



Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	Saltillo	División:	Agronomía	Departamento:	Botánica
Tema estratégico (ANA/PEP):	Ciencias agropecuarias y biotecnología				
Línea de investigación:	Control Biológico y Microbiano				
Título del proyecto:	Efecto de un virus transgénico con genes inmunodepresores de polidnavirus sobre el sistema inmune de <i>Spodoptera exigua</i> .				
Presupuesto solicitado (Máximo \$75,000)	50000	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	x
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	x	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	No	x	Fondos concurrentes:	miguel_cbg@hotmail.com
Cooperante(s):	Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional				
Entidad (es):	Coahuila	Municipio (s):	Saltillo		
Localidades:	Saltillo				
A realizar durante el(los) año(s):	2017-2019				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez	Botánica(3614)	4104		
Colaborador:	Dra. Rosalinda Mendoza Villareal	Horticultura			
Colaborador:	Dra Silvia Judith Martínez Amador	Botánica(3614)	3796		
Colaborador:	Dr. Mario Alberto Rodríguez Pérez	Centro de Biotecnología Genómica del IPN			
Colaborador:					
		Grado por obtener	Matrícula	Firma	
Tesista:	Tesista por designar	Licenciatura			
Programa Docente:	Ing. en Agrobiología				
Tesista:					
Programa Docente:					
Tesista:					
Programa Docente:					
	Vo. Bo. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"		Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Dra. Silvia Judith Martínez Amador Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

- Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

1.-Título del proyecto

Efecto de un virus transgénico con genes inmunodepresores de polidnavirus sobre el sistema inmune de *Spodoptera exigua*

2.- Introducción

Los polidnavirus son un grupo de virus asociado avispas parasitoides himenópteras que parasitan otros artrópodos para depositar dentro de ellos sus huevos junto con otros productos como polidnavirus, veneno y proteínas de los ovarios; estos productos permiten la sobrevivencia y el desarrollo de los huevos.

Los polidnavirus se fijan a las células del hospedero, penetran hacia el interior de las células, replican su ADN, sintetizan proteínas virus-específicas y liberan viriones progenie. Un caso concreto es la expresión del genoma del polidnavirus de *Cotesia rubecula* en los hemocitos parasitados, en el cual se expresa un producto génico de especial interés: la proteína CrV1 codificada por el polidnavirus de CrPDV, la cual es responsable de los cambios observados en los hemocitos principalmente la depolimerización del citoesqueleto de actina de los hemocitos del hospedero, lo cual conlleva a la inactivación de los mismos, lo cual trae consigo una interferencia en la respuesta inmune y por lo tanto en la incapacidad de neutralizar los huevos del parasitoide.

Previamente nuestro grupo de trabajo ha construido un baculovirus transgénico que expresa el CrV1 (AcMNPV-C6-CrV1) el cual demostró una concentración letal media (LC50) y un tiempo letal medio (LT50) menor comparado con el virus tipo silvestre (AcMNPV-C6) como bioinsecticida contra *S. exigua* (Wei *et al.*, 2016). En este proyecto se plantean determinar los efectos del virus recombinante sobre el sistema inmunológico de larvas de *S. exigua*.

Objetivos

Determinar los efectos que tiene la infección con un baculovirus transgenico que expresa el gen CrV1 sobre la capacidad de encapsulación, melanización y nodulación en *S. exigua*.

Hipótesis

La infección con un baculovirus transgénico que expresa CrV1 disminuye la capacidad de encapsulación, melanización y nodulación en *S. exigua*

3.-Revisión de Literatura

Los polidnavirus son un grupo de virus asociado avispas parasitoides himenópteras. Las avispas parasitoides buscan y parasitan otros artrópodos para depositar dentro de ellos sus huevos. Después de la parasitación, la

fisiología de los hospederos es alterada para sostener el desarrollo de los parásitos (Kroemer and Webb, 2004). El ciclo biológico de estas avispas parasitoides consta de los siguientes eventos: a) Avispas endoparasitoides ovipositan en los insectos hospederos e inyectan además otros productos como polidnavirus, veneno y proteínas de los ovarios; estos productos permiten la sobrevivencia y el desarrollo de los huevos, b) El parasitoide completa su desarrollo embrionario, incuba, sufre mudas larvales, emerge del hospedero, teje un capullo y pupa (Kroemer y Webb, 2004). El insecto hospedero muere durante o poco después de la emergencia de los parasitoides. El insecto adulto emerge del capullo, se aparea y busca nuevos insectos hospederos a los cuales parasitar para completar su ciclo de vida (Kroemer y Webb, 2004). Las avispas parasitoides se han vuelto especialistas en cuanto al insecto al cual parasitan, debido a que atacan a una sola especie o a especies muy relacionadas y en un estadio específico. El ADN de los polidnavirus está integrado en el genoma de la avispa y es transmitido cromosómicamente de una avispa a la generación siguiente (Fleming, 1992).

La inyección de CsPDV (polidnavirus de *C. sonorensis*) puede también causar la reducción de la población de plasmátocitos en *H. virescens*. Los resultados de todos los experimentos hasta la fecha sugieren que CsPDV no sólo juega una función importante en la protección del desarrollo de *C. sonorensis* contra las defensas celulares del hospedero (*H. virescens*), además, pueden tener un profundo efecto en el metabolismo y crecimiento de la larva parasitada (Theilmann and Summers, 1986). Las observaciones, por medio de microscopia electrónica, de CsPDV después de la oviposición en *H. virescens*, permiten detectar virus en el núcleo de los hemocitos, epitelio traqueal, músculo y cuerpo graso pero nunca se observa replicación de los virus en ninguno de esos tejidos (Stoltz and Vinson, 1979). En todos los casos, los polidnavirus no tienen efecto en las avispas parasitoides, pero son patogénicos a los lepidópteros hospederos (Whitfield and Asgari, 2003).

Los polidnavirus se fijan a las células del hospedero, penetran hacia el interior de las células, replican su ADN, sintetizan proteínas virus-específicas y liberan viriones progenie. Su ciclo de vida ocurre en dos diferentes hospederos: en las células de los ovarios de avispas parasitoides, donde sintetizan proteínas virus-específicas, liberan los viriones, y en las células de lepidópteros, donde la infección conduce la síntesis de proteínas involucradas en la interacción entre el hospedero y el parasitoide. Sin embargo, la mayoría de los virus no dirige la infección hacia la producción de progenie viral (Drezen *et al.*, 2003).

La transmisión del ADN circular de los polidnavirus sigue las reglas mendelianas de la herencia, lo cual sugiere una transmisión cromosómica (Stoltz, 1990). Las secuencias de genoma de polidnavirus son

escindidas del genoma de las avispas en las células del cáliz donde los virus se replican. Después de la escisión de las secuencias virales, las regiones flanqueantes en el cromosoma de las avispas son reintegradas.

La expresión del genoma del polidnavirus de *C. rubecula* en los hemocitos parasitados se lleva a cabo en una forma sumamente transitoria, esto está en contraste con otros sistemas conocidos de parasitoides, donde un número de familias multigenes virales son transcritas en las células y tejidos del hospedero y donde la mayoría de los transcritos persisten por una larga porción del desarrollo del parasitoide dentro de la larva hospedera (Theilmann and Summers, 1986).

Un producto génico de especial interés es la proteína CrV1 codificada por el polidnavirus de CrPDV, la cual es responsable de los cambios observados en los hemocitos debido a que seis horas después que *P. rapae* es parasitada por *C. rubecula*, comienzan a ser notorios cambios en la hemolinfa del lepidóptero, esta se vuelve menos viscosa y los hemocitos comienzan a cambiar en cuanto a su composición de superficie celular y en sus propiedades adhesivas (Asgari *et al.*, 1996). CrV1 es una glicoproteína de secreción que está implicada en la depolimerización del citoesqueleto de actina de los hemocitos del hospedero, lo cual conlleva a la inactivación de los hemocitos. En las orugas parasitadas, la proteína CrV1 es secretada en la hemolinfa por hemocitos infectados con polidnavirus y las células del cuerpo graso. Adicionalmente, el CrV1 recombinante muestra sus efectos en los hemocitos sólo en conjunción con la hemolinfa, pero no cuando es aplicado a los hemocitos libres de hemolinfa, lo cual implica modificaciones extracelulares a la proteína (Asgari *et al.*, 1997). Se ha demostrado que la proteína CrV1 es principalmente producida en los hemocitos del hospedero. En estas células las funciones inmunes tales como la fagocitosis y el esparcimiento celular son abolidos, por la desestabilización del citoesqueleto celular (Asgari and Schmidt, 2001).

En insectos, las respuestas de defensa celular se refieren a respuestas inmunes mediadas por hemocitos (Lavine and Strand, 2002). Los patógenos pequeños como bacterias y hongos son generalmente eliminados por las respuestas de defensa humoral o bien son fagocitados por los hemocitos, mientras amenazas más grandes tales como parasitoides o nematodos son encapsulados por los hemocitos (Schmidt *et al.*, 2001).

Previamente nuestro grupo de trabajo ha construido un baculovirus transgénico que expresa el CrV1 (AcMNPV-C6-CrV1) el cual demostró una concentración letal media (LC50) y un tiempo letal medio (LT50) menor comparado con el virus tipo silvestre (AcMNPV-C6) como bioinsecticida contra *S. exigua* (Wei *et al.*, 2016). En este proyecto se plantean determinar los efectos del virus recombinante sobre el sistema inmunológico de larvas de *S. exigua*.

4.- Procedimiento Experimental

Cria de *S. exigua*

Las muestras de *S. exigua* serán obtenidas del laboratorio de Biomedicina molecular de Centro de Biotecnología Genómica del IPN, serán alimentadas usando dieta sintética comercial específica para noctuidos (<http://www.insectrearing.com/index.html>), en vasos de plástico a una temperatura de 26°C en condiciones de 14h luz/10h oscuridad. Los adultos de *S. exigua* serán alimentados con una solución de 10% de miel en las mismas condiciones de temperatura y luz.

Amplificación viral

Muestras de virus transgénicos y tipo silvestres previamente obtenidas del laboratorio de Biomedicina Molecular del Centro de Biotecnología Genómica del IPN serán utilizadas para infectar larvas de *S. exigua* de segundo instar, de los cuerpos de las larvas muertas serán recuperados lo ODV de cada virus por medio de filtración como se ha documentado previamente (Van Beek and Davis, 2007), las partículas de polihedrina (cuerpos de oclusión) serán cuantificadas usando un hemocitometro (van Beek and Davis, 2007).

Bioensayos

Para realizar los bioensayos, se colocaran 5 ml de dieta recipientes de plástico de 30 mL. A la dieta se le agregaran las siguientes seis concentraciones de OB tanto de tipo silvestre y transgénico: 5882, 2.5×10^4 , 5.9×10^4 , 1.2×10^5 , 3.5×10^5 and 7.1×10^5 OBs/cm² en la superficie y se dejará secar por 20 minutos. De cada concentración viral se elaborarán 30 vasos y en cada vaso se colocará una larva de *S. exigua* de segundo instar, este experimento se realizara por triplicado. La mortalidad será calculada contando las larvas muertas cada día durante 10 días. Los parámetros de concentración letal media (LC50) y tiempo letal medio (Lt50) serán calculados usan el programa POLO-PC (Russell et al., 1977).

Ensayos de encapsulación

Larvas sanas de *S. exigua* de tercer instar serán esterilizadas superficialmente con una solución de etanol al 70%, serán alimentadas con dieta infectada con virus tipo silvestre y transgénico. Dos días después de iniciar la alimentación con los virus se les inyectaran 10 perlas Sephadex A-25 (previamente teñidas con una solución al 0.1% de rojo Congo) usando una micro jeringa estéril (Hamilton 7000 series microsyringe). Después de 24 y 28 horas de la inyección, las larvas serán disectadas y la encapsulación de las perlas

sephadex será examinada usando un estereoscopio y calificada con el siguiente criterio: 1=perlas encapsuladas con una capsula gruesa y clara; 2=perlas con células adherentes pero sin capsula clara; 3=perlas melanizadas; 4=perlas no encapsuladas sin células adherentes obvias (Mahmoud et al., 2011). Con los datos obtenidos se realizará un análisis de la varianza y si se encuentran diferencias entre tratamiento se realizara una prueba de rango múltiple de Duncan.

Ensayos de nodulación

La formación de nódulos de hemocitos de larvas alimentadas con el virus transgénico, el tipo silvestre y control negativo, será analizada esterilizando superficialmente larvas de tercer instar con alcohol al 70%, estas larvas serán inyectadas con 1×10^6 células de *Escherichia coli* previamente muertas por calentamiento. Las larvas inyectadas serán incubadas como es rutinario y 24 h después de la inyección serán diseccionadas para realizar los conteos de nódulos melanizados y oscuros en los intestinos, el cuerpo graos y en los tubos de Malpighi usando un estéreoscopio con aumento de 50x. Los datos resultantes serán analizados por diferencia mínima de cuadrados (LSD).

Cronograma de Actividades para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Ensayos de encapsulación	x	x	x	x								
Ensayos de nodulación					x	x	x					
Análisis de datos								x	x	x		
Escritura de publicaciones											x	x

Cronograma de distribución de presupuesto para el 2018.

Actividad por realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Ensayos de encapsulación	x	x	x	x								
Ensayos de nodulación					x	x	x					
Análisis de datos								x	x	x		
Escritura de publicaciones											x	x

Duración total del proyecto

Año de Inicio	2017	Año estimado de conclusión	2019
---------------	------	----------------------------	------

5.-Productos Esperados

1 publicación en revista nacional
1 tesis nivel licenciatura

6.-Literatura Citada

Asgari, S., Hellers, M., Schmidt, O., 1996. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. *Journal of General Virology* 77, 2653-2662.

- Asgari, S., Schmidt, O., 2001. Promoter studies of a polydnavirus gene from *Cotesia rubecula* (Hym: Braconidae). *Archives of virology* 146, 1979-1989.
- Drezen, J.-M., Provost, B., Espagne, E., Cattolico, L., Dupuy, C., Poirie, M., Periquet, G., Huguet, E., 2003. Polydnavirus genome: integrated vs. free virus. *Journal of Insect Physiology* 49, 407-417.
- Fleming, J.-A.G., 1992. Polydnaviruses: mutualists and pathogens. *Annual review of entomology* 37, 401-425.
- Kroemer, J.A., Webb, B.A., 2004. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. *Annual Reviews in Entomology* 49, 431-456.
- Lavine, M., Strand, M., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect biochemistry and molecular biology* 32, 1295-1309.
- Mahmoud, A., De Luna-Santillana, E., Rodriguez-Perez, M.A., 2011. Parasitism by the endoparasitoid, *Cotesia flavipes* induces cellular immunosuppression and enhances susceptibility of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of insect science* 11, 119.
- Russell, R.M., Robertson, J.L., Savin, N., 1977. POLO: a new computer program for probit analysis. *Bulletin of the Entomological Society of America* 23, 209-213.
- Schmidt, O., Theopold, U., Strand, M., 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays* 23, 344-351.
- Stoltz, D.B., 1990. Evidence for chromosomal transmission of polydnavirus DNA. *Journal of General Virology* 71, 1051-1056.
- Stoltz, D.B., Vinson, S.B., 1979. Viruses and parasitism in insects. *Advances in virus research* 24, 125-171.
- Theilmann, D.A., Summers, M.D., 1986. Molecular analysis of *Campoplex sonorensis* virus DNA in the lepidopteran host *Heliothis virescens*. *Journal of General Virology* 67, 1961-1969.
- van Beek, N., Davis, D.C., 2007. Baculovirus insecticide production in insect larvae. *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols*, 367-378.
- Wei, L., Pérez-Rodríguez, M.Á., Tamez-Guerra, P., De Luna-Santillana, E.d.J., Rosas-García, N.M., Villegas-Mendoza, J.M., Rodríguez-Pérez, M.A., 2016. Improved insecticidal activity of a genetically modified baculovirus expressing the immunosuppressive CrV1 protein from a polydnavirus against *Spodoptera exigua*. *Biocontrol Science and Technology* 26, 1-11.
- Whitfield, J.B., Asgari, S., 2003. Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. *Journal of Insect Physiology* 49, 397-405.

