

# IDENTIFICACIÓN DE UNA INFECCIÓN MIXTA POR BACULOVIRUS (GV Y NPV) EN *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Gloria Barrera<sup>1</sup>; Jorge Cerón<sup>1</sup>; Paola Cuartas<sup>2</sup>; Laura Villamizar<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CORPOICA – C.I. Tibaitatá. Mosquera – Cundinamarca, Colombia.

<sup>2</sup>Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, CORPOICA – C.I. Tibaitatá. Mosquera – Cundinamarca, Colombia.

## Introducción

*Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) conocido como gusano cogollero, es el principal insecto plaga en cultivos de maíz en América. Para su control se han utilizado aislamientos virales de la familia *Baculoviridae*, específicamente nucleopoliedrovirus (NPV). En diversas especies de insectos, se ha reportado un efecto potenciador entre granulovirus (GV) y NPV cuando coinfectan el mismo hospedero. En el presente trabajo, se identificó la presencia natural de infecciones mixtas (NPV y GV) en *S. frugiperda*, mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) y perfiles de restricción (REN) de ADN genómico. Para el análisis posterior de esta coinfección en el insecto, se diseñó una metodología basada en PCR en tiempo real (Q-PCR), para analizar de manera simultánea los dos géneros virales.

## Metodología y Resultados

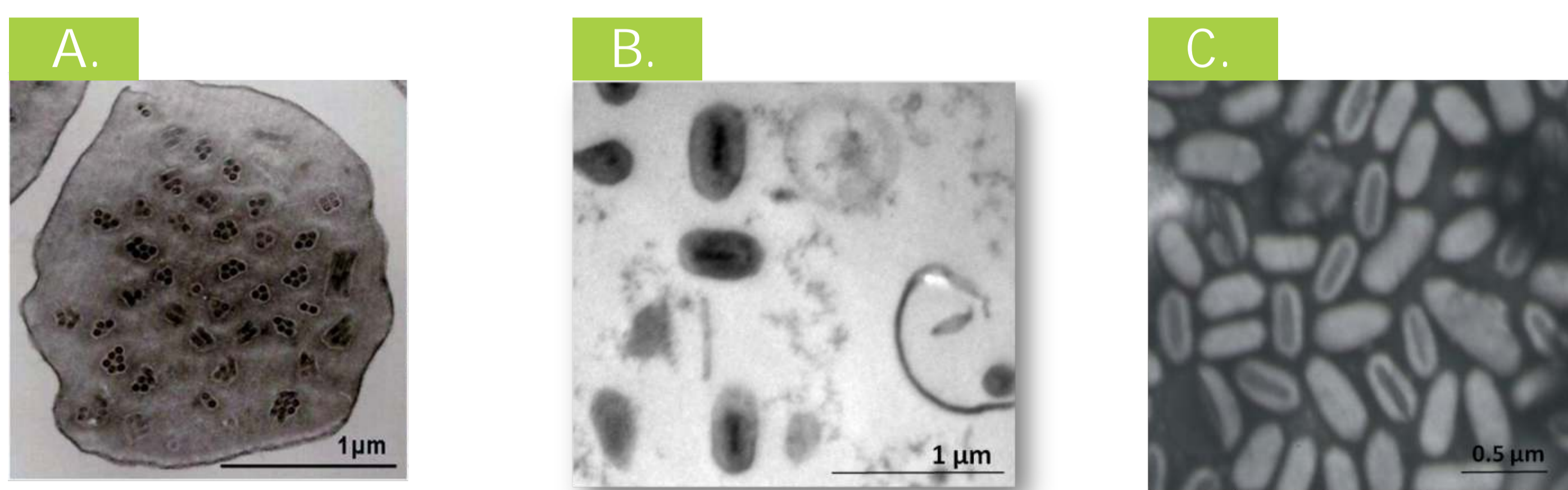


Figura 1. MET de partículas virales en infección mixta de *S. frugiperda* por Baculovirus.

Mediante cortes ultrafinos de 40 nm de grosor (Fig. 1A y B) y tinción negativa (Fig. 1C) se demostró la presencia de dos tipos morfológicos virales, causantes de infección en una larva de *S. frugiperda*. Se observaron cuerpos de inclusión (CI) con un diámetro promedio de 1,5 µm, con varios viriones de tipo múltiple correspondientes a NPV (Fig. 1A). Adicionalmente se observaron CI en forma de gránulo, de tamaño aproximado de 0,54 µm x 0,27 µm, con un único virión interno (Fig. 1B y C) los cuales corresponden con la morfología de GV (Slack y Arif, 2007).

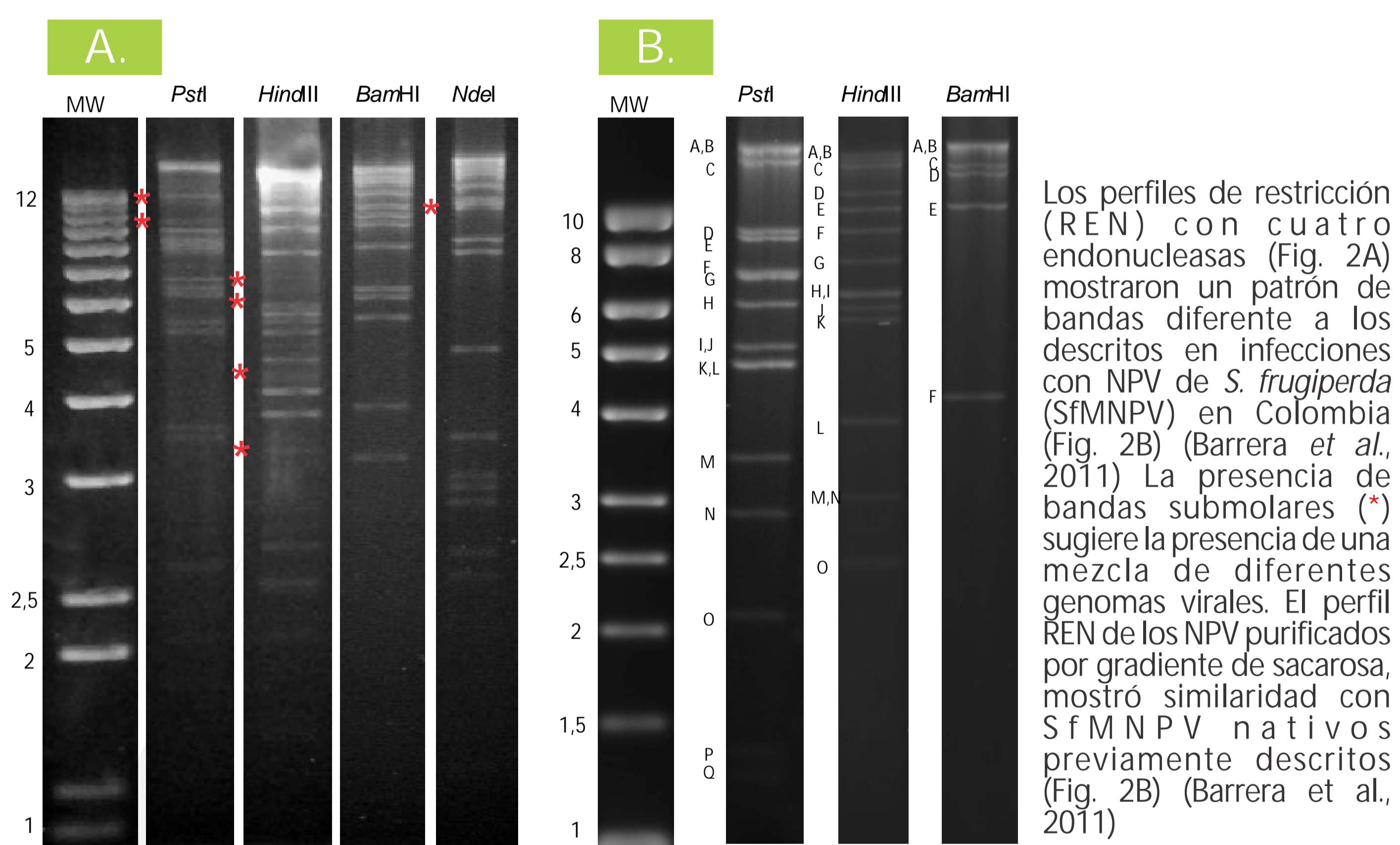


Figura 2. Perfiles REN de Baculovirus de *S. frugiperda*

Los perfiles de restricción (REN) con cuatro endonucleasas (Fig. 2A) mostraron un patrón de bandas diferente a los descritos en infecciones con NPV de *S. frugiperda* (SfMNPV) en Colombia (Fig. 2B) (Barrera et al., 2011). La presencia de bandas submolares (\*) sugiere la presencia de una mezcla de diferentes genomas virales. El perfil REN de los NPV purificados por gradiente de sacarosa, mostró similitud con SfMNPV nativos previamente descritos (Fig. 2B) (Barrera et al., 2011).

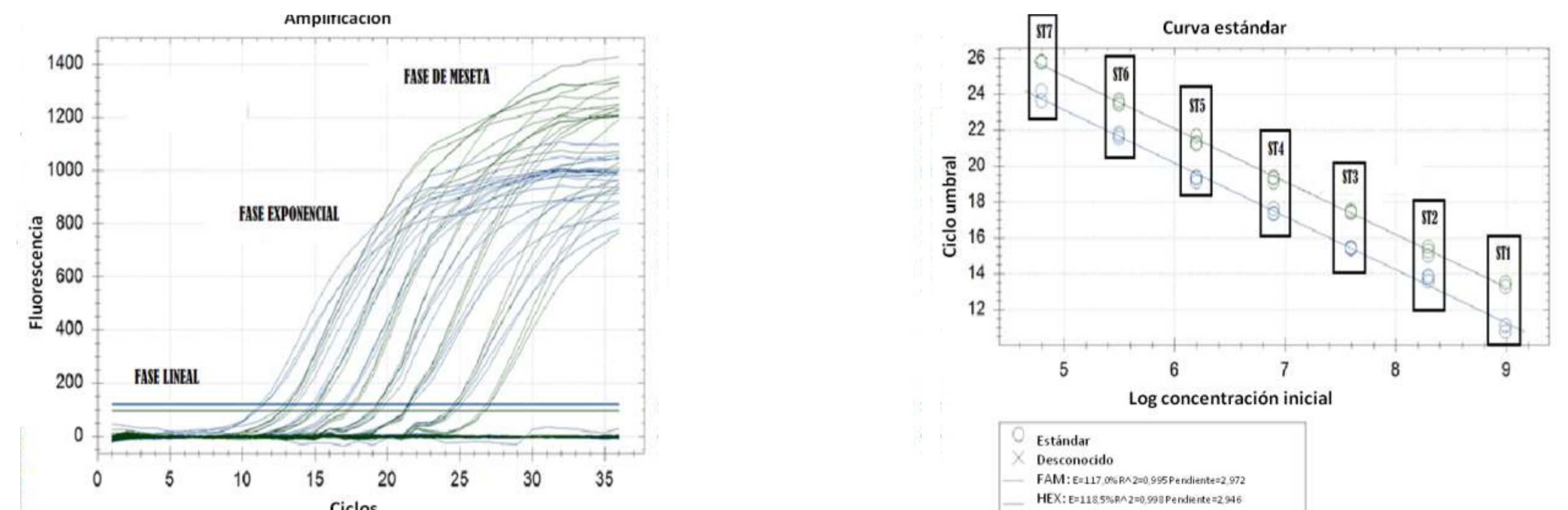


Figura 3. Curva patrón de Q-PCR múltiple para NPV y GV.

Los parámetros de la prueba relacionados con coeficiente de correlación, eficiencia y pendiente, fueron óptimos y se encuentran dentro de lo recomendado en la literatura (Scott, 2006) (Fig. 3).

Copias gen/µl	Sonda gran				Sonda polh			
	σ	σ	σ	σ	σ	σ	σ	σ
1,96E+09	0,30	0,27	0,52	0,24	0,18	0,25	0,10	0,49
3,92E+08	0,14	0,35	0,12	0,82	0,46	0,18	0,10	0,34
7,84E+07	0,15	0,10	0,05	0,83	0,24	0,06	0,19	0,23
1,57E+07	0,14	0,19	0,15	0,89	0,31	0,17	0,18	0,50
3,14E+06	0,07	0,26	0,05	0,43	0,45	0,19	0,14	0,56
6,27E+05	0,15	0,40	0,42	0,43	0,33	0,37	0,47	0,8

El límite mínimo de detección de la técnica fue de 0,00064 ng/ul de ADN, equivalente a  $1,25 \times 10^7$  copias del gen (*polh* y *gran*) correspondiente al patrón 7 (Fig. 3). La σ intracorridas de los ciclos umbrales (Ct) y la de las repeticiones en el tiempo, fueron bajos y nunca fueron superiores a 1 (Tabla 1), indicando alta reproducibilidad.

Tabla 1. Análisis de reproducibilidad

El análisis de la especificidad de las sondas por separado, demostró que no existe amplificación cruzada entre GV y NPV. Las dos sondas determinan la presencia de GV y NPV provenientes de diferentes aislamientos geográficos y de diferente especie de insectos (Tabla 2A). Los resultados de tres mezclas experimentales de ADN de SfMNPV y SFGV, permitieron descartar posibles interferencias entre las cuantificaciones virales de NPV y GV (Tabla 2B).

Muestra	Sonda polh		Sonda gran		σ
	Ct	σ	Ct	σ	
SfMNPV Nicaragua	24,68	N/A	N/A	0,06	
SfMNPV Montería	21,61	N/A	N/A	0,09	
SfMNPV Villavicencio	18,56	N/A	N/A	0,26	
SfGV	N/A	18,61	N/A	0,23	
Tecia solanivora GV	N/A	21,62	N/A	0,43	
Phthorimaea operculella GV	N/A	20,64	N/A	0,27	

Tabla 2. (A) Análisis de especificidad utilizando sondas *gran* y *polh* por separado. (B) Análisis de especificidad de la Q-PCR múltiple utilizando mezclas experimentales de NPV y GV.

Los estudios actuales de las interacciones entre los baculovirus se enfocan en la generación de nuevas estrategias en el diseño de productos biocontroladores, que contengan NPV y GV como principio activo. Dichas estrategias podrían favorecer la eficacia y la eficiencia de la infección.

## Conclusiones

Se demostró la presencia de una infección mixta de NPV y GV en larvas de *S. frugiperda*, en condiciones naturales, la cual podría ser debida a una interacción sinérgica entre los dos fenotipos virales.

La metodología de PCR cuantitativa para los genes *polh* y *gran* desarrollada en el presente trabajo es aplicable en diferentes etapas del desarrollo de un bioplaguicida desde la búsqueda de aislamientos en campo hasta el control de calidad de un producto formulado. Además, es una herramienta importante para el estudio del comportamiento de las infecciones mixtas.

## Referencias

- Barrera, G., Simón, O., Villamizar, L., Williams, T., Caballero, P., 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control* 58, 113-120.
- Scott, P. 2006. Data analysis and reporting. En: *Real-Time PCR*. Editor Tevfik, D. Ed. Taylor & Francis. p. 332.
- Slack, J., Arif, B.M., 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. *Advances in Virus Research* 69, 99-165.

## Agradecimientos

A Colciencias por su apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

## Q-PCR MÚLTIPLE

Se diseñó un sistema de sonda Taqman para la identificación y cuantificación simultánea de NPV y GV en infecciones mixtas, mediante Q-PCR.



Para la elaboración de una curva patrón de cuantificación se clonaron por separado los genes *gran* y *polh*, de GV y NPV respectivamente.

