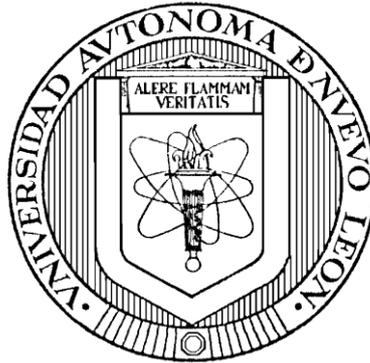


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



SUSCEPTIBILIDAD DE *Trichoplusia ni* HÜBNER (LEPIDÓPTERA: NOCTUIDAE) AL VIRUS ENTOMOPATÓGENO AcMNPV, POR BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *gloverina*, MEDIANTE ARNi.

POR

BIOL. GERARDO JAIR FLORES HERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

AGOSTO 2019

**SUSCEPTIBILIDAD DE *Trichoplusia ni* HÜBNER (LEPIDÓPTERA:
NOCTUIDAE) AL VIRUS ENTOMOPATÓGENO AcMNPV,
POR BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *gloverina*,
MEDIANTE ARNi**

Comité de Tesis



Dr. José Alberto Valadez Lira
Presidente



Dra. Itza Eloisa Luna Cruz
Secretario



Dr. Juan Manuel Alcocer González
Vocal



Dr. Alonso Alberto Orozco Flores
Vocal



Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

**SUSCEPTIBILIDAD DE *Trichoplusia ni* HÜBNER (LEPIDÓPTERA:
NOCTUIDAE) AL VIRUS ENTOMOPATÓGENO AcMNPV,
POR BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *gloverina*,
MEDIANTE ARNi**

Dirección de Tesis



Dr. José Alberto Valadez Lira
Presidente

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL, a la Unidad de Formulación de Biológicos y Departamento de Botánica de la misma institución, por brindar la infraestructura, material de trabajo y apoyo financiero, para la realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindar el apoyo financiero para realizar los estudios de posgrado, teniendo número de registro de becario 815846.

Al Dr. Alberto Valadez Lira, Dra. Patricia Tamez Guerra, Dr. Alonso Alberto Orozco Flores, Dra. Itza Luna Cruz y al Dr. Juan Manuel Adame, por el asesoramiento y revisión de este trabajo.

DEDICATORIA

El presente escrito va en dedicación a mi Madre, quien ha estado conmigo en las situaciones buenas, pero sobre todo en las malas.

Para ella gracias totales

ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Importancia económica de <i>T. ni</i> y medidas de control biológico.....	3
2.2 Clasificación de los Baculovirus	4
2.3 Estructura de los baculovirus	5
2.4 Cuerpos de oclusión	6
2.5 Estructura de los viriones ocluidos.....	7
2.6 Estructura de los viriones brotantes.....	8
2.7 Estructura de la Nucleocápside	9
2.8 Ciclo de infección.....	10
2.9 Infección primaria	12
2.10 Infección secundaria.....	13
2.11 Uso de Baculovirus como agentes de control biológico de insectos.....	13
2.12 Inmunidad innata en insectos	15
2.13 El papel de la actividad fenoloxidasa en la respuesta inmune de los insectos.	16
2.14 Péptidos antimicrobianos en lepidópteros	18
2.15 ARN de interferencia.....	21
2.16 ARN de interferencia para el control biológico de insectos.....	22
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. OBJETIVO.....	28
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29

6.1	Material biológico	29
6.1.1	Lepidóptero	29
6.1.2	Baculovirus	29
6.2	Evaluación de la respuesta inmune basal de <i>T. ni</i>	30
6.2.1	Análisis de la actividad de fenoloxidasa	30
6.2.2	Detección-obtención del inserto del gen <i>gloverina</i> y expresión relativa del péptido antimicrobiano, post- bloqueo mediante ARNi.	30
6.2.2.1	Detección del transcrito del gen <i>gloverina</i>	30
6.2.2.2	Extracción de ARN.	31
6.2.2.3	Síntesis de ADNc	31
6.2.2.4	Evaluación de la eficiencia de los oligonucleótidos y RT-PCR en Tiempo Real	32
6.3	Producción y Purificación de ARN de interferencia	33
6.3.1	Administración del ARN de Interferencia	34
6.4	Análisis del efecto de la interferencia de la expresión de <i>gloverina</i> en la respuesta inmune y expresión relativa.....	34
6.4.1	Cuantificación relativa de la expresión de <i>gloverina</i>	35
6.5	Efecto en la susceptibilidad de <i>T. ni</i> tras el bloqueo del gen <i>gloverina</i>	36
6.6.-	Análisis estadístico	36
7.	RESULTADOS	37
7.1	Análisis de la actividad de fenoloxidasa	37
7.1.1	Estandarización de evaluación de la respuesta inmune de <i>T. ni</i>	37
7.2	Detección del Transcrito de <i>gloverina</i> por RT-PCR	37
7.3	Producción de ARNdc del gen de <i>gloverina</i>	38
7.4	Eficiencia de los oligonucleótidos y RT-PCR en tiempo real	39
7.5	Efecto en la actividad fenoloxidasa, tras el bloqueo de la expresión de <i>gloverina</i> y exposición al AcMNPV	40
7.6	Análisis transcripcional de <i>Trichoplusia ni</i> tras el bloqueo de la expresión de <i>gloverina</i> y exposición al AcMNPV	42
7.7	Cambios etológicos y efectos morfológicos de <i>T. ni</i> como resultado de la modulación de la respuesta inmune e infección con el AcMNPV.	44
7.8	Análisis de la susceptibilidad de <i>T. ni</i> al AcMNPV tras inhibir el transcrito de <i>gloverina</i>	44
8.	DISCUSIÓN	48
9.	CONCLUSIONES	52
10.	PERSPECTIVAS	53
11.	BIBLIOGRAFÍA	54

12. RESUMEN BIOGRÁFICO 65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Actividad de los principales péptidos antimicrobianos de especies de insectos de importancia agrícola. -----	19
2. Genes inhibidos por ARNi en Lepidópteros de importancia agrícola. -----	23
3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR punto final. -----	31
4. Protocolo de reacción qPCR -----	32
5. Secuencias de Oligonucleótidos marcados con SYBRGreen, utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR en tiempo real. -----	33
6. Significancia en la actividad fenoloxidasa entre los tratamientos tras la exposición durante 24 h. -----	41
7. Significancia en la actividad fenoloxidasa entre los tratamientos tras la exposición durante 72 h. -----	42
8. Efecto de los tratamientos en la mortalidad y sobrevivencia de larvas neonatas de <i>T. ni</i> en un periodo de 24 a 168 h. -----	46
9. Efecto en la mortalidad por parte de los tratamientos, en un lapso de 168 h. -----	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Comparación entre las estructuras de los fenotipos virales NPV y microscopía electrónica del AcMNPV. -----	6
2. Componentes proteicos de un virión ocluido. -----	8
3. Esquema base de la morfología de los OBs de los Nucleopoliedrovirus. -----	10
4. Ciclo de infección por baculovirus en larvas de lepidópteros. -----	11
5. Representación esquemática de la activación de la enzima Fenoloxidasa . -----	17
6. Mecanismo de acción del péptido antimicrobiano gloverina ante la infección por AcMNPV. -----	21
7. Mecanismo del ARNi en el bloqueo de transcritos. -----	22
8. Plásmidos utilizados. -----	29
9. Administración de ARNi mediante gota en combinación con un colorante alimentario. -----	35
10. Actividad Fenoloxidasa del tercer estadio larvario de <i>T.ni</i> -----	37
11. Detección por RT-PCR punto final del transcrito que codifica para el péptido antimicrobiano gloverina.-----	38
12. Transformación bacteriana de la cepa de <i>Escherichia coli</i> HT115.-----	38
13. Producción y purificación del ARNdc.-----	39
14. Eficiencia de los primers de PCR en tiempo real para el gen endógeno β -actina. -----	40
15. Eficiencia de los primers de PCR en tiempo real para el gen <i>gloverina</i> . -----	40
16. Niveles de fenoloxidasa en larvas de tercer estadio expuestas a los tratamientos durante 24 h. -----	41
17. Niveles de fenoloxidasa en larvas de tercer estadio expuestas a los tratamientos durante 72 h. -----	42
18. Análisis transcripcional del gen de <i>gloverina</i> por RT-PCR en tiempo real (SYBR Green), después de exponerlos por 24 h. -----	43
19. Expresión relativa del gen de <i>gloverina</i> por qPCR (SYBR Green), con exposición de 72 h. -----	43
20. Etología y sintomatología de larvas de <i>T. ni</i> de tercer estadio. -----	44
21. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de <i>Trichoplusia ni</i> al ser expuestas a los tratamientos. -----	45
22. Etología y morfología en la mortalidad de <i>T.ni</i> al ser expuesta al AcMNPV mediando la respuesta inmune con ARNi. -----	47
23. Morfología y desarrollo de <i>T.ni</i> . -----	47

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

- ADNc** ácido desoxirribonucleico complementario
- AcMNPV** nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica*
- ARN** ácido ribonucleico
- BmNPV** nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori*
- Bt** *Bacillus thuringiensis*
- Bta** *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
- Bti** *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*
- Btk** *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*
- BV** viriones brotados (*budded virus*)
- CO** cuerpos de oclusión
- CpGV** Granulovirus de *Cydia pomonella*
- Ct** ciclo umbral (*cycle threshold*)
- CuniNPV** nucleopoliedrovirus de *Culex nigripalpus*
- DICER** enzima de silenciamiento por ARN de interferencia
- DEPC** dietil pirocarbonato
- DNTP's** desoxinucleotidotrifosfato
- DL₂₅** dosis letal 25
- ARNdc** ARN de doble cadena
- FO** fenoloxidasa
- G+** bacterias gram positivas
- G-** bacterias gram negativas
- GP64** Proteína de fusión a membrana en la cubierta de los baculovirus
- h** hora (s)
- IPTG** isopropil tiogalactopiranosido
- kDa** kilodalton

L-DOPA L-dihidroxifenilalanina

μL microlitros

μM micromolar

min minutos

MIP manejo integrado de plagas

mL mililitros

mM milimoles

MMLV virus de la leucemia murina Moloney

MNPV nucleopoliedrovirus múltiple

MP matriz peritrófica

NC nucleocápside

NeleNPV Nucleopoliedrovirus de *Neodiprion lecontei*

ng nanogramos

nM nanomoles

NPVs nucleopoliedrovirus

ODV virus derivados ocluidos

ORF marco abierto de lectura (open reading frame)

P10 proteína quinasa codificada por el baculovirus

P74 proteína de fusión presente en la envoltura de ODV's

PafINPV nucleopoliedrovirus de *Panolis flammea*

PAMs péptidos antimicrobianos

PBS amortiguador de sales de fosfatos

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PE proteína de envoltura en los cuerpos de oclusión

PGRP proteína de reconocimiento de peptidoglucanos

PIF proteína de fusión presente en la envoltura de ODV's

pH potencial de hidrógeno

PFO profenoloxidasa

QAU-Ms-E-10 (Ms-10) línea embrionaria de *Mythimna separata*

RISC complejo de silenciamiento por ARN de interferencia

ARNi ARN de interferencia

rpm revoluciones por minuto

RT transcriptasa reversa

seg segundos

SeMNPV nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*

SNPV nucleopoliedrovirus únicos

SpliDef defensina de *Spodoptera littoralis*

TnNPV nucleopoliedrovirus múltiple de *Trichoplusia ni*

VLF-1 proteína *very late* factor-1

WSSV virus del síndrome de la mancha blanca del camarón

2XYT medio 2X extracto de levadura-triptona

RESUMEN

El insecto plaga *Trichoplusia ni* Hübner, 1800-1803 (Lepidoptera: Noctuidae) en su estado larvario, puede ocasionar reducciones considerables en el rendimiento agrícola a causa de los daños que produce al alimentarse del follaje de cultivos de hortalizas y cucurbitáceas. El empleo de agentes de control biológico como los baculovirus, ha resultado ser una herramienta efectiva por su capacidad de autodiseminación entre lepidópteros blanco en estadio larvario. Para aumentar la efectividad de los baculovirus, se tiene como alternativa el ARN de interferencia (ARNi) que es una tecnología potenciadora en el control de plagas, a través del silenciamiento selectivo de genes. El silenciamiento de genes relacionados a la respuesta inmune de un insecto a un agente de biocontrol, podría mejorar la efectividad del mismo. En este estudio se evaluó el efecto del bloqueo de la expresión del péptido antiviral gloverina en la susceptibilidad y la respuesta inmune de *T. ni*. El silenciamiento mediante ARNi de *gloverina* tras 72 h disminuyó un 72% la expresión, y un 6% la actividad fenoloxidasa (FO), ambas relacionadas a la respuesta inmunológica. Por otra parte, larvas neonatas sometidas a tratamientos con dieta artificial, mostraron que el ARNi, en conjunto con el nucleopolihedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), aceleró la mortalidad en un menor intervalo de tiempo con un 17.7% en las primeras 72 h, en contraste con el AcMNPV sin interferente, que fue de un 4.4%. Los resultados permiten concluir que el empleo de ARNi incrementa la velocidad de infección de *T. ni* por AcMNPV y por ende disminuye el daño ocasionado al cultivo, lo cual redundaría en mayor rendimiento a nivel de campo.

ABSTRACT

The insect pest *Trichoplusia ni* Hübner, 1800-1803 (Lepidoptera: Noctuidae) can cause considerable reductions in agricultural yield in its larval stage, because of the damage produced by feeding on the vegetables and cucurbits foliage. The use of biological control agents such as baculovirus, has proved to be an effective tool for its autodissemination capability on target lepidoptera in the larval stage. To increase the baculoviruses effectiveness, RNA interference (RNAi) can be an enhancing technology in the pest control of agricultural importance, through the selective silencing of genes. The silencing of genes related to the immune response of an insect to a biocontrol agent could improve its effectiveness. In this study we evaluated the effect of blocking the expression of the antiviral peptide *gloverin* on the susceptibility and immune response of *T. ni*. The *gloverin* silencing by RNAi means reduced 72% its expression in 72 h, and 6% of the Phenol Oxidase (PO) activity, both related to the immune response. Neonatal larvae evaluated on artificial diet to this treatment, showed that RNAi, in conjunction with *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), accelerated mortality in a shorter time interval with 17.7% in the first 72 h, in contrast to the AcMNPV without interference, which was 4.4%. Overall, results allow us to conclude that the use of RNAi increases the speed of *T. ni* infection by AcMNPV and therefore decreases the damage caused to the crop, which would result in greater yield at the field level.

1. INTRODUCCIÓN

Las plagas de los cultivos son una de las principales causas de pérdidas de cosechas y por ende de pérdidas económicas en la agricultura mundial. El problema se agrava en países en vías de desarrollo, como la mayor parte de los países latinoamericanos, incluyendo a México.

En México se siembran alrededor de cincuenta mil hectáreas de crucíferas, de las cuales el 72.42% son de brócoli, 12.45% de col y el 7.0% de coliflor; las larvas del lepidóptero *Trichoplusia ni*, conocidas comúnmente con el nombre de gusano falso medidor, son plagas que se alimentan del follaje de crucíferas y afectan el rendimiento y calidad del producto comercial, generando pérdidas anuales del 20 al 100% (Tovar *et al.*, 2007).

Las estrategias para el control de plagas consisten en su mayoría, en la aplicación de productos químicos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos ha ocasionado problemas de contaminación ambiental, daños en la salud de los seres vivos presentes en el ambiente, aunado a la generación de organismos altamente resistentes. Por lo anterior se requieren nuevas estrategias para el control de plagas. La utilización de microorganismos en el control biológico es una alternativa que resulta ser más amigable con el ambiente y el cuidado de la integridad en la salud de los organismos que componen el ecosistema.

Los baculovirus son entomopatógenos presentes en la naturaleza, con alta especificidad de hospedador, pero algunos, como el nucleopoliedrovirus (NPV) múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV), pueden infectar una amplia gama de lepidópteros (Chen *et al.*, 2018).

El ciclo de los baculovirus en lepidópteros se presenta en el estado larvario, inicia cuando los cuerpos de oclusión (CO) son ingeridos, estas estructuras proteicas contienen partículas virales. Las proteasas y el pH alcalino del intestino liberan las partículas virales, estas pasan a través de la membrana peritrófica del intestino, los viriones se fusionan con la membrana plasmática de las células cilíndricas, después el ADN contenido en la cápside se dirige hacia el núcleo para replicarse. La infección se esparce hacia otros tejidos, generando la muerte del insecto y liberación de los CO en el ambiente (Cory y Myers, 2003; Clem y Passarelli, 2013).

El uso de los microorganismos entomopatógenos ve su eficiencia y viabilidad afectada, debido a que los insectos han desarrollado sensibilidad en la inmunidad humoral y celular, siendo mecanismos de protección contra patógenos ambientales incluyendo virus, hongos, bacterias y otros parásitos (Vallet *et al.*, 2008). Los signos distintivos de la inmunidad innata de insectos son la síntesis de potentes péptidos antimicrobianos por el cuerpo graso, fagocitosis, melanización y coagulación por hemocitos (Cao *et al.*, 2009).

Entre los péptidos antimicrobianos presentes en larvas de lepidópteros, se encuentra la gloverina, misma que ha sido reportada en larvas de *T. ni* (Wang *et al.*, 2010). Se caracteriza por ser una pequeña proteína antibacteriana catiónica, cuya expresión se induce en los hemocitos y en las células del cuerpo graso de larvas de lepidópteros expuestas a bacterias. El trabajo realizado por Moreno *et al.* (2012), demostró el papel que funge este péptido contra el AcMNPV, esclareciendo que es una proteína que afecta la unión del virus con las células del hospedero, a causa de la disrupción de la envoltura viral.

Actualmente las herramientas biotecnológicas, han servido como un complemento para las estrategias de control biológico por medio de agentes infecciosos en contra de plagas de importancia agrícola. Entre las estrategias moleculares, el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi), ha tenido gran relevancia, debido a que ejerce un papel regulador en la expresión génica tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional, ya que este ARN de doble cadena se une a un transcrito desencadenando la acción de las enzimas DICER O RISC, dando como resultado la inhibición de la proteína de interés (Nandety *et al.*, 2015).

Por lo mencionado en líneas previas, el presente proyecto permitirá comprobar que la modulación del gen *gloverina* en la inmunidad innata, por medio del bloqueo transcripcional por ARN de interferencia, servirá como estrategia de disminución de los mecanismos de respuesta inmune presentes en el proceso de defensa contra la infección por el AcMNPV, incrementando la susceptibilidad y mortalidad de *T. ni*.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia económica de *T. ni* y medidas de control biológico.

Trichoplusia ni es una especie de insecto que pertenece al orden Lepidoptera, familia Noctuidae, conocido como gusano falso medidor, su importancia económica radica en ser una plaga que se distribuye desde Canadá hasta México, afectando cultivos de hortalizas y cucurbitáceas, principalmente de la col, *T. ni* es un fitófago cuya etología en los primeros tres estadíos es encontrarse en el envés de las hojas, dejando el haz intacto; el cuarto y quinto estadío defolia las hojas, generando grandes agujeros (Valadez-Lira, 2011). Esta plaga consume hasta tres veces su masa corporal diariamente, por un periodo de tiempo de dos a tres días y su ciclo comprende de huevo a larva (cinco estadíos), pupa y adulto; su duración es de entre 30-35 días (Moir y Szito, 2008).

En México para su manejo integrado se utiliza el control a base de insecticidas químicos de los cuales se emplean; azaridactina, endosulfan, fenvalerato, metamidofos, metomilo, naled y permetrina (SAGAR 2000), además de hacer uso de los de tipo biológicos, de estos últimos destacan: Baculovirus, *Bacillus thuringiensis* y depredadores naturales como lo es *Telenomus* sp. (Hymenoptera: Scelionidae) (Ibarra *et al.*, 2006).

El control biológico es definido como la aplicación de técnicas compatibles con la conservación del medio ambiente mediante el uso de los enemigos naturales de las plagas que, actuando de un modo natural, controlan el nivel poblacional de las especies plaga sin ocasionar problemas de contaminación ni de residuos (Guardián y Sibaja, 2003).

Los inicios del control biológico se remontan a China 200 años A. C., los agricultores utilizaban cañas de bambú para comunicar los árboles y permitir que las hormigas circularan de un árbol a otro comiendo insectos plagas. En épocas más modernas, a fines del siglo XIX, en Norteamérica, se introdujo accidentalmente una plaga de los cítricos (*Icerya purchasi* Maskell), la cual fue controlada con la introducción desde Australia de la catarinita *Rodolia cardinalis* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) (Gerdin, 2005).

Entre los grupos de microorganismos entomopatógenos utilizados en México, para el control de plagas de lepidópteros, se encuentran los mencionados por Andaló, *et al.*, 2010: Virus, como el NPV de *Trichoplusia ni* (TnNPV) y el NPV múltiple (MNPV) de *Autographa californica* (AcMNPV), entre las especies de hongos utilizados *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y bacterias destacando la especie *B. thuringiensis var. kursaki* (Btk), *var. aizawai* (Bta) y *var. israelensis* (Bti).

El uso de los microorganismos entomopatógenos como herramienta de control biológico es variado y diverso. Entre ellos se encuentran un amplio grupo de virus, bacterias, nematodos y hongos entre otros. Cada uno de estos subgrupos se compone de un número de organismos que varían en su manera de infectar, el sitio en que se replican, y el mecanismo patogénico. Mientras que algunos patógenos presentan rangos de hospederos muy amplios, la mayoría prefieren ciertas especies de insectos (Nava *et al.*, 2012).

Los baculovirus son patógenos de insectos, su principal característica es su alta especificidad a hacia ciertas especies de hospederos, sin embargo, el AcMNPV se caracteriza por tener un amplio rango de hospederos, estos virus han sido considerados candidatos importantes para el control de lepidópteros, siendo en 1930 el primer caso en que fueron utilizados como reguladores de poblaciones de insectos en Europa y Norte América (Ojeda *et al.*, 2002).

2.2 Clasificación de los Baculovirus

Teniendo en cuenta el conocimiento de las secuencias genómicas baculovirales y sus relaciones filogenéticas, Jehle *et al.* (2006) han sugerido la división de esta familia en cuatro géneros:

El género *Alphabaculovirus* incluye a todos los NPVs específicos de lepidópteros. Los miembros de este género producen tanto viriones brotantes (BV del inglés *Budded Virus*) como viriones ocluidos (ODV del inglés *occlusion-derived virus*), los cuales pueden presentar solo una nucleocápside (SNPV) o varias nucleocápsides (MNPV) por virión. Un ejemplo de esto es el AcMNPV (Rohrman, 2008).

Por otra parte, entre los NPVs de lepidópteros se distinguen dos grupos. Los NPV que poseen la proteína GP64 pertenecen al grupo I, y al grupo II si carecen de un homólogo de GP64. En ese caso, la fusión de la membrana dependiente de bajo

pH durante la entrada viral ocurre mediada por la proteína F. Mientras que la proteína GP64 es exclusiva del grupo I de NPV, existen homólogos de la proteína F de envoltura, no sólo en los virus de insectos, sino también en algunos virus de vertebrados (Possee *et al.*, 2010).

El género *Betabaculovirus* comprende los granulovirus específicos para la infección solo de lepidópteros. En su ciclo replicativo producen tanto viriones brotantes como ocluidos. Como especie ejemplo de esto se propuso al granulovirus *Cydia pomonella* (CpGV) (Jehle *et al.*, 2006).

El género *Gammabaculovirus* incluye a los NPV aislados de himenópteros. El fenotipo de virus brotante (VB) puede estar ausente. Un ejemplo de esto es el NPV hallado en *Neodiprion lecontei* (NeleNPV) (Jehle *et al.*, 2006).

Por último, se encuentra el género *Deltabaculovirus* que incluye al NPV de *Culex nigripalpus* (CuniNPV) y otros baculovirus específicos de dípteros. La proteína constituyente del CO no es homóloga ni a la poliedrina ni a la granulina (Martínez *et al.*, 2012).

2.3 Estructura de los baculovirus

El genoma viral se encuentra empaquetado en nucleocápsides contenidas en viriones con forma de bastón, que miden aproximadamente 200 nm de largo por 30 nm de diámetro. Durante el ciclo de replicación viral, pueden presentar dos fenotipos virales con roles diferentes, los virus ocluidos (ODV) y virus brotantes (BV). Los ODV son embebidos por una matriz semi-cristalina (constituida principalmente por poliedrina o granulina) y son responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad entre los individuos susceptibles de una población, así como de iniciar la infección primaria en las células epiteliales del mesenterón. Los BV son los responsables de la transmisión de la infección de una célula a la otra y de un tejido a otro dentro del insecto (Williams *et al.*, 2017).

La principal diferencia entre BV y ODV es el origen de sus envolturas. Las proteínas de las envolturas de los BVs derivan de la membrana plasmática de la célula huésped que ha sido modificado por las proteínas virales. En contraste, ODV obtienen su dotación de proteínas en el núcleo y pueden derivar de las membranas nucleares que se modifican con una serie de proteínas virales. Como consecuencia,

las envolturas de los BV pueden limitarse a una o dos proteínas, mientras que la envoltura viral de los ODV es más compleja (Figura 1) (Rohrmann, 2008).

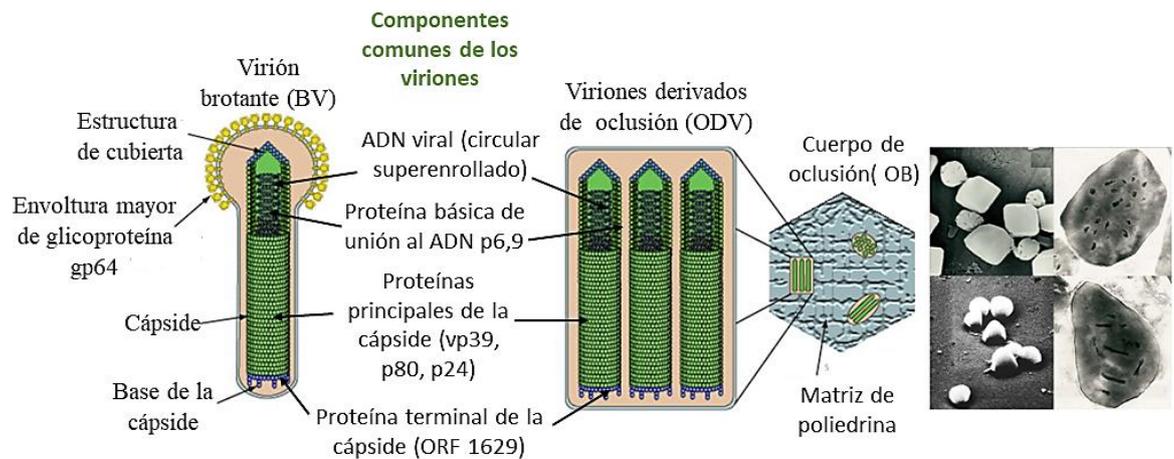


Figura 1. Comparación entre las estructuras de los fenotipos virales NPV y microscopía electrónica del AcMNPV (<https://viralzone.expasy.org/13>, accesado el 13 de Sept. 2018).

2.4 Cuerpos de oclusión

Los cuerpos de oclusión (CO) son estructuras cristalinas constituidas principalmente por poliedrina o granulina (según el género baculoviral), dentro de estas estructuras se encuentran “paquetes” de ODV los cuales pueden coexistir en grupos. Los CO’s que son los que contiene los ODV son los responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad entre individuos susceptibles. Además, los CO resultan ser una forma de resistencia del virus, ya que constituyen una protección mecánica de los viriones a las agresiones ambientales, que les permite sobrevivir fuera de una célula hospedadora por períodos largos hasta ser ingeridos por un insecto susceptible (Rios-Velasco *et al.*, 2012).

Estas proteínas poliedrina y granulina son los componentes estructurales más importantes del CO y ambas contienen aproximadamente 250 aminoácidos (30 kDa).

Los CO poseen una envoltura, constituida por una estructura densa de electrones que forma una superficie lisa. La función de esta envoltura se relaciona con sellar la superficie de los poliedros y aumentar su estabilidad, la evidencia sugiere que pueden sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal de las aves, facilitando su dispersión (Rohrmann, 2008). Inicialmente se identificó que la envoltura estaba constituida por carbohidratos, pero luego encontraron que una

proteína fosforilada, identificada como PE (Ac131) también forma parte de la envoltura. Los homólogos de esta proteína se encuentran en los genomas de todos los lepidópteros de NPV. Entre los factores asociados a los COs se puede citar además la proteína Ac68, que parece estar involucrada con la morfogénesis del poliedro. La proteína P10 (Ac137) es requerida para la correcta formación de los poliedros (Salvador, 2010).

2.5 Estructura de los viriones ocluidos

Los viriones ocluidos dentro de la matriz proteica del CO poseen una envoltura constituida por diversas proteínas designadas como ODV-E. Un ejemplo es la ODV-E66 en AcMNPV (Ac46) (Figura 2) codifica una enzima que es capaz de digerir el ácido hialurónico, que es un polisacárido importante de la matriz extracelular. Homólogos a esta proteína se encuentran en casi todos los baculovirus, excepto los aislados de himenópteros y dípteros (Van Oers y Vlak, 2007). De otro lado al suprimir proteínas como la ODV-E 25, (Ac94) (Figura 2) se genera una reducción en la población de VB, a de más se sugiere que puede jugar un papel en el cambio de VB a ODV. La proteína ODV-E C43 resulta esencial en la nucleocápside y la formación de poliedro y su ausencia inhibe la formación de estos (Figura 2).

Otro grupo de proteínas encontradas en la envoltura que rodea a los ODV se asocia a la infección de los insectos por vía oral, por lo cual fueron designadas con el nombre de *per os infectivity factors* (PIF). Se identificaron cuatro genes *pif* en AcMNPV denominados *p74-pif* (Ac138), *Ac 22 (pif-2)*, *Ac115 (pif-3)*, y *Ac119 (pif-1)*. Homólogos de estos cuatro genes están presentes en los genomas de todos los baculovirus. Las proteínas PIF1, PIF2, y p74 (Figura 2) actúan mediando de forma específica la unión de los ODV a las células del intestino medio, sugiriéndose que están directamente involucradas en la interacción virus-célula en las etapas iniciales de la infección (Ohkawa *et al.*, 2005).

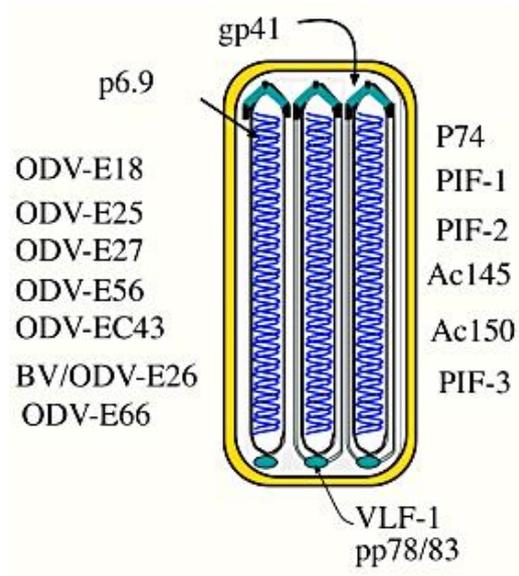


Figura 2. Componentes proteicos de un virión ocluido. ODV-E: Proteínas de envoltura ODV. Factores de infección per os PIF/P74/Ac145/Ac150 (Tomado de Rohrmann, 2008).

2.6 Estructura de los viriones brotantes

El segundo fenotipo viral hallado en el ciclo infeccioso de los NPVs corresponde a los viriones brotantes (BV). Como se mencionó anteriormente, si bien ambos BV y ODVs llevan la misma información genética, existen varias diferencias entre ellos en función y estructura (Peng *et al.*, 2010).

Este tipo de virión tiene una envoltura distinta de ODV que facilita la infección sistémica. Los BV difieren en su eficiencia para infectar los diferentes tejidos; mientras que los ODV infectan el intestino medio y las células epiteliales hasta 10.000 veces más eficiente de BV, mientras que BV son hasta 1.000 veces más eficiente en la infección de células en cultivo de tejidos (Rohrmann, 2013).

Estructuralmente los BVs poseen en su envoltura una proteína con actividad fusogénica bien caracterizada denominada GP64 (Ac128). Debido a su importancia en la infectividad del BV se pensó que estaría presente en todos los NPVs. El análisis de diversos genomas demostró la ausencia de homólogos a este ORF, en los cuales la función de fusión era cumplida por una proteína denominada F (prot. F). Algunos NPVs poseen ambos ORFs, pero en esos casos, la proteína F es inactiva. Según estudios realizados en tal sentido, se postula que GP64 podría haberse adquirido en

diferentes linajes baculovirales en los cuales la actividad de la proteína F fue desplazada (Rohrmann, 2008).

2.7 Estructura de la Nucleocápside

Una característica de las nucleocápsides dentro de poliedros es su organización, pues estas pueden ser individuales (SNPV por sus siglas en inglés) o presentarse en agregados múltiples (MNPV) dentro de la envoltura (Figura 3). Se ha sugerido que el fenotipo MNPV puede acelerar la capacidad del virus para establecer la infección, teniendo en cuenta que, al ser múltiple, una nucleocápsides podrían entrar en el núcleo y empezar la replicación, mientras que otros podrían transitar dentro de la célula y propagar la infección en otra parte. Otro beneficio de los grupos de nucleocápsides de infectar la célula es la posibilidad de reparar el ADN dañado a través de recombinación (Rohrmann, 2013).

La estructura de las nucleocapsides de los ODV es común con la de los viriones brotantes (BV). La nucleocápside (NC) está conformada por ADN superenrollado íntimamente asociado a la proteína P6.9. Esta proteína con capacidad de unión a ADN participa en alto grado de la compactación que presenta el material genético viral. Por otra parte, la proteína VLF-1 (Ac77) (*very late factor*), está ubicada en la región terminal de la NC y tiene funciones estructurales tanto en los ODV como en los BV (Yang y Miller, 1999).

Todos los NPVs presentan una etapa como SNPV, que posteriormente en la infección, cuando la replicación y la formación de virión se amplifica, inicia la formación de las nucleocápsides de los MNPV, las cuales se ensamblan y la proteína gp41 podría actuar como pegamento para unir las de modo que cuando la envoltura comienza a formarse, estos son co-envueltos. Sin embargo, la concentración de nucleocápside puede ser alterada por diversos factores como la replicación del ADN reducida, causada por una ADN polimerasa alterada o algún componente desconocido de la célula y cómo interactúan con los tipos de virus, pueden influir en si en el virus es predominantemente un SNPV o MNPV (Haase *et al.*, 2013).

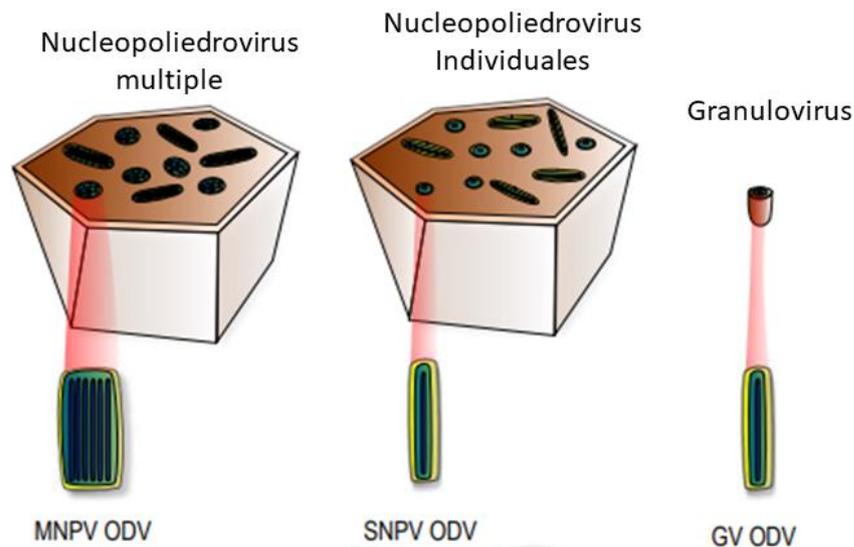


Figura 3. Esquema base de la morfología de los ODV de los Nucleopoliedrovirus. ODV con nucleocápside múltiple y nucleocápside simple (Tomado de Haase et al., 2013).

La cápside del virión está compuesta principalmente por la proteína VP39 (Ac89), que posee homólogos en todos los genomas baculovirales. Entre otras proteínas de importancia que están presentes en los viriones se pueden citar a GP41 (Ac80), que se encuentra localizada entre la envoltura del virión y la cápside, constituyendo una estructura denominada tegumento que es requerida para el regreso de la nucleocápside del núcleo (Olszewski y Miller, 1997).

2.8 Ciclo de infección

Después de la ingestión, los CO que contienen los viriones se disuelven en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 7,5$) del intestino medio y liberan los viriones. Los viriones infectan a las células epiteliales del intestino y posteriormente otros tejidos susceptibles del hospedero, donde el virus continúa su reproducción y multiplicación (Figura 4). Los tejidos del cuerpo gordo, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda, también son afectados. Las larvas infectadas se tornan lentas en sus movimientos, dejan de alimentarse y se paralizan. Cuando la enfermedad viral muestra sus efectos se pueden observar las larvas en las partes superiores de las plantas pendiendo con la parte cefálica hacia abajo y adheridas de las pseudopatas anales, el integumento se vuelve blando y de color pardo o negro, y los tejidos internos se licuan, quedando la larva como una bolsa líquida (Figura 4) (McCarthy y Theilmann, 2008).

Avanzada la infección se produce la lisis celular, adquiriendo la hemolinfa una característica coloración blanquecina debido a la acumulación de CO. En tal sentido, estudios realizados con AcMNPV, BmNPV y SeMNPV en células de insecto mostraron que este último proceso es dependiente de la presencia de P10, de la acción de una proteína quinasa y de catepsina codificadas por el virus.

En infecciones *in vivo*, cuando la mayor parte de los tejidos susceptibles se ven afectados, el insecto muere. El tegumento de la larva se rompe y se liberan los COs en el ambiente, ayudado este proceso por la acción de una quitinasa codificada por el mismo virus. Los CO liberados estabilizan a los viriones en el exterior del huésped, permitiendo la transmisión horizontal de la infección cuando las larvas de insectos susceptibles ingieren alimento por ellos contaminados (Figura 4) (Wang y Granados, 1997).

Para entender el ciclo de infección de los NPV, es necesario referirse al tracto gastrointestinal del insecto, ya que es en este sitio donde transcurren las primeras etapas de este. El intestino de este grupo de artrópodos se compone de tres secciones: intestino anterior, medio y posterior (Salvador, 2010).

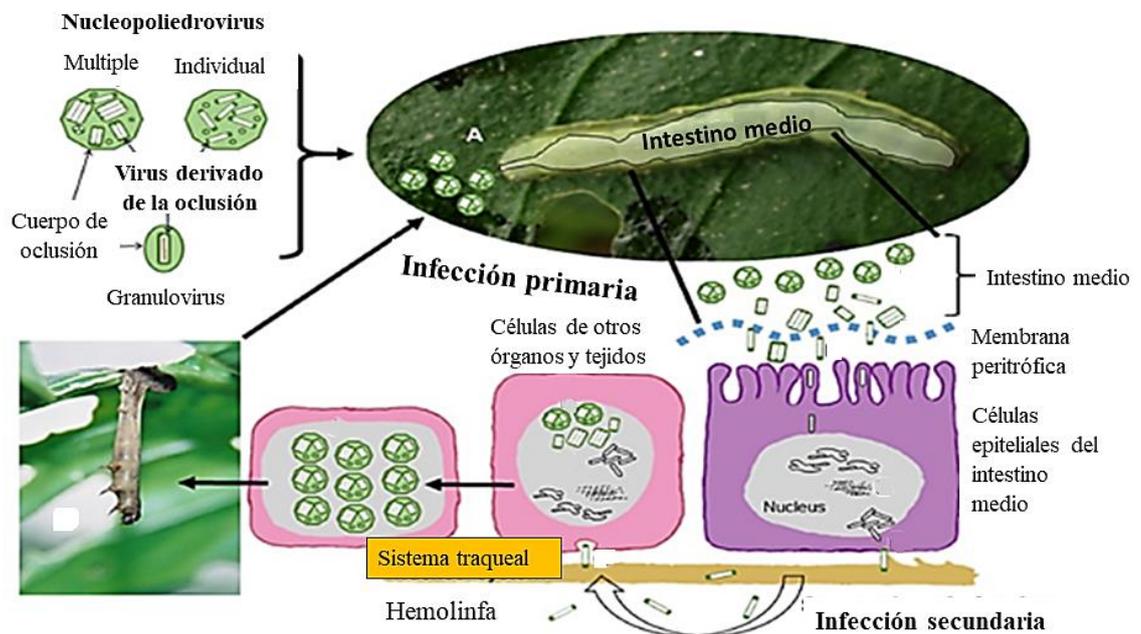


Figura 4. Ciclo de infección por baculovirus en larvas de lepidópteros (Tomado de Williams *et al.*, 2017).

En lepidópteros, el intestino anterior cumple la función de facilitar la absorción, el almacenamiento y la transformación física de los alimentos. Está

recubierto por una cutícula que contiene quitina y que forma parte del exoesqueleto del insecto. Una válvula separa el intestino anterior del intestino medio. Este último es el sitio principal de la digestión de los alimentos y carece de cutícula, pero cuenta con una membrana matriz peritrófica (MP) (Rohrmann, 2013).

La MP es compuesta por quitina, mucopolisacáridos, y proteínas. Se cree que protege la superficie del intestino de los daños causados por el material abrasivo de alimentos y limita el acceso de los microorganismos. También permite la transferencia de sustancias líquidas y digeridas a las células epiteliales intestino medio, pero impide el paso de partículas más grandes. Se desgasta por el paso de alimentos, pero se regenera a partir de las células epiteliales (Rohrmann, 2013).

Esta membrana no está presente en todos los grupos de insectos, faltando en grupos como fitiráteros (piojos) y tisanópteros (pescaditos de plata), entre otros. La presencia de la MP durante el ciclo vital de los insectos que la poseen es variable y en algunos aparece solo en los estadios larvales mientras que en otros puede estar presente en todos los estados (Peters, 1992).

El ciclo de infección de los nucleopoliedrovirus se divide en dos etapas: la infección primaria y la infección secundaria.

2.9 Infección primaria

Al parecer una combinación de factores están implicados en la iniciación de la infección del intestino medio, incluye factores que facilitan la unión a las células, estos son receptores de células a las que se une los viriones, además las proteínas del virión pueden tener actividad enzimática que permite el acceso viral a las células del intestino medio.

Los ODV se unen luego a las microvellosidades del epitelio intestinal mediante la fusión de sus membranas, permitiendo que las nucleocápsides (NC) contenidas en su interior sean liberadas en el citosol. Es en esta etapa, cuando las proteínas presentes en la envoltura del ODV, como las P74 y PIFs, juegan un rol importante en la fusión a las células del intestino medio (Ohkawa *et al.*, 2005).

Las NC liberadas en el citosol son transportadas al núcleo y el ADN desnudo entra por el poro nuclear iniciando la expresión y replicación del ADN. La mayor parte de las proteínas necesarias para la replicación del ADN viral están incluidas en el ODV: ADN polimerasa, helicasas, IE1, LEF1 y LEF3 (Granados y Lawer, 1981).

La incorporación al azar dentro del ODV no está descartada, aunque es probable que este proceso sea altamente específico. Una vez replicado el material genético e iniciada la cascada transcripcional de los genes virales que permite la formación de nuevas NC, estas salen del núcleo para propagar la infección; en el momento en que salen del núcleo obtienen la envoltura de la membrana nuclear, esta envoltura contiene al menos una proteína viral (GP16) (Gross *et al.*, 1994).

2.10 Infección secundaria

En la fase secundaria de la infección, las NC formadas son transportadas a la membrana celular, desde donde abandonan la célula por brotación o a través de la membrana basal. Las proteínas implicadas son la GP64 y F que además de requerirse en la salida de la célula, están involucradas en la infección a otras células.

Los BV una vez que abandonan la célula migran a células vecinas, en donde entran por endocitosis, con ayuda de las proteínas GP64 y F. Esto se da tras la unión de la proteína de fijación viral que estimula el citoplasma de la célula, generando una invaginación en el citoplasma celular llamado endosoma o vesícula endosomal, la cual se acidifica por causa de la proteína de fusión viral generando una fusión de la membrana endosomal y la envoltura viral, permitiendo la entrada de la NC al citoplasma celular (Granados y Lawer, 1981).

Durante la infección secundaria, en las infecciones producidas por NPV, los viriones que permanecen en el núcleo parecen obtener una membrana de microvesículas que tendría su origen en la membrana nuclear interna y que habría sido modificada por el agregado de proteínas virales específicas (Salvador, 2010).

En esta etapa ocurre la hiperexpresión de genes tardíos resultando en altos niveles de producción de proteínas como P10 y poliedrina. Esta última se acumula en el núcleo rodeando a los viriones y se sabe que al menos una proteína (Ac68) interviene en este proceso de oclusión de los viriones dentro de la matriz proteica del CO (Xu *et al.*, 2014). La proteína P10 parece estar íntimamente involucrada en el ensamblado de la envoltura del poliedro sobre el CO.

2.11 Uso de Baculovirus como agentes de control biológico de insectos.

Los baculovirus como agentes microbianos de biocontrol son herramientas ideales en el manejo integrado de plagas (MIP), ya que son altamente específicos con su huésped, por lo que no genera riesgos ambientales, seres humanos, plantas, y enemigos naturales (Yasuhisa, 2007; Ahmad *et al.*, 2011).

El baculovirus más estudiado es el AcMNPV, perteneciente al género *Alphabaculovirus* (http://viralzone.expasy.org/13?outline=all_by_species, accesado el 13 de Sept. 2017). Este fue uno de los primeros virus descritos y el interés en su estudio empezó cuando se observó que controlaba poblaciones del lepidóptero que destruían masivamente cultivos de alfalfa (Ojeda *et al.*, 2002). En 1970, se aplicó extensivamente en campos del suroeste de Ontario con el fin de estudiar la efectividad contra el gusano de la col, *T. ni* (Pest Management Research Center 2000).

Los análisis en la susceptibilidad de *T. ni*, reportados por Sarfraz *e. al.* (2010), indicó que el uso frecuente de insecticidas a base de Bt ha llevado a la resistencia en algunas poblaciones, siendo una alternativa el AcMNPV. Resultados de los bioensayos muestran que *T. ni* resistente a Bt era dos veces más susceptible a AcMNPV; sugiriendo que Bt y AcMNPV podría ser complementario en un programa de manejo de resistencia para *T. ni*.

Experimentos realizados por Hesketh y Hails 2015, sugieren que la co-inoculación de Btk y el NPV de *Panolis flammea* (Denis y Schiffermüller) (Lepidoptera: Noctuidae) (PaflNPV), en un campo experimental, sobre una población de larvas del lepidóptero *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae), mostraron un incremento en la mortalidad de la larva.

En otros estudios llevados a cabo por Meng *et al.* (2017) en una línea celular, Ms-10C, clonada a partir de la línea QAU-Ms-E-10 (simplificada Ms-10) de una línea embrionaria de *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), los resultados sugirieron que la línea celular clonada mostró ser significativamente más sensible a AcMNPV y al de *Mythimna separata* (MsNPV), siendo las tasas de infección viral de 94.2% y 92.3% respectivamente.

Debido a que una de las principales limitantes de los baculovirus como bioinsecticidas es su lento modo de acción, en los últimos años se han diseñado estrategias que permiten incrementar la virulencia (por ende, disminuir el tiempo de infección) con el objeto de incrementar su potencial como agentes de control biológico. Estas estrategias se basan principalmente en la inserción de genes en el

genoma de los baculovirus, los cuales, al expresarse en las primeras etapas de la infección, producen algún factor que aniquila al insecto en corto tiempo, incluso antes de que todos sus tejidos sean infectados. Estos factores son diversos e incluyen: toxinas específicas contra insectos, enzimas metabólicas, reguladores del crecimiento, entre otros (Del Rincón e Ibarra, 2003).

2.12 Inmunidad innata en insectos

Los insectos poseen un sistema inmune innato eficiente y potente para discriminar y eliminar patógenos y parásitos invasores; sin embargo, carecen de la inmunidad adquirida que está presente en los vertebrados (Liu *et al.*, 2017). El mecanismo de la selección clonal en los insectos no es evidente ya que no existe memoria, los mecanismos de defensas son rápidos y permanecen por pocos días y promueven una resistencia fuerte contra las infecciones microbianas (Rolff y Reynolds, 2009).

La primera línea de defensa puede ser ambiental, en la que el insecto evita entrar en el contacto con el potencialmente agente infeccioso. La segunda línea de defensa está formada por las barreras mecánicas y fisiológicas a la entrada del agente infeccioso, como el exoesqueleto y las enzimas digestivas y/o el pH del intestino medio. Si un patógeno logra la entrada en el insecto, encontrará dos reacciones inmunes innatas principales: la inmunidad celular y la inmunidad humoral (Tanaka *et al.*, 2008) los cuales están coordinados para proteger de una invasión por microorganismos (Vizioli y Salzet 2002).

Las respuestas inmunes celulares en lepidópteros son sus principales procesos de defensa inmunológica e involucran la fagocitosis y la encapsulación de material extraño exógeno por plasmocitos y células de la granulosa. La respuesta inmune humoral está compuesta por péptidos antibacterianos, factores antivirales, lectinas, lisozima y muchos otros factores activos, que actúan en conjunto con hemocitos funcionales (Cao *et al.*, 2009). Los hemocitos neutralizan los patógenos al envolverlos o atraparlos en nódulos que están melanizados a través de la actividad de las fenoloxidasas (FO), un proceso conocido como melanización (Dean *et al.*, 2004).

Las FO producen intermediarios reactivos para la producción de melanina que contribuyen a la destrucción de agentes infecciosos (Zhao *et al.*, 2011). Las vías

de señalización Toll e Imd, que participan en la inmunidad humoral, están mediadas por diferentes microorganismos patógenos e inducen y regulan la expresión de diferentes factores de péptidos antimicrobianos (Imler, 2014).

Estudios sugieren que la melanización juega un papel en la defensa contra los baculovirus en los insectos en etapas larvales. Se ha demostrado que la melanización puede inhibir la infección por AcMNPV en la cepa resistente de *Helicoverpa zea* Boddie (Trudeau *et al.*, 2001). Los baculovirus han desarrollado una estrategia para suprimir la melanización de la hemolinfa mediante la regulación negativa de la actividad de la FO, para promover la infección, incluida la regulación de sus propios genes como la conotoxina (*ctx*) y *Hemileuca* sp. 018 (*hesp018*), e induciendo proteínas huésped como serpin-5 y serpin-9 (involucradas en la inhibición de las serinas proteasas y caspasas) (Ardisson-Araujo *et al.*, 2015).

2.13 El papel de la actividad fenoloxidasa en la respuesta inmune de los insectos.

La melanización es un proceso que fue estudiado desde hace más de dos décadas en varias especies de insectos. Consiste en la formación del pigmento oscuro, la melanina, de la cual existen dos variedades, la feomelanina, de color pardo, que es propia de los vertebrados, y la eumelanina (negra) que se encuentra en los insectos (Medina y Fernández, 2014).

En este caso se trata de un polímero de indol-quinonas; este compuesto proviene de la oxidación de la fenilalanina y/o la tirosina e incluso de catecolaminas y otros sustratos. La finalidad de este pigmento que tiene una estructura altamente polimerizada consiste en rodear e infiltrar las células extrañas impidiéndole desarrollar sus funciones vitales. Este proceso se puede llevar a cabo acompañando de la encapsulación del agente invasivo (Wang y Jiang, 2004).

La formación de la melanina en la hemolinfa es catalizada en una primera fase por la enzima FO. De hecho, hay más de una enzima con actividad de FO. Esta enzima proviene de su forma inactiva, la proenzima profenoloxidasa (PFO) que es sintetizada en las células cristal y la que por acción de una cascada de serín proteasas es convertida en la forma activa (Figura 5). Este mecanismo que lleva a la constitución de la enzima activa se caracteriza por la presencia de una cantidad de pasos controlados (Wang y Jiang, 2004) los cuales regulan la aparición de la

actividad y la mantienen dentro de límites precisos. La ruta de la melanización se activa después del reconocimiento de productos microbianos a través de proteínas de reconocimiento de patrones y da como resultado la transcripción de ciertos genes, incluidos aquellos que codifican inhibidores de la serina proteasa, como las serpinas (Figura 5), que, a través de la regulación negativa, evitan la activación prematura y excesiva; entendiéndose que tales controles impiden que se produzca una activación incontrolada de la enzima que conlleve una generalizada melanización de las regiones no comprometidas por la invasión del agente infeccioso o cuerpo extraño (Cerenius *et al.*, 2010).

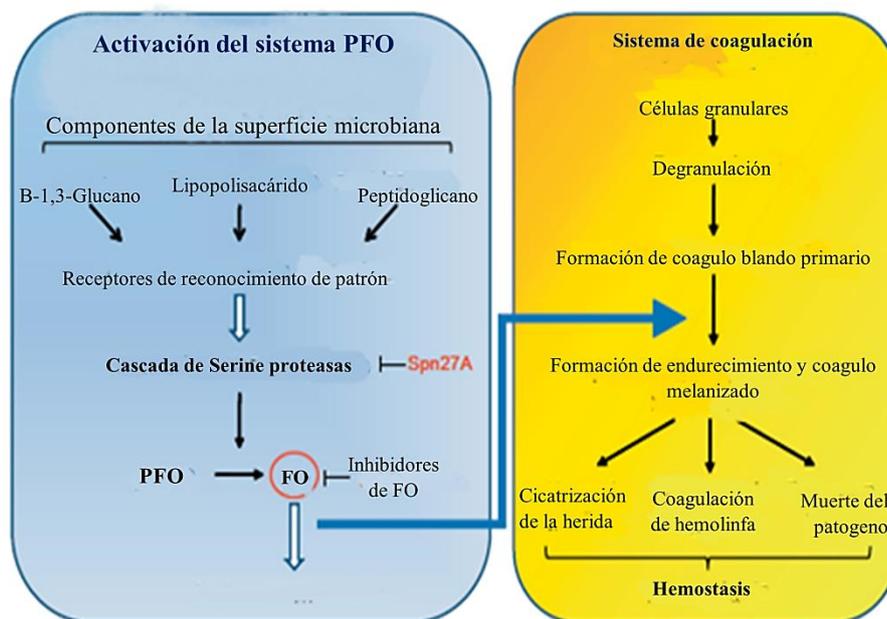


Figura 5. Representación esquemática de la activación de la enzima Fenoloxidasasa (Modificado de Eleftherianos y Revenis, 2011).

De acuerdo con la especie de insecto, la FO puede encontrarse en la hemolinfa o puede ser liberada por ruptura celular. Se deposita alrededor de heridas o de parásitos, sean encapsulados o no, inhibiéndolos a partir de generación de sus productos. Cabe mencionar que esta enzima puede ser transportada a la cutícula, y de hecho ello ocurre en la mayor parte de estos animales y sobre amplias áreas cuticulares, donde éstas son convertidas a una forma mecánicamente más resistente y opaca a la luz (Zou *et al.*, 2010).

La PFO es una enzima bastante conocida ya que ha sido purificada y aislada de un amplio rango de especies de insectos. La masa molecular de esta enzima en los insectos varía entre 78 a 80 kDa. Su estructura contiene una secuencia que muestra una gran similitud a la región tiolester de las proteínas C3 y C4 del Complemento de vertebrados. El camino que conduce desde la oxidación inicial de los sustratos endógenos, fenilalanina y tirosina, por parte de la FO, transcurre hasta la formación de dopacromo (Nappi y Christensen, 2005) a través de pasos intermedios catalizados o espontáneos; luego éste polimeriza a melanina, mediante intermediarios cuya conversión puede (también) ser catalizada o no. Todo parece indicar que una vez que se ha activado la FO, los pasos subsiguientes se llevan a cabo de una forma tal que las transformaciones intermedias no parecen estar sujetas a regulación.

2.14 Péptidos antimicrobianos en lepidópteros

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son componentes multifuncionales de los sistemas de defensa inmunes innatos en organismos procariontes y eucariotes (Bulet *et al.*, 1999). Sobre la base de las sustituciones de aminoácidos, las PAM se dividen en varios subgrupos. Generalmente consisten entre 12 y 50 aminoácidos y se dividen en subgrupos por su composición y estructura de aminoácidos. Algunos PAM pueden ser tan cortos como de siete a 100 aminoácidos (Yi *et al.*, 2014). La parte hidrófoba de su molécula generalmente ocupa más del 50% de los residuos de aminoácidos.

Los PAM tienen una variedad de actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Estos péptidos pueden alterar físicamente las membranas celulares microbianas y, por lo tanto, destruir un amplio espectro de microorganismos patógenos. Por lo tanto, la membrana microbiana generalmente se considera el objetivo principal de las PAM (Chernysh *et al.*, 2015).

Los PAM de insectos se dividen en tres grupos según su secuencia de aminoácidos y sus estructuras: (a) Cecropinas, los péptidos lineales con hélice α pero que carecen de residuos de cisteína; (b) Las defensinas con 6–8 restos de cisteína conservados, tienen una matriz estabilizadora de tres o cuatro puentes disulfuro y tres dominios que consisten en un bucle amino-terminal flexible; y (c) péptidos con una

representación excesiva de los residuos de prolina y / o glicina (Makarova *et al.*, 2018).

Los lepidópteros son conocidos por producir péptidos antimicrobianos en la hemolinfa en respuesta a una inyección con bacterias; los péptidos más caracterizados son las cecropinas y las atacinas aisladas de *Hyalophora cecropina* L. (Lepidoptera: Saturniidae), con un peso molecular alrededor de 4 -7 kDa. Se ha demostrado que la respuesta inmune humoral en *Heliothis virescens* (F.) es inducible con bacterias, en donde se encontró la expresión en péptidos parecidos a cecropinas y atacinas extraídos de la hemolinfa y que tienen actividad *in vitro* contra bacterias gram negativas y contra envolturas de virus (Ourth y Lockey 1994).

Los insectos lepidópteros son conocidos por producir factores antimicrobianos en la hemolinfa en respuesta a un estímulo mediado por un patógeno (Tabla 1).

Tabla 1. Actividad de los principales péptidos antimicrobianos de especies de insectos de importancia agrícola (modificado de Yi *et al.*, 2014).

Espece insecto	Péptido	Actividad
<i>Spodoptera frugiperda</i> Walker	Spodoptericina <i>Sl-gallerimycina</i>	*
<i>Samia cynthia ricini</i> Drury 1773	<i>Scr-gallerimycina</i>	*
<i>Spodoptera litura</i> Fabricius, 1775	<i>Sl-gallerimycina</i>	*
<i>Bombyx mori</i> Linnaeus, 1758	Defensina A Defensina B	*
<i>Spodoptera littoralis</i> Boisduval, 1833	<i>SpliDef</i>	G+, G-
<i>Galleria mellonella</i> Linnaeus, 1756	Defensina Gallerimicina	Hongos Hongos
<i>Heliothis virescens</i>	Heliomicina	Hongos
<i>Mamestra brassicae</i>	Defensina	G+, G-
<i>Archeoprepona demophoon</i> Linnaeus, 1758	ARD1	Hongos

<i>Trichoplusia ni</i>	Gloverina	G +; G- Baculovirus
------------------------	-----------	------------------------

*: No ha sido descrito G-: Bacterias gram -

G+: Bacterias gram +

En el lepidóptero plaga *T. ni* se han encontrado genes involucrados en la respuesta inmune, en los cuales han sido inducidos por agentes no patogénicos como *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli* (Tamez-Guerra *et al.*, 2008). Entre los genes que se han expresado y se ha determinado su función en la defensa contra patógenos están: *atacina* (antiviral), *cecropina* (antibacteriano, antiviral), *defensina* (antibacteriano), *gloverina* (antiviral y antifúngico), *gallerimicina* (antifúngico), *hemolina* (antiviral), *lebocina* (antifúngico), y *lisoizima* (antibacteriano) (Freitak *et al.*, 2007).

Los péptidos antimicrobianos se generan en insectos expuestos a patógenos para combatir la infección. La gloverina es una proteína antibacteriana catiónica pequeña cuya expresión se induce en los hemocitos y células de grasa corporal de larvas de *T. ni* expuestas a bacterias. Moreno *et al.* (2012), el papel y modo de acción de la gloverina durante la infección por baculovirus. Encontrando que la expresión de gloverina es inducido en *T. ni* infectado con el baculovirus AcMNPV, siendo GP64 la proteína de unión y fusión del AcMNPV la que se ve afectada por la gloverina. La carga negativa global de GP64 o grupos de aminoácidos cargados negativamente localizados cerca del dominio transmembrana de GP64 puede atraer a los aminoácidos de la gloverina cargados positivamente a la superficie del baculovirus.

Posteriormente, la gloverina obstaculiza los cambios conformacionales de GP64 necesarios para iniciar una infección. La gloverina puede interactuar con aminoácidos cargados negativamente de otras proteínas localizadas en la envoltura o con fosfolípidos cargados negativamente de la membrana de la envoltura. La gloverina acumulada en la superficie del virus puede causar deformación de la membrana o la formación de poros que interrumpen la envoltura (Figura 6).

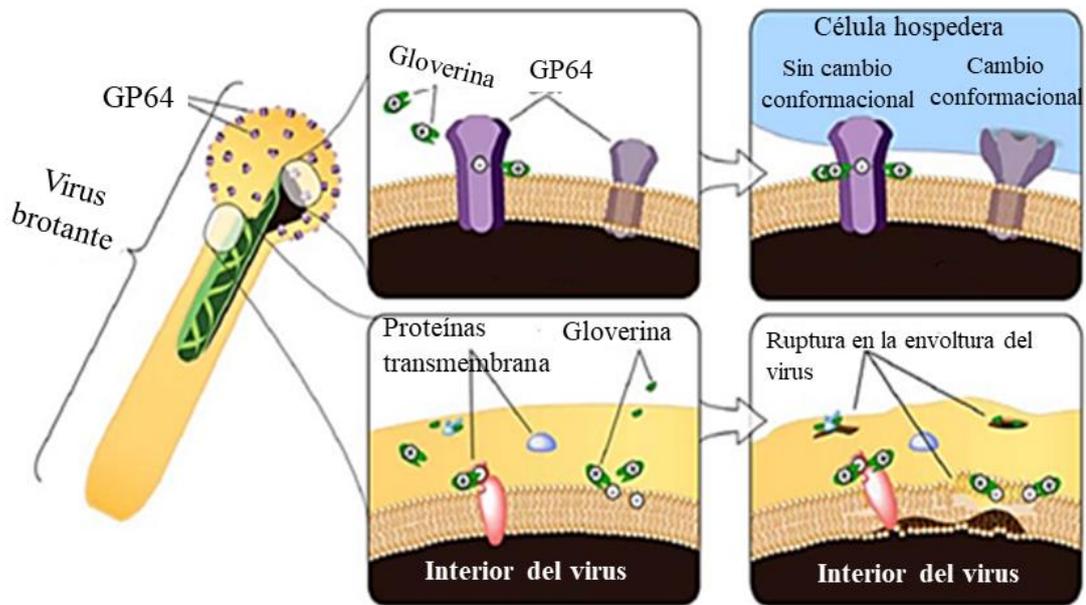


Figura 6. Mecanismo de acción del péptido antimicrobiano gloverina ante la infección por AcMNPV (modificado de Moreno *et al.*, 2012).

2.15 ARN de interferencia

El ARNi es un mecanismo de silenciamiento genético postranscripcional ocasionado por moléculas de ARN de doble cadena (ARNdc). Es un proceso regulatorio de la expresión génica y la defensa antiviral en eucariotas (Wynant *et al.*, 2014; Nandety *et al.*, 2015).

El primer indicio de este mecanismo fue visto en 1990 de manera accidental cuando científicos querían intensificar el color rojo de las petunias para beneficio comercial Rich Jorgensen introdujo el gen que expresaba la enzima chalcona sintasa para la formación de pigmento violeta en la flor de las violetas, esperando obtener un aumento en la pigmentación, sin embargo, obtuvieron flores con menor coloración incluso blancas (Napoli *et al.*, 1990).

A este fenómeno lo denominaron co-supresión debido a que el gen inducido no se expresaba y, además el gen nativo en la planta dejó de expresarse (Napoli *et al.*, 1990). Posteriormente también se observó este mismo fenómeno, pero en un hongo llamado *Neurospora crassa*, llamándolo *quelling* (Romano y Macino, 1992).

En animales fue caracterizado por primera vez en 1998 por Fire y Mello, ellos demostraron que la introducción de ARNdc en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*

(Maupas) provocó la degradación del ARN mensajero (ARNm) complementario a una u otra cadena del ARNdc, resultando en un silenciamiento del gen (Fire *et al.*, 1998). Estudios posteriores demostraron que el ARNi se presentaba en todos los eucariontes de manera conservada en respuesta a ARNdc, determinándose un mecanismo antiviral evolutivamente conservado (Ortiz, 2009).

2.16 ARN de interferencia para el control biológico de insectos

Actualmente, la técnica con ARNi se ha utilizado para bloquear la expresión de genes, en la cual el ARNi o ARNdc se une a su gen específico, provocando la activación de enzimas como DICER y RISC, lo cual lleva a la degradación y por lo tanto la inhibición de la proteína de interés. Estos mecanismos se han utilizado para inhibir genes en la mayoría de los organismos.

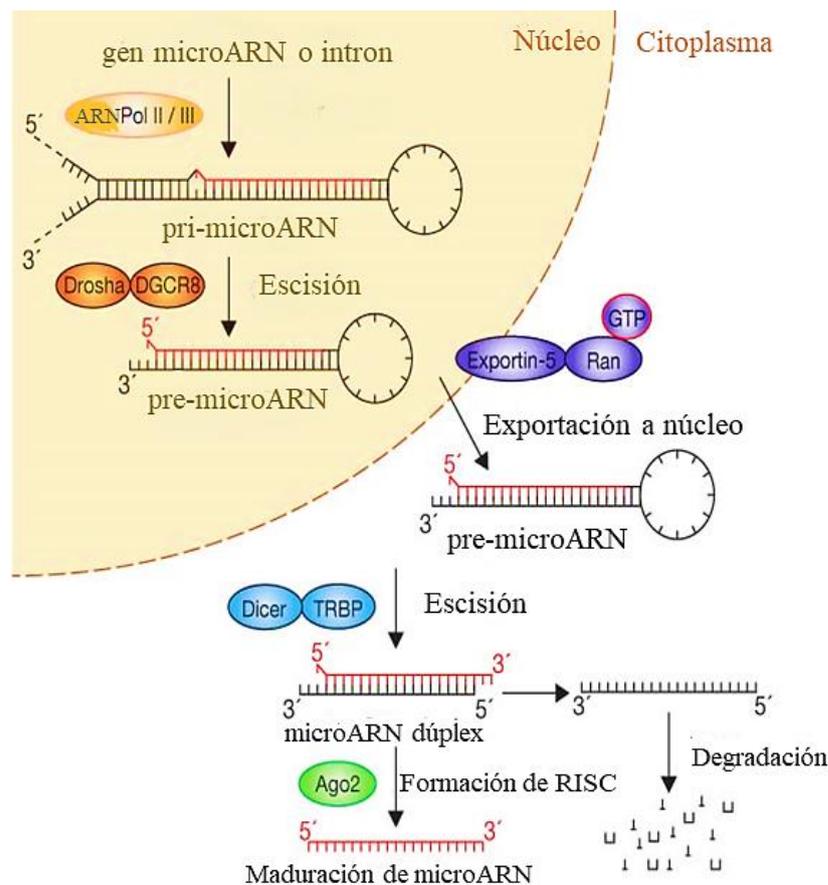


Figura 7. Mecanismo del ARNi en el bloqueo de transcritos (modificado de Hannon, 2002).

En los insectos se ha observado y demostrado inhibición de la expresión de genes con ARNi. Entre los ejemplos destacan la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Diptera: Drosophilidae), la garrapata *Boophilus* sp. (Ixodida: Ixodidae), el mosquito *Anopheles gambiae* (Giles) (Diptera: Culicidae) (Ghanim *et al.*, 2007) y recientemente en lepidópteros (Fang *et al.*, 2010).

Debido a que el silenciamiento por ARNi ha revolucionado el estudio de la función de genes, particularmente en insectos lepidópteros, se ha observado que es difícil la estandarización de la inhibición. De hecho, se han encontrado más resultados negativos que positivos en alrededor de 150 experimentos publicados en relación de genes inhibidos involucrados en la inmunidad. Se ha encontrado que la zona de mayor dificultad para silenciar es en el epitelio y cutícula, además de requerir de altas concentraciones de ingesta de ARNdc. En los estudios que se ha observado mayor frecuencia de silenciamiento es por inyección en el hemocele (Terenius *et al.*, 2010).

Tabla 2. Genes inhibidos por ARNi en Lepidópteros de importancia agrícola (modificado de Katoch y Thakur, 2012).

Especie	Gen diana	Patógeno	Referencias
<i>Epiphyas postvittana</i> Walker, 1863	Carboxilasa del intestino larval	NA	Turner <i>et al.</i> , 2006
<i>Bombyx mori</i> Linneo, 1758	La hormona desencadenante de ecdisis <i>ETH</i>	NA	Dai <i>et al.</i> , 2008
<i>Spodoptera frugiperda</i> Walker	Cytochrome P450 (<i>CYP6BF1v4</i>)	NA	Griebler <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichoplusia ni</i>	<i>caspara-1</i>	NA	Hebert, <i>et al.</i> , 2009
<i>Helicoverpa armigera</i> Hübner, 1805	acetilcolinesterasa	NA	Kumar <i>et al.</i> , 2009
<i>Spodoptera exigua</i> Hübner, 1808	Gloverina (<i>Sglv</i>)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Hwang y Kim, 2011
<i>Spodoptera litura</i> Fabricio, 1775	Receptor de Vitelogenina	NA	Shu <i>et al.</i> , 2011
<i>Mythimna separata</i>	Genes de quitinasa <i>MseChi1</i> y <i>MseChi2</i>	TMV-GFP	Bao <i>et al.</i> , 2016
<i>Ostrinia furnacalis</i> Guinea, 1854	Glutación-S-transferasa (<i>GST</i>)	NA	Zhang <i>et al.</i> , 2018
<i>Leguminivora glycinivorella</i> Matsumura, 1898	<i>PGRP</i>	NA	Ran <i>et al.</i> , 2018

*NA: No aplica

Entre los métodos utilizados actualmente para producir el ARNi a nivel de laboratorio, se encuentran los siguientes tres: mediante moldes de ADN lineal usando la ARN polimerasa del fago T7; sintetizados químicamente; uso de vectores de expresión de doble cadena (Papic *et al.*, 2015).

1) Los ARNdc generados enzimáticamente involucran una transcripción *in vitro* mediada por la polimerasa del fago T7. Se obtienen como producto de la transcripción de pequeños ARNs repetidos invertidos que se denominan small hairpin RNAs (shRNAs) o lineales que posteriormente, son cortados por Dicer. Sin embargo, la pureza y especificidad en este tipo de síntesis es variable y se puede obtener resultados de una inhibición no específica (Wynant *et al.*, 2014).

2) Los ARNdc sintetizados químicamente son inducidos directamente en el citoplasma de la célula evitando el paso por la enzima Dicer. Por su tamaño corto son denominados siRNA. Estos pueden ser sintetizados en gran cantidad y se ha probado que son más eficientes en la degradación del ARNm secuencia-específica, pero presenta problemas como lo es el alto costo económico y el tiempo de síntesis, lo que no lo hace factible para producciones a gran escala y menos cuando se tienen múltiples blancos y se requiere que múltiples siRNAs se produzcan (Wynant *et al.*, 2014).

3) El uso de vectores plasmídicos de ADN que poseen el promotor T7 también son utilizados para generar ARNdc. El uso de estos plásmidos permite una expresión estable de ARNdc por al menos dos meses post-transfección y es económico al generar múltiples secuencias que son obtenidas por la propia maquinaria del ARNi, sin necesitar un procesamiento externo. Su principal desventaja es que el éxito depende del proceso de transfección (Wynant *et al.*, 2014).

El uso de sistemas *in vivo* mediante estos vectores es otra estrategia para generar ARNdc; para este método el uso de bacterias recombinantes son una buena opción como sistemas de producción, debido a su rápido crecimiento, fácil manipulación y es económico ya que no requiere de medios especiales para su cultivo (Papic *et al.*, 2015).

Entre los métodos utilizados para la entrega de ARNdc en insectos ha sido reportados, el uso de inyecciones directas en el sistema circulatorio por

medio de transfección, incubación en solución que contenga ARNdc (Wynant *et al.*, 2014) e ingestión o extracción de ARNdc de bacterias *E. coli* que expresan este tipo de ARN a través de vectores con doble promotor T7, este último método resulta ser más fácil para su introducción en el organismo del insecto, ya que se puede suministrar vía alimentaria mediante una dieta artificial (Timmons *et al.*, 2001).

Investigaciones realizadas por Zhao *et al.*, (2016), utilizaron la cepa bacteriana de *E. coli* HT115 para expresar ARNdc correspondiente a CYP6B6 de *Helicoverpa armigera*. Después de investigar el efecto del pH, solución salina, plasma en hemolinfa y tiempo sobre la estabilidad del ARNdc de la bacteria, probaron el efecto del ARNdc exógeno sobre la transcripción y traducción de la larva CYP6B6, el crecimiento de larvas, el desarrollo y la tolerancia al insecticida del gusano cogollero después de la ingestión de bacterias manipuladas, los datos muestran que el silenciamiento del CYP6B6 puede perturbar el crecimiento y desarrollo de la larva y también reducir su tolerancia al insecticida. mostrando una buena base para la aplicación de estrategias de ARNi dirigidas a los genes *P450* de insectos mediante la transformación de algodón u otras plantas para la protección contra el gusano de la cápsula del algodón.

Ganbaatar *et al.*, (2017) utilizaron ARNi para el silenciamiento de genes de quitinasa (por estar en mayor proporción en tejido intestinal) en larvas de *M. separata*, utilizando el vector L4440 para producir ARNdc y transformando el vector en la cepa HT115 de *E. coli* (DE3), las bacterias se mezclaron y se dieron como dieta a las larvas, los resultados finales mostraron mortalidad y reducción del peso corporal de estos insectos.

3. JUSTIFICACIÓN

Trichoplusia ni es un insecto plaga que se distribuye desde Canadá hasta México, afectando cultivos de hortalizas y cucurbitáceas, resaltando como plaga principal de la col. Esta plaga consume de alimento tres veces su masa corporal. Uno de los métodos ambientalmente amigables para su control son los nucleopoliedrovirus (NPV).

Los mecanismos de la respuesta inmune en larvas de lepidópteros, como lo es la acción del péptido antimicrobiano gloverina ante la infección del AcMNPV, evitan la infección y regulación en las poblaciones de *T. ni*. El uso del ARNi como una herramienta, que permite el bloqueo a nivel post-transcripcional de genes que intervienen en los diferentes mecanismos de defensa, ha mostrado resultados en los cuales se ha obtenido una mayor eficiencia en la infección por parte de entomopatógenos.

La importancia del presente estudio permite detectar si los cambios en la modulación y bloqueo del sistema de defensa, en insectos plaga, durante los procesos infectivos con NPVs, podrían modificar o incrementar la susceptibilidad al virus, especialmente en poblaciones del falso medidor (*T. ni*) como organismo modelo en un sistema de bioensayos con dieta artificial.

4. HIPÓTESIS

El bloqueo génico por ARNi de la expresión del gen *gloverina* de *Trichoplusia ni* afecta la respuesta inmune al baculovirus AcMNPV, generando una mayor susceptibilidad del insecto.

5. OBJETIVO

Evaluar el efecto de la interferencia por ARN de la expresión del gen *gloverina* en la susceptibilidad de *T. ni* al virus entomopatógeno AcMNPV.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Producir ARNdc del gen *gloverina* de *T. ni*, en el sistema bacteriano HT115.
2. Evaluar la eficiencia del ARNi en la disminución de la expresión de *gloverina* y su efecto en la respuesta inmune basal de *T. ni*.
3. Analizar el incremento en la susceptibilidad al AcMNPV tras el bloqueo del gen *gloverina* en *T. ni*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Lepidóptero

El lepidóptero empleado como modelo de inmunidad innata en los procesos experimentales es una cepa de laboratorio de *T. ni*; mantenida en una dieta artificial, en incubación a una temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa del $75\% \pm 10\%$ (Tamez-Guerra *et al.* 2006).

6.1.2 Baculovirus

El baculovirus utilizado como entomopatógeno es el AcMNPV, perteneciente al género *Alphabaculovirus*, a la $CL_{25} 6 \times 10^6$ CO/cm² de dieta.

Plásmidos y vectores utilizados

El vector de clonación de productos de PCR pGEMT (Promega Corp, Fitchburg, WI, EUA) y vector de producción de ARNdc L4440 (Addgene), haciendo uso de las cepas Top 10 y HT115 de *E. coli*.

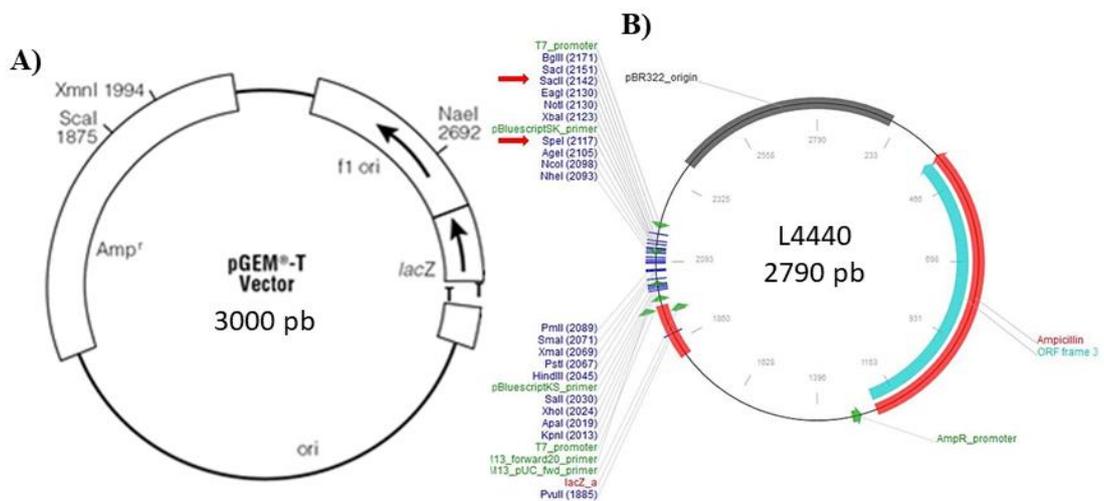


Figura 8. Plásmidos utilizados, A) Vector de clonación de Productos de PCR pGEMT (Promega), B) Vector de producción de ARNdc L4440 (Addgene).

6.2 Evaluación de la respuesta inmune basal de *T. ni*.

Para analizar la inmunocompetencia general del insecto, se evaluó la actividad de la FO y de manera específica la expresión relativa del gen *gloverina* con el fin de analizar el comportamiento de estos factores de la respuesta inmune en larvas sanas. Para esto se colectaron tres larvas de tercer estadio y se maceraron en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugaron a 13,000 rpm. El sobrenadante (plasma de hemolinfa) se utilizó para medir la actividad de la FO, como se describe en el punto 6.2.1, y el centrifugado para extraer el ARN total para medir la expresión relativa, como se menciona en los puntos siguientes.

6.2.1 Análisis de la actividad de fenoloxidasa

Para la determinación de la actividad de la FO por un método colorimétrico, se utilizan 10 µL del plasma de hemolinfa de *T. ni*, se colocaron en pozos de una multiplica de 96 pozos, y se agregaron 190 µL del substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA 10 mM en amortiguador PBS 1X), después de 20 min a temperatura ambiente en oscuridad, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 490 nm, en un fotómetro para microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ FC (Orozco-Flores *et al.*, 2017).

6.2.2 Detección-obtención del inserto del gen *gloverina* y expresión relativa del péptido antimicrobiano, post- bloqueo mediante ARNi.

6.2.2.1 Detección del transcrito del gen *gloverina*

Se realizó una búsqueda de secuencias disponibles de ADN complementario de *T. ni*, para el gen involucrado en inmunidad innata y el constitutivo: *gloverina* y *prs5* (gen que codifica para la proteína ribosomal S5) respectivamente, con la finalidad de detectar el transcrito de *gloverina* mediante RT-PCR punto final. Las secuencias fueron obtenidas de la base electrónica de datos de PUBMED y se analizaron para el diseño de oligonucleótidos específicos que permitan amplificar el ARNm del gen seleccionado, de esta manera se obtuvo el inserto de este gen y mediante este se estructuraría el ARNi (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR punto final.

Gen	Genbank	Oligonucleótido	Tamaño	Alineamiento
<i>prs5</i>	AY837869	F- ATG GCT GAA GAA AAC TGG AAT	782 pb	54°C
		R- TTA ACG GTT GGA CTT AGC ACC		
<i>gloverina</i>	AF233590	F- ATG CAG TCG TCT ATT TTA TTA	525 pb	50°C
		R- TTA AAA ATC ATG TTC AAT TTT		

6.2.2.2 Extracción de ARN.

La extracción de ARN total se realizó con el reactivo y protocolo de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific); Se partió del homogenizado de tres larvas de tercer estadio con 500 µL de TRIzol®. La mezcla se incubó 10 min a temperatura ambiente y se añadieron 200 µL de cloroformo y se homogenizó en vortex por 15 seg. La muestra se incubó por un min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. El ARN se recuperó de la fase transparente del sobrenadante, la cual se transfirió a otro microtubo, con un volumen de isopropanol, se agitó con vortex e incubó a -20°C por 15 min. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante, la pastilla del ARN fue lavada con un mL de etanol al 70%, se centrifugó por 1 min a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 µL de agua libre de nucleasas (Valadez-Lira, 2011). Finalmente se almacenó a -80°C hasta su uso; las concentraciones de ARN se cuantificaron por espectrofotometría a una absorbancia de 260 nm mediante el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

6.2.2.3 Síntesis de ADNc

Para la síntesis de la cadena de ADN complementario (ADNc) a partir de ARN se realizó una reacción de retrotranscripción (RT), mediante el *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). En cada reacción, se manejó un volumen de final 20 µL; se diluyeron 2 µg de ARN de cada una de las muestras en 10 µL, esta dilución se transfirió a una

solución de 2 μL de 10X RT buffer, 0.8 μL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 μL de 10X RT *Random primers*, 1 μL de *MultiScribe Reverse Transcriptase*, y 4.2 μL de agua libre de nucleasas. Las condiciones de reacción a utilizar fueron las siguientes: 25°C (10 min), 37°C (120 min), 85°C (5 min) y 4°C (∞). El ADNc obtenido se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.2.2.4 Evaluación de la eficiencia de los oligonucleótidos y RT-PCR en Tiempo Real

Se diseñaron y analizaron los oligonucleótidos para RT-PCR en Tiempo Real de los genes *gloverina* y *β -actina* (endógeno), las secuencias fueron obtenidas de la base electrónica de datos de PUBMED. Posteriormente se realizaron seis diluciones seriadas 1:5, esta eficiencia se evaluó mediante una qPCR utilizando las diluciones mencionadas.

Esta técnica se realizó para poder comparar y valorar las diferencias de expresión en los transcritos de los genes involucrados en la inmunidad innata. Para la reacción se tomaron 2.5 μL de ADNc para cada reacción y 2.5 L para control endógeno; además se usó el buffer Applied Biosystems™ SYBR™ Select Master Mix se usaron 100 ng de oligonucleótido por cada reacción de 10 μL . Las condiciones estimadas de temperaturas en la reacción de PCR tiempo real fueron las siguientes:

Tabla 4. Protocolo de reacción qPCR

Paso	Protocolo de reacción		PCR tiempo real
	Temperatura	Tiempo	
1 ciclo (desnaturalización inicial)	95°C	10 min.	_____
40 ciclos de reacción de PCR (alineamiento y extensión)	95°C	15 seg.	_____
	60°C	15 seg.	Lectura de fluoróforo (SYBR Green)

Tabla 5. Secuencias de Oligonucleótidos marcados con SYBRGreen, utilizados para la detección de transcritos por RT-PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia	Tm	Amplicon
<i>gloverina</i> (AF233590.1)	F-GGCTCAAGAGTGATAAACGAC R-CCCCTTCCAATTTCCCTTATGTAC	60.6 61.0	113
<i>β-actina</i> (JF303662)	F-CCACCTACAACCTCGATCATG R-GGCTGTGATTTCCCTTCTGC	59.8 60.9	128

Todas las reacciones se realizaron por duplicado y el análisis de resultados se realizó con ayuda del software del termociclador PCR en tiempo real 7500 Software v 2.3 (Applied Biosystems). Se calculó la R^2 , considerándose una eficiencia del 100% al presentar una pendiente de -3.3 ($\pm 10\%$) y una R^2 mayor a 0.98.

6.3 Producción y Purificación de ARN de interferencia

La secuencia de ARNm de *gloverina* obtenido de la RT-PCR punto final, fue clonada en un vector pGEMT (Promega Corp, Fitchburg, WI, EUA) mediante la metodología de transformación bacteriana por células calcio competentes, en la cepa de *E. coli* Top 10. Subsecuentemente, fue subclonado con los sitios de restricción Not I y Apa I en el vector L4440 (el cual consta de dos secuencias promotoras T7 para expresión bidireccional y es un sistema inducible con IPTG). Los ARNi se produjeron en la cepa de *E. coli* HT115 con actividad T7 de la ARN polimerasa. Esta cepa posee buen rendimiento de expresión de plásmido e insertos estables y carece de la enzima ARNasa III, la cual es responsable de la degradación de ARN de doble cadena.

La construcción del gen *gloverina* de inmunidad innata clonado en el vector L4440 se transformó en la cepa HT115 de *E. coli* usando la metodología estándar de células calcio competentes y posteriormente se obtuvo una colonia transformante, misma que permitió la inducción de producción del ARNi, para ello la colonia transformada fue inoculada en caldo 2XYT con 50 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina y tetraciclina (40 $\mu\text{g/mL}$). Posteriormente se dejaron crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6, para inmediatamente después agregar 4 μL de IPTG a 0.8 mM por 4 h para inducir la producción de los ARNi por el vector L4440.

En cuanto a la purificación de los ARNi obtenidos, se realizó una extracción total de ARN siguiendo las instrucciones del fabricante del TRIzol™ Reagent, al cual ya purificado se le agregaron ADNsa I para remover residuos de ADN, ARNasa pancreática para remover ARN de cadena sencilla. Finalmente, se observaron los ARN de doble cadena, en un gel de agarosa al 1.2%, que fue corrido en una cámara de electroforesis, finalmente teñido en bromuro de etidio, para visualizar en un transiluminador la producción de los ARNi (Timmons *et al.*, 2001).

6.3.1 Administración del ARN de Interferencia

La aplicación de los ARNi seleccionados, fue mediante la ingesta de gotas de ARNi a 840 ng/μL, agregadas en una caja de Petri, misma donde previamente se mantuvieron asiladas alimento durante tres horas las larvas de *T. ni*, para diferenciar y verificar que las larvas se alimentaron con el interferente, este fue combinado con un colorante alimentario (modificado de Rodrigues *et al.*, 2017) (Figura 9).

6.4 Análisis del efecto de la interferencia de la expresión de *gloverina* en la respuesta inmune y expresión relativa

Para evaluar los cambios en la expresión y la correcta función del ARN de interferencia, fueron realizados bioensayos en dieta artificial, exponiendo larvas de *T. ni* de tercer estadio a los siguientes tratamientos.

- Larvas de *T. ni* sin ningún agente infeccioso e interferente
- Larvas de *T. ni* infectadas con AcMNPV
- Larvas de *T. ni* tratadas con ARNi sobre el gen *gloverina*
- Larvas de *T. ni* tratadas con AcMNPV y ARNi

Fueron realizadas tres repeticiones de cada tratamiento y se compararon contra un control no tratado.

La administración del ARNi en las larvas, fue mediante la metodología que se describe en punto 6.3.1 (Figura 9). Para lograrlo, el baculovirus se impregnó sobre la dieta. Se realizaron dos experimentos en los cuales las larvas se expusieron durante 24 h a los tratamientos antes descritos, posteriormente se realizó otro con una exposición por 72 h.



Figura 9. Administración de ARNi mediante gota en combinación con un colorante alimentario.

Subsecuentemente se midió la actividad de la FO, como se explica en el punto 6.2.1, con la finalidad de esclarecer el efecto en la respuesta inmune de las larvas de tercer estadio de *T. ni* tras ser expuestas al baculovirus e inhibir el gen de *gloverina*. Para lograrlo, se extrajo el ARN y se realizó la síntesis de ADN complementario tal cual se describe en los puntos 6.2.2.2 y 6.2.2.3, para medir la expresión relativa por qPCR, como se indica en el punto 6.2.2.4, además del uso de la fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$, tomando como muestra de interés el ADNc de las larvas tratadas. Como muestra calibrador se tomó el ADNc de las larvas sin tratamiento, para determinar la expresión de la β -actina como gen endógeno. Los resultados de la actividad FO se analizaron por medio de análisis de varianza (ANOVA) mediante el software SPSS versión 22 (modificado de Valadez-Lira, 2011).

6.4.1 Cuantificación relativa de la expresión de *gloverina*

Se realizó la cuantificación relativa de cada transcrito mediante el método de Livak:

- 1) Normalización del ΔCt del gen problema restando el gen de referencia.
 - ΔCt (calibrador) = Ct (gen problema) - Ct (control endógeno)
 - ΔCt (muestra) = Ct (gen problema) - Ct (control endógeno)
- 2) Normalización del ΔCt de la muestra restando el calibrador.
 - $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct \text{ muestra}) - (\Delta Ct \text{ calibrador})$
- 3) Calcular la expresión en radios
 - $2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{expresión normalizada en radios}$

Posteriormente, se analizaron y se graficaron las diferencias de expresión del gen *gloverina* respecto a los tratamientos a los cuales fueron sometidas las larvas.

6.5 Efecto en la susceptibilidad de *T. ni* tras el bloqueo del gen *gloverina*

Se realizaron bioensayos en dieta artificial, exponiendo larvas neonatas de *T. ni* a los mismos tratamientos mostrados en el punto 6.4.

El tiempo de exposición fue de 168 h en los cuales fue monitoreada la etología y registrada la cantidad de larvas muertas cada 24 h.

6.6.- Análisis estadístico

De los bioensayos se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento y se compararon contra un control no tratado, las variables dependientes fueron el porcentaje de mortalidad. A partir de la mortalidad se realizó un ANOVA mediante el software SPSS versión 22; las diferencias significativas entre los tratamientos fueron estimadas mediante una prueba de Tukey estableciendo un límite de confianza de 0.05, y de esta manera poder observar las variantes en la mortalidad con el AcMNPV.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de la actividad de fenoloxidasa

7.1.1 Estandarización de evaluación de la respuesta inmune de *T. ni*

Como parte de los primeros análisis, fue estandarizada la evaluación de la actividad FO, fue utilizado el tercer estadio larvario de *T. ni*, debido al fácil manejo y extracción de hemolinfa en esta etapa del desarrollo, los resultados obtenidos de la toma lecturas de hemolinfa, mostraron una estabilidad a partir de los 20 min (Figura 10), sirviendo de plataforma para observar los cambios y niveles de defensa, además de esclarecer los el tiempo para la toma de lectura una vez realizados los bioensayos con los tratamientos.

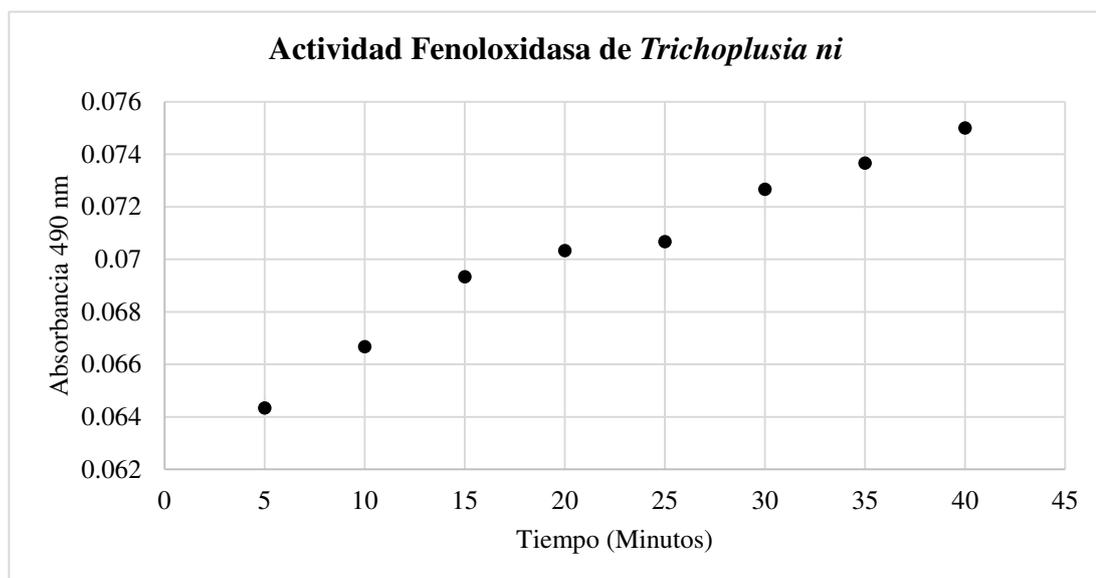


Figura 10. Actividad Fenoloxidasa del tercer estadio larvario de *T.ni*

7.2 Detección del Transcrito de *gloverina* por RT-PCR

Fue detectado por RT-PCR el transcrito en el lepidóptero *T. ni* el cual codifica para el gen involucrado en la inmunidad. La detección se realizó por medio de la técnica de RT-PCR convencional utilizando larvas completas para la extracción

de ARN, utilizando oligonucleótidos específicos para los genes *prs5* (control endógeno) y *gloverina* (Figura 11).

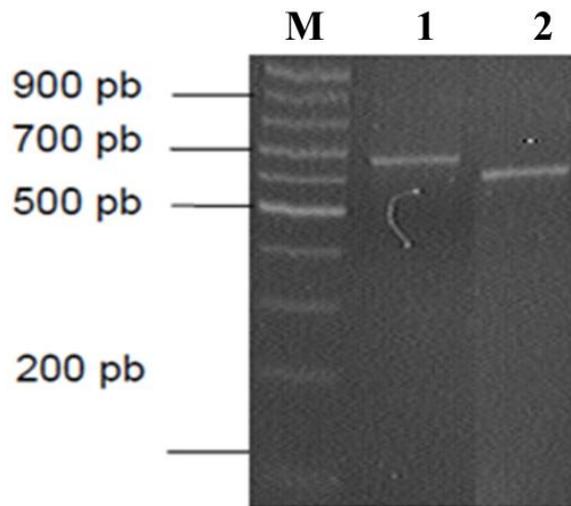


Figura 11. Detección por RT-PCR punto final del transcrito que codifica para el péptido antimicrobiano gloverina. M; marcador 100 pb (Promega), 1; *prs5* (control endógeno); 2; *gloverina*. Gel de agarosa al 1.2%.

7.3 Producción de ARNdc del gen de *gloverina*

Para la producción de ARNdc el cual se utilizó para bloquear el gen que codifica para el péptido gloverina, el cual posee actividad antiviral al baculovirus AcMNPV fue mediante el vector de producción de ARNdc L4440 y transformado en la cepa de *E. coli* HT115 (Figura 12). Posteriormente se produjo el ARNdc y se realizó una purificación de ARN para confirmar la producción de ARNdc por medio de la metodología de TriReagent (Ambion) (Figura 13).

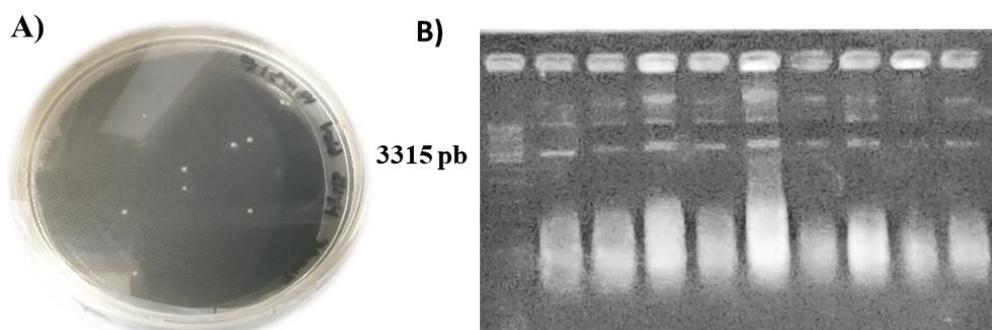


Figura 12. A) Transformación bacteriana de la cepa de *Escherichia coli* HT115, mediante la subclona del gen de *gloverina* en un vector L4440. B) Extracción de plásmido por método de Miniprep, vector L4440 + Gen de *gloverina*. M; Marcador 1 Kb (Promega).

Posterior a la extracción de ARN de la cepa de *E. coli* HT115 inducida, para la producción de ARNi y verificado mediante electroforesis en gel de agarosa 1.2%, se corrobora la inducción del ARNdc de ~700 pb (Figura 13).

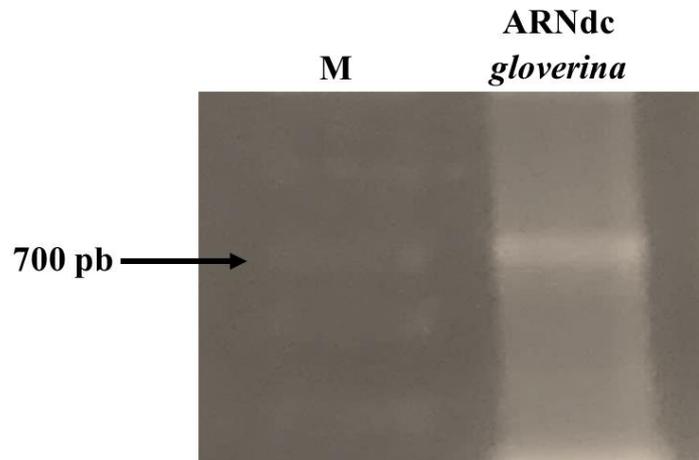


Figura 13. Producción y purificación del ARNdc por TriReagent (Ambion), producido en el vector L4440 regulado por la cepa HT115 de *E. coli* inducida con IPTG 0.8 mM. M; Marcador 1 Kb.

7.4 Eficiencia de los oligonucleótidos y RT-PCR en tiempo real

Tras la realización de seis diluciones seriadas 1:5 de ADN complementario de *T. ni*, utilizando los *primers* para los genes β -Actina y *gloverina*, fue evaluada la eficiencia mediante una qPCR utilizando las diluciones mencionadas, calculando la R^2 , considerándose una eficiencia del 100% al presentar una pendiente de -3.3 (+/- 10 %) y una R^2 mayor a 0.98 (Figuras 14 y 15).

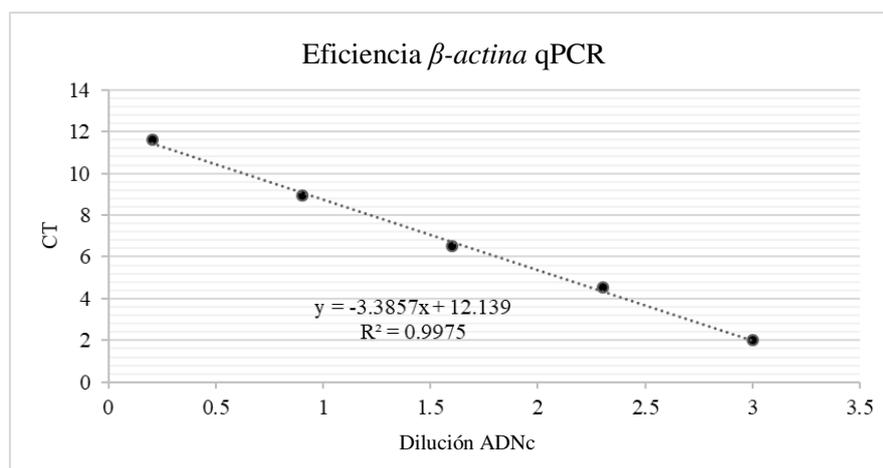


Figura 14. Eficiencia de los primers de PCR en tiempo real para el gen endógeno β -actina.

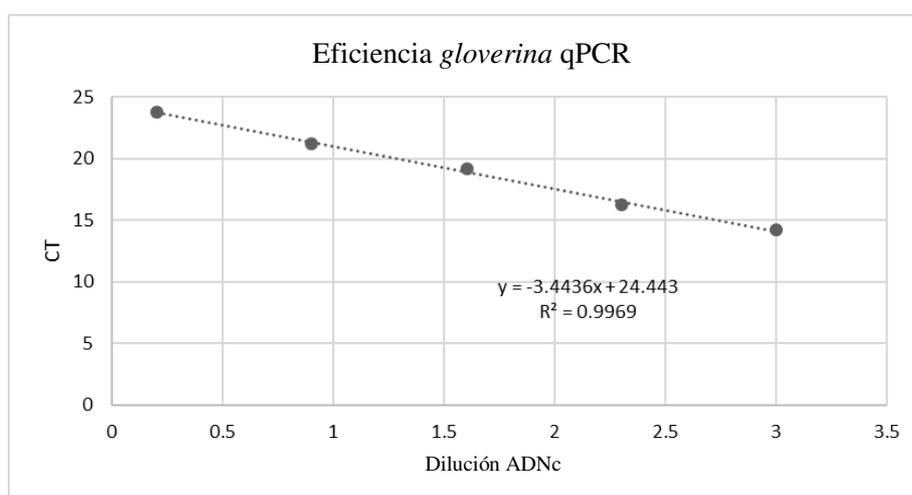


Figura 15. Eficiencia de los primers de PCR en tiempo real para el gen *gloverina*.

7.5 Efecto en la actividad fenoloxidasa, tras el bloqueo de la expresión de *gloverina* y exposición al AcMNPV

En cuanto a la relación que existe en respuesta de la FO cuando se somete al AcMNPV, en bioensayos con dieta artificial, fue aplicado el baculovirus a una dosis CL_{25} de 6×10^6 CO/cm² de dieta, a su vez administrado en gota el ARNi del gen de *gloverina* en combinación con un colorante alimenticio, en larvas de tercer estadio, para evaluar la actividad enzimática, en un tiempo de 24 h, en los insectos sometidos a los tratamientos.

Los resultados indican un aumento de la actividad FO del 3% por parte del tratamiento con ARNi y AcMNPV; un 4% con AcMNPV+ARNi, respecto al control

no tratado (Figura 16). El análisis estadístico por medio de un ANOVA fue de una significancia de 0.233 (Tabla 6), para los tratamientos utilizados, por lo que no hay diferencia significativa al utilizar el virus a una CL_{25} de 6×10^6 CO/cm², al exponer las larvas en un lapso de 24 h (ANOVA).

Tabla 6. Significancia en la actividad fenoloxidasa entre los tratamientos tras la exposición durante 24 h.

ANOVA

Valores

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.007	3	.002	1.756	.233
Dentro de grupos	.010	8	.001		
Total	.017	11			

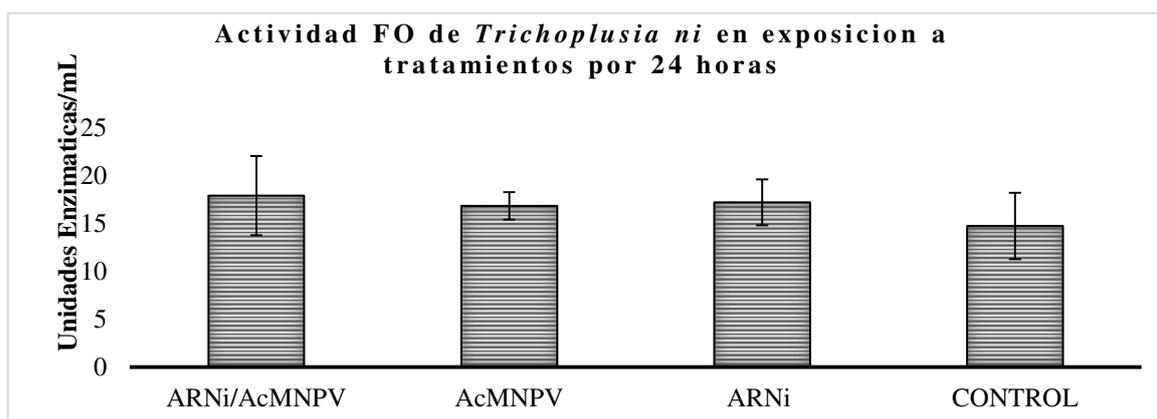


Figura 16. Niveles de fenoloxidasa en larvas de tercer estadio expuestas a los tratamientos durante 24 h: ARNi+AcMNPV, AcMNPV, ARNi, respecto al control no tratado.

Subsecuentemente fueron evaluados los parámetros de la actividad FO, posterior a realizar bioensayos en larvas de tercer estadio, tras ser sometidas a los tratamientos de ARNi, AcMNPV a una CL_{25} 6×10^6 CO/cm² de dieta y ARNi+AcMNPV, comparándolos respecto a un control no tratado en un tiempo de 72 h. Los resultados indican un detrimento de la actividad FO del 6% por parte del tratamiento con ARNi, por lo contrario, hubo un aumento del 2% con el AcMNPV+ARNi e igualmente con el AcMNPV, lo anterior respecto al control no tratado (Figura 17).

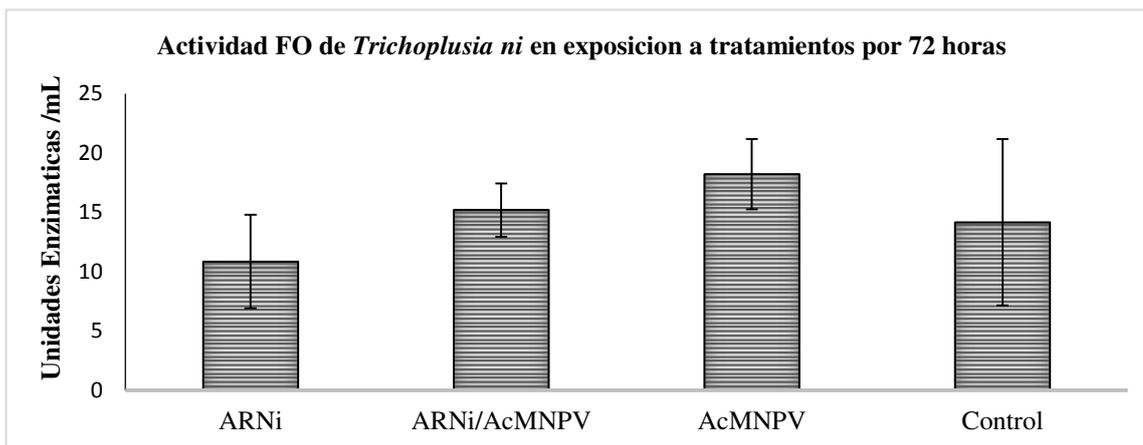


Figura 17. Niveles de fenoloxidasa en larvas de tercer estadio expuestas a los tratamientos durante 72 h: ARNi+AcMNPV, AcMNPV, ARNi, respecto al control no tratado.

El resultado estadístico de la actividad FO mediante un ANOVA, fue de una significancia de 0.218, para los tratamientos utilizados, por lo que no hay diferencia significativa al utilizar el virus a una CL_{25} de 6×10^6 CO/cm² de dieta (Figura 17 y Tabla 7).

Tabla 7. Significancia en la actividad fenoloxidasa entre los tratamientos tras la exposición durante 72 h.

ANOVA					
Valores					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	.015	3	.005	1.838	.218
Dentro de grupos	.022	8	.003		
Total	.038	11			

7.6 Análisis transcripcional de *Trichoplusia ni* tras el bloqueo de la expresión de *gloverina* y exposición al AcMNPV

Fue evaluada la expresión de *gloverina* por RT-PCR en Tiempo Real mediado por SYBR Green, tras la exposición a los tratamientos en larvas de tercer estado, la expresión de *gloverina* posterior a los tratamientos con una duración de 24 h, indica la disminución con el tratamiento de ARNi+AcMNPV al ser comparado

con el AcMNPV y control, siendo un valor de 2^{-DDCt} de 0.68, las larvas expuestas al AcMNPV mostraron una expresión de 2^{-DDCt} 1.12 en comparación a las larvas no tratadas (Figura 18).

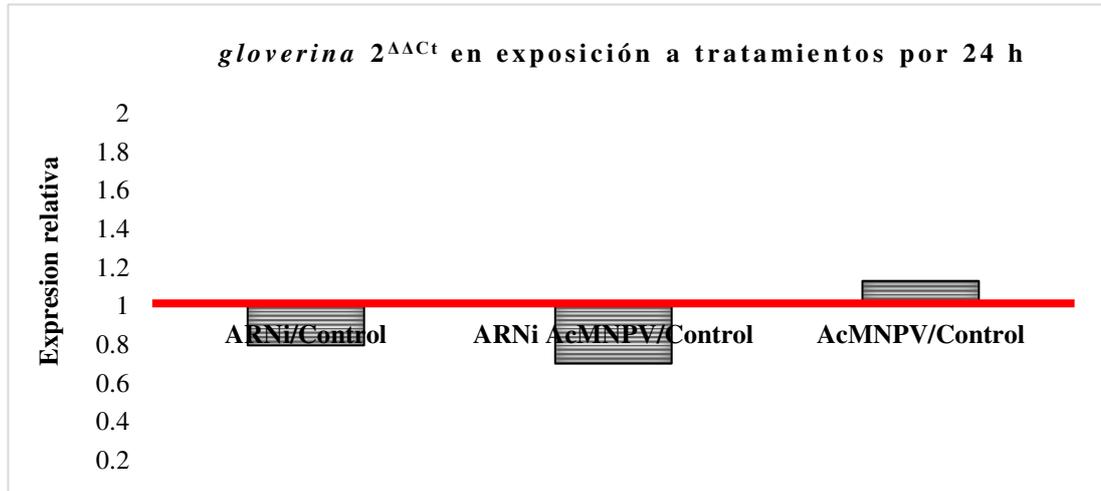


Figura 18. Análisis transcripcional del gen de *gloverina* por RT-PCR en tiempo real (SYBR Green), después de exponerlos por 24 h, a los tratamientos ARNi+AcMNPV, AcMNPV, ARNi y control negativo.

Por el contrario, los niveles de expresión de *gloverina* son reducidos con el tratamiento de ARNi al ser comparado y normalizado con el control, siendo un valor de 2^{-DDCt} de 0.28, las larvas expuestas al AcMNPV expresaron 12 veces más el gen de la *gloverina* (Figura 19).

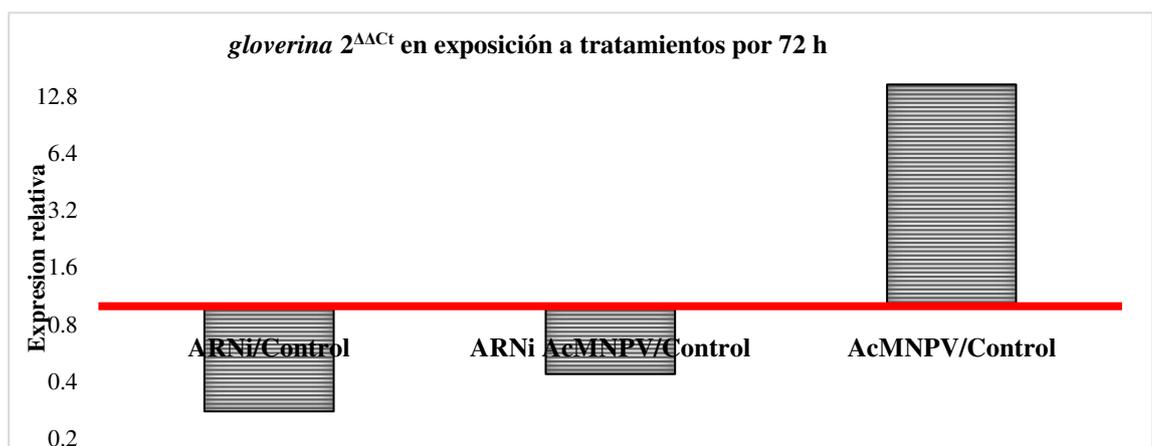


Figura 19. Expresión relativa del gen de *gloverina* por qPCR (SYBR Green), con exposición de 72 h a los tratamientos ARNi+AcMNPV, AcMNPV, ARNi y control negativo.

7.7 Cambios etológicos y efectos morfológicos de *T. ni* como resultado de la modulación de la respuesta inmune e infección con el AcMNPV.

Las observaciones etológicas y sintomatológicas de las larvas sometidas a los tratamientos con ARNi+AcMNPV, exhibieron movimientos sinuosos y de aletargamiento, aunado a la adhesión en posición invertida con patrón de V y una menor talla a comparación del control no tratado, mismo en cual las larvas alcanzaron la fase de pupa (Figura 20).

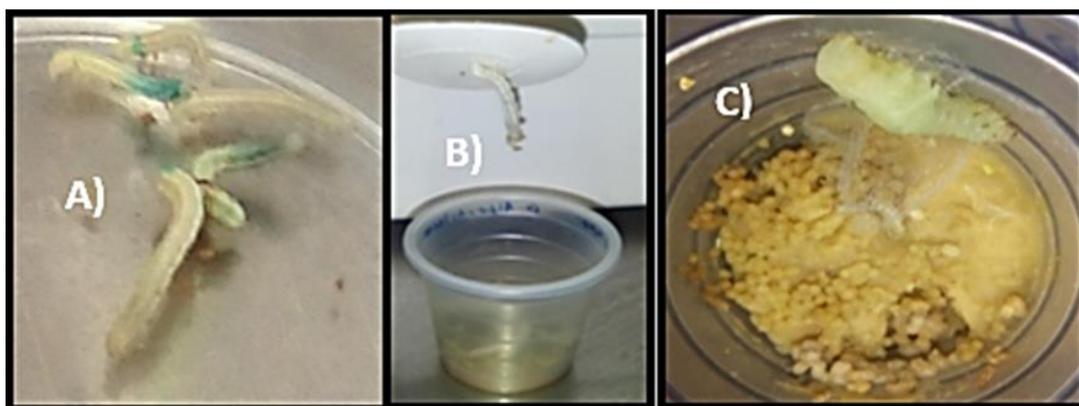


Figura 20. Etología y sintomatología de larvas de *T. ni* de tercer estadio; Administración de ARNi mediante gota (A), larvas sometidas al tratamiento ARNi+AcMNPV (B), respecto al control no tratado (C).

7.8 Análisis de la susceptibilidad de *T. ni* al AcMNPV tras inhibir el transcrito de *gloverina*.

En el bioensayo con dieta artificial, utilizando como tratamientos ARNi, ARNi+AcMNPV y AcMNPV (CL_{25}) 6×10^6 , donde larvas neonatas fueron expuestas en un lapso de 168 h, la cantidad de larvas vivas y muertas fue registrada cada 24 h, para su análisis estadístico y determinar de esta forma la susceptibilidad de *T. ni* al AcMNPV mediante la inhibición del gen de *gloverina* por ARNi.

Transcurridas las primeras 24, 48 y 72 h la eficiencia del tratamiento del ARNi+AcMNPV mostró el mayor porcentaje de larvas muertas con 15.5, 15.5 y 17.7 % respectivamente (Figura 21), además de ser significativamente diferente respecto al tratamiento con ARNi, AcMNPV y el control no tratado. Cabe señalar que morfológicamente las larvas tuvieron un reblandecimiento y ruptura de la cutícula,

así mismo la adhesión del cuerpo en posición de V invertida, aunado a la disminución en la alimentación (Figura 22).

Se observó un aumento en la mortalidad por parte del AcMNPV, a partir de las 120 h con un 88%, pero no existió diferencia significativa entre este tratamiento en comparación con el ARNi + AcMNPV. El tratamiento del ARNi únicamente mostro mortalidad en las primeras 24 h, con un 4.4% de mortalidad, por el contrario, el control no tratado no mostro muertes; cabe mencionar que las larvas en estos dos últimos casos exhibieron tegumento sin daño, aunado a un mayor tamaño y la alimentación fue recurrente (Figura 23).

En el transcurso de las 24 a 72 h, hubo diferencia significativa entre los tratamientos, a partir de las 96 a las 168 h del experimento, los tratamientos muestran una alta diferencia significativa, al tener una ANOVA de ≤ 0.01 (Tabla 8).

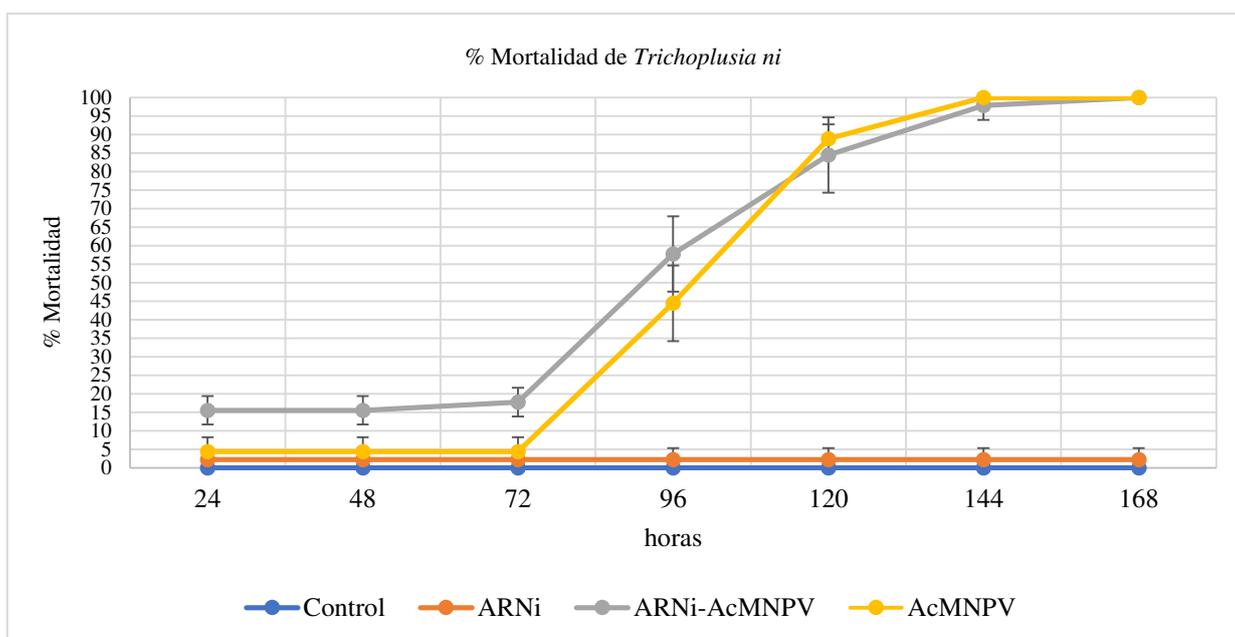


Figura 21. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *Trichoplusia ni* al ser expuestas a los tratamientos de ARNi, ARNi+AcMNPV y AcMNPV durante el monitoreo de 24 - 168 h.

Tabla 8. Efecto de los tratamientos en la mortalidad y sobrevivencia de larvas neonatas de *T. ni* en un periodo de 24 a 168 h.

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
24 horas	Entre grupos	9.667	3	3.222	12.889	≤0.01
	Dentro de grupos	2.000	8	.250		
	Total	11.667	11			
48 horas	Entre grupos	9.667	3	3.222	12.889	≤0.01
	Dentro de grupos	2.000	8	.250		
	Total	11.667	11			
72 horas	Entre grupos	12.917	3	4.306	17.222	≤0.01
	Dentro de grupos	2.000	8	.250		
	Total	14.917	11			
96 horas	Entre grupos	174.917	3	58.306	46.644	≤0.01
	Dentro de grupos	10.000	8	1.250		
	Total	184.917	11			
120 horas	Entre grupos	494.917	3	164.972	219.963	≤0.01
	Dentro de grupos	6.000	8	.750		
	Total	500.917	11			
144 horas	Entre grupos	645.667	3	215.222	1291.333	≤0.01
	Dentro de grupos	1.333	8	.167		
	Total	647.000	11			
168 horas	Entre grupos	660.250	3	220.083	2641.000	≤0.01
	Dentro de grupos	.667	8	.083		
	Total	660.917	11			

La prueba de Tukey permitió esclarecer la eficiencia del ARNi como facilitador de susceptibilidad a la infección por Baculovirus, mostro estadísticamente ser significativo tras tener una mortalidad en los insectos en un menor intervalo de tiempo, finalmente tuvo un detrimento en su efecto y una misma significancia que el tratamiento con virus sin el interferente, siendo ambos significativos en la muerte de gusano falso medidor a partir de las 96 a 168 h (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto en la mortalidad por parte de los tratamientos ARNi, ARNi-AcMNPV y AcMNPV, en un lapso de 168 h.

Mortalidad 24 a 72 horas				Mortalidad 96 a 168 horas			
HSD Tukey ^a				HSD Tukey ^a			
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa=0.05		Tratamiento	N	Subconjunto para alfa= 0.05	
		1	2			1	2
Control	3	.00		Control	3	.00	
ARNi	3	.33		ARNi	3	.33	
AcMNPV	3	.67		AcMNPV	3		15.00
ARNi/AcMNPV	3		2.67	ARNi/AcMNPV	3		15.00
Sig.		.414	1.000	Sig.		.525	1.000

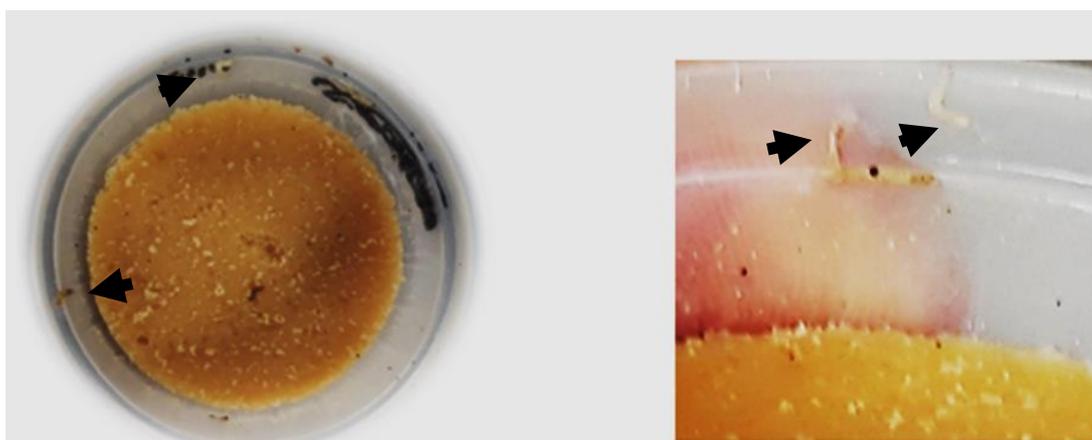


Figura 22. Etología y morfología en la mortalidad de *T.ni* al ser expuesta al AcMNPV mediante la respuesta inmune con ARNi.

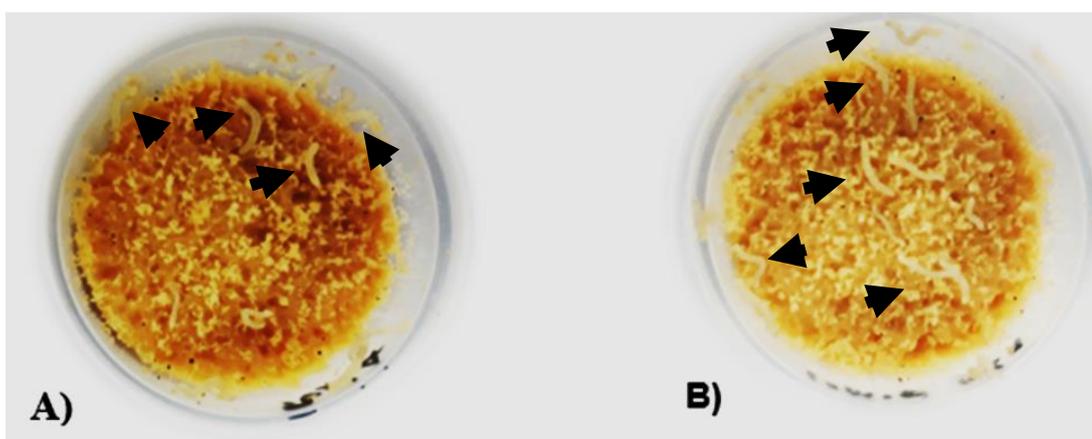


Figura 23. Morfología y desarrollo de *T.ni*, A) ARNi y B) control no tratado

8. DISCUSIÓN

Las pérdidas en cultivos de interés económico ocasionadas por factores ambientales se ven incrementadas por la existencia de enfermedades vegetales y el incremento de las poblaciones de insectos plaga.

El uso constante de insecticidas de origen químico y biológico ha ocasionado el fenómeno de aparición de poblaciones de insectos plaga resistentes; este fenómeno se ha presentado paralelamente en la aplicación de los planes de manejo integrado de plagas debido a la disminución de susceptibilidad de las poblaciones de insectos a la infección por organismos y entidades como entomopatógenos utilizados para el control biológico (virus, bacterias, hongos, nematodos y protozoarios), de los cuales el baculovirus AcMNPV se ha utilizado en el país como agente para regular las poblaciones de *T. ni*.

Durante la evolución, los insectos han desarrollado un complejo y efectivo sistema de inmunidad innata, aparentemente diferente al sistema inmune adquirido de los vertebrados. El mecanismo de la selección clonal en los insectos no es evidente ya que no existe memoria, los mecanismos de defensas son rápidos y permanecen por pocos días y promueven una resistencia fuerte contra las infecciones.

La respuesta inmune ante baculovirus puede ser de dos tipos: **Celular**, mediante el reconocimiento y encapsulación de células infectadas, o **Humoral**, mediada por diferentes vías de señalización que activan a la actividad de la FO. La expresión de péptidos antivirales como gloverina, cecropina y proteínas paralizantes de unión a péptido o una inhibición subcelular, mediante ARN de interferencia o la inducción de apoptosis de células infectadas (Cory y Myers, 2003; Sparks *et al.*, 2008).

Los péptidos antimicrobianos son típicamente compuestos de menos de 200 aminoácidos, jugando un papel en el combate contra infecciones de bacterias y hongos (Jiang *et al.*, 2011). Mayoritariamente son proteínas anfipáticas y poseen un alto número de aminoácidos cargados positivamente que interactúan con fosfolípidos de las membranas microbiales que están cargados negativamente (Peters *et al.*, 2010). Una vez unidos los péptidos incrementan la permeabilidad de la membrana, permitiendo el flujo de iones causando la muerte celular (Ganz, 2003).

Entre las proteínas antimicrobianas que han sido aisladas de hemolinfa de insectos se encuentra la gloverina (Axen *et al.*, 1997; Mackintosh *et al.*, 1998; Lundström *et al.*, 2002;). La investigación realizada por Etebari *et al.*, (2011) sugiere que la expresión de gloverina es aumentada en *Plutella xylostella* parasitada por una avispa de la familia Ichneumonidae que alberga un polidnavirus. Sin embargo, existe poca información referente al papel que desempeñan los péptidos antimicrobianos ante las infecciones virales (Brown *et al.*, 2009)

El gen utilizado para la construcción del sistema de expresión fue elegido en base a estudios previos realizados por Xu *et al.*, (2014), quienes caracterizaron las vías expresión del gen *PxGlo* en *Plutella xylostella*, determinando la relación que existe en la sobreexpresión de gloverina ante la presencia de bacterias entomopatógenas, posteriormente al implementar ARNi contra el transcrito del péptido antimicrobiano, aumento la susceptibilidad a Bt y *Serratia marcescens*.

El plásmido de expresión L4440 fue usado para obtener los ARNdc. Las Células HT115 fueron utilizadas, ya que codifican para RNasa III (*rnc14*), permitiendo la acumulación ARN de doble cadena, expresando la T7 ARN polimerasa con IPTG.

El vector posee dos promotores T7 en posición invertida conduciendo a la producción de ARNdc. De acuerdo con Ongvarrasopone *et al.*, (2007), la inducción se debe realizar a una densidad óptica de 0.6 nm, obteniendo una banda cercana a los 700 pb a una concentración de 840 ng/μL.

Tras cuantificar las concentraciones de ARNdc obtenido mediante el sistema HT115 se observaron cantidades inferiores a las obtenidas *in vitro* Romo-Quíñonez, 2014 para el gen *wsv151* del virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) del camarón, obteniendo un promedio de 958 ng/μL de ARNdc.

Según lo reportado por Kim *et al.*, (2015), una concentración de 350 ng/μL fue suficiente para producir actividad máxima insecticida mediante la alimentación con *E. coli* transformada e inducida, por lo que las concentraciones obtenidas en este trabajo fueron lo suficiente para realizar los bioensayos.

Sin embargo, comparando estas con las de algunos otros estudios como los de Ongvarrasopone *et al.*, (2007) y Zhang *et al.*, (2010), en los que las concentraciones iban desde 4 μg/μL hasta 30 μg/μL, si lo que se pretende es la producción a una mayor escala, los valores obtenidos en esta investigación resultan bajos, por ello se

debe de trabajar en la optimización de la inducción para lograr la obtención de una mayor concentración de ARN de doble cadena, que pueda ser utilizado en laboratorio y campo, además de resultar más económico.

Los resultados del análisis de la actividad FO, tras ser las larvas expuestas a los tratamientos, durante un lapso de 72 h, permitieron observar el comportamiento en la respuesta inmune, en los cuales hubo un incremento en los tratamientos con AcMNPV y AcMNPV+RNAi, por el contrario, existe la disminución con el ARNi (Figura 17).

En el bioensayo donde la exposición fue durante 24 h no hubo disminución o un cambio significativo en la actividad FO respecto al control no tratado (Figura 16), lo cual indicaría que el mecanismo de acción del ARNdc requiere un periodo mayor de tiempo.

Se ha demostrado que el sistema de FO desempeña una función importante en las reacciones de encapsulación y nodulación de los animales de invertebrados que son vitales en la defensa contra diferentes parásitos, como bacterias, hongos, protozoos y parasitoides (Lu *et al.*, 2014); un ejemplo es la investigación realizada por Binggeli *et al.*, (2014), en el cual se redujeron las defensas mediante ARNi bloqueando los genes PPO1 y PPO2 (involucrados en la FO) de *Drosophila melanogaster*, generando mayor susceptibilidad a bacterias gram positivas y hongos.

En la actualidad se discute el papel de la FO en la inmunidad de insectos contra la infección viral. Por ejemplo, experimentos con la polilla india *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) y los granulovirus (Baculoviridae) han demostrado que la actividad de la PO no afecta la resistencia del huésped al virus (Saejeng, 2010).

Por otra parte, McNeil *et al.*, (2010), han demostrado que la acumulación intensiva de PFO durante la respuesta antiviral en larvas *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Erebidae). Sin embargo, la actividad de FO (activada a partir de PFO) no fue significativamente diferente en comparación con las larvas no infectadas. Por lo tanto, el papel de la actividad de la FO en la resistencia de los insectos contra los baculovirus es todavía especulativo.

A manera de comprobar la eficiencia del ARNi sobre la expresión del gen que codifica el péptido gloverina, la cual es una proteína antiviral y antibacteriana, catiónica cuya expresión se induce en los hemocitos y células de grasa corporal de larvas de *T. ni* expuestas al AcMNPV, fue realizado el análisis mediante qPCR.

Los resultados del Ct comparativo en el bioensayo realizado durante 72 h, mostraron una disminución en la expresión relativa de gloverina en el tratamiento del ARNi, comparado con el control y ARNi+AcMNPV, ambos con los niveles más bajos de expresión relativa, siendo 2^{-DDCt} 0.28 y 1.04, respectivamente (Figura 19). En el bioensayo de exposición de 24 h, los resultados del tratamiento ARNi+AcMNPV comparado con el AcMNPV y ARNi, respecto al control no tratado, fueron de 2^{-DDC} 0.72 y 0.44 respectivamente (Figura 18).

Los bioensayos de mortalidad con larvas neonatas permitieron el análisis del papel del ARNi, para mediar la susceptibilidad de *T. ni* al baculovirus, el comportamiento de las mortalidades en un periodo de 168 h, indico que el ARNi+AcMNPV, presentó un mayor porcentaje de larvas muertas en los primeros tres días del experimento (17.7% de mortalidad) en comparación con el resto de los tratamientos realizados en dieta artificial.

Los cambios morfológicos, etológicos y del desarrollo de los insectos, al ser infectados con el baculovirus en este experimento, muestran relación con lo reportado por Ibarra *et al.*, (2006), quienes proponen que la sintomatología, en la cual los movimientos son más lentos, las larvas dejan de comer y el crecimiento se detiene. También se observa un cambio de color del integumento y el reblandecimiento de este, el cual se torna blanquecino. Finalmente, la larva muerta queda colgando generalmente de las protopatas en una posición de V invertida.

Por último, cabe señalar, que esta investigación representa una estrategia para incrementar el biocontrol de insectos plaga como blanco, al reducir su respuesta inmune a la infección por entomopatógenos.

9. CONCLUSIONES

1. La clonación del transcrito del péptido antimicrobiano *gloverina* se subclonó en el vector L4440 y se obtuvo la producción de ARNdc en la cepa de *E. coli* HT115.
2. La actividad FO no se afectó por la interferencia del gen *gloverina*, pero permitió detectar los cambios en la respuesta inmune tras la interacción de las larvas de *T. ni* con el AcMNPV.
3. La administración de ARNdc en larvas de *T. ni* de tercer estadio, redujo la expresión del transcrito que codifica para *gloverina* a las 24 y 72 h posteriores a su aplicación.
4. La inhibición de *gloverina* por ARNdc incrementó la susceptibilidad de *T. ni* al AcMNPV a una CL_{25} de 6×10^6 CO/cm² de dieta, en larvas neonatas, después de 24 h.
5. La inhibición de *gloverina* por ARNdc incrementó la mortalidad de *T. ni* al exponerse al AcMNPV, transcurridas las 72 h del tratamiento con ARNi+AcMNPV.

10.PERSPECTIVAS

1. La producción del ARNdc del gen *gloverina*, pretende servir de plataforma biotecnológica, para la implementación en pruebas de campo en la agricultura, como una medida de la regulación de las pérdidas de cultivos ocasionadas por el gusano falso medidor, permitiendo una ventaja inmunológica ante la infección por AcMNPV.
2. Optimizar las condiciones de inducción y extracción de ARNdc de la cepa de *E. coli* HT115, para la obtención de una mayor cantidad.
3. Generar un formulado que evite su degradación en el agua y que contenga un atrayente para una mayor ingestión en las larvas.

11.BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad I, F Ahmd, J Pichtel. 2011. Microbes and microbial technology: agricultural and environmental applications. Springer Science Business Media LLC. pp. 415-430.
- Axen A, A Carlsson, Å Engström, H Bennich. 1997. Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora pupae*. Eur. J. Biochem. 247: 614–619.
- Andaló V, V Santos, G Moreira, C Moreira, A Moino. 2010. Evaluation of entomopathogenic nematodes under laboratory and greenhouses conditions for the control of *Spodoptera frugiperda*. Ciência Rural, 40: 1860-1866.
- Ardisson-Araujo DM, GF Rohrmann, BM Ribeiro, RJ Clem. 2015. Functional characterization of hesp018, a baculovirus-encoded serpin gene. J. Gen. Virol, 96: 1150-1160.
- Bao W, B Cao, Y Zhang. 2016. Silencing of *Mythimna separata* chitinase genes via oral delivery of in planta-expressed RNAi effectors from a recombinant plant virus. Biotechnol Lett, 38 (11): 1961-1966.
- Binggeli O, C Neyen, M Poidevin, B Lemaitre. 2014. Prophenoloxidase activation is required for survival to microbial infections in *Drosophila*. PLoS Pathog. 10: e1004067 doi: 10.1371/journal.ppat.1004067
- Brown SE, A Howard, AB Kasprzak, KH Gordon, PD East. 2009. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. Insect Biochem. Mol. Biol. 39(11):792–800.
- Bryant B, RJ Clem. 2009. Caspase inhibitor P35 is required for the production of robust baculovirus virions in *Trichoplusia ni* TN-368 cells. J. Gen. Virol., 90:654-661.
- Bulet P, C Hetru, JL Dimarcq, D Hoffmann. 1999. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immun., 23: 329–344.
- Cao H, ZY Li, QX Wang. 2009. The progress of research on *Drosophila* innate immunity. Chinese Bull. Entomol. 46: 196-201.

- Cerenius L, S Kawabata, BL Lee, M Nonaka, K Söderhäll. 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends Biochem Sci*, 35:578–583.
- Chen E, D Kolosov, MJ O'Donnell, MA Erlandson, JN McNeil, C Donly. 2018. The effect of diet on midgut and resulting changes in infectiousness of *AcMNPV* baculovirus in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Front. Physiol.* 9:13048.
- Chernysh S, N Gordya, T Suborova. 2015. Insect antimicrobial peptide complexes prevent resistance development in bacteria. *PLoS ONE*, 10: e0130788.
- Clem RJ, AL Passarelli. 2013. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. *PLoS Pathogens*, 9(11): 1-4
- Cory JS, JH Myers. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Ann. Rev. Ecol. Evol.Sys.*, 34(1):239–272.
- Dai H, L Ma, J Wang, R Jiang, Z Wang, J Fei. 2008. Knockdown of ecdysis-triggering hormone gene with a binary UAS/GAL4 RNA interference system leads to lethal ecdysis deficiency in silkworm. *Acta Bioch. Biophys. Sin.*, 40(9): 790-795.
- Dean P, U Potter, EH Richards, JP Edwards, AK Charnley, SE Reynolds. 2004. Hyperphagocytic haemocytes in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.*, 50: 1027-1036.
- Del Rincon MC y JE Ibarra. 2003. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de nucleopoliedrovirus patógenas a *Trichoplusia ni* (Lepidóptera: Noctuidae) en México, y su potencial como agentes de control. *Memorias del XXVI Congreso de Control Biológico*. Guadalajara, Jal. pp. 311-314.
- Eleftherianos I, C Revenis. 2011. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *J. Innate Immun.*, 3:28–33.
- Etebari K, RW Palfreyman, D Schlipalius, LK Nielsen, RV Glatz, S Asgari. 2011. Deep sequencing-based transcriptome analysis of *Plutella xylostella* larvae parasitized by *Diadegma semiclausum*. *BMC Genom.*, 12: 446.
- Fang Q, Wang L. Zhu J. Li Y. Song Q. Stanley D. Akhtar Z. Ye G. 2010. Expression of immune response genes in lepidopteran host is suppressed by venom from and endoparasitoid, *Pteromalus puparum*. *BMC Genom.* 11.484.
- Fire AZ, SQ Xu, K Montgomery, M Kostas, SA Driver, S Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391: 806-11. 10.1038/35888.

- Freitag D, CW Wheat, DG Heckel, H Vogel. 2007. Immune system responses and fitness costs associated with consumption of bacteria in larvae of *Trichoplusia ni*. *BMC Biol.*, 5:56.
- Ganbaatar O, BC Zhang, Y Bao, D Bao, W Wuriyanghan. 2017. Knockdown of *Mythimna separata* chitinase genes via bacterial expression and oral delivery of RNAi effectors. *BMC Biotechnol.*, 17 (9): 1-11.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 3 (9): 710–720.
- Ghanim M, S Kontsedalov, H Czosnek. 2007. Tissue specific silencing by RNA interference in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37: 732-738.
- Gerdin P. 2005. Control Biológico, una herramienta en la agricultura nacional. Centro de Desarrollo Medioambiental Universidad Central. [Online]. Disponible en: <http://www.sustentable.cl/portada/Reportajes/4516.asp>
- Granados RR, KA Lawler. 1981. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*, 108: 297-308.
- Griebler M, SA Westerlund, KH Hoffmann, M Meyering. (2008). RNA interference with the allatonegulating neuropeptide genes from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* and its effects on the JH titer in the hemolymph. *J. Insect Physiol.*, 54: 997–1007.
- Gross CH, RL Russell, GF Rohrmann. 1994. *Orgyia pseudotsugata* baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. *J. Gen. Virol.*, 75 (5): 1115-1123.
- Guardián G, C Sibaja. 2003. Manual para el control de plagas en plantas procesadoras de alimentos para el consumo humano. Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección de Salud Animal Departamento de Servicios Zoonosológicos Internacionales Inspección de Carnes Costa Rica. Cry1A. pp 46-48.
- Hannon G. 2002. RNA interference. *Nature.*, 418(6894): 244-251.
- Haase S, L Ferrelli, M Pidre, V Romanowski. 2013. Genetic engineering of Baculovirus. In: *Current Issues In Molecular Virology: Viral Genetics and Biotechnological Applications*. Romanowski V. (eds). IntechOpen: United Kingdom, pp. 79-111.

- Hwang J, Y Kim. 2011. RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 108: 194-200.
- Hebert CG, JJ Valdes, WE Bentley. 2009. In vitro and in vivo RNA interference mediated suppression of *Tn-Caspase-1* for improved recombinant Protein production in High Five™ cell culture with the baculovirus expression vector system. *Biotechnol. Bioeng.*, 104: 390-399.
- Hesketh H, RS Hails. 2015. *Bacillus thuringiensis* impacts on primary and secondary baculovirus transmission dynamics in Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.*, 132: 171-181
- http://viralzone.expasy.org/13?outline=all_by_species, accesado el 13 de Sept. 2017
- Ibarra JE, MA Del Rincón, E Galindo, M Patiño, L Serrano, R Garcia, JA Carrillo, B Pereyra, A Alcázar, H Luna, L Galán, L Pardo, C Muñoz, I Gomez, M Soberon, A Bravo. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 48 (2): 113-120.
- Imler JL. 2014. Overview of *Drosophila* immunity: a historical perspective. *Dev. Comp. Immunol.* 42: 3-15.
- Jehle JA, GW Blissard, BC Bonning, JS Cory, EA Herniou, GF Rohrmann, DA Theilmann, SM Thiem, JM Vlak. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.*, 151: 1257-1266.
- Jiang H, A Vilcinskis, M Kanost. 2011. Immunity in lepidopteran insects. *Invert. Immun.*, 181–204.
- Katoch R, N Thakur. 2012. Insect gut nucleases: a challenge for RNA interference mediated insect control strategies. *International J. Biochemis. Biotechnol.*, 1 (8): 198-203.
- Kim E, Y Park, Y Kim. 2015. A transformed bacterium expressing double-stranded RNA specific to integrin B1 enhances Bt toxin efficacy against a polyphagous insect pest, *Spodoptera exigua*. *Plos one*, 10 (7): e0132631. doi:10.1371/journal.pone.0132631.
- Kumar M, GP Gupta, MV Rajam. 2009. Silencing of acetylcholinesterase gene of *Helicoverpa armigera* by siRNA affects larval growth and its life cycle. *J. Insect Physiol.* 55:273–278.

- Lu A, Q Zhang, J Zhang, B Yang, K Wu, W Xie. 2014. Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. *Front. Physiol.*, 5: 252
- Lundström A, G Liu, D Kang, K Berzins, H Steiner. 2002. *Trichoplusia ni* gloverin, an inducible immune gene encoding an antibacterial insect protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32 (7): 795–801.
- Mackintosh JA, AA Gooley, PH Karuso, AJ Beattie, DR Jardine, DA Veal. 1998. A gloverin-like antibacterial protein is synthesized in *Helicoverpa armigera* following bacterial challenge. *Dev. Comp. Immunol.*, 22: 387–399.
- Makarova O, P Johnston, A Rodriguez-Rojas, B El Shazely, JM Morales, J Rolff. 2018. Genomics of experimental adaptation of *Staphylococcus aureus* to a natural combination of insect antimicrobial peptides. *Sci. Rep.*, 8: 15359.
- Martínez AM, S Pineda, I Figueroa, JM Chavarrieta, T Williams. 2012. Los baculovirus como bioinsecticidas: evaluación de un nucleopoliedrovirus para el combate de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae en Mexico y Honduras). *Cien. Nicola.*, 56: 35-47
- McCarthy C., Theilmann. D. 2008. AcMNPV ac 143 is essential for ating budded virus production and is 30th baculovirus core gene. *J. Virol.*, 375 (1): 277-291.
- McNeil J, D Cox-Foster, J Slavicek, K Hoover. 2010. Contributions of immune responses to developmental resistance in *Lymantria dispar* challenged with baculovirus. *J. Insect Physiol.*, 56:1167–1177.
- Medina P, FM Fernández. 2014. Observaciones sobre los mecanismos de defensa de los insectos. *Act. Zoológ. Lill.*, 58 (1): 17-43.
- Meng X.Q, LZ Guhuhi, DZ Chuan, HW Fang, Y Chang. 2017. A cell clone strain from *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) highly susceptible to *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (AcMNPV) and *M. separata* NPV (MsNPV). *In Vitro Cel. Develop. Biol. Animal.*, 53(7): 646-650.
- Moir M, A Szito. 2008. Cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) Pest Datasheet/Pest Risk review for the cotton and horticultural industry. Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia. pp. 43.

- Moreno DA, IM Biglang, DA DD Luu, P Garcia, PMM Weers, EJ Hass. 2012. Inactivation of the budded virus of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus by gloverin. *J. Invertebr. Pathol.*, 110 (1): 92-101.
- Nandety RS, YW Kuo, S Nouri, BW Falk. 2015. Emerging strategies for RNA interference (RNAi) applications in insects. *Bioenginee.*, 6(1): 8-19.
- Nappi AJ, BM Christensen. 2005. Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: applications to insect innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 443-459.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. 1990. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*. 2: 279- 289.
- Nava E, C García, JR Camacho, EL Vázquez. 2012. Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai* 8(3): 17-29.
- Ojeda Z, RJ Rocha, H Calvache. 2002. Baculovirus como insecticida biológico. *Palmas*. 23 (4): 27-37.
- Ohkawa T, JO Washburn, R Sitapara, E Sid, LE Volkman. 2005. Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes *Ac119* and *Ac022* but not by *Ac115*. *J Virol*. 79, 15258-15264.
- Olszewski J, LK Miller. 1997. Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation. *J. Virol.*, 71(7):5040-50.
- Orozco-Flores AA, JA Valadez., B Oppert, R Gomez, R Tamez, C Rodríguez, P Tamez. 2017. Regulation by gut bacteria of immune response, *Bacillus thuringiensis* susceptibility and hemolin expression in *Plodia interpunctella*. *J. Insect Physiol.*, 98: 275–283.
- Ortiz-Quintero B. 2009. RNA de interferencia: Origen y aplicación en el silenciamiento de genes. *Rev. Investigac. Clín.*, 61(5): 412-427.
- Ourth D, T Locky, HE Renis. 1994. Inducción de actividad antibacteriana similar a cecropina y antibacteriana, pero no antiviral en larvas de *Heliothis virescens* *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 12: 200-1.

- Ongvarrasopone C, Y Roshorm, S Panyim. 2007. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in vertebrates. *ScienceAsia.*, 33: 35-39.
- Papic L, K Garcia, J Romero. 2015. Avances y limitaciones en el uso de los dsRNA como estrategias del control y prevencion de enfermedades virales en sistemas acuícolas. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 43 (3): 388-40
- Peng KE, W Minzhi, D Fei, S Jingjiao, D Chunsheng, W Hualin, H Zhihong. 2010. Identification of protein–protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 91:659-670
- Pest Management Research Centre. 2000. Baculoviruses as microbial pest control agents: potential benefits of biotechnology. Agriculture & Agfri - Food Canada Publication. Ontario, Canada. 10.
- Peters W. 1992. Peritrophic Membranes. Springer, Berlin. pp. 1-6.
- Peters BM, ME Shirtliff, MA Jabra. 2010. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs. *PLoS Path.*, 6 (10): e1001067.
- Possee R, C Griffiths, R Hitchman, A Chambers, F Murguiameca, J Danquah, A Jeshtadi, L King. 2010. Baculoviruses: Biology, replication and exploitation. In: *Insect virology*. Caister Academic Press. Gran Bretaña. pp. 35-57.
- Ran R, T Li, X Liu, H Ni, W Li, F Meng. 2018. RNA interference-mediated silencing of genes involved in the immune responses of the soybean pod borer *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae). *PeerJ*, 6: 1-19.
- Rios-Velasco C, G Gallegos-Morales, MC Del Rincón-Castro, E Cerna-Chávez, SR Sánchez-Peña, MC Siller. 2012. Insecticidal activity of native aislates of *Spodopters frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus from soil samples in Mexico. *Fla. Entomol.* 94 (3): 716-718.
- Rodrigues TB, LK Rieske, JJ Duan, K Mogilicherla, SR Palli. 2017. Development of RNAi method for screening candidate genes to control emerald ash borer, *Agrilus planipennis*. *Sci Rep*, 7(1): 1-8.
- Rohrmann GF. 2008. *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fci?book=bacvir>
- Rohrmann, G. 2013. *Baculovirus Molecular Biology*. 3ra edición. www.ncbi.nlm.nih.gov/Books/NBK49500/

- Rolff J, SE Reynolds. 2009. Insect Infection and Immunity: Evolution, Ecology and Mechanisms. Oxford Biology, United States. p. 241.
- Romano, N, G Macino. 1992. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. Mol. Microbiol., 6: 3343-3353
- Romo-Quiñonez, C.R. 2014. Diseño y construcción de un vector de dsRNA específico tipo hairpin expresado en la cepa de *Escherichia coli* HT115 (DE3) contra WSSV en camarón *Litopenaeus vannamei*. Centro de investigaciones Biológicas del Noreste, S.C. Tesis de Maestría. p. 83.
- SAGAR. 2000. Guía de Plaguicidas Autorizados de uso Agrícola. Dirección General de Sanidad Vegetal. Celaya, Gto. p.504.
- Saejeng A, H Tidbury, MT Siva-Jothy, M Boots. 2010. Examining the relationship between hemolymph phenoloxidase and resistance to a DNA virus, *Plodia interpunctella* granulosis virus (*PiGV*). J. Insect Physiol. 56:1232–1236.
- Salvador, R. 2010. Caracterización biológica y molecular de genes involucrados en la virulencia de baculovirus de importancia agronómica. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Shu YH, JW Wang, K Lu, JL Zhou, Q Zhou, GR Zhang. 2011. The first vitellogenin receptor from a Lepidopteran insect: molecular characterization, expression patterns and RNA interference analysis. Insect Mol. Biol., 20: 61–73.
- Sparks WO, LC Bartholomay, BC Bonning. 2008. Insect immunity to viruses. In: Insect Immunology, Beckage, NE. (Eds) Elsevier: San Diego, CA. pp 209-242.
- Sarfraz RM, V Cervantes, JH Myers. 2010. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) increases susceptibility to a nucleopolyhedrovirus. J. Invertebr. Pathol., 105: 204-206
- Tamez-Guerra P, G Damas, M Iracheta, B Oppert, R Gomez, C Rodríguez. 2006. Differences in susceptibility and physiological fitness of mexican field *Trichoplusia ni* strains exposed to *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol., 99(3): 937 – 945.
- Tamez-Guerra P, JA Valadez, JM Alcocer, R Gomez, C Rodríguez. 2008. Detection encoding antimicrobial peptides in Mexican strains of *Trichoplusia ni* exposed to *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol., 92(2): 218-227.

- Tanaka H, J Ishibashi, K Fujita, Y Nakajima, A Sagisaka, K Tomimoto, N Suzuki, M Yoshiyama, Y Kaneko, T Iwasaki. 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1087-1110.
- Timmons L, DL Court, A Fire. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene.*, 263(1-2):103-12.
- Terenius O, A Papanicolaou, JS Garbutt, I Eleftherianos, H Huvenne, K Sriramana. 2010. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *J. Insect Physiol.*, 57(2): 231-245.
- Tovar H, N Bautista, J Vera, A Delia, S Ramirez. 2007. Fluctuación poblacional y parasitismo de larvas de *Copitarsia decolora* Guenée, *Plutella xylostella* L. y *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera) en *Brassica oleracea* L. *Acta Zool. Mex.* 23 (2): 183-196.
- Trudeau D, JO Washburn, LE Volkman. 2001. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *J. Virol.*, 75: 996-1003.
- Turner CT, MW Davy, RM MacDiarmid, KM Plummer, NP Birch, RD Newcomb. 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Mol. Biol.*, 15:383–391.
- Valadez-Lira JA. 2011. Modulación de la Inmunidad Innata del Lepidoptero plaga *Trichoplusia ni* (Hübner) expuesto a *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis de Doctorado. pp. 81.
- Vallet-Gely I, B Lemaitre, F Boccard. 2008. Bacterial strategies to overcome insect defences. *Nature Rev. Microbiol.*, 6: 302-313.
- Van Oers MM, JM Vlak. 2007. Baculovirus genomics. *Curr. Drug Targets.* 8 (10): 1051-68.
- Vizioli J, M Salzet. 2002. Review. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci.*, 23:494-6.
- Wang P, R Granados. 1997. An intestinal mucin is the target substrate for a Baculovirus enhancer. *PNAS.*, 94(13): 6977-6982.

- Wang Y, H Jiang. 2004. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 387-395.
- Wang Q, Y Liu, HJ He, XF Zhao, JX Wang. 2010. Immune responses of *Helicoverpa armigera* to different kinds of pathogens. *BMC Immunol.*, 11(1): 9.
- Williams T, C Virto, R Murillo, P Caballero. 2017. Covert infection of insects by baculoviruses. *Front. Microbiol.*, 8:1337. doi: 10.3389/fmicb.2017.01337
- Wynant N, D Santos, JV Broeck. 2014. Biological Mechanisms determining the success of RNA interference in insects. *Inter. Rev. Cell Mol. Biol.*, 312:139-166.
- Xu P, Y Liu, RI Graham, K Wilson, K Wu. 2014. Densovirus is a mutualistic symbiont of a global crop pest (*Helicoverpa armigera*) and protects against a baculovirus and Bt biopesticide. *PLoS Pathog.* 10: e1004490. doi: 10.1371/journal.ppat.1004490
- Yang S, LK Miller. 1999. Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J. Virol.*, 73: 3404-3409.
- Yasuhisa K. 2007. Current status and prospects on microbial control in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 181–186.
- Yi HY, M Chowdhury, YD Huang, XQ Yu. 2014. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98: 5807–5822.
- Zhang X, J Zhang, K Zhu. 2010. Chitosan/double-stranded RNA nonoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the african malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect mol. Biol.*, 19 (5): 683-693.
- Zhang Y, Y Zhang, M Fu, G Yin, RT Sayre, KK Pennerman, F Yang. 2018. RNA Interference to Control Asian Corn Borer Using dsRNA from a Novel *Glutathione-S-Transferase* Gene of *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. insect Scie.*, 18 (5): 16; 1-9.
- Zhao P, Z Lu, MR Strand, H Jiang. 2011. Antiviral, antiparasitic, and cytotoxic effects of 5,6-dihydroxyindole (DHI), a reactive compound generated by phenoloxidase during insect immune response. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41: 645-652.

- Zhao J, N Liu, J Ma, L Huang, X Liu. 2016. Effect of silencing CYP6B6 of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on its growth, development, and insecticide tolerance. *J. Econ. Entomol.*, 109(6): 2506-2516.
- Zou Z, SW Shin, KS Alvarez, V Kokoza, AS Raikhel. 2010. Distinct melanization pathways in the mosquito *Aedes aegypti*. *Immunity*, 32: 41-53.

12. RESUMEN BIOGRÁFICO

Gerardo Jair Flores Hernandez

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología

Tesis: SUSCEPTIBILIDAD DE *Trichoplusia ni* HÜBNER (LEPIDÓPTERA: NOCTUIDAE) AL VIRUS ENTOMOPATÓGENO AcMNPV, POR BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *gloverina*, MEDIANTE ARNi.

Campo de estudio: Biotecnología agrícola-control biológico

Datos personales: Nacido en Monterrey, N.L., México el 27 de Febrero de 1993, hijo de Nicol Flores Hernández.

Educación: Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado de Biólogo en 2016.

Experiencia profesional: Asistente de investigación y personal docente en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2013. Supervisor de calidad de alimentos percederos en 2016. Docente de tiempo completo en la Preparatoria 2 de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2019.



SUSCEPTIBILIDAD DE *Trichoplusia ni* (LEPIDÓPTERA: NOCTUIDAE; HÜBNER) AL VIRUS ENTOMOPATÓGENO *AcMNPV* POR BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE *GLOVERINA*, MEDIANTE ARNi

Flores Hernández Gerardo Jair^a, Tamez Guerra Patricia^a, Alcocer González Juan Manuel^a, Orozco Flores Alonso Alberto^a, Luna Cruz Itza Eloísa^a, Rodríguez Padilla Cristina^a, Ibarra Rendón Jorge E^b, Valadez Lira José Alberto^a

^aLaboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Pedro de Alba s/n. Ciudad Universitaria, C.P. 66451, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. ^bLaboratorio de Bioinsecticidas, Cinvestav Unidad Irapuato, Irapuato, Guanajuato, México.
gera_jair@hotmail.com

RESUMEN

El insecto plaga *Trichoplusia ni* en su estado larvario, puede ocasionar reducciones considerables en el rendimiento agrícola a causa de los daños que produce al alimentarse del follaje de cultivos de hortalizas y cucurbitáceas. La utilización de agentes de control biológico como los baculovirus ha resultado ser una herramienta efectiva por su rápido ciclo infectivo en lepidópteros en estado larvario. Para aumentar la efectividad de los baculovirus, el ARN de interferencia (ARNi) puede ser una tecnología potenciadora en el control de plagas de importancia agrícola, a través del silenciamiento selectivo de genes. Se evaluó el efecto del bloqueo de la expresión del péptido antiviral gloverina en la susceptibilidad y la respuesta inmune de *T. ni*. El silenciamiento mediante ARNi de gloverina tras 72 horas disminuyó un 72 % la expresión, y un 6 % la actividad Fenol Oxidasa (FO). Larvas neonatas sometidas a tratamientos en dieta artificial, mostraron que el ARNi en conjunto con el Nucleopolihedrovirus múltiple de *Autographa californica* (*AcMNPV*) aceleró la mortalidad en un menor intervalo de tiempo con un 17.7 % en las primeras 72 horas, en contraste con el *AcMNPV* sin interferente fue de 4.4%.

PALABRAS CLAVE: *Trichoplusia ni*, ARNi, *Escherichia coli* HT115, *AcMNPV*, Control Biológico

INTRODUCCIÓN

El gusano falso medidor, *Trichoplusia ni* Hübner, 1800-1803 (Lepidoptera: Noctuidae), es una plaga de hortalizas y cucurbitáceas que se distribuye desde Canadá hasta México, puede consumir tres veces su masa corporal diariamente. Una de las alternativas al uso de pesticidas químicos para el control de esta plaga son los baculovirus, virus entomopatógenos utilizados en control biológico principalmente de lepidópteros, su ciclo se presenta en el estado larvario, inicia cuando la larva se alimenta de los cuerpos de oclusión (CO), subsecuentemente la integración y replicación de su material genético, da inicio a la infección y disseminación a otros tejidos, finalmente ocasiona la muerte del insecto y expulsión al ambiente de los CO (Clem y Passarelli 2013).

Por otra parte la respuesta inmune de los insectos puede ser celular mediante el reconocimiento y encapsulación de células infectadas; o humoral, activada por diferentes receptores y vías de señalización que activan la actividad de la FO y la expresión de péptidos antimicrobianos entre ellos la gloverina una proteína catiónica antiviral que interactúa con las membranas, afectando



sus cargas, es inducida por las infecciones con baculovirus en los hemocitos y células del cuerpo graso de *T. ni*. Estudios realizados por Moreno *et al.* (2012), demostraron que la gloverina tiene un efecto por *AcMNPV*.

La importancia del presente estudio permitirá detectar si los cambios en la modulación del sistema de defensa en insectos durante los procesos infectivos con NPVs, podrían modificar la susceptibilidad al virus. Planteando como objetivo el evaluar el efecto de la interferencia de la expresión del gen del péptido antimicrobiano *gloverina*, mediada por ARNi, en la susceptibilidad de *T. ni* al virus entomopatógeno *AcMNPV*. Teniendo como hipótesis, que el bloqueo de la expresión del gen *gloverina* de *T. ni* mediada por ARNi, afecta la respuesta inmune del insecto e incrementa su susceptibilidad al baculovirus *AcMNPV*.

MATERIAL Y MÉTODOS

La producción de ARNi fue realizada, utilizando el gen previamente clonado en el vector pGEM®-T (Promega) y subclonado en el vector L4440. Los ARNi se produjeron en la cepa de *E. coli* HT115, siguiendo la metodología propuesta por Valadez-Lira, 2011 y Timmons *et al.* 2001.

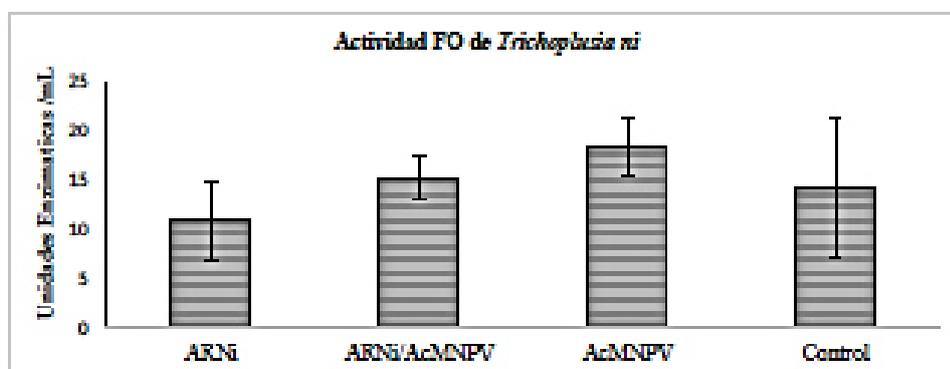
Se validó el bloqueo del gen de la gloverina por medio de ARNi se evaluó estimando la expresión relativa por qPCR mediante la fórmula el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando β -Actina como gen endógeno. El efecto en la susceptibilidad de *T. ni* a *AcMNPV* a una dosis de 6×10^6 de cuerpos de ocusión por cm^2 de dieta artificial, se expusieron larvas de tercer estadio de *T. ni* a los siguientes tratamientos: ARNi; *AcMNPV* y *AcMNPV*-ARNi, comparándolos con un control no tratado. Los análisis de expresión y respuesta inmune se determinaron después de 72 horas, la administración del ARNi fue en gota en combinación con un colorante alimentario y el *AcMNPV* se diseminó en la superficie de la dieta.

Para evaluar el efecto del ARNi de gloverina sobre la respuesta inmune de *T. ni*, se midió la actividad FO mediante la metodología propuesta por Orozco-Flores *et al.* 2017, la expresión relativa se estimó mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por qPCR.

En el efecto en la mortalidad, fueron utilizados los tratamientos descritos anteriormente, durante un periodo de 168 horas en larvas neonatas. A partir de la mortalidad se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el software SPSS versión 22; las diferencias significativas entre los tratamientos fueron estimadas mediante una prueba de Tukey estableciendo un límite de confianza de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la producción de ARNi en la cepa de *E. coli* HT115, se obtuvo dsARN del gen de gloverina a una concentración de 840 ng/ μ L. Posterior a realizar bioensayos con una exposición de 72 horas, los resultados de la FO indican un detrimento de la actividad del 6 % por parte del tratamiento mediante ARNi, por lo contrario hubo un aumento del 2 % con el *AcMNPV*+ARNi e igualmente con el *AcMNPV*, lo anterior respecto al control no tratado (Figura 1).



Los niveles de expresión de *Gloverina* son reducidos con el tratamiento de ARNi al ser comparado con el control, siendo un valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de 0.28, las larvas expuestas al AcMNPV expresaron 15 veces más el gen de la *gloverina* en comparación a las larvas no infectadas (Figura 2).

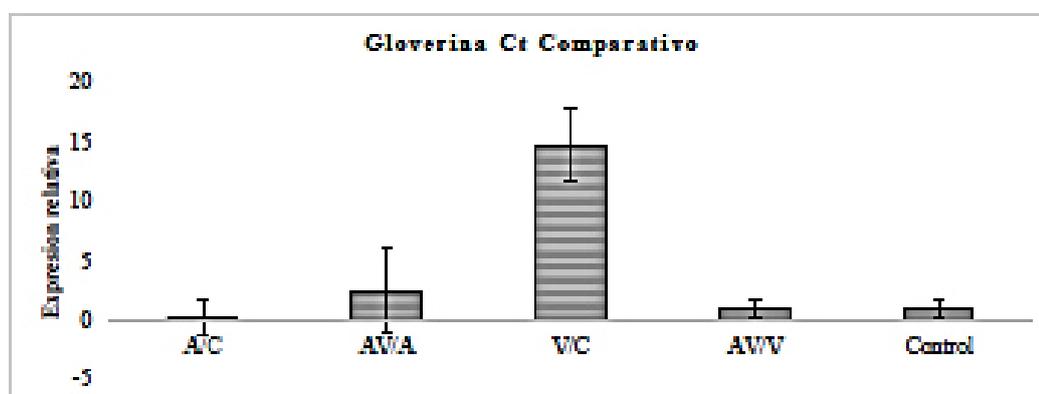
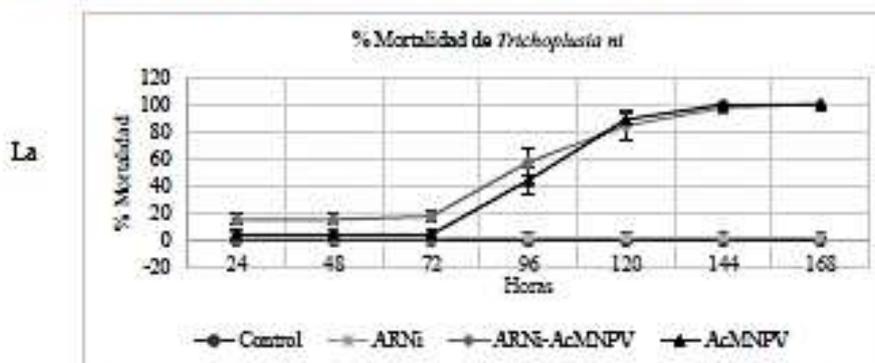


Figura 2. Expresión relativa del gen de *Gloverina* por qPCR (SYBR Green), en tratamientos con ARNi+AcMNPV (AV), AcMNPV (V), ARNi (A), respecto a un Control (C).

En el bioensayo de mortalidad, transcurridas las 72 horas el tratamiento del ARNi+AcMNPV mostro el mayor porcentaje de larvas muertas con 17.7 % (Figura 3), fue significativamente diferente respecto a los tratamiento con ARNi, AcMNPV y el control no tratado. Morfológicamente las larvas tuvieron un reblandecimiento y ruptura de la cutícula, así mismo la adhesión del cuerpo en posición de J característico a las infecciones con baculovirus, aunado a la disminución en la alimentación.

A partir de las 96 a las 168 horas del experimento, los tratamientos muestran una alta diferencia significativa, al tener un nivel de significancia del 0.001. El AcMNPV tuvo un aumento en la

mortalidad, a partir de las 120 horas con un 88 %, no existió diferencia significativa en comparación con el ARNi + AcMNPV. Las larvas en los casos del ARNi y control exhibieron tegumento sin daño, un mayor tamaño y la alimentación fue recurrente.



protección de los insectos a la infección por baculovirus se lleva a cabo por barreras físicas y fisiológicas, como el pH, proteasas y lipasas en el intestino. Además de una respuesta inmune que puede ser de dos tipos: Celular, mediante el reconocimiento y encapsulación de células infectadas, o humoral, mediada por diferentes vías de señalización que desencadenan el mecanismo de la actividad de la FO; así también, la defensa se manifiesta por el reconocimiento de distintos patógenos y desencadena mecanismos de transducción de señales para la expresión de péptidos antimicrobianos (Sparks *et al.* 2008; Cory y Myers 2003).

Los resultados del análisis de la actividad FO y expresión relativa de la gloverina, de las larvas expuestas a los tratamientos, permiten esclarecer el comportamiento de la respuesta inmune, existiendo la disminución posterior a la exposición a los tratamientos que involucran al ARNi (Figura 1 y 2). La modulación en la susceptibilidad tras bloquear el transcrito del péptido antimicrobiano, se vio reflejada en los bioensayos de mortalidad, ya que en las primeras 72 horas la infección con el AcMNPV en combinación con el interferente genero el mayor porcentaje de mortalidad (Figura 3), ya que tras la disminución de la actividad de la gloverina se evitan los cambios conformacionales en la estructura del baculovirus al interactuar con la superficie de las células del insecto (Xu *et al.* 2015).

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización del proyecto. Al laboratorio de Inmunología y Virología, a la Unidad de Formulación de Biológicos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, por brindar la infraestructura y material de trabajo. Al Dr. Alberto Valadez, Dra. Patricia Tamez y M.C. Alonso Orozco, por el asesoramiento y revisión de este proyecto.

LITERATURA CITADA

- Clam RJ, Passarelli AL. 2013. Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects. PLoS Pathogens, 9(11): 1-4.
- Cory JS and Myers JH. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 34(1):239-272.



LA SOCIEDAD MEXICANA DE CONTROL BIOLÓGICO A.C.



www.smc-b-mx.org

Otorga el presente

RECONOCIMIENTO

A:

Flores Hernández Gerardo Jair, Tamez Guerra Patricia, Alcocer González Juan Manuel, Orozco Flores Alonso Alberto, Luna Cruz Itza Eloísa, Rodríguez Padilla Cristina, Ibarra Rendón Jorge, Valadez Lira José Alberto

Por su participación como:

PONENTE

con el trabajo titulado:

SUSCEPTIBILIDAD DE *Trichoplusia ni* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE; HÜBNER) AL VIRUS ENTOMOPATÓGENO AcMNPV POR BLOQUEO DE LA EXPRESIÓN DE GLOVERINA, MEDIANTE ARNI

en modalidad Oral realizado el 8 y 9 de noviembre de 2018 dentro del marco del XLI Congreso Nacional de Control Biológico y XXIX Curso Nacional de Control Biológico

Puerto Vallarta Jalisco, México.

Dr. Fernando Tamayo Mejía
Presidente de la SMCB

