

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
(IBBM, UNLP – CONICET - La Plata)



**“Desarrollo de un sistema de recombinación
para su aplicación al estudio de determinantes
genéticos que afectan la infectividad
de baculovirus de interés agronómico”**

Marina E. Biedma

*TESIS
No 1215*

**Tesis Doctoral
Marzo de 2009**

REGISTRACION.....
Fecha..... 07-08-09
Inv. B..... Inv..... B. 58784

1215

(043.2)
TESIS
01215

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 129



DEX-58781

El presente trabajo de Tesis, para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas, ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM, UNLP-CONICET-La Plata), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; bajo la dirección del Profesor Dr. Victor Romanowski.

A Eduardo,
Por tu amor, compañerismo,
Por ser la fuerza impulsora...

MI RECONOCIMIENTO AL CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET), A LA AGENCIA NACIONAL DE PROMOCIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA (ANPCYT), Y A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA POR HABER HECHO POSIBLE LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

Agradecimientos

Al Dr. Romanowski, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, por su criticismo constante, por las correcciones, por brindarme apoyo y confianza.

A la Ing. Agrónoma Alicia Sciocco de Cap, por el apoyo y el aliento, por su valiosa colaboración desde el comienzo y hasta el final, gracias.

Al Dr. Berretta, por su infinita paciencia conmigo, por su meticulosidad tanto en la enseñanza de la técnica de CAT como en la lectura de este trabajo, entre muchas otras cosas.

A los Dres. Daniel Ghiringhelli y Diego Posik. A Daniel, porque desinteresadamente me ayudó con la bioinformática, por las charlas, por el ánimo desde que “era” una estudiante universitaria. A Diego, por darme las primeras lecciones en “técnicas y comportamiento de laboratorio”, por su aliento durante los años siguientes, por darme la oportunidad de dar clases, por confiar en mí, gracias.

A los Dres. Ricardo Gomez, Antonio Lagares, Anibal Lodeiro, Laura García y Daniela Hozbor, porque de alguna u otra manera han incentivado mi entusiasmo y me han ayudado en este camino, les estoy profundamente agradecida. Al Dr. Grau, por su sinceridad y los viajes compartidos a Bernal.

A mis compañeritos: Agustín (colo), Leticia (la ferre), Ricki (el buche), Carolina (cariño), Fernanda (la Dra.) y Javier. Por acompañarme durante todos estos años y en cada momento en que lo necesité, por su ayuda a cambio de nada. Por los mates, las discusiones (de todo tipo), los asados, por alegrarme el día en los momentos más complicados, porque hicieron estos años más fáciles, por sus observaciones en la corrección de la tesis..... miles de gracias!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!! Fue un placer para mí trabajar con uds, gracias. Los voy a extrañar....

A quienes pasaron por VJ, Sole, Huguito y Alita, por brindarme su amistad y seguir en contacto siempre.

A la Dra. Silvina “Pity” Lopez-García, por sus consejos, por poner el hombro, por su aliento constante, gracias; no cambies nunca!!!!

A Mariano Pistorio, por su ayuda con las clases de Bioquímica I, por enseñarme a enseñar, por hacer tan simple ejercicios tan complicados!!!

A Florencia Del Papa, Federico Sisti, Julieta Fernandez.

A mis compañeros del IBBM: Elías, Nacho, JPG, Florcita, Julita, Emi, Dani Bottero, Finger, Augusto, Angie, Walter, Gonzalito, Mauricio, Cecilia, Carina y Verónica, por compartir éxitos y fracasos, por los almuerzos, las PC2, y todo “eso” que ameniza la jornada laboral y que también fue importante durante toda esta etapa.

A Martín Sarachu, por explicarme tantas veces!! como funciona un algoritmo, por permitir asociarme al “club del trago”, te extrañamos....

A Silvia Moya, por ayudarme con la compra de reactivos, por su gratitud y preocupación desinteresada.

Al personal del IMYZA, INTA, por el trato recibido y a María y Débora, responsables del Insectario, por la ayuda con las Anticarsias, Epinotias y el resto de las “bichas” durante los bioensayos y disponibilidad de material para realizarlos.

A Angeles Baridón, Fernando Perez y la Dra. Klein por darme la oportunidad de inmiscuir en el campo de los trasplantes, por su ayuda desinteresada en momentos difíciles.

A Carito y Alejandra, por sus preguntas, por confiar en mí, porque aprendí mucho con uds. al lado y fue un placer poder compartir lo poco que pude brindarles.

A mis amigas “el clan de biotecnólogas”, Lety, Maru, Naty, Dani, Marie, Kari y Pili. Por ser los pilares en los que encontré base para seguir, sin uds. calculo que me hubiese vuelto a casa. Por todos estos años de amistad, por las risas y “cotorrerío” indistinguibles que nos caracterizan, gracias. Las voy a extrañar...

A Agustín “el colo” Ure, por ser un amigo incondicional, o el hermano que no tuve (si me lo permite), por enseñarme a usar la computadora y los exóticos programas, por su claridad en las discusiones técnicas, por su optimismo en los días difíciles. A Laurita.

A mis amigos: Pablo, Cecilia B., Isidro, Mauro y Gisel.

A Juancho, Paula, Josefina, Eleonora, Jose (la suegra), Eduardo (el suegro) y los pequeños, Fede y Santi, por acompañarme en esta etapa también, por su apoyo y hacerme sentir una más de la familia durante todos estos años, gracias.

A mi hermana Moira, la única, la mejor, la más compañera y más hermana de todas las hermanas, por estar siempre aunque estemos lejos, por su amor y compañerismo, por darme muchas alegrías, entre las que incluyo a las princesas, Male y Delfi y al pequeñino Cirilo.

A mis abuelos, Raquel y Florentino, por su amor, sus consejos, los mimos, por hacerme sentir nieta!!!!

A mi mamá, porque le debo lo que soy, por incentivar me constantemente, por disculpar mi ausencia.

A Eduardo, por despertarme cada mañana con una sonrisa, por comprender mis estados de ánimo y acompañarme constantemente en todos los proyectos. Por hacer especial cada uno de mis días.....

Y por último, a todas aquellas personas que de alguna u otra forma ayudaron, incentivaron y se pusieron felices por los logros obtenidos y a aquellos que hicieron todo lo contrario, gracias!!!.

INDICE

CAPITULO I	Introducción general
Cultivo de soja	1
Complejo de plagas: los casos particulares:	2
<i>Epinotia aporema</i>	3
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	4
Control Microbiano de Plagas	6
Control biológico de plagas: Uso de baculovirus	7
Baculovirus	8
Ciclo de infección	12
Regulación de la transcripción	14
Genes tempranos	15
Replicación	15
Genes tardíos y muy tardíos	17
Rango de hospedantes	18
Reseña del uso de baculovirus como bioinsecticidas	20
Virus de la granulosis de <i>Epinotia aporema</i>	21
Virus de la poliedrosis de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	22
Contexto de trabajo	22
Objetivos	24
Referencias	25

CAPITULO II Efectos de la administración conjunta de AgMNPV y EpapGV en larvas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	
Resumen	35
Introducción	36
Materiales y Métodos	39
Resultados	42
Discusión	51
Referencias	53

CAPITULO III Secuenciación del gen *ie-1* de EpapGV y análisis bioinformático

Resumen	59
Introducción	60
Materiales y Métodos	65
Resultados	67
Discusión	82
Referencias	84

CAPITULO IV Transactivación de promotores de EpapGV

Resumen	91
Introducción	92
Materiales y Métodos	94
Resultados	100
Discusión	108
Referencias	110

CAPITULO V Desarrollo de un sistema de recombinación para AgMNPV

Resumen	115
Introducción	116
Materiales y Métodos	118
Resultados	123
Discusión	138
Referencias	140

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

145

ANEXO

Materiales y Métodos generales	149
Notas	159

Listado de abreviaturas

% (v/v)	porcentaje volumen en volumen
μCi	micro Curie
μl	microlitro
μM	micromolar
aa	aminoácido
<i>background</i>	ruido de fondo, señal de fondo
BLAST	" <i>Basic local alignment search tool</i> ". Algoritmo basado en los algoritmos de Smith-Waterman cuyo objetivo es la búsqueda de similitudes entre secuencias
<i>Buffer</i>	solución reguladora de pH
BV	<i>Budded Virus</i> o viriones brotantes
CAT	Cloranfenicol Acetil Transferasa
<i>chiA</i>	<i>chitinase A</i> = quitinasa A (gen)
CHI-A	<i>chitinase A</i> = quitinasa A (proteína)
DAR	<i>downstream activation region</i> = región de activación downstream
DI	<i>Defective Interfering virus</i> = virus defectivo interferente
DNA	ácido 2' desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de doble cadena
<i>egfp</i>	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (gen)
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (polipéptido)
EPV	entomopoxvirus
<i>Expect value</i>	indica el número de diferentes alineamientos con <i>scores</i> (S) equivalentes, o mayores al valor S que se espera que aparezcan en la búsqueda en una base de datos por azar. Mientras más bajo es el <i>Expect</i> , más significativo es el <i>score</i>
Fig.	figura
<i>gp37</i>	glicoproteína de AcMNPV de 37 kDa (gen). Se aplica a genes homólogos aunque su producto tenga un peso molecular diferente
GP37	glicoproteína de AcMNPV de 37 kDa (proteína)
h	hora (s)
<i>hr</i>	<i>homologous regions</i> = secuencias de repetición homólogas
<i>hsp70</i>	proteína de <i>heat shock 70</i> (gen)
<i>iap</i>	<i>inhibitor of apoptosis</i> = inhibidor de apoptosis
<i>ie-1</i>	<i>immediate early 1</i> = inmediato temprano 1
IE-1	polipéptido expresado a partir del gen <i>ie-1</i>
INR	motivo iniciador temprano (transcripción)
kb	kilo pares de bases
kDa	kilo Daltons
<i>lef</i>	<i>late expression factor</i> = factor de expression tardía
LT ₅₀	Tiempo Letal medio
M	molar
ME	Microscopía Electrónica
mg	miligramo (s)
min	minuto (s)
MIP	Manejo Integrado de Plagas
ml	mililitro (s)
mM	milimolar
MOI	Multiplicity Of Infection = multiplicidad de infección (unidades de virus por célula)
MP	membrana peritrófica
mRNA	RNA mensajero
NC	Nucleocápside

nt	nucleótido (s)
OB	<i>Occlusion Bodies</i> = cuerpos de oclusión
ODV	<i>Occlusion Derived Virions</i> = virus derivados de cuerpos de inclusión
ON	<i>over night</i> = durante toda la noche
ORF	<i>Open Reading Frame</i> = marco de lectura abierto (traducción)
ori	<i>origin of viral DNA replication</i> = origen de replicación de DNA viral
p.i.	post-infección
p.iy.	post-inyección
p10	ORF de p10
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> = Reacción en Cadena de la Polimerasa
pl	punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
<i>polh</i>	ORF de poliedrina
<i>Pp10</i>	Promotor de p10
<i>Ppolh</i>	Promotor de poliedrina
<i>Primer</i>	Oligonucleótido sintético que actúa como cebador de la síntesis de DNA
SOE PCR	Splice Overlap Extension PCR
ssDNA	DNA de simple cadena
UAR	<i>upstream activation region</i> = región de activación <i>upstream</i>
UV	ultravioleta
V	Volts (voltios)
<i>vef</i>	<i>viral enhancing factor</i> = factor aumentador viral (gen)
VEF	<i>viral enhancing factor</i> = factor aumentador viral (proteína)
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

GV	Granulovirus o virus de la granulosis
NPV	NucleoPolyhedroVirus o nucleopoliedrovirus
MNPV	Multiple Nucleocapsid PolyhedroVirus o virus de la poliedrosis nuclear múltiple
SNPV	Single Nucleocapsid PolyhedroVirus o virus de la poliedrosis nuclear simple

Baculovirus nombrados en esta tesis

AcMNPV	<i>Autographa californica</i> MNPV	AdorGV	<i>Adoxophyes orana</i> GV
AdorNPV	<i>Adoxophyes orana</i> NPV	AgseGV	<i>Agrotis segetum</i> GV
AdhoNPV	<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	CfGV	<i>Choristoneura fumiferana</i> GV
AgMNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	CoGv	<i>Choristoneura occidentalis</i> GV
BmNPV	<i>Bombyx mori</i> NPV	CrleGV	<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV
CfMNPV	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV	CypoGV	<i>Cydia pomonella</i> GV
HaSNPV	<i>Heliothis armigera</i> SNPV	EpapGV	<i>Epinotia aporema</i> GV
HycuNPV	<i>Hyphantria cunea</i> NPV	HaGV	<i>Heliothis armigera</i> GV
HzSNPV	<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	HcGV	<i>Hyphantria cunea</i> GV
LdMNPV	<i>Lymantria dispar</i> MNPV	PhopGV	<i>Phthorimaea operculella</i> GV
MbMNPV	<i>Mamestra brassicae</i> MNPV	PuGV	<i>Pseudaletia unipuncta</i> GV
OpMNPV	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	PxGV	<i>Plutella xylostella</i> GV
PuNPV	<i>Pseudaletia unipuncta</i> NPV	SpltGV	<i>Spodoptera litura</i> GV
SeMNPV	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	TnGV	<i>Trichoplusia ni</i> GV
SpltMNPV	<i>Spodoptera litura</i> MNPV	XcGV	<i>Xestia c-nigrum</i> GV
TnMNPV	<i>Trichoplusia ni</i> MNPV		
XcNPV	<i>Xestia c-nigrum</i> NPV		

CAPÍTULO I
Introducción General

INTRODUCCIÓN GENERAL

Cultivo de soja

La soja es un cultivo anual que crece en las regiones templadas, subtropicales y tropicales. La planta de la soja (*Glycine max*), produce granos que contienen más de 50% de proteína, lo que la hace la fuente de proteína vegetal de más alto rendimiento del mundo. Además, de su contenido de aminoácidos, las proteínas de la soja se parecen mucho más a las proteínas animales que a las del maíz u otras fuentes de proteínas vegetales, lo que hace de la soja un complemento dietético ideal para consumo humano o animal (Dros, 2004).



Imagen tomada de www.webescuela.edu.py

La soja se ha convertido, en los últimos años, en el principal cultivo de la Argentina, tanto en superficie cultivada como en producción total. En la campaña agrícola 1988/89 se sembraron 4,6 millones de hectáreas y la producción alcanzó los 6,5 millones de toneladas. Casi veinte años después, en la campaña 2006/2007, la superficie sembrada con esta oleaginosa ascendió a 16,1 millones de hectáreas y la producción fue 7,3 veces mayor (47,5 millones de toneladas) que lo cosechado en 1989 (SAGPyA, 2008). En la **Fig. I.1** se muestran los mapas que permiten apreciar el progreso del área sembrada de soja (parte superior) y de producción (parte inferior) entre los períodos 1986-1990 y 2001-2005 en nuestro país.

La mayor parte de la producción de soja (88%) es prensada para obtener aceite y harina de soja. El resto es utilizado como semilla o procesado como grano entero. Esta leguminosa satisface el 50% de la demanda de harinas oleaginosas ricas en proteína y abastece el 25% de los aceites comestibles del mundo (Dros, 2004). En este sentido, la Argentina es el primer exportador mundial de aceite de soja y el segundo de harina y *pellets*. En términos de participación en las exportaciones agroalimentarias, la exportación del complejo sojero (grano, aceite, harina y pellets) constituyó en el 2005 más del 40% del total de los productos agrícolas nacionales (INDEC, 2008).

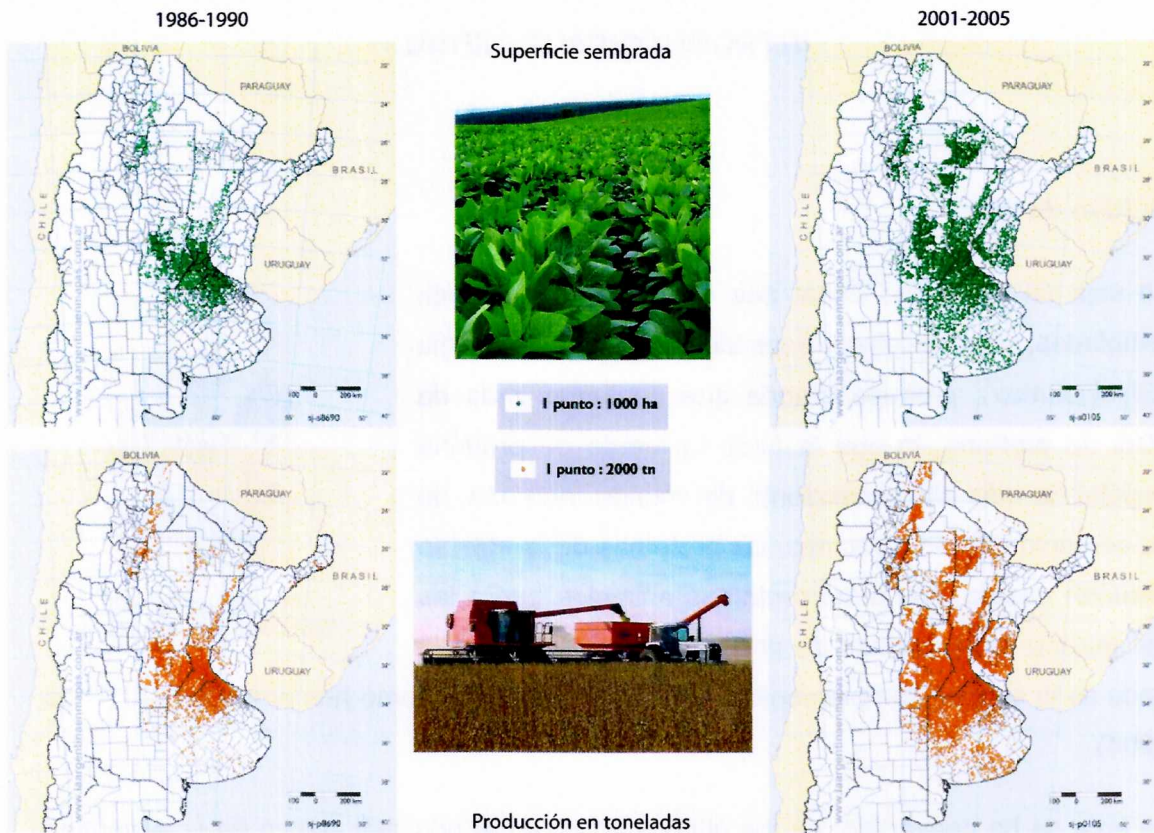


Figura 1.1: Mapas ilustrativos

de: Arriba: superficie sembrada de soja; Abajo: producción en toneladas de soja. Imagen tomada de http://www.laargentinaenmapas.com.ar/caste/soja_re.html.

Complejo de plagas: los casos particulares de *Epinotia aporema* y *Anticarsia gemmatalis*.

La soja es el cultivo que sufre los mayores ataques de plagas animales, principalmente insectos, situación que la ubica como el cultivo que requiere más insecticidas para su protección dentro de los cereales (ej., maíz, trigo) y oleaginosas (girasol, colza) (Aragón, 2002). Las poblaciones de insectos son controladas naturalmente por predadores, parasitoides o por enfermedades. Esta situación de equilibrio se logra cuando los factores ambientales, como ausencia de períodos de sequía prolongados y altas temperaturas, acompañan el normal desarrollo del ciclo de cultivo. Pero cuando las poblaciones de insectos aumentan por encima de niveles críticos, son capaces de provocar pérdidas significativas en la producción del cultivo y necesitan ser controlados. A pesar de que los daños causados por insectos son, en algunos casos, alarmantes, no se recomienda la aplicación preventiva de insecticidas químicos, porque, además del grave problema de contaminación ambiental, la aplicación puede aumentar innecesariamente el costo de producción.

El barrenador de los brotes, *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) y la oruga de las leguminosas, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), son dos plagas importantes del cultivo de leguminosas en Sudamérica. En Argentina, su importancia económica ha crecido considerablemente en concordancia con el mencionado crecimiento del área sembrada de soja desde la década del 80, principalmente en el norte, en la región pampeana y la Mesopotamia. En algunas regiones y durante cierta época del año, ambas especies pueden presentarse simultáneamente (ver **Tabla I.1**).

Tabla I.1: Época de mayor probabilidad de ataque de algunas plagas de la soja sobre el cultivo.

Cuadro tomado de J. Aragón, INTA Marcos Juárez, 2002, con modificaciones.

Estado del cultivo	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Chinches				<i>Nezara viridula, Piezodorus guildini</i>			
Orugas Cortadoras	<i>Agrotis spp, Peridroma</i>						
Orugas Defoliadoras			<i>Rachiplusia, Spodoptera</i>		<i>Anticarsia gemmatalis</i>		
Barrenador del Brote				<i>Epinotia aporema</i>			

Epinotia aporema

Este lepidóptero está ampliamente difundido en América constituyendo una de las principales plagas de leguminosas desde México hasta Argentina (Iede y Foerster, 1982). Además de la soja, daña otras leguminosas de importancia económica tales como poroto, arveja, lenteja, garbanzo y alfalfa (Villata y Ayessa, 1994).

La hembra coloca los huevos en los brotes jóvenes. Las larvas recién nacidas se alimentan preferentemente de estos brotes, tanto terminales como laterales; unen las hojas con hilos sedosos que ellas mismas segregan, dificultando así el normal desarrollo foliar. El brote atacado puede secarse y, entonces, las larvas se trasladan a brotes vecinos o hacen galerías en peciolo, ramas y tallos, deteniendo el crecimiento de la planta (Rojas-Fajardo, 1998) (**Fig. I.2**). Asimismo, en el período reproductivo

atacan pedúnculos florales, vainas y granos en diferentes estados de desarrollo, pudiendo producir caída de flores y chauchas. Para empupar, generalmente se entierran a 1 o 2 cm de profundidad. *E. aporema* transcurre el invierno en diapausa larval resguardada en hojas y brotes de sus plantas hospedantes alternativas.

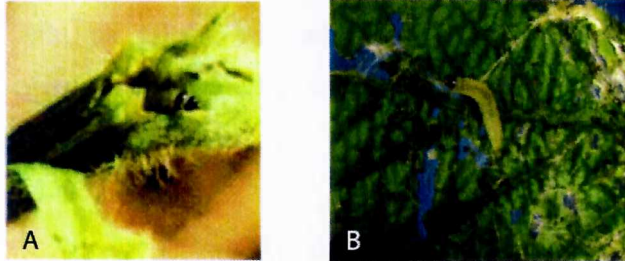


Figura 1.2: Larva de *Epinotia aporema*.

A: Barrenando el tallo.

B: Larva de segundo estadio.

Imagen tomada de la galería de fotos Del INTA Castelar.

Anticarsia gemmatalis

Es nativa de regiones tropicales y subtropicales del hemisferio oeste, fue descrita por primera vez en 1903 en Florida (Hinds y Osterberger, 1931). En nuestro país, se encuentra en la región Pampeana, Mesopotamia y Norte. Las mayores infestaciones se han producido en las provincias de Córdoba y Santa Fe (Iannone, 2007) coincidente con la mayor área sembrada de soja, su planta predilecta. Además, puede encontrarse en maní, alfalfa, frijol y otras plantas diferentes a leguminosas que incluyen el algodón, trigo, lino y algunas hortalizas.

Los huevos son depositados en forma aislada, principalmente en el envés de las hojas. Durante el primer estadio se alimentan del parénquima, dejando la epidermis superior de las hojas casi intacta; en el segundo, se alimentan de la porción intervenal del tejido y de las nervaduras más pequeñas. A medida que aumenta su desarrollo su voracidad también se incrementa (Gutierrez y Pulido, 1978). Las larvas son esencialmente filófagas, pero en ocasiones atacan también las vainas que aún no formaron granos. Una larva llega a consumir entre 100 y 110 cm² de hojas de soja, también pueden dañar, total o parcialmente, vainas tiernas.

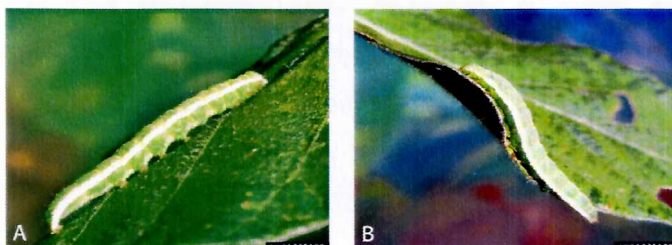


Figura 1.3: Larva de *Anticarsia gemmatalis*.

A: sobre hoja de soja.

B: daño producido por la larva sobre la hoja.

Imagen tomada de IPM Images The Source for Agriculture and Pest Management Pictures.

En las últimas décadas estos insectos han alcanzado altos niveles poblacionales, factor asociado al rápido incremento del área cultivada con soja y leguminosas forrajeras en Argentina, Brasil, Chile y Uruguay y a las condiciones ambientales desfavorables que no permiten el desarrollo del control biológico natural (Aragón *et al.*, 2005; Iannone, 2007).

Actualmente, para el control de estas plagas, se usan insecticidas químicos de amplio espectro a base de piretroides y organofosforados (Aragón, 2007). Además, debido a la protección que le brindan al “barrenador de los brotes” las hojas acartuchadas, vainas y brotes, los insecticidas que permiten un control eficiente son aquellos que tienen propiedades sistémicas o de penetración (generalmente, fosforados o mezclas de fosforados y piretroides), los cuales son usados en dosis mayores a las necesarias para el control de orugas defoliadoras. En la **Tabla I.2**, se muestran los valores comparativos de las aplicaciones de productos químicos usados para el control de *E. aporema* y *A. gemmatalis*.

Tabla I.2: Lista parcial de productos y dosis registradas usados para el control del barrenador del brote, *E. aporema* y la oruga de las leguminosas *A. gemmatalis*.

Insecticidas para cultivo de soja		
Principio Activo	Especies que controla*	Dosis (cm ³ /ha)
Cipermetrina 25%	Barrenador del brote	100 + otros**
	Oruga de las leguminosas	120 a 200
Clorpirifos A 48%	Barrenador del brote	1 000 a 1 300
	Oruga de las leguminosas	650 a 800
Clorpirifos 50% + Cipermetrina 5%	Gusanos cortadores - Oruga militar tardía - Oruga de las leguminosas - Isoca de la alfalfa - Isoca medidora - Chinche verde - Barrenador del brote	350 a 750
Deltametrina	Barrenador del brote	100 + otros**
	Oruga de las leguminosas	40 a 70
Gamma Cialotrina 15%	Isoca medidora - Oruga militar tardía - Oruga de las leguminosas - Barrenador del brote - Chinche Verde	13 a 30
Lambdacialotrina 5%	Barrenador del brote	150 + otros**
	Oruga de las leguminosas	80 a 120

* En algunos casos, sólo se ha especificado las plagas de interés debido a que la dosis a aplicar varía según el insecto.

** En gral se agrega de 600 a 750 cm³ de Clorpirifos

FUENTE: Via Rural, 2008 y guía SATA, 2008.

Control microbiano de plagas

Desde finales de la Segunda Guerra Mundial, el control de poblaciones de insectos plaga se realiza mediante la aplicación de pesticidas químicos. Si bien estos productos alcanzaron un éxito comercial para el control de plagas de interés agrícola, médico o veterinario, su utilización no está exenta de problemas. La mayoría son de amplio espectro, algunos no son biodegradables y otros tienen elevada persistencia en el medio ambiente. El uso indiscriminado de estos compuestos ha perturbado el equilibrio de las comunidades de insectos y, como consecuencia, algunos fitófagos inicialmente sin interés económico adquirieron cierto nivel de densidad poblacional alcanzando así el umbral de daño económico. Por otro lado, el uso continuo de los insecticidas químicos sobre las poblaciones de plagas ejerció una fuerte presión de selección favoreciendo a los individuos más resistentes. Como consecuencia, se incrementaron las dosis y el número de aplicaciones necesarias para su control. Ello condujo a la acumulación de residuos químicos hasta niveles perjudiciales en el medio ambiente y en los distintos eslabones de las cadenas tróficas.

Es dentro de este contexto que surge el concepto de Manejo Integrado de Plagas (MIP). El concepto de MIP fue articulado originalmente entre entomólogos (Stern et al., 1959), para luego extenderse progresivamente a la protección vegetal en un sentido amplio. En 1966, un comité de expertos de la FAO definió al MIP como el sistema de manejo que, teniendo en cuenta el ambiente y la dinámica de la plaga, utiliza de manera compatible todos los medios apropiados disponibles (técnicas de cultivo, control biológico, genético, químico, etc.), para mantener las poblaciones de plagas por debajo de los niveles que ocasionan daños significativos (Aragón et al., 1998). El objetivo no es desterrar el uso de insecticidas químicos, sino reducir su empleo complementándolo con otras estrategias de control. Entre las tácticas que involucra el MIP se incluyen el control químico, las prácticas culturales y el control biológico de plagas. Este último se relaciona con el uso de los enemigos naturales: predadores, parásitos, parasitoides y patógenos. En particular, el uso o manejo de patógenos de insectos (entomopatógenos) para reducir las poblaciones y los efectos de las plagas, define una rama del control biológico conocida como control microbiano. En dicha categoría se incluyen virus, bacterias, hongos, protozoos y nemátodos. En particular, para que un patógeno sea efectivo como agente de control microbiano de plagas, debe reunir algunas características deseables, entre las que se encuentran alta virulencia, inocuidad a otras formas de vida (incluidos insectos benéficos, vertebrados y plantas), acción rápida, larga permanencia a campo y producción fácil y económica.

Los baculovirus (virus patógenos de insectos) junto con la bacteria esporulada *Bacillus thuringiensis* y algunas especies de hongos representan los tres grupos de entomopatógenos que mayor atención han recibido para su desarrollo como bioinsecticidas. Los baculovirus son una parte integrante de los ecosistemas y desempeñan un importante papel en la regulación de las poblaciones de insectos, principalmente lepidópteros.

Control biológico de plagas: Uso de baculovirus

Los miembros de la familia *Baculoviridae* son altamente específicos, infectando sólo a organismos del phylum Arthropoda y mayoritariamente de la clase Insecta (Gröner, 1986). La mayoría de los aislamientos presentan un reducido espectro de hospedantes. No afectan a las plantas, a los vertebrados incluyendo al hombre, u otros insectos benéficos que son parasitoides y depredadores de las plagas. En cuanto a las normas de bioseguridad, esto permite desarrollarlos como insecticidas, con un menor número de restricciones respecto a los insecticidas químicos.

Otras ventajas de los baculovirus son su alta virulencia y la existencia de un fenotipo viral ocluido en una matriz proteica (*occlusion body*, OB) especializado en la transmisión horizontal del virus, el cual se produce en grandes cantidades. Este fenotipo es capaz de persistir en la naturaleza durante largos períodos de tiempo (principalmente en el suelo y hojarasca) constituyendo una fuente de inóculo para generaciones subsiguientes de la plaga. Por otro lado, la persistencia en el ambiente permite prolongar el efecto de una aplicación o el establecimiento de un factor regulador de las poblaciones del insecto hospedante. Este último fenómeno se presenta cuando el baculovirus provoca epizootias naturales, lo que a su vez depende de la densidad poblacional del insecto (Kalmakoff y Krauford, 1982).

Por último, la alta producción de OB por larva, sumada a la factibilidad de producción a gran escala tanto en larvas como en cultivos celulares, hace de los baculovirus posean una excelente potencial para su uso como tanto para el control de plagas como para la producción de proteínas recombinantes (Claus y Sciocco de Cap, 2001).

Baculovirus

La familia Baculoviridae está constituida por virus de DNA envueltos que infectan artrópodos, principalmente insectos del orden Lepidoptera, pero también ciertos miembros de otros órdenes como Diptera e Himenoptera (Adams y McClintock, 1991). La familia se divide en dos géneros, diferenciables por la forma y el tamaño de sus cuerpos de oclusión y por aspectos citopatológicos de interés taxonómico: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV, virus de la poliedrosis nuclear) y *Granulovirus* (GV, virus de la granulosis) (Slack y Arif, 2007) (Fig. I.4).

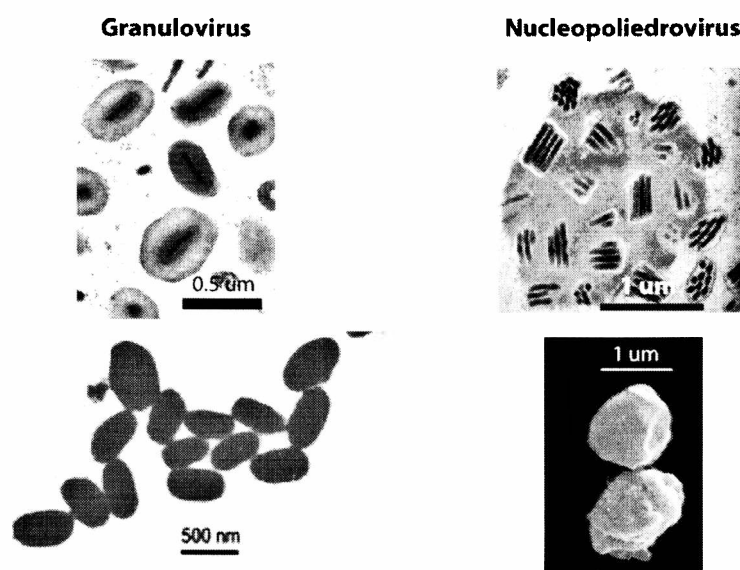


Figura I.4: Cuerpos de oclusión de granulovirus (izquierda) y nucleopoliedrovirus (derecha) en imágenes de microscopía electrónica de transmisión (arriba) y de barrido (abajo).

A lo largo de esta tesis se hará referencia a estos dos géneros, que se encuentran formalmente aceptados por el ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Sin embargo, recientemente, se ha propuesto que la familia se podría dividir en cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (NPV de Lepidópteros), *Betabaculovirus* (GV de Lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV de Himenópteros) y *Deltabaculovirus* (NPV de Dípteros) (Jehle *et al.*, 2006). Esta re-clasificación se asocia con el aumento de evidencia molecular a partir de la cual se infiere que estos virus pertenecen a grupos filogenéticamente distintos. Asimismo, el género *Alphabaculovirus* puede subdividirse en NPV de grupo I y II, basándose en análisis filogenéticos del DNA viral (Bulach *et al.*, 1999; Herniou, 2003). La necesidad de una nueva clasificación está directamente relacionada con el aumento del número de secuencias genómicas disponibles durante los últimos años [10 GV y 36 NPV, secuenciados completamente hasta el momento

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes>, 2008)], y a partir de las mismas el reconocimiento de una gran variedad de genes, presentes en algunos y ausentes en otros, que se relaciona directamente con la evolución y diversidad de estos virus.

Los NPV están ampliamente distribuidos entre más de 400 especies de artrópodos pertenecientes a siete órdenes de insectos (Murphy, 1995). En general, el rango de hospedantes de la mayoría de los NPV está restringido a una o unas pocas especies del género o familia de insectos de donde fueron aislados originalmente. Las infecciones por GV han sido reportadas en más de 100 especies de insectos, sin embargo, parecen infectar sólo a miembros del orden Lepidoptera (Murphy, 1995). En contraste a los NPV, el rango de hospedantes de los GV parece ser mucho más estrecho y mayormente restringido a una sola especie.

Entre las características que diferencian a los NPV de GV, además del rango de hospedantes, encontramos diferente tropismo de tejido y citopatología (Jehle *et al.*, 2006) y diferencias en el número de nucleocápsides (NC) que forman la partícula viral. Una diferencia particular de los GV es que tienen una única NC envuelta dentro de cada virión y un solo virión incluido en el cuerpo de oclusión (*occlusion bodies*, OB), mientras que los NPV contienen simples o múltiples NC por virión y múltiples viriones por cuerpo de oclusión (Slack y Arif, 2007) (**Fig I.5**).

La capacidad de los baculovirus para replicarse eficientemente dentro del hospedante y diseminar la infección dentro de una población de insectos se debe principalmente a la presencia de dos fenotipos de viriones (o partículas infectivas) durante el ciclo de vida del virus: virus ocluidos (*occlusion-derived virus*, ODV) y virus brotantes (*budded virus*, BV). Los ODV se encuentran incluidos en una matriz cuasicristalina de proteína formando los OB 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 (Granados y Williams, 1986). Los BV son responsables de transmitir la infección de una célula a otra y de un tejido a otro dentro del insecto.

Los miembros de esta familia se caracterizan por poseer un genoma compuesto por una molécula de DNA doble cadena circular cerrado covalentemente, cuyo tamaño oscila entre 90 y 180 kpb, empaquetada dentro de una cápside proteica (Theilmann *et al.*, 2005). La función de esta NC (formada por el DNA y proteínas) es la de transportar la información genética altamente compactada, a la célula hospedante. El DNA genómico se encuentra condensado alrededor de 100 veces. Esto es posible gracias a una proteína básica, rica en arginina, denominada P6.9, la cual se une al DNA

neutralizando sus residuos ácidos y permitiendo la compactación del DNA (Fig. I.5). Aparentemente, son eventos de fosforilación y desfosforilación los que juegan un papel clave en la regulación de esta proteína provocando el desempaquetado del DNA al ser fosforilada (Funk, 1997; Slack y Arif, 2007).

Entre las proteínas presentes en la cápside, se distinguen la VP39 y la fosfoproteína PP78/83 que intervienen activamente en el desplazamiento de la NC en la célula hospedante gracias a su asociación con filamentos de actina (Charlton y Volkman, 1993).

Asociada a la cápside también se encuentra una proteína con actividad quinasa que cataliza la fosforilación de la proteína básica P6.9 produciendo el desempaquetamiento del DNA y su liberación en el núcleo de la célula hospedante para iniciar la replicación (Oppenheimer y Volkman, 1995).

En un momento dado de la replicación, las NC adquieren una envoltura lipoproteica para dar paso a la formación de los viriones, principales elementos infecciosos de los baculovirus (Federici, 1997). El origen de esta envoltura y, por lo tanto, su composición de proteínas, lípidos y ácidos grasos, es distinta para cada uno de los fenotipos de viriones (ODV o BV) (Braunagel *et al.*, 2003).

En el caso de los BV, las NC formadas *de novo* adquieren su envoltura de la membrana plasmática de la célula infectada, en la cual se ha anclado previamente una proteína fusogénica codificada por el virus, GP64 o F (grupo I NPV o II NPV y GV, respectivamente) (Blissard y Rohrmann, 1990; IJkel *et al.*, 2001). Esta glicoproteína está involucrada en la entrada del virus a una nueva célula a través de un mecanismo de endocitosis mediado por receptor (Blissard y Wenz, 1992; Hefferon *et al.*, 1999). En cultivo de células de insecto los BV son liberados en el medio de cultivo para luego extender la infección a las células vecinas.

Algunas NC permanecen en la célula adquiriendo una membrana lipoproteica dando lugar a la formación del otro fenotipo viral, ODV (Faulkner y Carstens, 1986). El origen de dicha membrana aún no está claro. Algunos autores sugieren que es sintetizada *de novo* (Blissard, 1996b) mientras que otros sostienen que el origen de la envoltura esta asociada a la formación de microvesículas a partir de la invaginación de la membrana nuclear interna (Slack y Arif, 2007).

Los ODV están inmovilizados en una estructura paracristalina mayormente constituida por una proteína codificada por el virus denominada poliedrina o granulina, según el género (NPV o GV), formando los cuerpos de oclusión (OB). Los OB (denominados

comúnmente poliedros o gránulos) están involucrados en la transmisión horizontal de un insecto al otro y protegen a los viriones de la degradación ambiental (**Fig.1.5**). El OB es insoluble en agua, resistente a la putrefacción y a la desintegración por agentes químicos (Benz, 1987) y también a tratamientos físicos como la congelación, la desecación o la liofilización (Jacques, 1985). Estas características les confieren la capacidad de persistir en el medio ambiente una vez que son liberados del hospedante y hasta ser consumidos por un nuevo insecto susceptible. Recubriendo a los cuerpos de oclusión, se encuentra una envoltura electron-densa compuesta por carbohidratos y proteínas (Caballero *et al.*, 2001).

Ambos fenotipos de viriones comparten la misma estructura de NC y llevan exactamente la misma información genética (Blissard, 1996a; Rohrmann, 1992). Sin embargo, la diferente composición de lípidos, ácidos grasos y proteínas de la envoltura lipoproteica no solo es un reflejo de su distinta morfogénesis sino que, además, es un indicio de las diferentes funciones que ambos tipos de viriones cumplen en el ciclo biológico de los baculovirus.

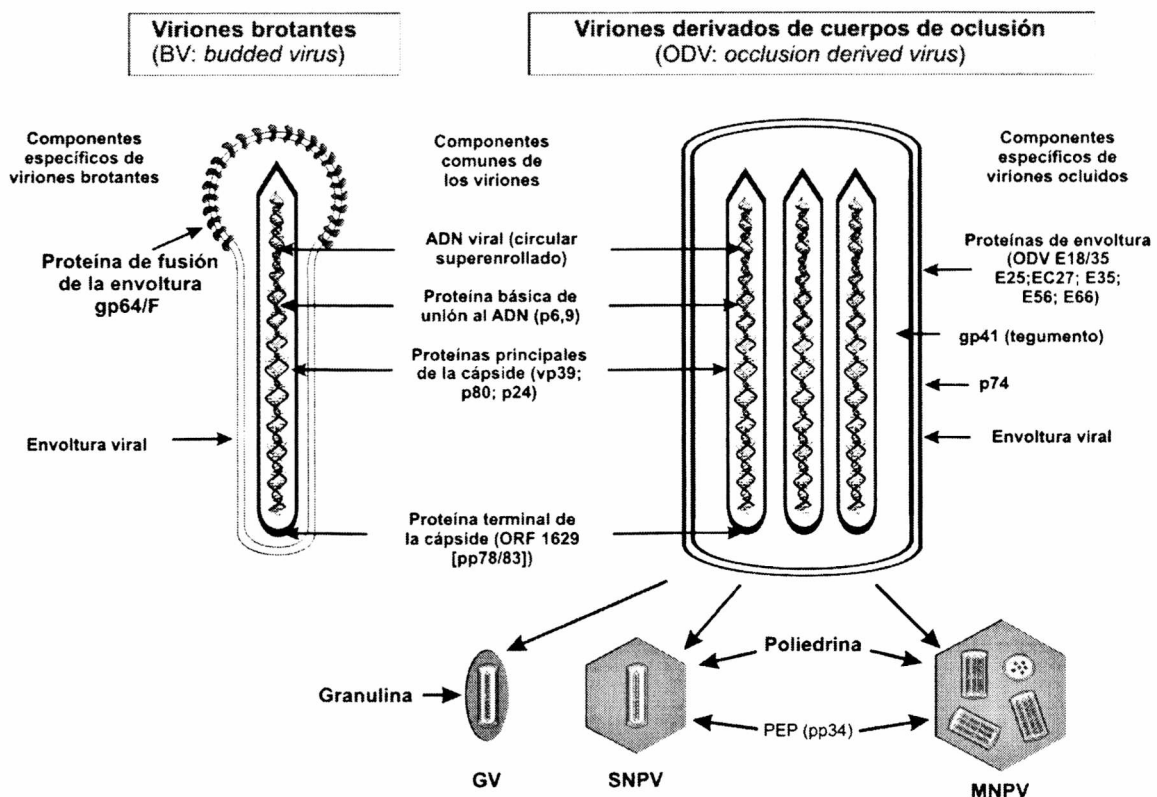


Figura 1.5: Estructura de los fenotipos virales de baculovirus, Virus Brotante (BV) y Virus Derivado de Oclusión (ODV).

Los componentes que comparten ambos fenotipos están detallados en el medio de la ilustración. Los componentes que caracterizan a cada fenotipo viral se presentan a los costados, izquierdo para el BV y al derecho para el ODV. En la parte inferior de la figura se muestra la estructura adoptada por los cuerpos de oclusión, que se forman por inclusión de los ODV en una matriz proteica, constituida por poliedrina o granulina, según el género viral.

Ciclo de infección

La replicación de AcMNPV ha sido ampliamente estudiada en larvas de *Trichoplusia ni* y cultivo de células de *Spodoptera frugiperda* y sirve como modelo para la replicación de NPV y GV en Lepidópteros (Granados y Williams, 1986; Williams, 1997).

En larvas, el ciclo de infección comienza en las células del intestino medio, una vez que los OB son ingeridos. En este ambiente alcalino ($\text{pH} > 9.5$), los OB son rápidamente disueltos, liberando los ODV. Hay evidencia que sugiere que la disolución de la matriz de los OB en el intestino podría ser facilitada por una proteasa alcalina derivada del insecto la cual está asociada con la matriz del OB (Lepore *et al.*, 1996) y cuya acción aumenta la susceptibilidad de las larvas a las infecciones por baculovirus y disminuye su tiempo de supervivencia (Derksen y Granados, 1988).

Los ODV pasan a través de la membrana peritrófica (MP), una red de proteínas y quitina secretada por las células intestinales con el fin de proteger el epitelio del contacto directo con el alimento ingerido. Esta estructura acelular es considerada una barrera de importancia frente a la infección viral (Eisemann y Binnington, 1994; Lehane, 1997).

Luego de la unión a los microvilli del epitelio, las NC entran a la célula mediante fusión de la envoltura del virión con la membrana epitelial, liberando las NC en el citosol (Barrett *et al.*, 1998; Flipsen *et al.*, 1995). Las NC son transportadas al núcleo, el DNA desnudo entra por el poro nuclear y se inicia la expresión y replicación del DNA.

En la fase tardía de la infección, las NC formadas nuevamente son transportadas a la membrana celular, desde donde abandonan la célula por brotación o a través de la membrana basal. Los BV extienden la infección a las células vecinas y vía hemolinfa a través del insecto a otros tejidos. En la fase muy tardía de la infección, las NC son ensambladas en una envoltura formada *de novo* para convertirse en ODV. Los ODV posteriormente son incluidos en una matriz proteica formando los OB. Al final de la infección los OB formados son liberados por ruptura celular, quedando disponibles para iniciar un nuevo ciclo de infección.

La infección por baculovirus frecuentemente altera el comportamiento del hospedante. Las larvas infectadas a menudo tienden a moverse hacia la punta de la planta o de las hojas, donde finalmente mueren (Steinhaus, 1967). Se asume que este comportamiento ha evolucionado para aumentar la transmisión del virus por gravedad o lluvia (D'Amico, 1995; Goulson, 1997; Vasconcelos, 1996).

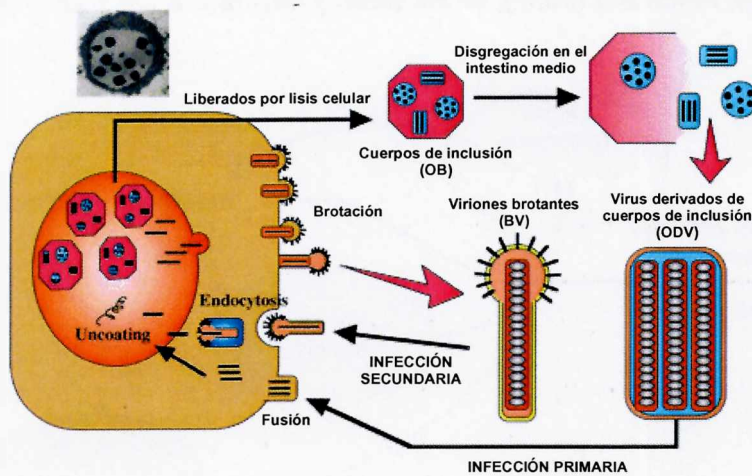
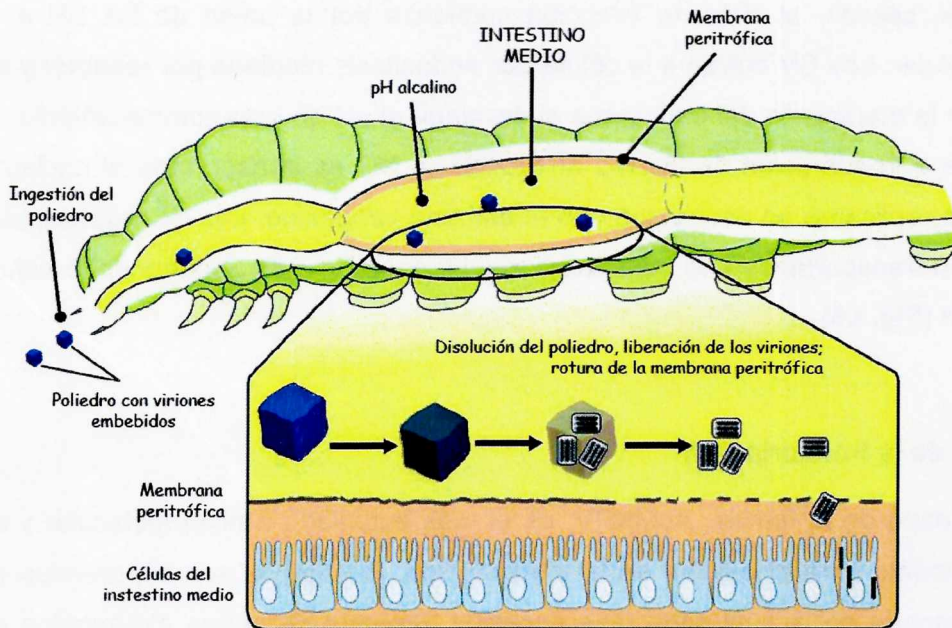


Figura I.6: Ciclo de infección de un baculovirus (NPV).

Infección de células epiteliales del intestino medio por OB (fase primaria de la infección). La matriz de poliedrina de un OB ingerido se disuelve en el lumen del intestino medio, liberando un ODV que atraviesa la membrana peritrófica y llega a las células columnares del epitelio intestinal. La membrana de los ODV se fusiona con las membranas de los *microvilli*, liberando nucleocápsides (NC) en el citoplasma, donde (a) migrarán al núcleo o (b) emergen nuevamente. **Infección secundaria y producción de OB.** Los viriones brotantes (BV) emergen de las células epiteliales en la fase tardía de la infección y migran a células vecinas, adonde entran por endocitosis, probablemente mediada por la interacción de GP64 con un receptor de la superficie celular. Una vez que la vesícula endosomal es liberada en el citosol, el endosoma se acidifica, su membrana y la del BV se fusionan, liberando la nucleocápside en el citoplasma. Las nucleocápsides se dirigen al núcleo, en donde interactúan con el poro nuclear. Tras entrar al núcleo, el DNA es liberado del virión y comienza la transcripción. El DNA es replicado y empaquetado en las nucleocápsides en una región conocida como estroma virogénico. Durante la fase tardía de la infección, las nucleocápsides salen del núcleo, migrando a la membrana plasmática, y brotan como BV infecciosos. Durante la fase muy tardía, las nucleocápsides son retenidas en el núcleo, adquieren su membrana y son embebidas en una matriz cristalina de poliedrina para formar OB. Los OB maduros son liberados por lisis celular.

En cultivo de células, el ciclo de infección comienza por la unión de los BV a la superficie celular. Los BV entran a la célula por endocitosis mediada por receptor y se fusionan con la membrana del endosoma al disminuir el pH de este compartimiento, lo que conduce a la liberación de las NC al citosol. La NC es transportada al núcleo y liberada para replicarse en asociación con el estroma virogénico. Las NC nuevamente formadas son transportadas a la membrana celular desde donde abandonan la célula por brotación (**Fig. I.6**).

Regulación de la transcripción

El virus prototipo de la familia, AcMNPV, es el más estudiado a nivel molecular y se usa como modelo para el estudio de la transcripción. Sus genes son expresados en forma de cascada en la cual cada fase sucesiva depende de genes expresados en fases anteriores (Romanowski y Ghiringhelli, 2001). En términos generales, hay tres fases establecidas: temprana (*early*), tardía (*late*) y muy tardía (*very late*) (**Fig. I.7**).

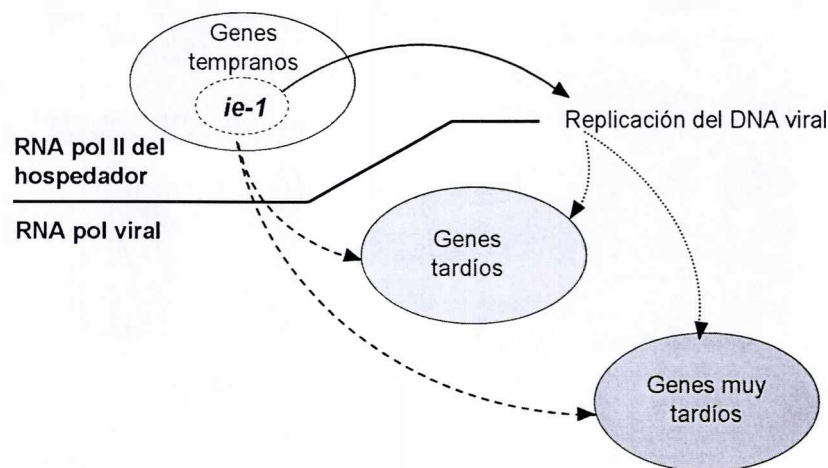


Figura I.7: Regulación de la transcripción de los genes baculovirales durante el ciclo de infección.

La expresión de genes virales se divide en tres etapas: temprana, tardía y muy tardía. La transcripción de genes tempranos depende de la RNA polimerasa celular. La replicación del DNA viral es un pre-requisito para la expresión de genes tardíos y muy tardíos. La transcripción de estos genes depende de la presencia de la RNA polimerasa viral.

La replicación del DNA viral es un pre-requisito para la expresión de genes tardíos (Lu y Miller, 1997). Esto se apoya en la evidencia de que la inhibición de la replicación del DNA por afidicolina también bloquea la transcripción de este grupo de genes (Miller, 1981). Los transcriptos tempranos son sintetizados por la RNA polimerasa II de la célula hospedante, mientras que la transcripción tardía está mediada por la RNA polimerasa codificada por el virus (Gruha *et al.*, 1981; Huh y Weaver, 1990). Durante la

fase temprana se expresan, entre otros, los genes requeridos para la replicación del DNA viral. En la fase tardía se producen proteínas virales estructurales necesarias para el ensamblaje de los BV que se liberan al medio extracelular, mientras que la etapa muy tardía está centrada en la expresión de las proteínas necesarias para la formación de los cuerpos de oclusión (OB). El mecanismo más importante en la regulación génica es a nivel de la transcripción, es decir, en la etapa de reconocimiento de los promotores. Sin embargo también puede haber regulación negativa de la traducción de los RNA mensajeros tempranos por transcriptos de genes tardíos. En particular cuando los productos de transcripción corresponden a regiones parcialmente solapadas pero de sentido opuesto pueden dar lugar a un mecanismo de RNA antisentido (Ooi y Miller, 1990)

Genes tempranos.

Dentro de los genes tempranos hay una subdivisión en tempranos inmediatos y tempranos retrasados (genes α y β). Ambos son transcriptos por la RNA polimerasa II de la célula hospedante, sensible a la α -amanitina. Los genes α y β difieren en sus promotores y en las secuencias activadoras a distancia (*enhancers*). Los genes tempranos inmediatos son expresados dentro de los 30 min post-infección (Chisholm y Henner, 1988) una vez que el DNA viral ha alcanzado el núcleo. Los genes tempranos retrasados requieren de la unión de transactivadores virales (sintetizados previamente) a los *enhancers* para alcanzar niveles de expresión máximos. Los promotores de estos genes se asemejan a los promotores de genes del hospedante, tienen un motivo TATA *box* típico y un sitio de inicio de la transcripción CAGT que se ubica 25-31 pb *upstream* del motivo TATA *box* y son reconocidos por extractos nucleares de células no infectadas (Hoopes y Rohrmann, 1991). La secuencia CAGT está involucrada en la eficiencia del inicio de transcripción, probablemente influyendo sobre la afinidad por el factor de transcripción TFIID (Pullen y Friesen, 1995).

Replicación

La replicación del DNA se produce en el núcleo de la célula infectada, el virus codifica sus propios genes durante la etapa temprana para este proceso. Los elementos que actúan en *cis* requeridos para la replicación (origen de replicación u ori) han sido identificados por el análisis de genomas defectivos obtenidos luego de varios pasajes virales en cultivo de células de insecto (Kool *et al.*, 1994a; Lee y Krell, 1994) y por ensayos de replicación transitorios (Leisy y Rohrmann, 1993; Pearson y Rohrmann,

1995). La actividad de ori fue encontrada en los baculovirus por estar asociada con las regiones homólogas (*hr*, por *homologous region*) (Lu y Miller, 1995b). Las *hr* contienen secuencias palindrómicas interespaciadas con repeticiones directas cortas, y se encuentran dispersas a lo largo del genoma del baculovirus. Estas secuencias también pueden actuar como *enhancers* transcripcionales (Friesen, 1997). La presencia de las *hr* es una característica común de los baculovirus, sin embargo no todo está aclarado acerca de ellos. Además de los ori tipo *hr*, han sido identificadas secuencias no *hr* con actividad ori mediante ensayos de replicación transitoria en los genomas del nucleopoliedrovirus de *Orgyia pseudotsugata* (Pearson *et al.*, 1993), de *Autographa californica* (Kool *et al.*, 1994b), de *Spodoptera exigua* (Heldens *et al.*, 1997) y de *Spodoptera litura* (Huang y Levin, 1999). Estos ori llamados de tipo no-*hr* consisten de secuencias que carecen de las estructuras tipo palindrómicas o repeticiones encontradas en los ori tipo *hr*. Los ori no-*hr* de diferentes baculovirus no tienen homología estructural entre ellos o a los ori tipo *hr* en el mismo genoma. Sin embargo, tienen estructuras básicas que se encuentran en el consenso de los ori eucariotas (DePamphilis, 1993), tales como múltiples repeticiones invertidas y directas, palíndromes y estructuras ricas en AT. A diferencia de los ori tipo *hr*, la presencia y distribución de motivos de estructura secundaria dentro de las secuencias ori no-*hr* es probablemente lo más importante para la actividad ori que la secuencia primaria en sí misma.

Los elementos que actúan en *trans* requeridos para la replicación del DNA baculoviral incluyen entre otros la DNA polimerasa viral (*dnapol*), p143 (*helicasa*), *lef-1* (DNA *primasa*) y *lef-2*, cuatro genes que han sido encontrados en todos los baculovirus secuenciados hasta el momento (Herniou, 2003). Se han identificado cinco genes esenciales (*p143*, *ie-1*, *lef-1*, *lef-2*, y *lef-3*) y cinco genes estimulantes de la replicación del DNA (*dnapol*, *p35*, *ie-2*, *lef-7*, y *pe38*) en AcMNPV (Crouch y Passarelli, 2002).

En ensayos de replicación transitoria, los plásmidos conteniendo *hr* replican a una alta tasa (Leisy y Rohrmann, 1993). En otros estudios, un plásmido basado en pUC, sin ninguna secuencia viral ori, replica en células de insecto infectadas como concatémeros y/o integrados en el genoma viral (Wu *et al.*, 1999). Estas observaciones sugieren un mecanismo de replicación de DNA tipo círculo rodante, mientras Kool *et al.* (1995) sugieren una posible combinación de los mecanismos de círculo rodante y tipo theta. Oppenheimer y Volkman (1997) fueron capaces de detectar múltiples fragmentos de genoma de una unidad de longitud replicando, sugiriendo que AcMNPV replica en una manera cabeza-cola vía un mecanismo de círculo rodante.

Genes tardíos y muy tardíos

Entre las 8 y 24 h. p. i. ocurre la transcripción y expresión de genes tardíos (o genes γ), la producción de proteínas estructurales y la formación de BV. Estos genes así como también los genes muy tardíos (o genes δ) tienen un sitio de inicio de la transcripción invariante y universal (A/G/T)TAAG y son transcritos por la RNA polimerasa codificada por el propio virus, la cual es insensible a la α amanitina. Además, estudios de expresión transitoria mostraron que dieciocho genes de AcMNPV fueron esenciales para lograr niveles de expresión óptimos de un gen indicador bajo el control de promotores tardíos y muy tardíos (*vp39*, *p6.9*, *polh*, *p10*) (Lu y Miller, 1995a). En la fase tardía se expresan, entre otros, genes que codifican para proteínas estructurales dando comienzo a la etapa de ensamblaje de NC en el núcleo de la célula infectada (Fraser, 1986).

La expresión génica muy tardía comienza alrededor de las 18-24 h p.i. y se caracteriza por un dramático incremento de la transcripción y expresión de genes muy tardíos, y la reducción de la transcripción de genes tardíos. En los promotores muy tardíos, a diferencia de los tardíos, el nivel de expresión no depende del contexto inmediato en el que se encuentra la secuencia TAAG sino de una secuencia denominada *burst sequence* que se localiza entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón de inicio de la traducción. En los promotores muy tardíos esta secuencia es rica en AT e influye en la actividad del promotor. Esta región interactúa con proteínas celulares, las cuales son imprescindibles para asegurar altos niveles de transcripción de genes tales como *poliedrina* (*polh*) o *granulina* (*gra*), *p10* y otros que codifican proteínas necesarias para formar los cuerpos de oclusión (Braunagel *et al.*, 1999). El producto génico *p10* está asociado con la formación de extensas estructuras fibrilares en el núcleo y citoplasma de células infectadas (Quant-Russell, 1987; Van der Wilk, 1987). También se ha sugerido que podría contribuir a la disrupción de la membrana nuclear y la liberación de los cuerpos de oclusión desde las células infectadas (van Oers, 1993; Williams, 1989). Dado que *polh* y *p10* no son necesarias para la replicación del DNA y que se hiperexpresan durante la infección, sus promotores han sido utilizados para el desarrollo de vectores de expresión. La región codificante de estos genes puede ser reemplazada por genes exógenos que resultan en la producción de altos niveles de proteína de interés (Smith, 1983; Vlak *et al.*, 1990).

Rango de hospedantes

El rango de hospedantes de cualquier virus está determinado por su capacidad de entrar a las células y tejidos del organismo hospedante, replicar y liberar nuevas partículas infecciosas. Los baculovirus presentan dos fenotipos que participan en la infección: ODV, infección primaria y BV, infección secundaria. La entrada del virus está frecuentemente determinada por la presencia de receptores celulares que faciliten la unión e ingreso del virus a la misma. Sin embargo, parece que este no es el factor determinante para AcMNPV. En 1983, Tija *et al.* (1983) encontraron que AcMNPV pudo ser internalizado en tres líneas celulares derivadas de mamífero. La lista de células susceptibles al ingreso de este virus, aumentó considerablemente con el transcurso del tiempo (Hu, 2008). Lo que indica que si hay receptores específicos que son usados por baculovirus, ellos son comunes entre las células de insecto y las de mamífero. Si bien, se ha observado que AcMNPV puede ingresar en varias líneas celulares, la persistencia del DNA se vio limitada y la expresión de genes indicadores dependen del promotor elegido (Shoji *et al.*, 1997). La glicoproteína GP64 es el componente más abundante de la envoltura del BV (NPV grupo I) y es esencial para la entrada del virus en células de insecto por endocitosis mediada por receptor (Wickham *et al.*, 1990). Diversos estudios han permitido identificar a esta proteína como la protagonista del proceso de transducción. Recombinantes de AcMNPV carentes de *gp64* fueron incapaces de transducir células de mamífero (Abe *et al.*, 2005). Asimismo, *gp64* de AcMNPV insertada en el genoma del nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera* (HaSNPV), un virus incapaz de transducir células de mamífero naturalmente, permitió revertir el proceso. Lo que señalaría a GP64 de AcMNPV como la responsable en permitir el proceso de entrada a células no permisivas. Por otro lado, a partir de ensayos de transfección de células Se301 con un bácmido derivado de SeMNPV (NPV grupo II) que carece de la proteína F no se observó la producción de BV infecciosos. Este defecto fue recuperado por la inserción de la proteína F de SeMNPV, pero no por la inserción de la proteína GP64 de AcMNPV. Lo que permitió sugerir que la analogía funcional entre GP64 y F no es recíproca (Westenberg y Vlak, 2008).

A pesar de que AcMNPV y el nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori* (BmNPV), están relacionados genéticamente, tienen distintas especificidades en cuanto al rango de hospedantes. Kondo y Maeda (1991) demostraron que un mutante de AcMNPV conteniendo parte del gen *p143* de BmNPV se torna infectivo hacia la línea celular BmN derivada de *Bombyx mori*, normalmente refractaria a la infección por AcMNPV.

Este mutante llamado eh2-AcMNPV, fue obtenido luego de la coinfección de células SF-21 con AcMNPV y BmNPV, los cuales no son infectivos a las células BmN y SF-21, respectivamente. La progenie viral fue sucesivamente pasada a través de células BmN y SF-21, aislando finalmente el virus eh2-AcMNPV el cual resultó infectivo para ambas líneas celulares. En otros experimentos, se encontró que la región del genoma responsable de la extensión del rango de hospedantes se localizaba en el fragmento de 572 pb de BmNPV que contenía al gen *p143*, el cual difiere en 14 de 109 aminoácidos comparada a la de AcMNPV (Maeda *et al.*, 1993). Resultados similares fueron obtenidos por Mori *et al.* (1992) quienes realizaron experimentos de co-transfección con fragmentos del genoma de BmNPV. Esto fue corroborado por estudios realizados por el grupo de Croizier (1994) quienes demostraron que el intercambio de sólo tres aminoácidos dentro de *p143* es suficiente para expandir el rango de hospedantes de AcMNPV hacia células de *B. mori*. Parece que la sustitución de un residuo de serina a un residuo de asparagina en *p143* de AcMNPV es suficiente para la extensión del rango de hospedantes (Kamita y Maeda, 1997). La infección de la línea celular derivada de *Lymantria dispar*, Ld652Y, con AcMNPV se caracteriza por la aparición de un efecto citopático, hay transcripción desde todas las clases temporales de promotores y replicación viral, pero hay muy poca traducción de proteínas y no hay formación de viriones infectivos (Guzo *et al.*, 1992). Sin embargo, cuando las células Ld625Y fueron coinfectadas con AcMNPV y LdMNPV, se produjo replicación y producción de AcMNPV, sugiriendo que LdMNPV codifica un factor que actúa en *trans*, el cual rescata la infección abortiva de AcMNPV (McClintock and Dougherty, 1987). Este factor que actúa en *trans* codificado por LdMNPV fue finalmente mapeado e identificado por cotransfección de células Ld625Y con DNA genómico de AcMNPV y cósmidos del genoma de LdMNPV. El factor fue llamado factor del rango de hospedantes 1 (*host range factor 1*, *hrf-1*) y se demostró que extiende el rango de hospedantes de un virus recombinante de AcMNPV que expresa el factor hacia células Ld625Y y larvas de *L. dispar*. Lo que indica que *hrf-1* determina el rango de hospedantes a nivel de cultivo celular y de larvas (Thiem *et al.*, 1996). Estudios de expresión transitorios usando el gen indicador de cloranfenicol acetil transferasa (CAT), revelaron que dieciocho genes de AcMNPV, llamados factores de expresión tardías (*late expression factors*, *lefs*), fueron esenciales para lograr niveles óptimos de expresión de genes tardíos y muy tardíos en células SF-21. En la línea permisiva derivada de *T. ni*, TN-368, se encontró que además de estos dieciocho genes *lef* se necesitaba un gen adicional, llamado factor específico de la célula hospedante (*host cell-specific factor-1*, *hcf-1*) para que se produzca una eficiente expresión génica tardía. Mutantes de AcMNPV carentes de *hcf-1* replican

normalmente en células SF-21 y larvas de *S. frugiperda* pero son incapaces de producir infección en larvas de *T. ni* o células TN-368 (Lu y Miller, 1995a; 1996; Lu y Miller, 1997). Estas observaciones claramente indican que *hcf-1* tiene especificidad de tejido así como también efectos especie específicos en la replicación de AcMNPV en cultivo de células y en larvas de insecto. Mutantes de AcMNPV que carecen del gen funcional *p35*, son incapaces de replicar en la línea celular permisiva SF-21 (y SF-9). P35 es una supresora de la muerte celular programada (apoptosis), la cual podría actuar en una reacción de defensa del insecto contra la infección por baculovirus a nivel del organismo (Clem *et al.*, 1991). Parece que *p35* también ejerce una función en el rango de hospedantes de AcMNPV, dado que este gen es esencial para la replicación en células SF-21 y larvas de *S. frugiperda* pero no en células TN-368 y larvas de *T. ni*. El mutante *p35* de AcMNPV resultó 1000 veces menos infectivo a las larvas de *S. frugiperda* que el *wt* cuando el virus es inyectado en el hemocele y resultó 25 veces menos infectivo en infecciones *per os* (Clem y Miller, 1993; 1994).

Si bien se han realizado numerosos estudios con el fin de determinar cuáles son los determinantes genéticos que permiten ampliar el rango de hospedantes de los NPV, no se ha podido establecer un esquema válido para todas las especies.

Reseña del uso de baculovirus como bioinsecticidas

La primera descripción de una enfermedad producida por un baculovirus fue realizada por un obispo italiano en el siglo XVI. Sin embargo, recién en el siglo XIX y gracias a las técnicas de microscopía, se correlacionó la aparición de cristales poliédricos con la enfermedad descrita anteriormente. A partir de las investigaciones realizadas en la primera mitad del siglo XX, se pudo determinar que los cristales poliédricos contenían partículas virales en forma de bastón y se iniciaron los primeros estudios bioquímicos sobre estos virus (Benz, 1986).

El potencial de los baculovirus para el control de insectos defoliadores fue reconocido a principios de la década de los cuarenta cuando una infección empezó a diezmar poblaciones del tentredínido exótico *Gilpina (Diprion) hercyniae*, en Canadá, con resultados notables (Cameron, 1973). Como disciplina propia, el estudio de la patología de insectos y su aplicación para el control biológico de poblaciones de plagas se inició a finales de los años cuarenta (Steinhaus, 1963). El desarrollo de los baculovirus como pesticidas biológicos estimuló la realización de estudios para

comprender la biología molecular de estos virus, y esto a su vez despertó el interés en desarrollar bioinsecticidas a escala industrial.

En 1981, en Estados Unidos se desarrolló el primer formulado bioinsecticida que utilizó un baculovirus como ingrediente activo para la lucha contra *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Desde entonces se han comercializado distintos productos que utilizan aislamientos determinados de baculovirus efectivos en la lucha contra plagas, tanto en los ecosistemas agrícolas como en los forestales (Entwistle, 1998; Moscardi, 1999). Actualmente, hay comercializados más de treinta bioinsecticidas basados en baculovirus, algunos de ellos se mencionan en la **Tabla I.3**. El programa más importante de control de insectos plaga, mediante uso de baculovirus, se lleva a cabo en Brasil donde más de dos millones de hectáreas de soja son tratadas anualmente para el control del lepidóptero *Anticarsia gemmatalis* (Moscardi, 2002).

Tabla I.3: Baculovirus utilizados en bioinsecticidas comerciales.

Insecto plaga	Virus	Cultivos
<i>Anagrapha falcifera</i>	AfNPV	Vegetales
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	AgMNPV	Soja
<i>Cydia pomonella</i>	CpGV	Manzana, Pera
<i>Helicoverpa</i> y <i>Heliothis</i> , varias especies	HaNPV	Garbanzo, girasol, algodón, tomate
<i>Helicoverpa zea</i> y <i>Heliothis virescens</i>	HvNPV	Algodón
<i>Lymantria dispar</i>	LdMNPV	Forestales
<i>Mamestra brassicae</i>	MbNPV	Repollo, tomate, algodón
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	OpMNPV	Forestales
<i>Phthorimaea operculella</i>	PhopGV	Papa
<i>Plutella xylostella</i> ,	PxGV	Repollo
<i>Spodoptera exigua</i>	SeMNPV	Algodón, hortalizas, etc
<i>Spodoptera littoralis</i>	SlitNPV	Algodón
Varios lepidópteros plaga	AcMNPV	Brócoli, algodón, tomate

Virus de la granulosis de *Epinotia aporema*

En 1982 en Chile, se colectaron por primera vez larvas muertas de *E. aporema* con signos característicos de infección viral (Ripa, 1982). Por medio de estudios realizados en microscopio óptico se detectaron cuerpos de inclusión en tejidos de estas larvas y se asoció la patología a una infección producida por baculovirus.

En Oliveros (Santa Fe, Argentina), se realizaron estudios sobre la dinámica poblacional de *E. aporema* en cultivos de soja y se identificaron sus principales agentes de control biológico natural. Producto de dichas investigaciones, se detectó un granulovirus con alta incidencia en la mortalidad natural de larvas de dicha especie (Diaz y Diez, 1989), el cual fue denominado posteriormente EpapGV.

Ensayos preliminares a partir del aislamiento argentino, indicaron una alta virulencia de EpapGV sobre los diferentes estadios larvales de la plaga, sugiriéndose que el mismo podría poseer potencialidad de uso para el control de *E. aporema* en áreas de alta incidencia del insecto (Goldberg *et al.*, 2002; Goldberg Cavalleri, 2003; Sciocco-Cap *et al.*, 2001; Sosa-Gomez y Moscardi, 1992).

Virus de la poliedrosis de *Anticarsia gemmatalis*

En 1977, en el sur de Brasil, Carner y Turnipseed (1977) aislaron un baculovirus a partir de la oruga aterciopelada de las leguminosas (*A. gemmatalis*), un conocido defoliador de la soja. Poco tiempo después, se demostró que el baculovirus de *A. gemmatalis* (AgMNPV) era una de las mayores causas de mortalidad de las poblaciones de larvas en los cultivos de soja (Moscardi y Corso, 1981), y que era una herramienta mucho más eficiente, limpia y segura para el control de *A. gemmatalis* comparada con los insecticidas químicos (Moscardi *et al.*, 1985). Desde 1989/90 el virus AgMNPV fue aplicado a más de 1 millón de hectáreas por ciclo de cultivo de soja en Brasil, alcanzando 1,2 millones de *ha* en 1998. Se ha utilizado también en 100 mil *ha* de soja en Paraguay y en escala menor en Argentina y EEUU. Sin embargo, muchos productores se muestran reacios a la utilización de este virus debido a su relativamente baja velocidad de acción (produce la muerte en 6 a 8 días), comparada con el rápido efecto de los insecticidas químicos.

Contexto de trabajo

Desde hace mucho tiempo se conocen las limitaciones para el sector comercial, de los baculovirus como bioinsecticida. Se señala que: a) son demasiados específicos desde el punto de vista de la industria agroquímica, b) tienen un modo lento de acción, y c) la producción *in vivo* es relativamente costosa. Debemos tener en cuenta que no es posible que un entomopatógeno logre igualar las características de un insecticida sintético, ya que se comportan de manera diferente. Sin embargo, los bioinsecticidas tienen características únicas que pueden ser aprovechadas: a) la capacidad de

replicarse en el hospedante y dispersarse en el cultivo, b) la habilidad de actuar de manera sinérgica con otros enemigos naturales de la plaga, c) el potencial de ser producidos a escala regional o local, además de la escala industrial internacional.

Por otra parte, para disminuir las desventajas inherentes del sistema, existe la posibilidad de modificarlos genéticamente con el objeto de aumentar su eficacia como agentes de control biológico. Desde el punto de vista teórico se consideran dos tipos de modificaciones: por un lado, disminuir su especificidad, es decir ampliar su rango de hospedantes y por otro, modificar los factores de eficacia insecticida del virus, es decir la velocidad de acción y la dosis efectiva.

La posibilidad de generar baculovirus recombinantes mediante ingeniería genética ha permitido no solo la producción de nuevos agentes de control biológico, sino también el desarrollo de sistemas muy eficientes para la expresión de proteínas heterólogas (Luckow y Summers, 1988). Teniendo en cuenta esto, se puede considerar la posibilidad de aumentar la tasa de mortalidad producida por baculovirus salvajes, mediante introducción de modificaciones en sus genomas: la expresión de proteínas heteróloga como toxinas específicas para insectos (van Beek y Davis, 2007), hormonas de insecto, o el uso de estrategias basadas en RNA de interferencia (RNAi) entre otras alternativas (Kanginakudru *et al.*, 2007; Kramer y Bentley, 2003; Means *et al.*, 2003; Schultz *et al.*, 2009).

Considerando que *A. gemmatalis* y *E. aporema* son dos plagas importantes de interés agronómico en nuestro país, que pueden encontrarse simultáneamente a campo durante cierta época del año y que hay baculovirus aislados que tienen capacidad de infectarlas naturalmente; sería interesante la generación de un bioinsecticida que sea capaz de controlar ambas plagas a la vez. Esto podría lograrse mediante el uso de ambos virus en una formulación viral o mediante la generación de virus recombinantes que permitan ampliar el rango de hospedantes de AgMNPV hacia *E. aporema*, aprovechando la disponibilidad de líneas celulares permisivas a su infección y que permiten su manipulación. Es dentro de este contexto que surge el plan de trabajo de Tesis planteando los siguientes objetivos generales y particulares:

OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS

Desarrollo de un sistema de recombinación para la inserción de fragmentos de DNA heterólogos de gran tamaño en el genoma del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV).

Objetivos Particulares

- Evaluación de la infectividad de EpapGV y AgMNPV en larvas *A. gemmatalis*. Efectos de la administración conjunta de ambos virus.
- Estudio de la actividad transcripcional de promotores de EpapGV en células derivadas de *A. gemmatalis*.
- Desarrollo de un vector de transferencia para la inserción de fragmentos de DNA heterólogos en el genoma del virus de la poliedrosis nuclear de *A. gemmatalis* (AgMNPV).
- Generación de recombinantes de AgMNPV (rAgMNPV) con distintos fragmentos del genoma de EpapGV, o con genes particulares de EpapGV, utilizando los plásmidos de transferencia generados.

Referencias

- Abe, T., Hemmi, H., Miyamoto, H., Moriishi, K., Tamura, S., Takaku, H., Akira, S. & Matsuura, Y. (2005). Involvement of the Toll-like receptor 9 signaling pathway in the induction of innate immunity by baculovirus. *J Virol* **79**, 2847-2858.
- Adams, J. R. & McClintock, J. T. (1991). Nuclear polyhedrosis viruses of insects. In *Atlas of Invertebrate Viruses*, pp. 87-204. Edited by J. R. Adams & J. R. Bonami. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Aragón, J. (2002). Insectos perjudiciales de la soja y su manejo integrado en la Región Pampeana Central INTA.
- Aragón, J. (2007). Sistema de alarma de plagas agrícolas con Trampa de Luz y observaciones de campo. In *Planeta Soja*. Edited by C. I. E. M. Juárez.
- Aragón, J., Segura, L., Elorriaga, S., Resch, G., Miranda, R. & López, A. (2005). Sistema de alarma de plagas agrícolas. Edited by Comunicaciones: INTA EEA Marcos Juárez.
- Aragón, J. R., Molinari, A. & Lorenzatti, S. (1998). Manejo integrado de plagas. In *El cultivo de la soja en Argentina*, pp. 247-288. Edited by L. G. H. Baigorri: Argentina: INTA.
- Barrett, J. W., Brownwright, A. J., Primavera, M. J., Retnakaran, A. & Palli, S. R. (1998). Concomitant primary infection of the midgut epithelial cells and the hemocytes of *Trichoplusia ni* by *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Tissue Cell* **30**, 602-616.
- Benz, G. (1987). Epizootiology of infectious diseases. In *Environment*, pp. 177-214. Edited by J. R. F. y. Y. Tanada. NY: John Wiley y Sons.
- Benz, G. A. (1986). Historical perspectives. In *The Biology of Baculoviruses*, pp. 1-35. Edited by R. R. G. a. B. A. Federici. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Blissard, G. W. (1996a). Baculovirus--insect cell interactions. *Cytotechnology* **20**, 73-93.
- Blissard, G. W. (1996b). Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology* **20**, 73-93.
- Blissard, G. W. & Rohmann, G. F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev Entomol* **35**, 127-155.
- Blissard, G. W. & Wenz, J. R. (1992). Baculovirus gp64 envelope glycoprotein is sufficient to mediate pH-dependent membrane fusion. *J Virol* **66**, 6829-6835.
- Braunagel, S. C., Burks, J. K., Rosas-Acosta, G., Harrison, R. L., Ma, H. & Summers, M. D. (1999). Mutations within the *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus FP25K gene decrease the accumulation of ODV-E66 and alter its intranuclear transport. *J Virol* **73**, 8559-8570.
- Braunagel, S. C., Russell, W. K., Rosas-Acosta, G., Russell, D. H. & Summers, M. D. (2003). Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 9797-9802.
- Bulach, D. M., Kumar, C. A., Zaia, A., Liang, B. & Tribe, D. E. (1999). Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences. *J Invertebr Pathol* **73**, 59-73.
- Caballero, P., Williams, T. & López Ferber, M. (2001). Estructura y clasificación de los baculovirus. In *Los baculovirus y sus aplicaciones como insecticidas en el control biológico de plagas*, pp. 15-46. Edited by M. L. F. y. T. W. P. Caballero. Valencia, España: Phytoma S.A. .
- Cameron, J. W. M. (1973). Insect Pathology. *Annu Rev Entomol* **18**, 285-306.
- Carner, G. R. & Turnipseed, S. G. (1977). Potential of a nuclear polyhedrosis virus for control of the velvetbean caterpillar in soybean. *J Econ Entomol* **70**, 608-610.

- Claus, J. D. & Sciocco de Cap, A. (2001). Producción masiva de baculovirus. In *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas*. Edited by P. Caballero, M. López Ferber & T. Williams. Pamplona-España Universidad Pública de Navarra – Phytoma S.L.
- Clem, R. J., Fechheimer, M. & Miller, L. K. (1991). Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. *Science* **254**, 1388-1390.
- Clem, R. J. & Miller, L. K. (1993). Apoptosis reduces both the in vitro replication and the in vivo infectivity of a baculovirus. *J Virol* **67**, 3730-3738.
- Clem, R. J. & Miller, L. K. (1994). Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Mol Cell Biol* **14**, 5212-5222.
- Croizier, G., Croizier, L., Argaud, O. & Poudevigne, D. (1994). Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 48-52.
- Crouch, E. A. & Passarelli, A. L. (2002). Genetic requirements for homologous recombination in *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *J Virol* **76**, 9323-9334.
- Charlton, C. A. & Volkman, L. E. (1993). Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf 21 cells induces actin cable formation. *Virology* **197**, 245-254.
- Chisholm, G. E. & Henner, D. J. (1988). Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *J Virol* **62**, 3193-3200.
- D'Amico, V., and J. S. Elkinton (1995). Rainfall effects on transmission of the gypsy moth nuclear polyhedrosis virus. *Environmental Entomology* **24**, 1144-1149.
- DePamphilis, M. L. (1993). Origins of DNA replication that function in eukaryotic cells. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 434-441.
- Derksen, A. C. & Granados, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* **167**, 242-250.
- Diaz, B. & Diez, S. (1989). Presencia de un virus de la granulosis en larvas de *Epinotia aporema* (Wals.), en cultivos de soja. In *IV Conferencia Mundial de Investigación en soja*, pp. 1588-1592. Buenos Aires, Argentina.
- Dros, J. M. (2004). Managing the Soy Boom: Two scenarios of soy production expansion in South America. Edited by A. I. D. Environment. Amsterdam.
- Eisemann, C. H. & Binnington, K. C. (1994). The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *Int J Parasitol* **24**, 15-26.
- Entwistle, P. F. (1998). A world survey of virus control of insect pests. In *Insect viruses and pest management*, pp. 189-200. Edited by P. F. E. F.R. Hunter-Fujita, H.F. Evans y N.E. Crook. Chichester, U.K.: John Wiley and Sons.
- Faulkner, P. & Carstens, E. (1986). An overview of the structure and replication of baculoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **131**, 1-19.
- Federici, B. A. (1997). *Baculovirus Pathogenesis*. New York: Plenum Press.
- Flipsen, J. T., Martens, J. W., van Oers, M. M., Vlak, J. M. & van Lent, J. W. (1995). Passage of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus through the midgut epithelium of *Spodoptera exigua* larvae. *Virology* **208**, 328-335.
- Fraser, M. J. (1986). Ultrastructural observations of virion maturation in *Aulographa californica* nuclear polyhedrosis virus infected *Spodoptera frugiperda* cell cultures. *J Ultrastruct Mol Struct Res* **95**, 189-195.
- Funk, C. J. B., S. C. and Rohrmann, G. F. (1997). Baculovirus Structure. In *The Baculoviruses*, pp. 7-32. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.

- Goldberg, A. V., Romanowski, V., Federici, B. A. & Sciocco-Cap, A. (2002).** Effects of the Epap granulovirus on its host, *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae). *J Invertebr Pathol* **80**, 148-159.
- Goldberg Cavalleri, A. V. (2003).** Estudio biológico y molecular del proceso de infección de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema* y evaluación de su potencial como agente de control biológico. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Goulson, D. (1997).** Wipfelkrankheit : modification of host behaviour during baculoviral infection. *Oecologia* **109**, 219-228.
- Granados, R. R. & Williams, K. A., (eds) (1986).** *In vivo infection and replication of baculoviruses*. Boca Raton.
- Gröner, A. (1986).** Specificity and safety of baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses*, pp. 177-202. Edited by R. R. G. y. B. A. Federici. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Gruha, M. A., Buller, P. L. & Weaver, R. F. (1981).** alpha-Amanitin-Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells. *J Virol* **38**, 916-921.
- Gutierrez, B. & Pulido, J. (1978).** Ciclo de vida y hábitos de *Anticarsia gemmatalis* plaga de la Boya en el Valle del Cauca. *Rev Colomb Entomol* **4**, 3-9.
- Guzo, D., Rathburn, H., Guthrie, K. & Dougherty, E. (1992).** Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected gypsy moth cell lines. *J Virol* **66**, 2966-2972.
- Hefferon, K. L., Oomens, A. G., Monsma, S. A., Finnerty, C. M. & Blissard, G. W. (1999).** Host cell receptor binding by baculovirus GP64 and kinetics of virion entry. *Virology* **258**, 455-468.
- Heldens, J. G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1997).** Identification and functional analysis of a non-hr origin of DNA replication in the genome of *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* **78** (Pt 6), 1497-1506.
- Herniou, E. A. O., J. A.; Cory, J. S. and O'Reilly, D. R. (2003).** The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu Rev Entomol* **48**, 211-234.
- Hinds, W. & Osterberger (1931).** The soybean caterpillar in Louisiana. *Journal of Economic Entomology* **24**, 1168-1173.
- Hoopes, R. R., Jr. & Rohmann, G. F. (1991).** In vitro transcription of baculovirus immediate early genes: accurate mRNA initiation by nuclear extracts from both insect and human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 4513-4517.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes> (2008).**
- Hu, Y. C. (2008).** Baculoviral vectors for gene delivery: a review. *Curr Gene Ther* **8**, 54-65.
- Huang, J. & Levin, D. B. (1999).** Identification and functional analysis of a putative non-hr origin of DNA replication from the *Spodoptera littoralis* type B multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* **80** (Pt 8), 2263-2274.
- Huh, N. E. & Weaver, R. F. (1990).** Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **71**, 195-201.
- Iannone, N. (2007).** ALERTA! Plagas de Soja. Edited by C. s. d. alerta: INTA Pergamino.
- Iede, E. T. & Foerster, M. (1982).** Biología de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera:Tortricidae), em soja. In *Anais Soc Entom*, pp. 13-21. Brasil.
- IJkel, W., Lebbink, R. J., Op den Brouw, M. L., Goldbach, R. W., Vlak, J. M. & Zuidema, D. (2001).** Identification of a novel occlusion derived virus-specific protein in *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* **284**, 170-181.
- INDEC (2008).** http://www.indec.mecon.ar/principal.asp?id_tema=551. In *Sector Agropecuario*.

- Jacques, R. P. (1985). Stability of insect virus in the environment. In *Viral insecticides for biological control*, pp. 286-359. Edited by K. M. a. K. E. Sherman. Orlando: Academic Press Inc.
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M. & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol* **151**, 1257-1266.
- Kalmakoff, J. & Krauford, J. M. (1982). Enzootic virus control of *Wiseana* spp. in the pasture environment. In *Microbial and Viral Pestides*, pp. 435-448. Edited by G. Kurstak. New York: Marcel Dekker.
- Kamita, S. G. & Maeda, S. (1997). Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion. *Gene* **190**, 173-179.
- Kanginakudru, S., Royer, C., Edupalli, S. V., Jalabert, A., Mauchamp, B., Prasad, S. V., Chavancy, G., Couble, P. & Nagaraju, J. (2007). Targeting ie-1 gene by RNAi induces baculoviral resistance in lepidopteran cell lines and in transgenic silkworms. *Insect Mol Biol* **16**, 635-644.
- Kondo, A. & Maeda, S. (1991). Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **65**, 3625-3632.
- Kool, M., Ahrens, C. H., Goldbach, R. W., Rohrmann, G. F. & Vlak, J. M. (1994a). Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11212-11216.
- Kool, M., Ahrens, C. H., Vlak, J. M. & Rohrmann, G. F. (1995). Replication of baculovirus DNA. *J Gen Virol* **76** (Pt 9), 2103-2118.
- Kool, M., Goldbach, R. W. & Vlak, J. M. (1994b). A putative non-hr origin of DNA replication in the HindIII-K fragment of *Autographa californica* multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **75** (Pt 12), 3345-3352.
- Kramer, S. F. & Bentley, W. E. (2003). RNA interference as a metabolic engineering tool: potential for in vivo control of protein expression in an insect larval model. *Metab Eng* **5**, 183-190.
- Lee, H. & Krell, P. J. (1994). Reiterated DNA fragments in defective genomes of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus are competent for AcMNPV-dependent DNA replication. *Virology* **202**, 418-429.
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol* **42**, 525-550.
- Leisy, D. J. & Rohrmann, G. F. (1993). Characterization of the replication of plasmids containing hr sequences in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Virology* **196**, 722-730.
- Lepore, L. S., Roelvink, P. R. & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol* **68**, 131-140.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1995a). Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *J Virol* **69**, 6265-6272.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1995b). The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J Virol* **69**, 975-982.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1996). Species-specific effects of the hcf-1 gene on baculovirus virulence. *J Virol* **70**, 5123-5130.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1997). Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In *The baculoviruses*, pp. 193-211. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum.
- Luckow, V. A. & Summers, M. D. (1988). Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology* **167**, 56-71.

- Maeda, S., Kamita, S. G. & Kondo, A. (1993).** Host range expansion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from *Bombyx mori* NPV. *J Virol* **67**, 6234-6238.
- Means, J. C., Muro, I. & Clem, R. J. (2003).** Silencing of the baculovirus Op-iap3 gene by RNA interference reveals that it is required for prevention of apoptosis during *Orgyia pseudotsugata* M nucleopolyhedrovirus infection of Ld652Y cells. *J Virol* **77**, 4481-4488.
- Miller, L. K. J., J. and E. Browne, D. (1981).** Baculovirus induction of a DNA polymerase. *J Virol* **40**, 305-308.
- Mori, H., Nakazawa, H., Shirai, N., Shibata, N., Sumida, M. & Matsubara, F. (1992).** Foreign gene expression by a baculovirus vector with an expanded host range. *J Gen Virol* **73** (Pt 7), 1877-1880.
- Moscardi, F. (1999).** Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* **44**, 257-289.
- Moscardi, F. & Corso, I. C. (1981).** Influencia do estadio larval de *Anticarsia gemmatalis* Hubner na suscetibilidade ao seu virus de poliedrose nuclear. In *Resultados de pesquisa de soja 1980/81*, pp. 458-465. Londrina, Brasil: EMBRAPA-CNPSO. Londrina, PR.
- Moscardi, F., Leite, L. G. & Zamataro, C. E. O. (1985).** Teste da atividade de uma formulacao po molhavel de Baculovirus anticarsia em laboratorio. In *Resultados de pesquisa de soja 1984/85*, pp. 129-130. Londrina. Brasil: EMBRAPA-CNPSO. Londrina, PR.
- Moscardi, F. M., L and Santos B. (2002).** The successful use of AgMNPV for the control of velvetbean caterpillar, *A. gemmatalis*, in soybean in Brazil. In *XXXV SIP Meeting*, pp. 86-91. Foz do Iguazu, Brazil.
- Murphy, F. A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and, Summers, M.D. (1995).** The Classification and Nomenclature of viruses: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, New York. *Virus Taxonomy*
- Ooi, B. G. & Miller, L. K. (1990).** Transcription of the baculovirus polyhedrin gene reduces the levels of an antisense transcript initiated downstream. *J Virol* **64**, 3126-3129.
- Oppenheimer, D. I. & Volkman, L. E. (1995).** Proteolysis of p6.9 induced by cytochalasin D in *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus-infected cells. *Virology* **207**, 1-11.
- Oppenheimer, D. I. & Volkman, L. E. (1997).** Evidence for rolling circle replication of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus genomic DNA. *Arch Virol* **142**, 2107-2113.
- Pearson, M. N., Bjornson, R. M., Ahrens, C. & Rohrmann, G. F. (1993).** Identification and characterization of a putative origin of DNA replication in the genome of a baculovirus pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* **197**, 715-725.
- Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1995).** *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins. *J Virol* **69**, 213-221.
- Pullen, S. S. & Friesen, P. D. (1995).** The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1. *J Virol* **69**, 3575-3583.
- Quant-Russell, R. L. P., M. N.; Rohrmann, G. F. and Beaudreau, G. S. (1987).** Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. *Virology* **160**, 9-19.
- Ripa, R. (1982).** Presencia de dos nuevos patógenos en *Epinotia aporema* Wals. *Agricultura Técnica* **41**, 55-56.
- Rohrmann, G. F. (1992).** Baculovirus structural proteins. *J Gen Virol* **73** (Pt 4), 749-761.
- Rojas-Fajardo, G. (1998).** Estudio de la interacción entre el "barrenador de los brotes" *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914), el cultivo de soja *Glycine max* (Merrill) y otras leguminosas. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Naturales y Museo*, p. 186. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

- Romanowski, V. & Ghiringhelli, P. D. (2001). Biología molecular de baculovirus: Replicación y regulación de la expresión génica. In *Los Baculovirus y sus Aplicaciones como Bioinsecticidas*, pp. 119-142. Edited by P. Caballero, M. López-Ferber & T. Williams. Pamplona, España: Universidad Pública de Navarra- Phytoma S.L.
- SAGPYA (2008). <http://www.sagpya.mec.gov.ar>. In *Estimaciones Agrícolas*. Buenos Aires.
- Sciocco-Cap, A., Parola, A. D., Goldberg, A. V., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001). Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3702-3706.
- Schultz, K. L., Wetter, J. A., Fiore, D. C. & Friesen, P. D. (2009). Transactivator IE1 is required for baculovirus early replication events that trigger apoptosis in permissive and nonpermissive cells. *J Virol* **83**, 262-272.
- Shoji, I., Aizaki, H., Tani, H., Ishii, K., Chiba, T., Saito, I., Miyamura, T. & Matsuura, Y. (1997). Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol* **78** (Pt 10), 2657-2664.
- Slack, J. & Arif, B. M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res* **69**, 99-165.
- Smith, G. E. S., M. D. and Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol* **3**, 2156-2165.
- Sosa-Gomez, D. R. & Moscardi, F. (1992). Epizootiología: chave dos problemas para o controle microbiano com fungos. In *SIMPOSIO DE CONTROLE BIOLOGICO*, pp. 64-69: Aguas de Lindoia. Anais. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA.
- Steinhaus, E. A. (1963). Background for the diagnosis of insect diseases. In *Insect Pathology: An Advanced Treatise*. Edited by N. Y. Academic Press.
- Steinhaus, E. A. (1967). On the importance of invertebrate pathology in comparative pathology. *J Invertebr Pathol* **9**, i-v.
- Stern, V. M., Smith, R. F., van den Bosch, R. & Hagen, K. S. (1959). The integrated control concept. *Hilgardia* **29**, 81-101.
- Theilmann, D. A., Blissard, G. W., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D. R., Rohrmann, G. F., Theim, S. & Vlak, J. M. (2005). Baculoviridae. In *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 177-185. Edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball. London: Elsevier/Academic Press.
- Thiem, S. M., Du, X., Quentin, M. E. & Berner, M. M. (1996). Identification of baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. *J Virol* **70**, 2221-2229.
- Tjia, S. T., zu Altenschildesche, G. M. & Doerfler, W. (1983). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology* **125**, 107-117.
- van Beek, N. & Davis, D. C. (2007). Baculovirus insecticide production in insect larvae. *Methods Mol Biol* **388**, 367-378.
- Van der Wilk, F., van Lent, J.W.M. and Vlak, J.M. (1987). Immunogold detection of polyhedrin, p10 and virion antigens in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of General Virology* **68**, 2615-2623.
- van Oers, M. M. F., J. T.; Reusken, C. B.; Sliwinsky, E. L.; Goldbach, R. W. and Vlak, J. M. (1993). Functional domains of the p10 protein of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **74** (Pt 4), 563-574.
- Vasconcelos, S. D. (1996). Alternative Routes for the Horizontal Transmission of a Nucleopolyhedrovirus. *J Invertebr Pathol* **68**, 269-274.

Villata, C. A. & Ayessa, A. M. (1994). Manejo integrado de plagas en soja. *Agro de Cuyo* **7**, 71.

Vlak, J. M., Schouten, A., Usmany, M., Belsham, G. J., Klinge-Roode, E. C., Maule, A. J., Van Lent, J. W. & Zuidema, D. (1990). Expression of cauliflower mosaic virus gene I using a baculovirus vector based upon the p10 gene and a novel selection method. *Virology* **179**, 312-320.

Westenberg, M. & Vlak, J. M. (2008). GP64 of group I nucleopolyhedroviruses cannot readily rescue infectivity of group II f-null nucleopolyhedroviruses. *J Gen Virol* **89**, 424-431.

Wickham, T. J., Granados, R. R., Wood, H. A., Hammer, D. A. & Shuler, M. L. (1990). General analysis of receptor-mediated viral attachment to cell surfaces. *Biophys J* **58**, 1501-1516.

Williams, G. a. F., P. (1997). Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection. In: *The Baculoviruses*, (LK Miller, Ed) Plenum Press, New York, 61-107.

Williams, G. V. R., D. Z.; Kuzio, J. and Faulkner, P. (1989). A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion/deletion mutants. *J Gen Virol* **70**, 187-202.

Wu, Y., Liu, G. & Carstens, E. B. (1999). Replication, integration, and packaging of plasmid DNA following cotransfection with baculovirus viral DNA. *J Virol* **73**, 5473-5480.

CAPÍTULO II

**Efectos de la administración conjunta
de EpapGV y AgMNPV en larvas de
*Anticarsia gemmatalis***

Resumen

En nuestro país se caracterizaron aislamientos autóctonos de baculovirus a partir de larvas infectadas de *Epinotia aporema* y *Anticarsia gemmatalis*. Estos virus, denominados EpapGV (*Epinotia aporema Granulovirus*) y AgMNPV (*Anticarsia gemmatalis Nucleopolyhedrovirus*) están siendo evaluados para ser utilizados como bioinsecticidas para el control de sus hospedantes homónimos. Con el fin de evaluar el uso potencial de dichos virus como bioinsecticidas, se estudió el efecto de la inoculación simultánea con EpapGV y AgMNPV, en larvas de *A. gemmatalis* y el posible mejoramiento de la virulencia mediante el agregado de ácido bórico a las mezclas virales. Los resultados obtenidos indican una aparente acción sinérgica, con una disminución del tiempo letal medio de AgMNPV en larvas de *A. gemmatalis*. Si bien no se observó infección con el virus de EpapGV en estas larvas, la presencia de gránulos en la mezcla viral pareció facilitar la infección por AgMNPV.

Introducción

La información acerca del rango de hospedantes es un requerimiento para el registro de pesticidas microbianos, y es un componente crucial de las características biológicas que definen una especie particular de patógeno. En términos del rango de hospedantes ideal, hay un desencuentro entre las preocupaciones ambientales, donde se prefiere un estrecho rango de hospedantes, y los intereses comerciales y de aplicación, los cuales prefieren un producto que sea capaz de atacar a todas las plagas presentes en un cultivo (Cory, 2003). Para los bioinsecticidas a base de baculovirus, el rango de hospedantes es a menudo considerado como demasiado estrecho para hacer frente al complejo de plagas que se encuentran en un cultivo.

Es conocido que los insectos son comúnmente infectados por más de un virus (Hess *et al.*, 1978; Steinhaus, 1963; Tanada, 1969; Tanada y Chang, 1964). Por medio del uso de microscopía electrónica se han encontrado hasta cinco virus en las células de insecto, incluyendo baculovirus (Hess *et al.*, 1978). El estudio de las infecciones múltiples es interesante dado que, comparando con infecciones virales simples, las otras pueden resultar en una disminución (inhibición virus-virus), efecto aditivo (efectos neutros) o aumento (interacciones virales sinérgicas) de la mortalidad del hospedante. Varios estudios han demostrado que los granulovirus (GV) aumentan la infectividad de los nucleopoliedrovirus (NPV). Sin embargo, cuando las larvas fueron doblemente infectadas con un NPV y un GV, se observó interferencia entre los dos virus en *Choristoneura fumiferana* (Bird, 1959), en *Heliothis armigera* (HaSNPV y HaGV) (Whitlock, 1977) y en *Helicoverpa zea* (HzSNPV y HaGV) (Hackett *et al.*, 2000), mientras que no hubo interferencia o aumento de infectividad entre los virus en *Trichoplusia ni* (Lowe y Paschke, 1968), en *Hyphantria cunea* (HycuNPV e HcGV) (Boucias y Nordin, 1977) y en *Adoxophyes orana* (AdorGV y AdorNPV) (Fluckiger, 1982). Tanada (1959) demostró una asociación sinérgica entre un NPV y un GV en *Pseudaletia unipuncta* (PuNPV y PsunGV). Resultados similares se reportaron para las combinaciones NPV-GV con *Pseudaletia separata* (PuNPV y GVH) (Hukuhara, 1987), *T. ni* (TnGV y AcMNPV) (Derksen y Granados, 1988), *Xestia c-nigrum* (XcNPV y XcGV) (Goto, 1989) y *Mamestra brassicae* (MbNPV y XcGV) (Mukawa y Goto, 2007).

Estudios posteriores permitieron identificar al factor responsable de este aumento de la virulencia, al cual se lo denominó factor aumentador viral (*viral enhancing factor* (VEF) o *enhancin*), y se lo encontró en varios GV y algunos NPV (Bischoff y Slavicek, 1997; Hashimoto *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2003a; Popham *et al.*, 2001; Roelvink *et al.*, 1995). Los VEF son una clase de metaloproteasas que facilitan la infección viral por

degradación de proteínas de alto peso molecular presentes en la matriz de la membrana peritrófica (MP) del intestino medio del insecto (Derksen y Granados, 1988; Lepore *et al.*, 1996). La MP está constituida por quitina y mucina tipo II y se ha demostrado que es la mucina el blanco de acción de los VEF (Wang y Granados, 1997).

Por otro lado, se ha demostrado que las estructuras paracristalinas en forma de huso (*spindles*) que generan los entomopoxvirus (EPV) también facilitan la infección del insecto hospedante por disrupción de la MP (Mitsubishi *et al.*, 2007). Este mecanismo se ha atribuido a la presencia de la proteína fusolina en estas estructuras, la cual ha posibilitado aumentar la infectividad de los NPV hacia sus hospedantes en ensayos de inoculación conjunta (Hayakawa *et al.*, 1996; Hukuhara *et al.*, 1999; Mitsubishi *et al.*, 1998). Las fusolinas, a nivel aminoacídico, son muy similares a las proteínas GP37 encontradas en baculovirus (Arif, 1995; Li *et al.*, 2003b) y a las proteínas de unión a quitina descritas en bacterias (Tsujibo *et al.*, 2002; Vaaje-Kolstad *et al.*, 2005). Li *et al.* han demostrado que GP37 del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera litura* (SplMNPV) tiene la capacidad de unirse a la quitina presente en la MP de *S. litura*. Ensayos de localización celular, indicaron que la proteína GP37 de SplMNPV se distribuye a través del núcleo y del citoplasma de las células infectadas, al igual que GP37 del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV). Mientras que en los nucleopoliedrovirus de *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV) y *M. brassicae* (MbMNPV) la proteína es principalmente citoplasmática (Gross *et al.*, 1993; Phanis *et al.*, 1999). Análisis de *western blot* revelaron que GP37 de SplMNPV se asocia tanto a los virus derivados de oclusión (*occlusion derived virus*, ODVs) como a los virus brotantes (*budded virus*, BVs). Esto difiere de GP37 de AcMNPV, en el cual se observó asociada a los cuerpos de oclusión (*occlusion bodies*, OBs) pero no a los BV (Gross *et al.*, 1993; Vialard *et al.*, 1995; Vialard *et al.*, 1990), mientras que en OpMNPV y MbMNPV no se encontró asociada ni a BV ni a OB.

Es de destacar que, casi la totalidad de los estudios realizados en relación con la interacción de mezclas de GV y NPV, o de EPV y NPV, se efectuaron a partir de baculovirus permisivos para una misma especie de lepidóptero.

La permeabilidad de la MP (Wang y Granados, 2000; Zhu *et al.*, 2007), y con ello el aumento de la probabilidad de la infección viral, puede lograrse mediante el agregado de brillantadores ópticos que se utilizan en las formulaciones virales. Se ha descrito que el estilbena aumenta la probabilidad de la infección viral por inhibición de la síntesis de quitina (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1994; Elorza *et al.*, 1983), por otro lado, el agregado de Calcofluor M2R a preparaciones de cuerpos de oclusión de AcMNPV

provoca una reducción de la tasa de desprendimiento de células del intestino medio de larvas de *Heliothis virescens* y de *T. ni*, lo que facilita la infección (Washburn et al., 1998). Esto es debido a que estas células, que son primeramente infectadas, tardan en desprenderse, permitiendo la diseminación de la infección en forma más eficiente. Una consideración interesante de destacar es que rangos altos de desprendimiento de células del intestino en larvas de los últimos estadios de desarrollo representa una de las causas principales de resistencia a la infección por baculovirus.

Otra alternativa -de menor costo- que posee un efecto similar al de los abrillantadores ópticos, es el uso de ácido bórico en las formulaciones baculovirales (Cisneros et al., 2002; Lauro Morales, 1997; Shapiro y Bell, 1982). El grado de potenciación aumenta con el incremento de la concentración del mismo, y su efecto se refleja en la disminución del tiempo letal medio.

Considerando que *E. aporema* y *A. gemmatalis* son especies que se presentan en ciertas áreas como plagas simultáneas y sobre la base de los antecedentes mencionados, se procedió a verificar si EpapGV y AgMNPV son capaces de causar infecciones cruzadas o coinfecciones sobre sus hospedantes naturales. Paralelamente, se analizó el efecto de inoculaciones conjuntas de AgMNPV y EpapGV y del agregado de ácido bórico como ingrediente acrecentador de virulencia, en larvas de *A. gemmatalis*. Los estudios encarados, además de brindar conocimientos utilizables en el diseño de las estrategias de mejoramiento genético de AgMNPV, contribuyen en lo inmediato al posible desarrollo de nuevas formulaciones baculovirales con mayor poder insecticida.

Materiales y métodos

Insectos. Las larvas de *E. aporema*, *A. gemmatalis*, *Rachiplusia nu* y *Eulia* sp empleadas tanto para los bioensayos como para la multiplicación de virus, fueron provistas por el insectario del IMYZA-INTA, Castelar. La cría de insectos se realizó bajo condiciones controladas de temperatura (26 ± 1 °C), humedad relativa (50-70%) y fotoperíodo (14:10 L/O) y fueron mantenidas en dieta artificial (Greene *et al.*, 1976).

Virus. Los virus de EpapGV y AgMNPV (aislamiento argentino, AgMNPV-A, y clon 2D) fueron multiplicados en larvas de cuarto estadio de sus respectivos hospedantes. La propagación se realizó por contaminación superficial de la dieta (sin formaldehído) con cuerpos de inclusión (1×10^4 OBs/mm²). Las larvas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura (26 ± 1 °C) y humedad (50%) hasta el momento de recolección del material infectado. El virus vAgEGT Δ -lacZ⁺ (Pinedo *et al.*, 2003), fue amplificado en cultivos de células UFLAg-286 (Sieburth y Maruniak, 1988), mediante infección superficial (MOI = 0,1) de la monocapa y mantenidas a 27 °C por 7 días. Los virus brotantes (BV) fueron recuperados del medio sobrenadante de las células infectadas, previa centrifugación a 5000 rpm durante 5 min, para separar células y restos celulares.

Infección de larvas de distintos lepidópteros con AgMNPV. Se inocularon lotes de larvas de *A. gemmatalis* (control positivo), *E. aporema*, *R. nu* y *Eulia* sp. en el hemocele con 1 μ l (10^8 pfu/ml) de vAgEGT Δ -lacZ⁺. Se realizaron cuatro ensayos, usando en cada uno diez larvas de cada especie, a las que luego del tratamiento se les suministró dieta artificial e incubó en estufa a 27 °C. Se tomaron muestras de la hemolinfa y tejidos cada 24 h y se hicieron extendidos de los mismos sobre placas *multiwell* y portaobjetos, respectivamente. Las muestras fueron desecadas en estufa a 37 °C por 12 h, fijadas mediante agregado de formaldehído 2% por 5 min, lavadas dos veces con PBS, cubiertas con una solución de *X-gal* (1 mg/ml) e incubadas a 37 °C por al menos dos horas o hasta aparición de coloración azul.

Bioensayos. Los bioensayos fueron realizados según la metodología descrita por Hughes y Wood (1986). Para ello, los insectos fueron desprovistos de alimento durante 12 h y luego se les suministró una gota de suspensión viral dispuesta sobre *Parafilm*, utilizándose sacarosa al 1% como fagoestimulante y *Coomassie Brilliant Blue* al 0,1% como colorante para la verificación final de la ingesta. Sólo se seleccionaron aquellos individuos en los que se observó el contenido de la suspensión hasta la mitad

del tracto digestivo. Los ensayos se realizaron en una cámara climatizada a 26 ± 1 °C, 50% de humedad relativa y 14:10 horas L/O.

Se ensayaron dos dosis de AgMNPV (50 y 300 OB/larva) y una de EpapGV (6000 OB/larva), sobre 30 individuos por grupo, los ensayos se realizaron al menos 3 veces. Se utilizaron como inóculo tanto los virus individuales (AgMNPV-A y EpapGV) como la mezcla (AgMNPV/EpapGV en relación 50/6000 OB/larva y 300/6000 OB/larva), asimismo, se evaluó el agregado de ácido bórico al 0,1% a cada grupo. Las larvas control fueron tratadas en forma idéntica con soluciones que no contenían virus de AgMNPV.

En el caso del bioensayos realizado sobre *R. nu*, se utilizaron 4 dosis de AgMNPV (300, 600, 900 y 1800 OB/larva), el mismo se hizo sobre un grupo de 15 larvas.

La concentración del inóculo inicial se determinó mediante el uso de una cámara de Petroff-Hauser. Una vez ingerida la dosis, las larvas fueron transferidas a recipientes individuales conteniendo dieta artificial. La mortalidad fue registrada a intervalos de 12 h. El cálculo de los respectivos tiempos de supervivencia medios se realizó utilizando el programa Vistat® (Cornell University) especialmente diseñado para ensayos con baculovirus. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANAVA) usando el software InfoStat (versión 2008). Para la comparación de los valores obtenidos (TL_{50}) se utilizó el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación (α) de 0,05.

Extracción de DNA total. Las larvas recolectadas fueron maceradas en baño hielo-agua, esta mezcla se filtró a través de una gasa colocada en un tubo *ependorf* de 0,5 ml perforado en su base. El filtrado fue tratado con Na_2CO_3 a concentración final de 0,1 M durante 30 min, se neutralizó la solución mediante agregado de Tris-HCl (pH 6,2). Las muestras fueron hervidas por 5 min y se utilizó 1 μ l de esta solución para la reacción de PCR.

PCR. La presencia de DNA viral de AgMNPV y EpapGV en larvas infectadas y coinfectadas fue determinada mediante PCR (Sambrook, 1989) utilizando *primers* específicos que amplifican el ORF de poliedrina (orf-I y orf-f) (Arana *et al.*, 2001) y el ORF de granulina (Gr-up y Gr-down) (Manzán, 2002), respectivamente. Los productos de amplificación fueron analizados en geles de agarosa 1% y visualizados bajo luz UV mediante tinción con Bromuro de etidio.

Extracción de DNA a partir de cuerpos de oclusión. Las larvas infectadas fueron maceradas con la ayuda de un mortero, se agregó agua para ayudar a la

homogeneización, esta mezcla se incubó a temperatura ambiente una semana. Posteriormente, se filtró la mezcla a través de gasa, se midió el volumen y se agregó SDS a concentración final de 0,1%. Se centrifugó 2 min a 2000 rpm en rotor SS34 (Sorvall) para eliminar todos los restos celulares. El sobrenadante se centrifugó por 20 min a 5000 rpm, este paso se repitió 3 veces. El *pellet* obtenido se disolvió en 2 ml de SDS 0,5% y se centrifugó a 5000 rpm por 20 min, luego se trató con SDS al 0,2% y 0,1%, y se centrifugó 20 min a 5000 rpm. Posteriormente, los OB se resuspendieron en agua y se centrifugó por 20 min a 5000 rpm, este paso se realizó tres veces. Finalmente se disolvieron en agua y se verificó su limpieza por medio de observación al microscopio de contraste de fase (400X).

A una solución de 1×10^9 poliedros en 500 μ l de agua, se le agregó 55 μ l de Na_2CO_3 1 M para llevar la suspensión a una concentración final de 0,1 M. Se incubó 30 min a temperatura ambiente para permitir la disolución de los poliedros y la liberación de los viriones. Cuando la solución se tornó transparente se agregó 55 μ l de Tris-HCl 1 M pH 7,6 para neutralizar la suspensión. Se centrifugó a 7000 rpm durante 2 min para sedimentar los poliedros no disueltos e impurezas contaminantes. El sobrenadante se llevó a una concentración final de 10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,25% SDS y 500 μ g/ml proteinasa K, se incubó ON a 37 °C con agitación suave. Se realizaron tres extracciones sucesivas (fenol/ fenol-cloroformo-isoamílico/ cloroformo-isoamílico) agregando 500 μ l de solvente orgánico en cada caso. Se llevó la fase acuosa a una concentración final de 0,2 M NaCl, se agregó 500 μ l de isopropanol para precipitar y posteriormente se lavó el *pellet* con 500 μ l de etanol 70%, se centrifugó a 14000 rpm 5-10 min. El *pellet* se resuspendió en 50 μ l de TE.

SDS-PAGE. Las proteínas contenidas en la membrana peritrófica de larvas de *A. gemmatalis*, fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) usando el equipo Mini-protean II (Bio-Rad). Las MP fueron extraídas a distintos tiempos post-inoculación, lavadas con agua bidestilada y se mezclaron con *buffer* 1X.

Resultados

Infección de larvas de diferentes lepidópteros con AgMNPV

La información disponible acerca del rango de hospedantes de AgMNPV se limita a las especies: *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens* y *Trichoplusia ni* (Grasela y McIntosh, 1998), en consecuencia se planteó en una primera etapa, hacer un ensayo para identificar posibles hospedantes alternativos, considerando las principales especies de lepidópteros que también afectan al cultivo de la soja en nuestro país: *E. aporema*, *R. nu*, y *Eulia* sp, utilizándose *A. gemmatalis* como control positivo.

Para ello, se analizó el efecto de la inyección del virus recombinante vAgEGT Δ -lacZ⁺ (Pinedo *et al.*, 2003) que contiene el gen indicador *lacZ* bajo el control del promotor constitutivo *hsp70* en el locus del gen *egt* de AgMNPV-2D. A las 24 y 72 h post-inyección (p.iy.) se extrajo hemolinfa, se extendió sobre portaobjetos y se detectó la presencia del virus en estas células, mediante tinción histoquímica con el sustrato cromogénico *X-gal*. La **Fig. II.1** muestra los resultados obtenidos luego de la tinción de los tejidos fijados. Pudo observarse coloración en la hemolinfa proveniente de *A. gemmatalis* y de *R. nu* a partir de las 24 h p.iy. y hasta la muerte de las larvas. Por el contrario, en hemolinfa de *E. aporema* y de *Eulia* sp. inyectadas con el virus, así como en larvas de *A. gemmatalis* sin infectar, no se detectaron células teñidas de azul.

Para verificar si el virus fue capaz de iniciar una infección productiva dentro de la larva diseminando la infección a diversos órganos y/o tejidos, las especies que mostraron ser susceptibles a las 24 h p.iy. fueron disecadas a las 72 h. Se realizó un extendido y tinción de tejidos sobre portaobjetos. Como puede observarse en la parte inferior de la **Fig. II.1**, tanto los extendidos de tejidos de *R. nu* como de *A. gemmatalis* presentaron zonas coloreadas, indicando la presencia del virus en otros tejidos distintos al de inoculación. Sin embargo, no se pudo detectar la expresión del gen indicador en ninguna de las muestras de *E. aporema* ni de *Eulia* sp.

Sobre la base de estos resultados y para descartar que hubiera alguna barrera durante la infección natural *per os*, se suministraron suspensiones de OB de AgMNPV-A a las larvas de segundo estadio de *R. nu*. Se registró mortalidad sólo con dosis mayores a 300 OB/larva, lo cual indica que si bien la especie es susceptible a la infección se requerirían altas dosis de aplicación del virus para un control efectivo.

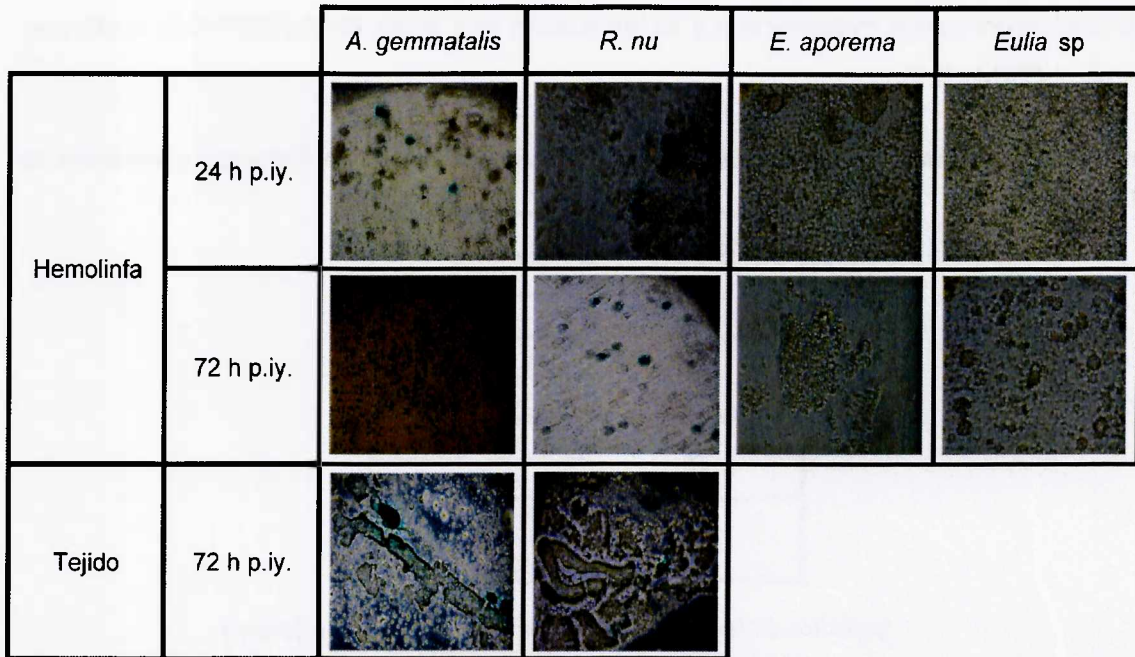


Figura II.1: Micrografías de hemolinfa y extendido de tejidos de larvas de *Anticarsia gemmatalis*, *Rachiplusia nu*, *Epinotia aporema* y *Eulia sp*.

Inoculadas con vAgEGTΔ-lacZ⁺ y reveladas con X-Gal. La hemolinfa fue extraída a las 24 y 72 h post-inyección (p.iy.). El extendido de tejidos sólo se realizó a las 72 h p. iy. sobre las especies que resultaron susceptibles.

Efectos de la administración conjunta de AgMNPV y EpapGV sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis*

Como se mencionó en la introducción, se ha demostrado la capacidad de ciertos GV de provocar un aumento de la virulencia a los NPV en sus hospedantes. Para evaluar si EpapGV puede causar el mismo efecto en AgMNPV, se diseñaron ensayos tendientes a evaluar el efecto de la interacción entre estos virus, así como la inclusión de ácido bórico en la preparación viral sobre larvas de *A. gemmatalis*.

Este ensayo se realizó mediante la técnica peroral (**Fig. II.2**), considerando los datos de volúmenes ingeridos por Kunimi y Fuxa (1996) para larvas de tercer estadio de *A. gemmatalis* ($155 \pm 13,9$ nl), de los datos disponibles de DL₅₀ para el aislamiento argentino de AgMNPV (168 OB/larva) y de los antecedentes acerca de la ausencia de virulencia de EpapGV en *A. gemmatalis* (Sciocco-Cap *et al.*, 2001) .



Figura II.2: Método de “la gotita”. Larva de *Anticarsia gemmatalis* de tercer estadio ingiriendo el inóculo viral.

Se realizaron cuatro tratamientos y se evaluaron dos dosis de AgMNPV en cada uno de ellos (**Tabla II.1**).

Tabla II.1: Denominación de los tratamientos realizados sobre larvas de *Anticarsia gemmatalis* de tercer estadio.

Tratamiento	Dosis
1	300*
	50*
2	300/6000**
	50/6000**
3	300-AB§
	50-AB§
4	300/6000-AB
	50/6000-AB

*poliedros de AgMNPV, **poliedros AgMNPV/gránulos EpaGV, §AB indica el agregado de ácido bórico al 0,1%.

Los gráficos de porcentaje de mortalidad acumulada en el tiempo, permitieron hacer una primera aproximación acerca del efecto que produce EpaGV en la infección por AgMNPV en *A. gemmatalis*. En la **Fig. II.3**, se comparan los valores de mortalidad acumulada obtenidos para el tratamiento 1 y 2 (virus sólo y mezcla viral).

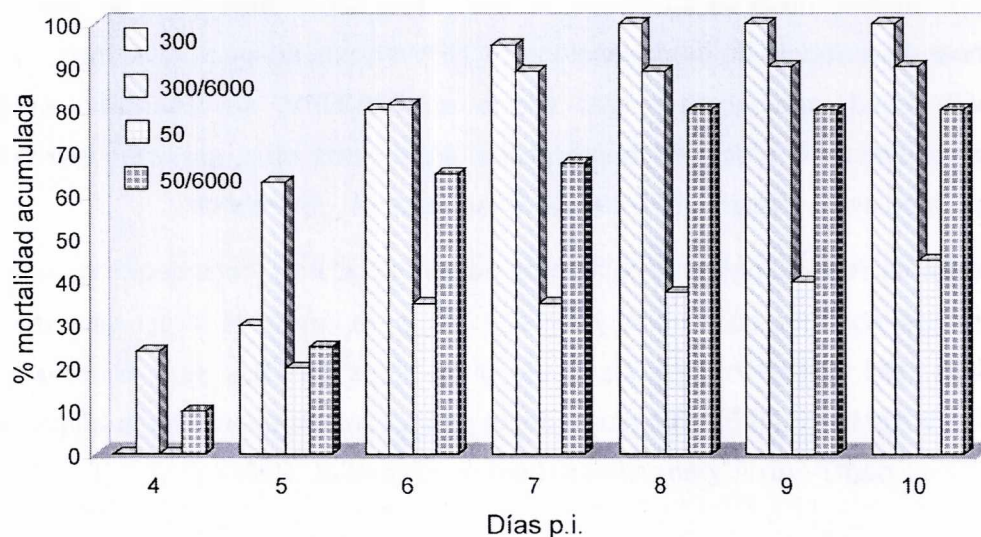


Figura II.3: % de mortalidad acumulada vs. días post-infección (p.i.).

Bioensayos realizados sobre larvas de *A. gemmatalis* de tercer estadio, tratadas con virus de AgMNPV sólo (300 y 50 poliedros, OB/larva) o con la mezcla viral AgMNPV/EpaGV (300/6000 o 50/6000, poliedros/gránulos, OB/larva). El control de larvas sin infectar no se muestra, no se registraron muertes. Las desviaciones estándar oscilaron entre $\pm 2,33$ (50 OB AgMNPV) y $\pm 10,61$ (300/6000 mezcla viral).

La diferencia más notoria en mortalidad entre los tratamientos se observó entre las dosis más bajas evaluadas (50 OB AgMNPV vs. 50/6000 OB AgMNPV/EpapGV).

En los gráficos que continúan se compara el tratamiento 1 (virus solo) con el tratamiento 3 (virus más ácido bórico) (**Fig. II.4.A**) y el tratamiento 1 con el tratamiento 4 (mezcla viral más ácido bórico) (**Fig. II.4.B**).

Como puede apreciarse, el agregado de ácido bórico al 0,1% a las dosis ensayadas, no acentuó el registro de mortalidad observado previamente (tratamiento 2, con la mezcla viral sola).

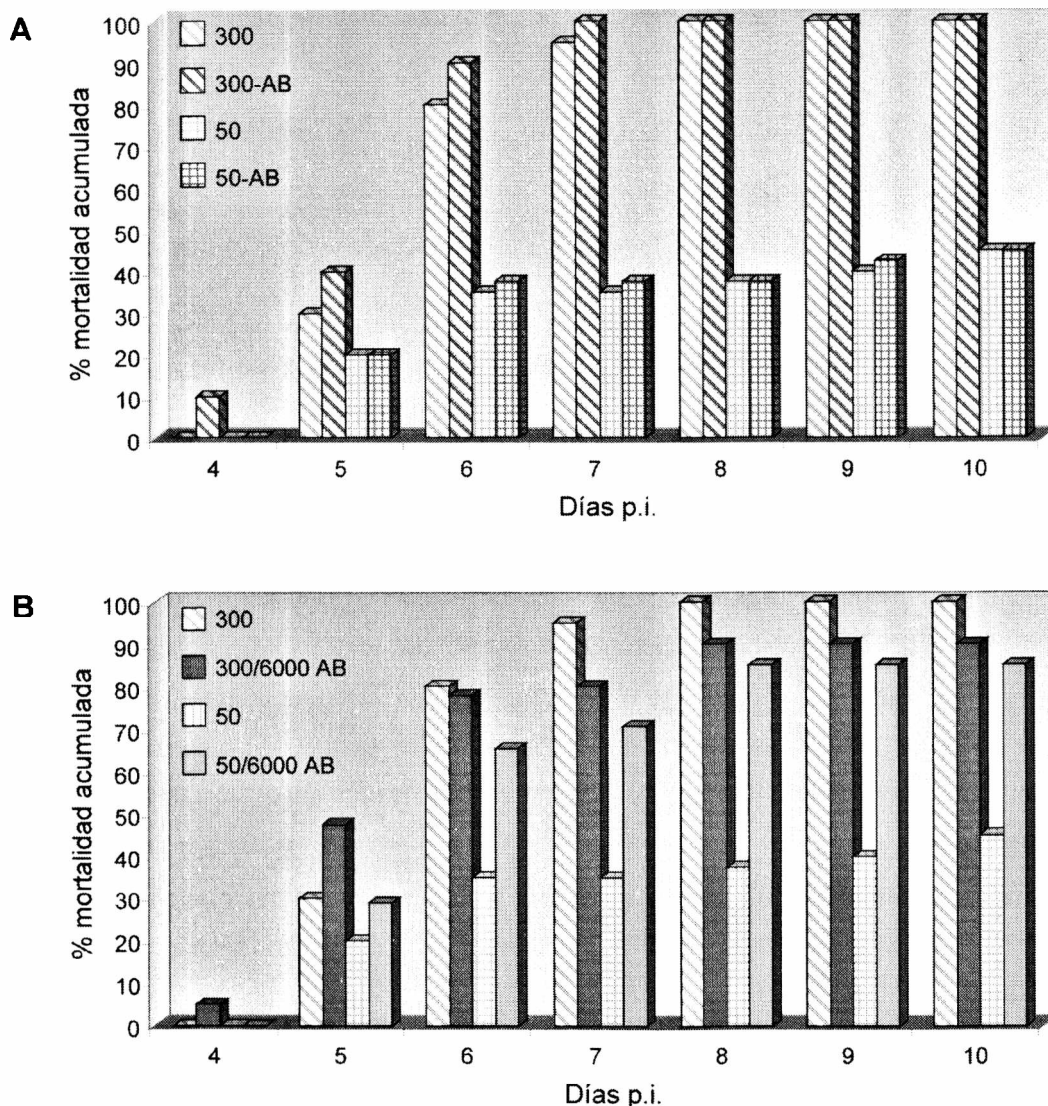


Figura II.4: % de mortalidad acumulada vs. días post-infección (p.i).

Bioensayos realizados sobre larvas de *A. gemmatalis* de tercer estadio.

A: comparación de tratamientos 1 y 3, infectadas con AgMNPV sólo o con AgMNPV más el agregado de ácido bórico al 0,1%;

B: comparación de tratamientos 1 y 4, infectadas con AgMNPV sólo o con la mezcla viral AgMNPV/EpapGV más el agregado de ácido bórico al 0,1%.

Las desviaciones estándar oscilaron entre $\pm 2,33$ (50 OB AgMNPV) y $\pm 10,61$ (300/6000 mezcla viral).

Con los datos de mortalidad obtenidos, para cada uno de los tratamientos y dosis ensayadas, se calculó el Tiempo Letal medio (TL_{50}). Un gráfico comparativo de los TL_{50} calculados puede observarse en la **Fig. II.5**.

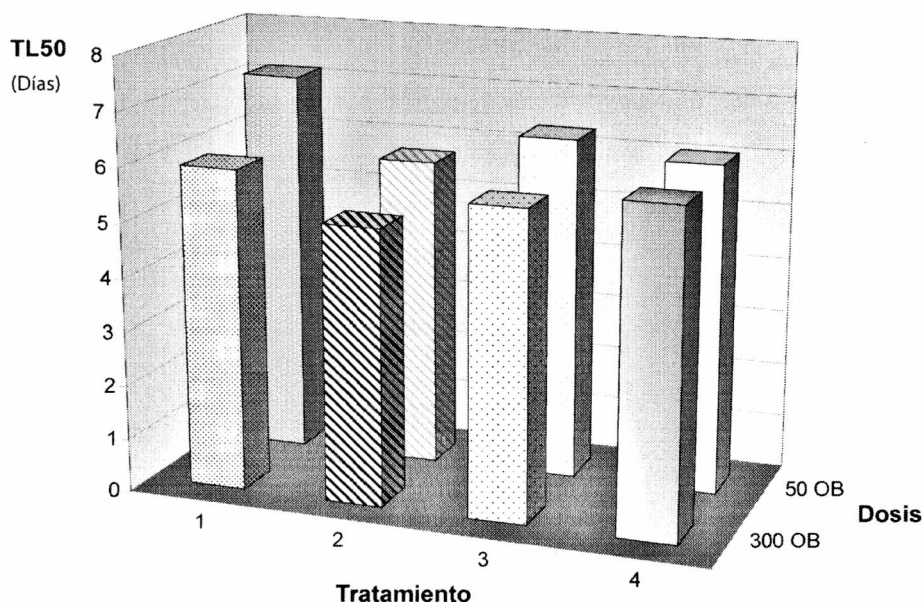


Figura II.5: Comparación del Tiempo Letal Medio (TL_{50}) calculado para larvas de *A. gemmatalis*. Las larvas fueron infectadas con: 1: poliedros solos; 2: mezcla poliedros/gránulos; 3: poliedros con ácido bórico al 0,1%; 4: mezcla poliedros/gránulos con ácido bórico al 0,1%.

Con estos datos se realizó un análisis de varianza, obteniéndose los resultados que se presentan en **las Tablas II.2.A y II.2.B** para dosis y tratamientos, respectivamente.

Se observan diferencias significativas entre las dosis ensayadas (**Tabla II.2.A**) tal como se había supuesto al diseñar el ensayo. Cuando se analizaron la diferencias entre los tratamientos, éstas fueron significativas entre el tratamiento en el cual se infectó con virus sólo (AgMNPV, T1) y el resto de los tratamientos [AgMNPV/EpapGV (T2), o agregado de ácido bórico al virus (T3) o a la mezcla viral (T4)]. No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en los cuales se agregó ácido bórico, tanto en presencia de AgMNPV sólo (T3) como en la mezcla viral (T4) (**Tabla II.2.B**).

Tablas II.2: Análisis de Varianza.A) Comparación de TL₅₀ (días) de las dosis ensayadas, 50 y 300 poliedros. DMS 0.35067.B) Comparación de TL₅₀ de los tratamientos ensayados. DMS: 0.49592.

(**) Letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05).

A

AgMNPV (OB)	TL ₅₀	**	
300	5.67	a	
50	6.32		b

B

Tratamiento	AgMNPV	EpapGV (OB)	BO ₃ H ₃	TL ₅₀	**		
2	Sí	6000		5.41	a		
3	Sí		0,1%	6.01		b	
4	Sí	6000	0,1%	6.01		b	
1	Sí			6.55			c

Como puede observarse en la **Tabla II.3**, el análisis de interacción entre dosis y tratamiento presentó diferencias significativas entre el tratamiento con virus sólo en la menor dosis (T1, letra c) y la mezcla viral (T2, letra a) (en ambas dosis) o el virus sólo más el agregado de ácido bórico en la mayor dosis (T3, letra a). No hubo diferencias significativas entre el tratamiento con ácido bórico (virus sólo (T3) o mezcla viral (T4), mezcla viral en la menor dosis o virus sólo (T1) usado en la mayor dosis (letra b).

Tabla II.3: Valores estimados de Tiempo Letal Medio (TL₅₀) y análisis de la varianza de los distintos tratamientos y dosis utilizados en los bioensayos. () Letras diferentes indican diferencias significativas en los valores de TL₅₀ (p<0.05). DMS: 0.70133.**

Tratamiento	AgMNPV (OB)	EpapGV (OB)	BO ₃ H ₃	TL ₅₀	**		
2	300	6000		5.1	a		
2	50	6000		5.72	a	b	
3	300		0,1%	5.68	a	b	
1	300		0,1%	5.95		b	
4	300	6000		5.95		b	
3	50		0,1%	6.33		b	
4	50	6000	0,1%	6.07		b	
1	50			7.15			c

Detección del agente viral

Los resultados anteriores sugieren que la inoculación conjunta, AgMNPV/EpapGV, en larvas de *A. gemmatalis* disminuyen el TL₅₀. Entonces, para verificar si esta disminución observada fue consecuencia de una coinfección viral, se realizó una PCR

sobre el DNA total obtenido del conjunto de larvas muertas con síntomas de infección (**Fig. II.6**). Para identificar a los virus se realizaron reacciones de PCR individuales sobre el DNA extraído. Para identificar a EpapGV se utilizó un juego de *primers* que amplifican al gen de *granulina*, dando un producto de 830 pb; mientras que para identificar a AgMNPV se utilizó un juego de *primers* dirigidos al gen de *poliedrina*, dando un producto de 750 pb. Como se observa en la **Fig. II.6**, en los tratamientos de inoculación conjunta (AgMNPV/EpapGV), calle 2 geles A y B, la reacción resultó positiva sólo para AgMNPV mientras que no se detectó el producto de amplificación para EpapGV.

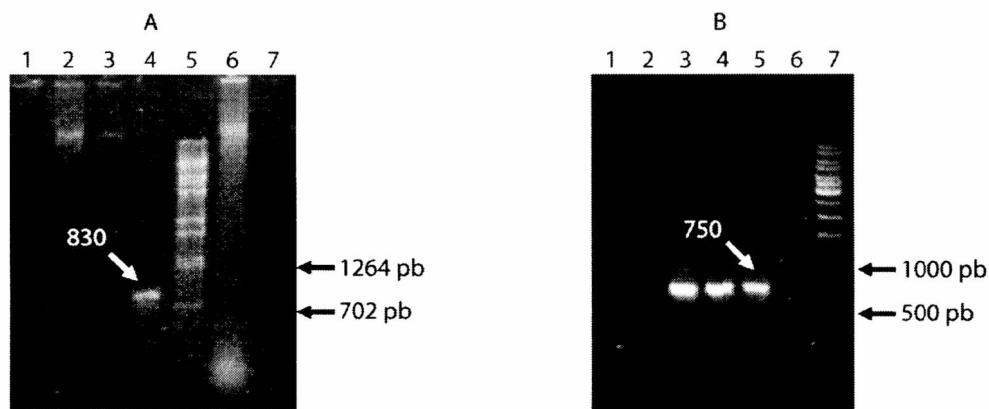


Figura II.6: Productos de PCR obtenidos utilizando *primers* específicos que amplifican *granulina* (A) y *poliedrina* (B).

En A: Calles 1-3, DNA de larvas tratadas con: 1: AgMNPV, 2: AgMNPV/EpapGV, 3: EpapGV; 4: DNA EpapGV (control positivo), 5: DNA/*BstEII*, 6: DNA de larvas sin tratar (control negativo), 7: DNA de AgMNPV (control negativo)

En B: Calle 1: DNA EpapGV (control negativo); calles 2-4, DNA de larvas tratadas con: 2: EpapGV, 3: AgMNPV, 4: AgMNPV/EpapGV; 5: DNA de AgMNPV (control positivo), 6: Control larvas (control negativo), 7: 500 pb.

Las flechas blancas señalan la banda de interés; a la izquierda del gel se indican los tamaños de algunas de las bandas del marcador de PM.

La recombinación, luego de la coinfección con baculovirus con alta a moderada homología, es un proceso que se ha demostrado tanto en cultivo de células (Croizier y Ribeiro, 1992; Hajos *et al.*, 2000; Kondo y Maeda, 1991) como en larvas de insecto (Kamita *et al.*, 2003; Merryweather-Clarke *et al.*, 1994). Debido a que no se dispone de la secuencia completa del genoma de EpapGV, el grado de homología entre los genomas virales utilizados en estos experimentos es desconocido. En consecuencia, para confirmar la identidad del virus presente en los cuerpos de oclusión, se realizó una digestión del DNA viral obtenido a partir de los mismos. Los resultados se muestran en la **Figura II.7**.

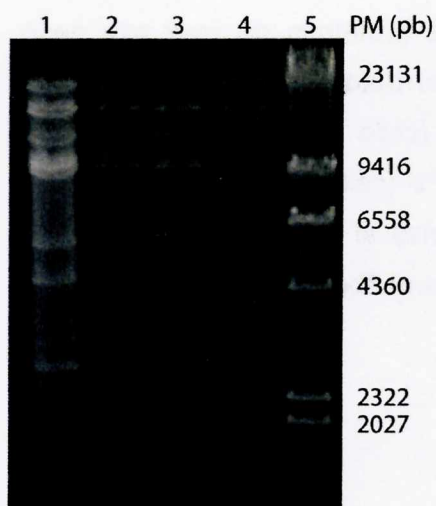


Figura II.7: Patrón de restricción obtenido a partir de la extracción de DNA de OB extraídos de larvas de *A. gemmatalis* sometidas a distintos tratamientos.

DNA extraído de OB presentes en:

Calle 1: control AgMNPV-A extraído de cultivo celular.

Calle 2: larvas infectadas con la mezcla

50 pol/6000 gra.

Calle 3: larvas infectadas con la mezcla 300

poliedros/6000 gránulos.

Calle 4: larvas infectadas con AgMNPV-A sólo.

Calle 5: marcador de peso molecular (*λ*HindIII, PBL)

Como se mencionó en la introducción, se ha descrito en ciertos organismos, la presencia de proteínas que ayudan a romper la membrana peritrófica o estructuras tipo quitina durante su ciclo infectivo, las que ayudan al pasaje de los viriones a través de la membrana peritrófica facilitando la infección. Con el fin de verificar si algún factor proteico presente en el cuerpo de oclusión de EpapGV fue el que ayudó a disminuir el TL_{50} observado en los ensayos previos, se realizó un patrón proteico de membranas peritróficas de las larvas sometidas a distintos tratamientos (**Fig. II.8**).

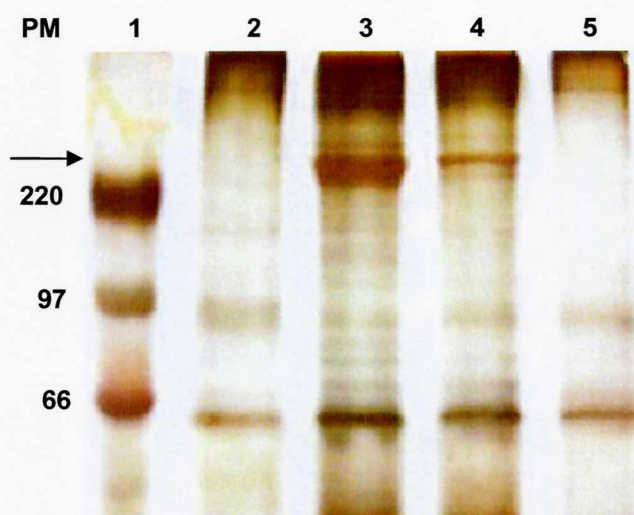


Figura II.8: SDS-PAGE de proteínas de membranas peritróficas extraídas de *A. gemmatalis* a los 90 minutos post-infección.

Calle 1: Marcador de PM (kDa). Calle2: Control (larvas sin infectar), calle 3: tratadas con AgMNPV +

EpapGV (50/6000 OB/larva), calle 4: con EpapGV (6000 OB/larva), calle 5: con AgMNPV (50

OB/larva). Tinción con plata. La flecha indica los probables productos de degradación de las proteínas

de muy alto peso molecular

Se puede apreciar que hay una degradación de las proteínas de muy alto peso molecular en las membranas peritróficas sometidas al tratamiento por ambos virus (calle 3) como en larvas tratadas con EpapGV solo (calle 4); mientras que en las muestras correspondientes al tratamiento con AgMNPV (calle 5) como en el control (calle 2) las proteínas de alto peso molecular (cercanas al punto de siembra de la muestra) no son degradadas a productos de menores tamaños.

Discusión

AgMNPV es uno de los baculovirus que se ha utilizado a nivel comercial y experimental en varios países de Sudamérica. En nuestro país, sin embargo, no ha alcanzado una gran difusión, aunque existe una creciente demanda, principalmente por parte de productores de soja orgánica. Para que esta herramienta de biocontrol sea usada exitosamente en regiones donde no ha sido aún experimentada, se consideró de importancia realizar estudios básicos tendientes a identificar qué especies presentes normalmente en el cultivo son susceptibles a AgMNPV, analizar el efecto de inoculaciones conjuntas con EpaGV y evaluar la conveniencia del agregado de incrementadores de virulencia en las formulaciones virales. Con esto, además de obtener pautas aplicables en el manejo orgánico o integrado de los principales lepidópteros plaga de la soja, se aportarían nuevos datos necesarios para la tramitación del registro de AgMNPV como bioinsecticida ante SENASA y se generarían nuevos conocimientos aplicables al mejoramiento de la eficacia de AgMNPV por modificación genética.

Según los resultados obtenidos, a las especies anteriormente reportadas como susceptibles a la infección por AgMNPV, se agrega ahora la “oruga medidora” *Rachiplusia nu* (Lep. Noctuidae). Este es el primer informe en el que se demuestra la infectividad de AgMNPV en *R. nu* mediante el uso de un rAgMNPV con un gen indicador y mediante un ensayo de infección oral, aunque a altas dosis.

Por otra parte, se han descripto ciertos factores involucrados en la falla de efectividad de AgMNPV en regiones con temperaturas medias menores a 20 °C, las cuales resultan en un TL₅₀ mayor en el hospedante (Braga Silva y Moscardi, 2002). Esta deficiencia podría ser minimizada con mejoramientos en las formulaciones de AgMNPV, mediante el agregado de incrementadores de virulencia y/o modificaciones genéticas.

En tal sentido, como se mencionó en la introducción de este capítulo, se han realizado varios estudios tendientes a evaluar la capacidad bioinsecticida de mezclas baculovirales y agregado de aditivos químicos en numerosos baculovirus utilizados como agentes de control de plagas. Sin embargo, los resultados obtenidos en ciertos casos no fueron los esperados. Así, por ejemplo, Farrar *et al.* (2007) demostraron que larvas de *Plutella xylostella* tratadas con la mezcla viral de un nucleopoliedrovirus y un granulovirus que la infectan (PxMNPV/PxGV) provocaron una disminución del porcentaje de mortalidad de las larvas a pesar de que se había demostrado que ambos virus eran capaces de infectar esta especie naturalmente.

Considerando que *E. aporema* y *A. gemmatalis* se presentan en forma simultánea y que se dispone de baculovirus caracterizados que las infectan, se realizaron los estudios de inoculación conjunta. El efecto más notorio se registró en larvas de *A. gemmatalis* inoculadas con 50 OB de AgMNPV/6000 OB de EpapGV, tratamiento con el que se obtuvo tanto una disminución significativa del TL_{50} como un efecto sinérgico (mayor mortalidad larval) a igual dosis de AgMNPV.

Los resultados de detección de DNA mediante PCR sugieren la inexistencia de infectividad cruzada de *A. gemmatalis* y *E. aporema* con EpapGV y AgMNPV, respectivamente, por vía oral. Esto confirma los resultados obtenidos previamente respecto al rango de hospedantes de EpapGV (Sciocco-Cap *et al.*, 2001) y el obtenido en esta tesis respecto a AgMNPV en larvas de *E. aporema*. Por consiguiente, se puede inferir que el aumento de la virulencia a partir de la mezcla viral sobre larvas de *A. gemmatalis*, se debería a la adición de cuerpos de oclusión de EpapGV y no a una coinfección.

El análisis proteico a de las membranas peritróficas de larvas sometidas a distintos tratamientos permite inferir que el agregado de EpapGV provoca la degradación de ciertas proteínas de muy alto peso molecular, presentes en las larvas control o tratadas solamente con AgMNPV. Este resultado estaría indicando la presencia en los OBs de EpapGV de algún factor que favorece la degradación de esas proteínas. Se necesitan estudios adicionales para identificar el factor responsable de este efecto.

El agregado de ácido bórico a las formulaciones virales ha sido probado para varios NPV. Shapiro & Bell (1982) han visto reducciones a la mitad en la concentración letal media (CL_{50}) de LdMNPV sobre *L. dispar* en presencia de 0,5% de ácido bórico y de siete veces en presencia de un 1%. Morales *et al.* (1997) obtuvieron resultados similares, detectando una reducción en cinco veces de la CL_{50} de AgMNPV en larvas de *A. gemmatalis* en presencia de 0,045% de ácido bórico incorporado en la dieta. En forma similar, la CL_{50} de SfMNPV se redujo unas 2,2 veces en presencia de ácido bórico al 1% en larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* (Cisneros *et al.*, 2002).

El potencial indirecto de los efectos del ácido bórico (en las dosis usadas en este estudio) sobre los polinizadores u otra fauna benéfica es desconocido. En este contexto, el uso de formulaciones que incluyan ambos virus en lugar de ácido bórico, podría ser una herramienta valiosa para el manejo de plagas en áreas con climas donde *E. aporema* presenta alta incidencia el cultivo de leguminosas y AgMNPV tiene una lenta velocidad de acción.

Referencias

- Arana, E. I., Albarino, C. G., O'Reilly, D., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001). Generation of a recombinant *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus expressing a foreign gene under the control of a very late promoter. *Virus Genes* **22**, 363-372.
- Arif, B. M. (1995). Recent advances in the molecular biology of entomopoxviruses. *J Gen Virol* **76**, 1-13.
- Bartnicki-Garcia, S., Persson, J. & Chanzy, H. (1994). An electron microscope and electron diffraction study of the effect of calcofluor and congo red on the biosynthesis of chitin in vitro. *Arch Biochem Biophys* **310**, 6-15.
- Bird, F. T. (1959). Polyhedrosis and granulosis viruses causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* Clemens. *J Insect Pathol* **1**, 406-430.
- Bischoff, D. S. & Slavicek, J. M. (1997). Molecular analysis of an enhancin gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **71**, 8133-8140.
- Boucias, D. G. & Nordin, G. L. (1977). Interinstar susceptibility of the fall webworm, *Hyphantria cuneanext* term, to its nucleopolyhedrosis and granulosis viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* **30**, 68-75.
- Braga Silva, M. T. & Moscardi, F. (2002). Field Efficacy of the Nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of Formulations, Water pH, Volume and Time of Application, and Type of Spray Nozzle *BIOLOGICAL CONTROL* **31**, 75-83.
- Cisneros, J., Pérez, J. A., Penagos, D. I., Ruiz V., J., Goulson, D., Caballero, P., Cave, R. D. & Williams, T. (2002). Formulation of a Nucleopolyhedrovirus with Boric Acid for Control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize. *Biological Control* **23**, 87-95.
- Cory, J. S. (2003). Ecological impacts of virus insecticides: host range and non-target organisms. In *Environmental Impacts of Microbial Insecticides*, pp. 73-91. Edited by H. Hokkanen & A. Hajek: BIOS.
- Croizier, G. & Ribeiro, H. C. T. (1992). Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus wild populations *Virus Research* **26**, 183-196.
- Derksen, A. C. & Granados, R. R. (1988). Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology* **167**, 242-250.
- Elorza, M. V., Rico, H. & Sentandreu, R. (1983). Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J Gen Microbiol* **129**, 1577-1582.
- Farrar, R. R., Shapiro, M. & Shepard, M. (2007). Relative activity of baculoviruses of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) *BioControl* **52**, 657-667.
- Fluckiger, C. R. (1982). Investigations on three baculovirus isolates of the summerfruit tortrix, *Adoxophyes orana* F.v.R. (Lep., Tortricidae), its phenology, and first field trials, as basis for the microbiological control of this fruit pest.. *Mitt Schweiz Entomol Ges* **55**, 241-245.
- Goto, C. (1989). Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection by a granulosis virus (GV) isolated from the spotted cutworm, *Xestia c-nigrum* L. (Lepidoptera:Noctuidae). *Appl Entomol Zool* **25**, 135-137.
- Grasela, J. J. & McIntosh, A. H. (1998). In vitro and in vivo host range of *Anticarsia gemmatalis* multiple nuclear polyhedrosis virus. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **34**, 79-83.
- Greene, G. L., Leppla, N. C. & Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J Econ Entomol* **69**, 487-488.
- Gross, C. H., Wolgamot, G. M., Russell, R. L., Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1993). A 37-kilodalton glycoprotein from a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies. *J Virol* **67**, 469-475.

GrupolInfoStat (versión 2008). InfoStat Argentina: FCA, Universidad Nacional de Córdoba

Hackett, K. J., Boore, A., Deming, C., Buckley, E., Camp, M. & Shapiro, M. (2000). Helicoverpa armigera granulovirus interference with progression of H. zea nucleopolyhedrovirus disease in H. zea larvae. *J Invertebr Pathol* **75**, 99-106.

Hajos, J. P., Pijnenburg, J., Usmany, M., Zuidema, D., Zavodszky, P. & Vlak, J. M. (2000). High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture. *Arch Virol* **145**, 159-164.

Hashimoto, Y., Corsaro, B. G. & Granados, R. R. (1991). Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the Trichoplusia ni granulosis virus. *J Gen Virol* **72**, 2645-2651.

Hayakawa, T., Xu, J. & Hukuhara, T. (1996). Cloning and sequencing of the gene for an enhancing factor from Pseudaletia separata entomopoxvirus. *Gene* **177**, 269-270.

Hess, R. T., Summers, M. D. & Falcon, L. A. (1978). A mixed virus infection in midgut cells of Autographa californica and Trichoplusia ni larvae. *J Ultrastruct Res* **65**, 253-265.

Hughes, P. R. & Wood, H., A. (1986). In vivo and In vitro Bioassay Methods for Baculoviruses. In *The Biology of Baculoviruses, Biological Properties and Molecular Biology*. Edited by R. R. G. a. B. A. Federeci. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Hukuhara, T., Hayakawa, T. & Wijonarko, A. (1999). Increased baculovirus susceptibility of armyworm larvae feeding on transgenic rice plants expressing an entomopoxvirus gene. *Nat Biotechnol* **17**, 1122-1124.

Hukuhara, T., K. Tamura, Y. Zhu, H. Abe and Y. Tanada (1987). Synergistic factor shows specificity in enhancing nuclear polyhedrosis virus infections. *Appl Entomol Zool* **22**, 235-236.

Kamita, S. G., Maeda, S. & Hammock, B. D. (2003). High-frequency homologous recombination between baculoviruses involves DNA replication. *J Virol* **77**, 13053-13061.

Kondo, A. & Maeda, S. (1991). Host range expansion by recombination of the baculoviruses Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus and Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **65**, 3625-3632.

Kunimi, Y. & Fuxa, J. R. (1996). Volumes ingested by four species of noctuids with reference to peroral droplet bioassay of baculoviruses. *J Invertebr Pathol* **68**, 310-311.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lauro Morales, F. M., Daniel R. Sosa-Gómez, Fábio E. Paro and Ivanilda L. Soldorio (1997). Enhanced Activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübn. (Lepidoptera: Noctuidae) Nuclear Polyhedrosis Virus by Boric Acid in the Laboratory. *An Soc Entomol Brasil* **26**, 115-120.

Lepore, L. S., Roelvink, P. R. & Granados, R. R. (1996). Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J Invertebr Pathol* **68**, 131-140.

Li, Q., Li, L., Moore, K., Donly, C., Theilmann, D. A. & Erlandson, M. (2003a). Characterization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancin and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus recombinant. *J Gen Virol* **84**, 123-132.

Li, Z., Li, C., Yang, K., Wang, L., Yin, C., Gong, Y. & Pang, Y. (2003b). Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* **96**, 113-122.

Lowe, R. E. & Paschke, J. D. (1968). Pathology of a double viral infection of trichoplusia ni. *J Invertebr Pathol* **12**, 438-443.

Manzán, M. A. (2002). Clonado molecular del genoma del virus de la granulosis de *Epinotia aporema*, EpapGV y caracterización del gen de la ecdisona glicosiltransferasa. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas*, p. 156. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

- Merryweather-Clarke, A. T., Hirst, M. & Possee, R. D. (1994).** Recombination between genetically modified and unmodified *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in *Trichoplusia ni* larvae. *Acta Virol* **38**, 311-315.
- Mitsubishi, W., Furuta, Y. & Sato, M. (1998).** The spindles of an entomopoxvirus of coleoptera (*Anomala cuprea*) strongly enhance the infectivity of a nucleopolyhedrovirus in lepidoptera. *J Invertebr Pathol* **71**, 186-188.
- Mitsubishi, W., Kawakita, H., Murakami, R., Takemoto, Y., Saiki, T., Miyamoto, K. & Wada, S. (2007).** Spindles of an entomopoxvirus facilitate its infection of the host insect by disrupting the peritrophic membrane. *J Virol* **81**, 4235-4243. Epub 2007 Jan 4224.
- Morales, L., Moscardi, F., Sosa-Gómez, D. R., Paro, F. E. & Soldorio, I. L. (1997).** Enhanced Activity of *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) Nuclear Polyhedrosis Virus by Boric Acid in the Laboratory. *An Soc Entomol Brasil* **26**, 115-120.
- Mukawa, S. & Goto, C. (2007).** Enhancement of Nucleopolyhedrovirus Infectivity Against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by Proteins Derived from Granulovirus and a Fluorescent Brightener. *Journal of Economic Entomology* **100**, 1075-1083.
- Phanis, C. G., Miller, D. P., Cassar, S. C., Tristem, M., Thiem, S. M. & O'Reilly, D. R. (1999).** Identification and expression of two baculovirus gp37 genes. *J Gen Virol* **80**, 1823-1831.
- Pinedo, F. J. R., Moscardi, F., Luque, T., Olszewski, J. A. & Ribeiro, B. M. (2003).** Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. *Biological Control* **27**, 336-344.
- Popham, H. J., Bischoff, D. S. & Slavicek, J. M. (2001).** Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus enhancin genes contribute to viral potency. *J Virol* **75**, 8639-8648.
- Roelvink, P. W., Corsaro, B. G. & Granados, R. R. (1995).** Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. *J Gen Virol* **76**, 2693-2705.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.
- Sciocco-Cap, A., Parola, A. D., Goldberg, A. V., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2001).** Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3702-3706.
- Shapiro, M. & Bell, R. (1982).** Enhanced Effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) Nucleopolyhedrosis Virus Formulated With Boric Acid. *Annals of the Entomological Society of America* **75**, 346-349.
- Sieburth, P. J. & Maruniak, J. E. (1988).** Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **24**, 195-198.
- Steinhaus, E. A. (1963).** Background for the diagnosis of insect diseases. In *Insect Pathology: An Advanced Treatise*. Edited by N. Y. Academic Press.
- Tanada, Y. (1959).** Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). *J Insect Pathol* **215-231**, 215-231.
- Tanada, Y. (1969).** Ineffectiveness of a microsporidian and a granulosis virus in activating a cytoplasmic polyhedrosis virus in the alfalfa caterpillar, *Colias eurytheme*. *J Invertebr Pathol* **13**, 313-315.
- Tanada, Y. & Chang, G. Y. (1964).** Interactions of two cytoplasmic polyhedrosis viruses in three insect species. *J Insect Pathol* **6**, 500-516.
- Tsujibo, H., Orikoshi, H., Baba, N., Miyahara, M., Miyamoto, K., Yasuda, M. & Inamori, Y. (2002).** Identification and characterization of the gene cluster involved in chitin degradation in a marine bacterium, *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol* **68**, 263-270.

- Vaaje-Kolstad, G., Horn, S. J., van Aalten, D. M., Synstad, B. & Eijsink, V. G. (2005). The non-catalytic chitin-binding protein CBP21 from *Serratia marcescens* is essential for chitin degradation. *J Biol Chem* **280**, 28492-28497. Epub 22005 Jun 28491.
- Vialard, J. E., Arif, B. M. & Richardson, C. D. (1995). Introduction to the molecular biology of baculoviruses. *Methods Mol Biol* **39**, 1-24.
- Vialard, J. E., Yuen, L. & Richardson, C. D. (1990). Identification and characterization of a baculovirus occlusion body glycoprotein which resembles spheroidin, an entomopoxvirus protein. *J Virol* **64**, 5804-5811.
- Wang, P. & Granados, R. R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6977-6982.
- Wang, P. & Granados, R. R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 135-143.
- Washburnb, J. O., Kirkpatrickb, B. A., Haas-Stapletonb, E. & Volkman, L. E. (1998). Evidence That the Stilbene-Derived Optical Brightener M2R Enhances *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus Infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by Preventing Sloughing of Infected Midgut Epithelial Cells. *Biological Control* **11**, 58-69.
- Whitlock, V. H. (1977). Simultaneous treatments of *heliiothis armigera* with a nuclear polyhedrosis and a granulosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **29**, 297-303.
- Zhu, R., Liu, K., Peng, J., Yang, H. & Hong, H. (2007). Optical brightener M2R destroys the peritrophic membrane of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Pest Manag Sci* **63**, 296-300.

CAPÍTULO III

Secuenciación del gen *ie-1* de EpapGV y análisis bioinformático

Resumen

Se determinó la secuencia del gen *ie-1*, localizado entre 28.5 y 29.5 unidades del mapa físico del virus de la granulosis de *Epinotia aporema* (EpapGV). El análisis de la secuencia nucleotídica indica que el marco abierto de lectura comprende 1197 nucleótidos y codifica una proteína de 398 aminoácidos. El análisis de la composición aminoacídica muestra valores similares a los que presentan el resto de las proteínas de granulovirus. La búsqueda de similitud mediante BLASTP relacionó a IE-1 de EpapGV con el ORF8 de AgseGV. El análisis filogenético realizado con varias secuencias de proteínas IE-1 de NPV y de GV, permitió separar a la familia *Baculoviridae* en *Granulovirus* y *Nucleopolyhedrovirus* como también distinguir en el género *Nucleopolyhedrovirus* los grupos I y II. El alineamiento de las proteínas IE-1 de GV, muestra mayor similitud de secuencias aminoacídicas en la región C-terminal, este resultado concuerda con las investigaciones previas que establecen que la región C-terminal es la más conservada en el conjunto de las proteínas IE1 de los nucleopoliedrovirus. Esta región coincide con la región de homología a motivos similares a los encontrados en genes homólogos de NPV. Estos genes se expresan muy tempranamente en el ciclo de infección y están asociados al proceso de transactivación. La región *upstream* del codón de inicio de la traducción presenta motivos de secuencia característicos de promotores baculovirales tempranos, sin embargo, éstos no están conservados en estas regiones de otros GV.

Introducción

La mayor parte de los conocimientos sobre los eventos moleculares que ocurren durante el proceso de infección de los baculovirus proviene de los estudios realizados con el prototipo de la familia AcMNPV, que ha sido ampliamente utilizado como vector de expresión. Sus genes son expresados en forma de cascada en la cual cada fase sucesiva es dependiente de genes expresados en la fase anterior. En términos generales hay cuatro fases establecidas: inmediata temprana (*immediate early*), retrasada temprana (*delayed early*), tardía (*late*) y muy tardía (*very late*). La replicación del DNA viral es un pre-requisito para la expresión de genes tardíos (Lu y Miller, 1997).

Los genes de la fase temprana son transcritos por la RNA polimerasa II de la célula hospedante, mientras que la transcripción tardía está mediada por la RNA polimerasa codificada por el virus (Grula *et al.*, 1981; Huh y Weaver, 1990). Para aprovechar la maquinaria de la célula, los promotores tempranos imitan la estructura de los promotores celulares. Uno de los motivos frecuentemente encontrados incluye el TATA *box* (Blissard *et al.*, 1992; Guarino y Smith, 1992). Este elemento rico en A/T, se localiza generalmente unos 25-31 nt antes del sitio de inicio de transcripción (*upstream*) y se considera que es el principal elemento regulatorio de los promotores tempranos (Pullen y Friesen, 1995b), define la velocidad de inicio de la transcripción y el sitio de inicio de la transcripción temprana, especialmente en ausencia de un motivo iniciador temprano (INR). También se pueden encontrar otros elementos regulatorios que actúan en *cis*, como los INR, propuestos para artrópodos (A/G/T)CA(G/T)T (Cherbas y Cherbas, 1993). Las secuencias de los INR, por definición, se solapan con el sitio de inicio de la transcripción, contribuyen a la actividad promotora basal, y determinan el sitio de inicio de transcripción en ausencia de un motivo TATA *box*. En los promotores tempranos de baculovirus la secuencia CAGT es la más conservada y el dinucleótido CA es el que más influye en la regulación de la cantidad de transcritos en ausencia de un TATA *box*. En diversos análisis se han encontrado secuencias conservadas en las regiones de activación *downstream* (DAR, *downstream activation region*) y en la región activadora *upstream* (UAR, *upstream activation region*), tales como cajas GC, motivos GATA y CGT (Friesen, 1997).

Para transcribirse eficientemente, los genes retrasados tempranos requieren de la presencia de proteínas regulatorias virales que se transcriben durante la fase inmediata temprana (Guarino y Summers, 1986a).

La transcripción de los genes tardíos y muy tardíos comienza en la secuencia TAAG, la cual es un elemento esencial para ambas clases de promotores (Lu y Miller, 1997;

Thiem y Miller, 1989). La distinción entre promotores tardíos y muy tardíos involucra un elemento adicional encontrado entre el sitio TAAG y el codón de inicio de la traducción, esta secuencia es requerida para la hiperexpresión de estos genes durante la fase muy tardía del ciclo infectivo y es conocida como secuencia *burst* (Mans y Knebel-Mörsdorf, 1998; Ooi *et al.*, 1989; Possee y Howard, 1987; Rankin *et al.*, 1988; Yang y Miller, 1999).

El gen temprano *ie-1*

Una de las proteínas transactivadores descritas más importantes es IE-1, que participa en distintas etapas del ciclo viral (Carson *et al.*, 1991).

El gen *ie-1* de AcMNPV se transcribe inmediatamente luego de la infección dando un producto de 67 kDa y su expresión se mantiene hasta fases tardías (Choi y Guarino, 1995; Theilmann y Stewart, 1993). En ensayos de expresión transitorios, se ha demostrado que IE1 es requerido para la expresión de genes virales tempranos (Carson *et al.*, 1991; Guarino y Summers, 1986a; 1987; Kovacs *et al.*, 1991; Passarelli y Miller, 1993), estimula su propia transcripción (Kovacs *et al.*, 1991), participa en la replicación de plásmidos que incluyen posibles orígenes de replicación viral (Ahrens *et al.*, 1995; Kool *et al.*, 1994; Lu y Miller, 1995; Stewart *et al.*, 2005), es necesario para la expresión génica tardía (Passarelli y Miller, 1993; Rapp *et al.*, 1998) y para la inducción de la apoptosis (Schultz *et al.*, 2009).

La activación de un promotor temprano por parte de IE1 se incrementa en presencia de una secuencia *enhancer* (*hr*, por *homologous region*) en *cis* (Berretta y Passarelli, 2006; Carson *et al.*, 1991; Guarino *et al.*, 1986; Guarino y Summers, 1986b; Nissen y Friesen, 1989; Pullen y Friesen, 1995b). Los *hr* son secuencias con un número variable de repeticiones que se localizan a lo largo del genoma (Ayres *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1995). En AcMNPV cada repetición contiene uno o más palíndromes imperfectos de 28 pb (comúnmente llamado *28-mer*) que comprende un sitio *EcoRI* y un número variable de repeticiones directas e invertidas. Los *hr* están implicados tanto en el aumento transcripcional de los genes tempranos como en la replicación del DNA viral (ver introducción general). IE-1 se une a las regiones palindrómicas de los *hr* como un dímero, y la interacción óptima se logra cuando ambas mitades del palíndromo están presentes (Rodems y Friesen, 1995).

La proteína IE-1 de AcMNPV tiene una estructura modular conformada por dos dominios: un dominio N-terminal implicado en la estimulación de la transcripción y un dominio C-terminal involucrado en la unión a DNA (Kovacs *et al.*, 1992). Diversos

estudios realizados con distintos mutantes de delección de IE-1 permitieron identificar subregiones dentro de estos dos dominios principales. En el dominio N-terminal, se identificaron un Dominio de Activación Funcional I (que se extiende desde el aa 1 al 125), y un Dominio Acídico Secundario (entre los aa 168 y 222) (Slack y Blissard, 1997), ambos compuestos por una alta proporción de residuos ácidos (Rodems *et al.*, 1997). Los dominios de transactivación están separados por una secuencia aminoacídica rica en residuos básicos altamente conservada, el Dominio Básico I (DB I, aa 150-165) (Olson *et al.*, 2003).

En el Dominio C-terminal, se localizaron el Dominio de Dimerización (DD, que se extiende entre los aa 543 a 568) (Olson *et al.*, 2001), conformado por un motivo tipo hélice-giro-hélice (HLH, *helix-loop-helix*) (Olson *et al.*, 2001) y el Dominio Básico II (DB II, aa 521-542). Este motivo positivamente cargado, es requerido para la importación de IE-1 al núcleo (Olson *et al.*, 2002). Se ha propuesto, que en este dominio hay un elemento de localización nuclear (NLE, *nuclear localization element*), y para que funcione como señal de localización nuclear (NLS, *nuclear signal localization*), IE-1 debe dimerizar (ver modelo, en **Fig. III.1**).

En la **Fig. III.1**, se esquematiza la estructura primaria de IE-1 y el modelo de dimerización e interacción de IE-1 con el DNA, propuesto por el grupo de Friesen (Olson *et al.*, 2002; 2003).

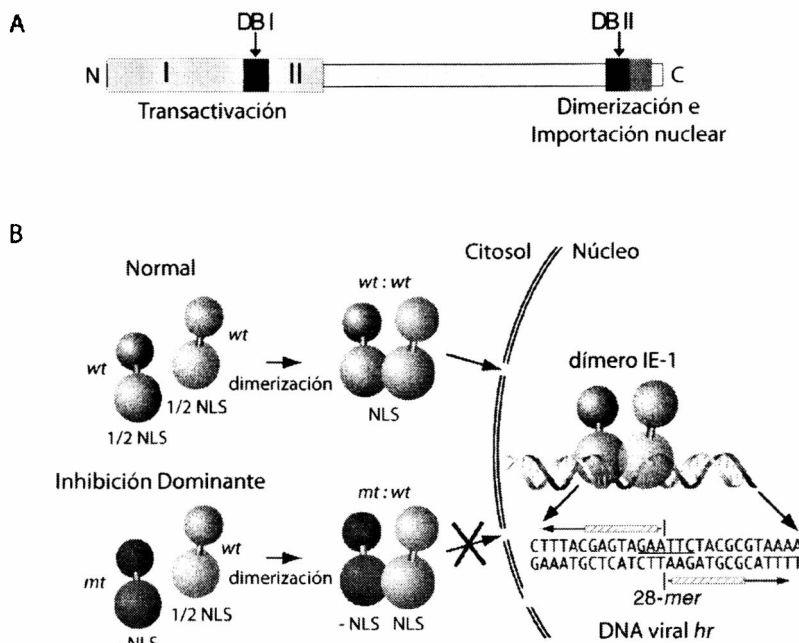


Figura III.1: Esquema de los dominios encontrados en IE-1 de AcMNPV, modelo de importación nuclear y transactivación.

En A: Dominios encontrados en IE-1. En la región N-terminal se destacan: el Dominio Básico I (DB I, bloque negro) entre los dos dominios de transactivación ácidos (designados como I y II).

En la región C-terminal: el Dominio Básico II (DB II, bloque negro) que media la importación al núcleo seguido por el dominio de dimerización (bloque gris).

En B: Panel superior, los monómeros de IE-1 *wild type* (*wt*) se ensamblan en el citoplasma como dímeros (*wt:wt*), permitiendo al correcta formación de la señal de localización nuclear (NLS) y su posterior transporte al núcleo. Luego de la entrada al núcleo, el dímero de IE-1 interactúa simétricamente con la región palindrómica 28-mer (con el sitio para *EcoRI* subrayado) presente en el *hr* (*homologous region*) para la estimulación de la transcripción de genes virales tempranos.

Panel inferior: Cuando la 1/2 NLS presente en IE-1 está mutada (-NLS), se forman los heterodímeros entre ésta (*mt*) y la *wt* (*mt:wt*), dado que el dominio de dimerización no está afectado. Como consecuencia, el heterodímero de IE-1 queda atrapado en el citosol y no puede entrar al núcleo. De esta forma, la transactivación por IE-1 es inhibida por la presencia de una mutante IE-1 dominante negativa. Modelo tomado de Olson et al. (2002, 2003).

En la replicación, la unión de IE1 a *hr* funcionaría como elemento nucleador de los restantes factores de replicación (Kang *et al.*, 2005; Kawasaki *et al.*, 2004; Nagamine *et al.*, 2005). El requerimiento de IE1 para la transcripción de genes tardíos (Passarelli y Miller, 1993) se interpreta en base a que la fase tardía depende de la replicación del DNA viral (Todd *et al.*, 1996).

A pesar de que IE1 está implicada en múltiples funciones a lo largo del ciclo viral en los NPV, no se han reconocido homólogos de secuencia en el genoma de los baculovirus de himenópteros y del díptero secuenciados (Afonso *et al.*, 2001; Garcia-Maruniak *et al.*, 2004; Lauzon *et al.*, 2006). Sin embargo, dentro del conjunto de 30 genes conservados entre todos los baculovirus secuenciados, sí se encuentran al

menos otros 9 genes participantes en la replicación-transcripción tardía (Jehle *et al.*, 2006). Esto sugiere que existe un grado de diversidad asociado a los mecanismos en los que IE1 participa.

Finalmente, si bien se identificaron ORF correspondientes a homólogos del gen *ie-1* tanto en NPV como en GV, la información acerca de estos genes en GV es escasa en la literatura (Rashidan *et al.*, 2002). Este trabajo, es un aporte que analiza el gen *ie-1* de EpapGV y su secuencia aminoacídica.

Materiales y métodos

Secuenciación del gen *ie-1*. En base a los datos de secuencia disponibles, se diseñaron primero tres *primers* (A, B y C) y, posteriormente, dos *primers* adicionales con los datos de secuencia obtenidos (D y E) (ver **Fig. III.3**). La secuencia de los *primers* se detalla en la **Tabla III.1**.

Tabla III.1: *Primers* diseñados para la estrategia de caminata cromosómica. (ver región de pegado en **Fig. III.3**).

Nombre	Secuencia	Tm	% GC
A	5' CCACAACAGCTTTAGATTCCG 3'	60	48
B	5' GGATTGTATAACACATCG 3'	46	39
C	5' ACCACATCATATTTAAGCA 3'	45,6	31,6
D	5' CGTGCCTGATAACAAACCG 3'	57,2	52,6
E	5' CCTTGTCGTAATCCTCGTTG 3'	55,6	50

Asignación de ORF. El montaje de las secuencias obtenidas se realizó con el programa Contig Express (Vector NTI 10.0.1, Invitrogen). El fragmento de EpapGV de 3,2 kb fue usado para detectar secuencias homólogas en la base de datos del GenBank (restringida a la base de datos de secuencias virales) mediante el uso del programa BLASTN (Altschul *et al.*, 1997). Además, las secuencias aminoacídicas deducidas fueron comparadas con las secuencias existentes en la base de datos del GenBank usando el programa BLASTP (Altschul y Gish, 1996).

Análisis bioinformático. Se utilizó el programa CLUSTALX (1.81) (Thompson *et al.*, 1997) para el alineamiento múltiple de secuencias (detalladas en la **Tabla III.2**). El análisis filogenético se realizó con programa Mega 4.1 (Tamura K *et al.*, 2007), usando los métodos de *Neighbor-Joining* y *Parsimonia*. En ambos casos los árboles se evaluaron mediante análisis de *bootstrap* con la condición de 500 repeticiones. La composición aminoacídica y el punto isoeléctrico fueron calculados usando la herramienta BioAnnotator del programa Vector NTI 10TM (Invitrogen) y herramientas de ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). La búsqueda de dominios homólogos en la base de datos CDD (Conserved Domain Database) del Entrez, se realizó mediante el programa RPS-BLAST (*reverse-position-specific* BLAST) (Marchler-Bauer *et al.*, 2007).

Tabla III.2: Lista de baculovirus incluidos en el análisis bioinformático.

Los nombres están ordenados alfabéticamente, en la parte superior están los granulovirus y en la inferior los nucleopoliedrovirus. EpapGV está indicada al inicio de la tabla.

Baculovirus incluidos en este análisis		
Nombre del virus	Abreviatura	Núm. de acceso
<i>Epilotia aporema</i> GV	EpapGV	-
<i>Adoxophyes orana</i> GV	AdorGV	NC 005038
<i>Agrotis segetum</i> GV	AgseGV	NC 005839
<i>Choristoneura fumiferana</i> GV	CfGV	AAL47676
<i>Choristoneura occidentalis</i> GV	CoGV	NC 008168
<i>Cryptophlebia leucotreta</i> GV	CrleGV	NC 005068
<i>Cydia pomonella</i> GV	CypoGV	NC 002816
<i>Helicoverpa armigera</i> GV	HaGV	NC 010240
<i>Phthorimaea operculella</i> GV	PhopGV	NC 004062
<i>Plutella xylostella</i> GV	PlixGV	NC 002593
<i>Spodoptera litura</i> GV	SIGV	NC 009503
<i>Xestia c-nigrum</i> GV	XcGV	NC 002331
<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	AdhoNPV	NC 004690
<i>Anticarsia gemmatalis</i> NPV	AgMNPV	NC 008520
<i>Autographa californica</i> MNPV	AcMNPV	NC 001623
<i>Bombyx mori</i> NPVK1	BmNPVK1	AY048770
<i>Choristoneura fumiferana</i> MN	CfMNPV	NC 004778
<i>Chrysodeixis chalcitis</i> NPV	ChChNPV	NC 007151
<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	EpNPV	NC 003083
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	HearNPV	NC 003094
<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	HzSNPV	NC 003349
<i>Hyphantria cunea</i> NPV	HcNPV	NC 007767
<i>Lymantria dispar</i> MNPV	LdMNPV	NC 001973
<i>Mamestra configurata</i> NPV-A	McNPV-A	AF539999
<i>Mamestra configurata</i> NPV-B	McNPV-B	NC 004117
<i>Maruca vitrata</i> MNPV	MvMNPV	NC 008725
<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	OpMNPV	NC 001875
<i>Rachiplusia ou</i> MNPV	RoMNPV	NC 004323
<i>Spodoptera exigua</i> NPV	SeNPV	NC 002169
<i>Spodoptera litura</i> NPV	SpltNPV	NC 003102
<i>Trichoplusia ni</i> SNPV	TnSNPV	NC 007383

Resultados

Determinación de la secuencia nucleotídica del gen *ie-1* de EpapGV

Al inicio de este trabajo se contaba con el mapa físico de EpapGV (Parola *et al.*, 2002). El mismo se construyó a partir del análisis de las bibliotecas obtenidas con distintas enzimas de restricción, *HindIII*, *BglII*, *BamHI* y *EcoRI*. El conjunto de clones, que representa el DNA genómico entero, permitió calcular el tamaño del genoma en 120.1 kpb. La secuenciación de los extremos de distintos fragmentos fue utilizada para confirmar la contigüidad de los mismos y permitió identificar 29 posibles ORF, los cuales se localizaron en el mapa y se utilizaron para explorar la organización genómica (Parola *et al.*, 2002). Cuando se comenzó con este estudio, además, se disponía de la secuencia completa de siete genomas de Granulovirus: PhopGV, PxGV, XcGV, CrleGV, CypoGV, AdorGV y AgseGV (Croizier *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 1999; Lange y Jehle, 2003; Luque *et al.*, 2001; Wormleaton *et al.*, 2003; Xiulian *et al.*, 2004). En la Fig. III.2 se muestra el mapa físico de EpapGV. A partir de los datos de secuencia anteriores, se pudo inferir que el gen *ie-1* (*immediate early-1*) se encuentra en el fragmento *BamHI* E de 14 kb, sombreado en gris (Fig. III.2).

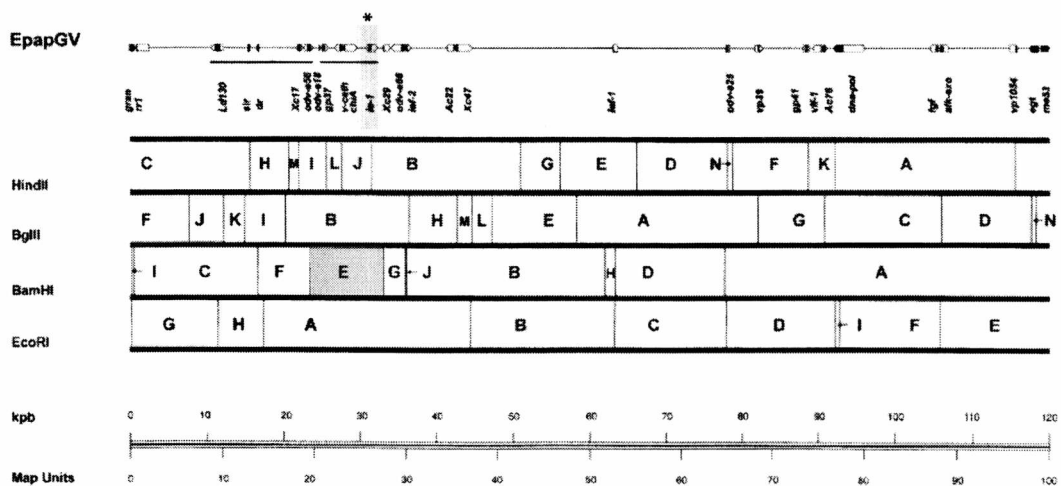


Figura III.2: Mapa físico linealizado del genoma de EpapGV.

Se muestran los mapas de restricción obtenidos con las enzimas *HindIII*, *BglII*, *BamHI* y *EcoRI*. El nucleótido +1 del mapa es el primer nucleótido del codón ATG correspondiente al ORF de granulina. En la parte inferior de la figura se muestra la doble escala en kpb y unidades de mapa. Ubicados sobre la línea superior (EpapGV) se encuentran los 29 ORF encontrados, con punta de flecha corresponden con la posición y orientación asignada, la región negra del rectángulo simboliza la secuencia identificada, mientras que la región blanca corresponde al resto de cada ORF, del cual no se dispone de datos de secuencia. Resaltado con una sombra gris y con un asterisco, se indica la ubicación del ORF *IE-1*. Figura basada en el trabajo de Parola *et al.* (2002) con modificaciones.

Para determinar la secuencia nucleotídica completa del gen *ie-1* y sus regiones flanqueantes, se utilizó la estrategia de caminata cromosómica (Fig. III.3).

Para ello, en una primera etapa, se diseñaron tres *primers* a partir de secuencias parciales del fragmento *HindIII* J (*primers* A y B) y del *contig BamHI* E-G (*primer* C) del mapa físico de EpapGV (Parola, 2004). El montaje de las secuencias obtenidas con las parciales previamente disponibles, permitió la lectura completa del ORF IE1, según análisis de similitud con genes de otros baculovirus utilizando BLAST. A partir de estos nuevos datos de secuencia nucleotídica se diseñaron dos *primers* adicionales (denominados D y E) que permitieron confirmar la secuencia obtenida previamente (**Fig. III.3**, caminata cromosómica).

El solapamiento del conjunto de secuencias obtenidas y de las secuencias disponibles permitió obtener un *contig* de 3836 nt, el cual fue analizado en busca de marcos de lectura abiertos (ORF). El análisis de similitud mediante BLAST permitió identificar la presencia de varios ORF, con similitud a otros ORF baculovirales. Estos se identificaron por el nombre asignado al ORF con mayor similitud de secuencia en los genomas comparados y se ubicaron en el mapa según el sentido de la transcripción (**Fig. III.3**, organización genómica). Así, desde el extremo 5' al 3' del *contig* se pudieron identificar: el marco de lectura correspondiente a la región C-terminal del gen que codifica la quitinasa (*chiA*); seguido de un ORF de 294 pb con similitud al ORF 12 de PxGV; luego, un ORF de 573 pb con similitud al ORF 9 de AgseGV; posteriormente el ORF IE-1 de 1197 pb y en el extremo 3' del *contig* se indica la región C-terminal similar al ORF 28 de XcGV, identificada previamente (Parola *et al.*, 2002). Estos datos confirman la descripción del mapa físico de EpapGV (Parola, 2004), y aportan información sobre nuevos ORF en esta región. El estudio comparativo de la organización génica en esta región con la de otros GV, se presenta más adelante en este capítulo.

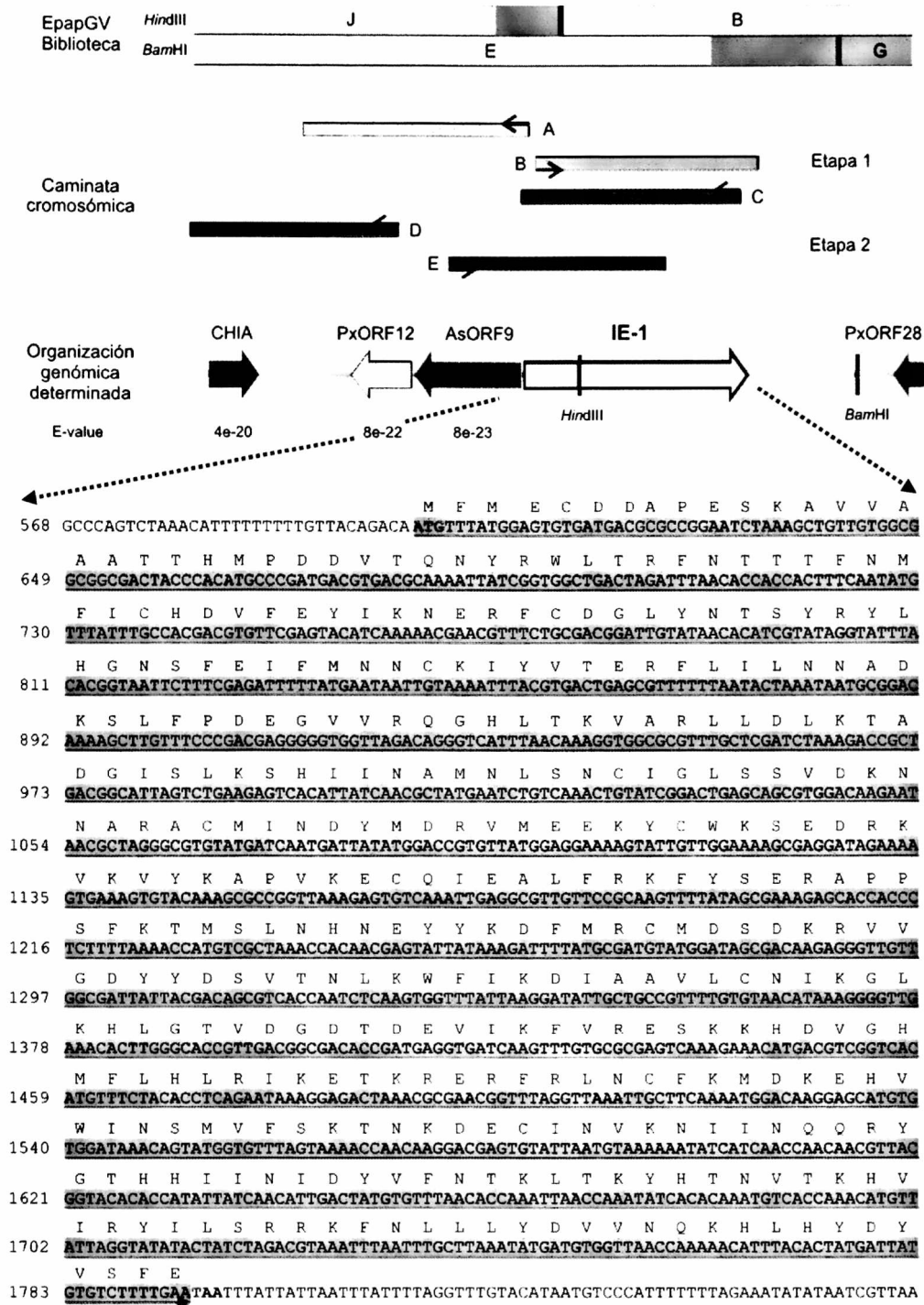


Figura III.3: Esquema general de la estrategia de caminata cromosómica, secuencia nucleotídica determinada y aminoacídica deducida.

Arriba: Esquema de la región del mapa físico de *EpapGV*. Los rectángulos en tono de gris corresponden a la secuencia previamente determinada (clon J *HindIII* y contig *BamHI* E-G).

Centro: Caminata cromosómica, las flechas negras indican la posición de los *primers* diseñados que permitieron amplificar las regiones indicadas con rectángulos sombreados en distintos tonos de grises.

Abajo: esquema de la organización genómica determinada. Con flechas se indican la orientación y posición de los ORF CHIA, PxORF12, AsORF9, IE-1 y PxORF28. Los mismos se identificaron mediante análisis de similitud utilizando BLASTP, los valores de similitud arrojados (*E-values*) se indican debajo de cada uno de los ORF. Las flechas desde IE-1 señalan la secuencia nucleotídica determinada y secuencia aminoacídica deducida del ORF. Resaltado en gris, el ORF IE-1, la flecha azul indica la dirección de traducción. Los codones de inicio y de terminación están resaltados en rojo.

Px: *Plutella xylostella* GV, As: *Agrotis segetum* GV.

Análisis del producto de traducción del gen *ie-1* de EpapGV

El gen *ie-1* (*immediate early 1*) está presente en todos los baculovirus que infectan lepidópteros estudiados hasta el momento (Jehle *et al.*, 2006).

El análisis de la secuencia obtenida indica que el ORF del gen *ie-1* de EpapGV tiene 1197 pb y codifica una proteína de 398 aminoácidos (aa) con un peso molecular teórico de 47 kDa. Así, sería la segunda proteína más pequeña identificada hasta el momento dentro de la familia de proteínas IE-1 de baculovirus, con cinco aa más que *Plutella xylostella* GV (Harrison y Lynn, 2007).

La composición aminoacídica en términos de aminoácidos cargados (DEKRH), polares (GSTYCNQ) e hidrofóbicos (AVLIPMFW) indica que presenta un 32,17% de aa cargados, 31,18% de aa polares y un 36,69% de aa hidrofóbicos.

En la **Tabla III.4** se presenta un resumen de la composición aminoacídica, longitud en aa, predicción del tamaño molecular (en kDa) y punto isoeléctrico (pI), de las once proteínas IE-1 de GV disponibles en la base de datos del GenBank y la de EpapGV.

Tabla III.4: Composición aminoacídica (%), tamaño, tamaño molecular y punto isoeléctrico de las proteínas IE-1 de doce GV.

El cálculo de los parámetros se realizó mediante el uso de la herramienta BioAnnotator del programa Vector NTI Advance 10.0.1 (Invitrogen).

Granulovirus	Ador	Agse	Cf	Co	Crle	Cypo	Epap	Ha	Phop	Px	Spli	Xc
aa Cargados (RKHDE)	29,39	34,56	27,69	28,93	29,52	30,54	32,17	28,03	33,34	30,78	29,63	27,69
aa Polares (GSTYCNQ)	35,17	28,73	34,05	33,86	34,14	34,43	31,18	33,61	29,8	31,55	33,79	34,29
aa Hidrofóbicos (AVLIPMFW)	35,54	36,71	38,27	37,23	36,34	35,03	36,69	38,34	36,85	37,65	36,58	38,02
Tamaño (aa)	422	463	426	446	454	488	398	485	426	393	432	484
Tamaño molecular (kDa)	50	55,1	50,3	52,8	53,8	57,9	47,1	56,6	50,7	46,6	50	56,4
PI	8,62	6,10	9,17	6,94	8,52	8,25	8,92	8,61	8,26	8,21	7,09	8,62

aa: aminoácidos; Tamaño (aa): número de aa del polipéptido IE-1; PI: punto isoeléctrico. Se omitió la sigla GV del nombre de cada uno de los Granulovirus indicados en las columnas. En negrita se resaltan los valores obtenidos para IE-1 de EpapGV.

En términos generales, los valores obtenidos para la composición aminoacídica de IE-1 de EpapGV son similares a los valores que presentan el resto de las proteínas IE-1 de GV. Los tamaños de las proteínas IE-1 de GV se encuentran por debajo de los 500 aa, a diferencia de las proteínas IE-1 de NPV que son mucho más grandes. Las más pequeñas, de 560 aa, fueron identificadas en los genomas de OpMNPV y de CfMNPV

(Carstens *et al.*, 2002; Theilmann y Stewart, 1991) y la más grande, de 927 aa en LsNPV (Xiao y Qi, 2007).

La búsqueda de similitud de IE-1 de EpapGV con la base de datos de proteínas (BLASTP), indica que la misma se encuentra más relacionada con el ORF8 de AgseGV, que se corresponde con el gen *ie-1* de esta especie.

Estudios previos de comparación entre las proteínas IE-1 de cuatro GV y diez NPV, muestran que los valores de similitud entre las mismas no superan el 15% (Rashidan *et al.*, 2002). Los resultados de la comparación de a pares entre las distintas secuencias de proteínas de IE-1 de GV se presentan en la **Tabla III.5**. IE-1 de EpapGV presenta una moderada similitud (28-33%) con otras proteínas IE-1 de GV. Estos valores se asemejan a los que se presentan entre el resto de las especies, salvo para las relaciones de XcGV y HaGV (97,3%), de CoGV y CfGV (90,4%), y de CypoGV y CrleGV (64,3%), que presentan valores de similitud mucho mayores. Algo similar se ha observado al comparar los valores de similitud entre las proteínas IE-1 de NPV, los cuales rondan entre 25-40%, salvo ciertas excepciones (van Strien *et al.*, 2000).

Tabla III.5: Comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de IE-1 de EpapGV con once proteínas IE-1 de GV.

Se muestran los valores de identidad de a pares (%) entre las distintas especies. Entre paréntesis se indica el número de aminoácidos. En negrita se indican los valores obtenidos para EpapGV.

	CypoGV	CrleGV	AgseGV	HaGV	XcGV	SpliGV	PxGV	EpapGV	CoGV	PhopGV	CfGV (426)
AdorGV (422)	38,9	41,9	31,5	26,8	26,7	28,2	28,4	33	38	39,7	39,2
CypoGV (488)		64,3	33,6	27,2	27,1	28,3	25,1	30,7	36,8	36,5	34,7
CrleGV (454)			34	26,5	25,8	29,2	27,3	31,2	41,5	38,4	39,8
AgseGV (463)				35,6	35,7	37,7	31,1	30,4	33,4	30,4	31,6
HaGV (485)					97,3	36,1	27,5	29,4	26,1	24,6	24,2
XcGV (484)						35,9	27,7	29,4	25,5	24,6	23,6
SpliGV (432)							31,8	28,8	29,4	27,7	26,5
PxGV (393)								28	25,1	28,2	25,1
EpapGV (398)									30,3	30,5	30,8
CoGV (446)										33,1	90,4
PhopGV (426)											34,5

Análisis filogenético

Para dilucidar la relación de *ie-1* de EpapGV con el resto de las secuencias disponibles de baculovirus, la secuencia aminoacídica deducida fue comparada con IE-1 de 29 baculovirus (12 GV y 17 NPV). El árbol filogenético está separado en dos grupos que se corresponden con los dos géneros de la familia: NPV y GV (**Fig. III.4**). Además, se observa una clara división de los NPV de los Grupos I y II, lo que concuerda con los datos publicados previamente en base a la filogenia del gen de poliedrina (Zanotto *et al.*, 1993).

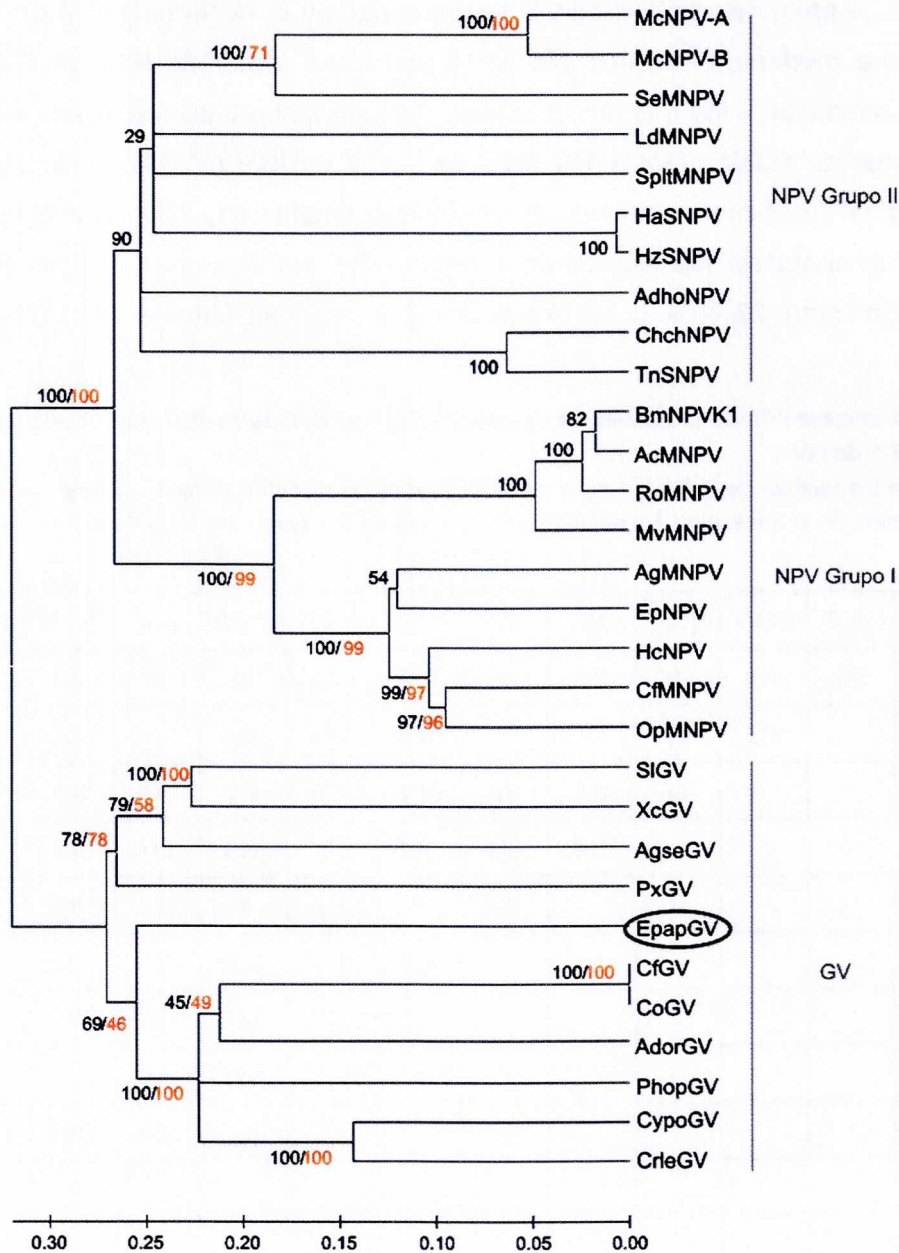


Fig. III.4: Análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de IE1 de 19 NPV y 11 GV.

Los datos fueron analizados mediante los métodos de *Neighborn-Joining* y *Parsimonia*. Los valores de *Bootstrap* (500 repeticiones) se muestran en negro para *Neighborn-Joining* y en rojo para el de *Parsimonia*. EpapGV está señalada con un óvalo.

Alineamiento múltiple de proteínas IE-1 de GV

El alineamiento múltiple entre la secuencia de aminoácidos deducida de IE1 de EpapGV y de once GV (Fig. III.5), reveló mayores similitudes entre las regiones C-terminales de estas proteínas que las que se advierten en las N-terminales. Este análisis concuerda con los alineamientos realizados para NPV por Theilmann & Stewart (1991).

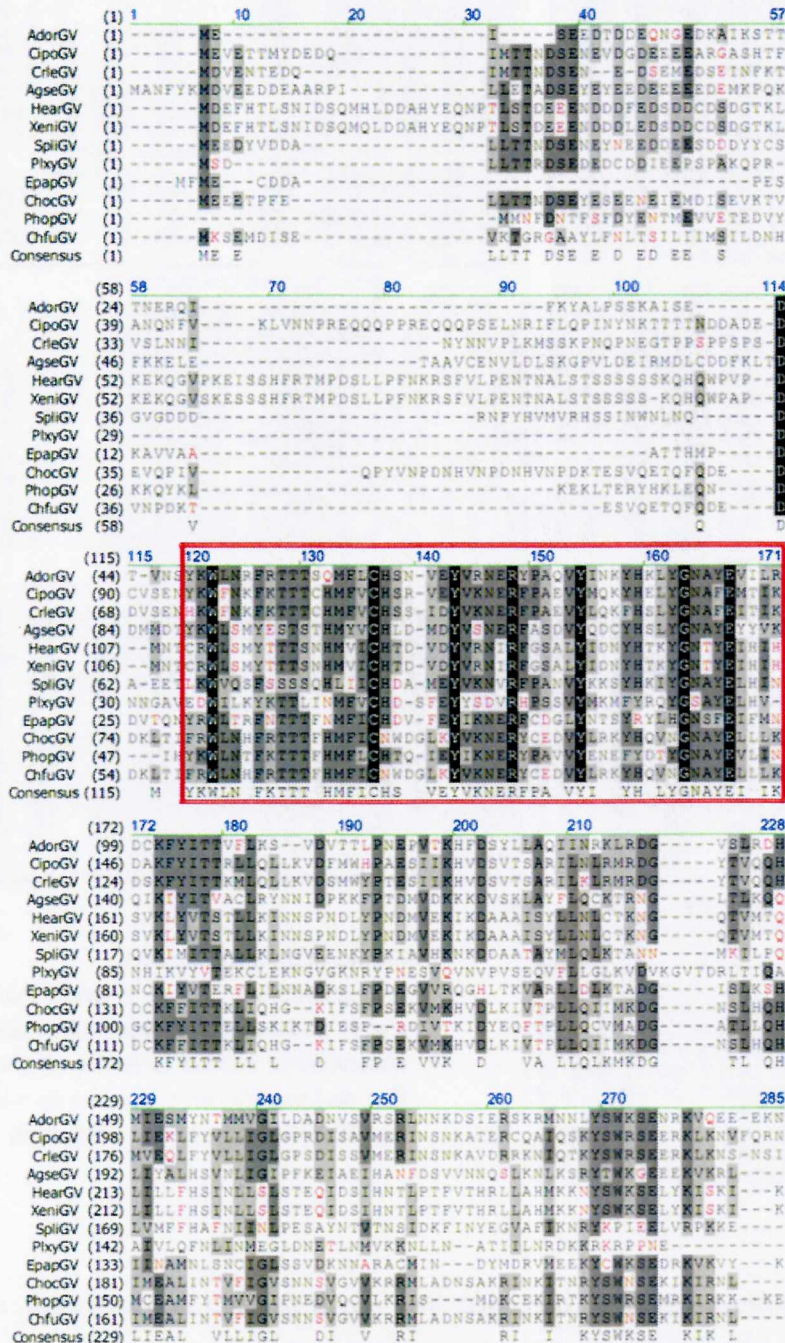


Figura III.5: Alineamiento de IE-1 de EpapGV con once proteínas homólogas de GV.

El alineamiento se realizó con el programa Vector NTI Advance 10.0.1 (Invitrogen). Los tres tonos de gris representan, del más oscuro al más claro, residuos idénticos, residuos conservados y residuos similares. Los residuos en letra roja representan aquellos con baja similitud.

[Continúa en página siguiente].

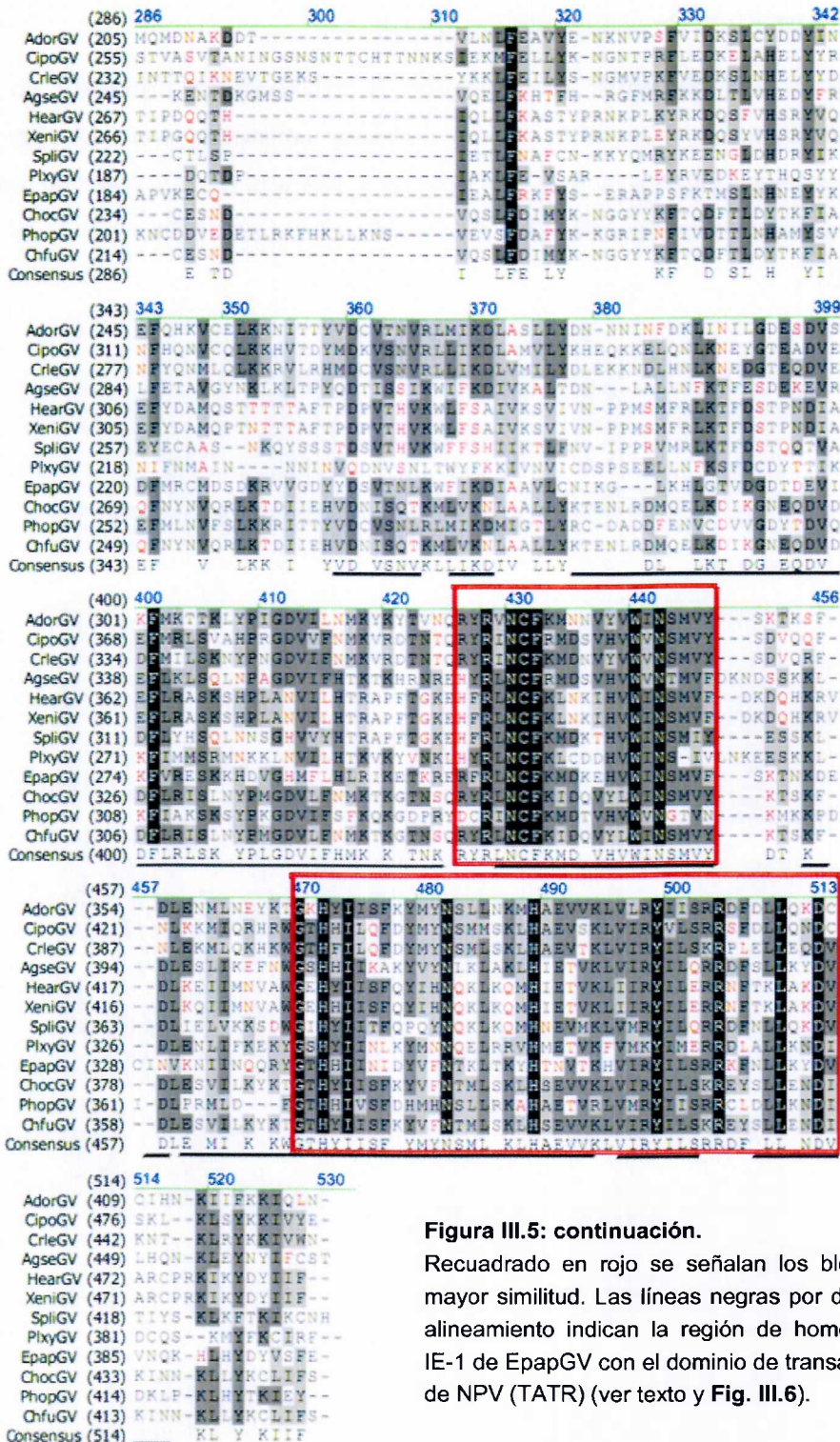


Figura III.5: continuación.
 Recuadrado en rojo se señalan los bloques de mayor similitud. Las líneas negras por debajo del alineamiento indican la región de homología de IE-1 de EpapGV con el dominio de transactivación de NPV (TATR) (ver texto y Fig. III.6).

En el alineamiento se pueden distinguir tres regiones bien conservadas, recuadradas en rojo. En la región N-terminal (posición 1-250 del alineamiento múltiple) un bloque que se extiende entre la posición 120 a 171, en el cual la composición aminoacídica de P_xGV es la que presenta menos aminoácidos conservados. Hacia el extremo C-terminal se pueden observar dos bloques de conservación de secuencia aminoacídica

comprendidos entre las posiciones 426-447 y 470-513 del alineamiento múltiple, en estas regiones P_xGV también presenta variaciones en el patrón.

Como se mencionó en la introducción, en IE-1 de AcMNPV, se han identificado dos dominios, uno N-terminal implicado en la activación transcripcional (Slack y Blissard, 1997) y otro C-terminal, donde se ubica la región de dimerización (Rodems *et al.*, 1997) y, de unión a DNA (Kovacs *et al.*, 1992). La región N-terminal de NPV se caracteriza por la presencia de residuos ácidos, que le otorgan a la región implicada en la transactivación una carga neta negativa. Por el contrario, el bloque de similitud encontrado en el alineamiento de IE-1 de GV en la región N-terminal, presenta mayor cantidad de residuos básicos (que ácidos), confiriéndole a esta región una carga neta positiva.

Por otra parte, se puede observar que el bloque de similitud 470-513 se alinea con la región de AcMNPV implicada en la formación de un dominio tipo hélice-giro-hélice (Olson *et al.*, 2001) que conduce a la dimerización de IE-1, proceso necesario para su función de activador transcripcional.

Con el fin de buscar dominios reconocidos en otras proteínas dentro de la secuencia de IE-1 de EpapGV, se utilizó la herramienta CDART: *Conserved Domain Architecture Retrieval Tool* (Marchler-Bauer *et al.*, 2007) disponible en la interfase del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). La búsqueda de similitud de la secuencia aminoacídica con la base de datos de dominios conservados (CDD), permitió identificar un dominio conservado que pertenece a la superfamilia de reguladores transcripcionales por trans-activación (TATR, pfam 03430). La región de similitud comprende a los residuos de aminoácidos 236 a 388 de IE-1 de EpapGV (**Fig. III.6**), la región de homología se indica además con líneas negras por debajo del alineamiento múltiple (**Fig. III.5**).



Figura III.6: Resultado del análisis obtenido mediante el uso de CDART.

Parte superior, esquema de la estructura primaria de IE-1 de EpapGV (query, rectángulo gris) y la región de homología con el dominio TATR (sombreado en rojo).

Parte inferior, alineamiento aminoacídico de la región del dominio TATR entre las especies que definen al dominio (NPV) y la secuencia de aminoácidos de EpapGV (sólo la región entre el aminoácido 236 y 388).

gi 82013070 *Helicoverpa zea* SNPV, query EdpapGV, gi 81920636 *Lymantria dispar* MNPV, gi 1174588 *Autographa californica* MNPV, gi 1174589 *Choristoneura fumefarama* MNPV gi 135323 *Orgyia pseudotsugata* MNPV. La región de homología se indica además con líneas negras debajo del alineamiento múltiple mostrado en la Fig. III.5

Lo interesante de esta búsqueda resultó en que este dominio fue definido en base a alineamientos realizados entre proteínas IE-1 del género *Nucleopolyhedrovirus*. Con esta información obtenida se procedió a buscar dominios similares en el resto de las proteínas IE-1 de GV, dado que la región en la cual se encontró el TATR coincide con los bloques de mayor similitud en la región C-terminal del alineamiento múltiple (líneas negras Fig. III.5). La búsqueda de similitud con la base de datos CDD usando CDART, no detectó zonas de similitud con algún dominio del tipo TATR en el resto de las proteínas IE-1 de GV.

Análisis de las regiones flanqueantes al gen *ie-1* de EpapGV

El gen *ie-1* se transcribe inmediatamente luego de la entrada del virus a la célula hospedante, utilizando la RNA polimerasa II y factores de transcripción presentes en la misma. Este mecanismo de regulación puede explotarse gracias a la presencia de ciertos motivos de secuencia que actúan en *cis* imitando a los elementos presentes en los promotores propios de la célula (Friesen, 1997).

El análisis de la secuencia nucleotídica de *ie-1* de EpapGV 600 pb *upstream* del ATG iniciador, permitió identificar la secuencia consenso correspondiente al probable sitio de inicio de la transcripción (CAGT) 26 nt *upstream* del ATG y una TATA box 85 nt *upstream* del CAGT (Fig. III.7). En NPV, el motivo TATA box se localiza entre 25 a 31 nt *upstream* de la secuencia CAGT (Guarino y Smith, 1992; Pullen y Friesen, 1995a).

También se detectaron posibles elementos en la región de activación *upstream* (UAR), del tipo GATA, CGT y motivos ricos en GC *upstream* de la TATA box. Se ha descrito que estos elementos pueden encontrarse 100 o más nt *upstream* del motivo TATA box y actúan potenciando la transcripción y su actividad puede variar en forma específica según el hospedante (Kogan y Blissard, 1994). Pudieron ubicarse, además, tres motivos de inicio de la transcripción tardíos TAAG, uno de ellos ubicado a 173 nt del CAGT. La señal de poliadenilación no canónica, ATTAAA, se ubicó 124 nt *downstream* del codón de terminación de la traducción (Fig. III.7).

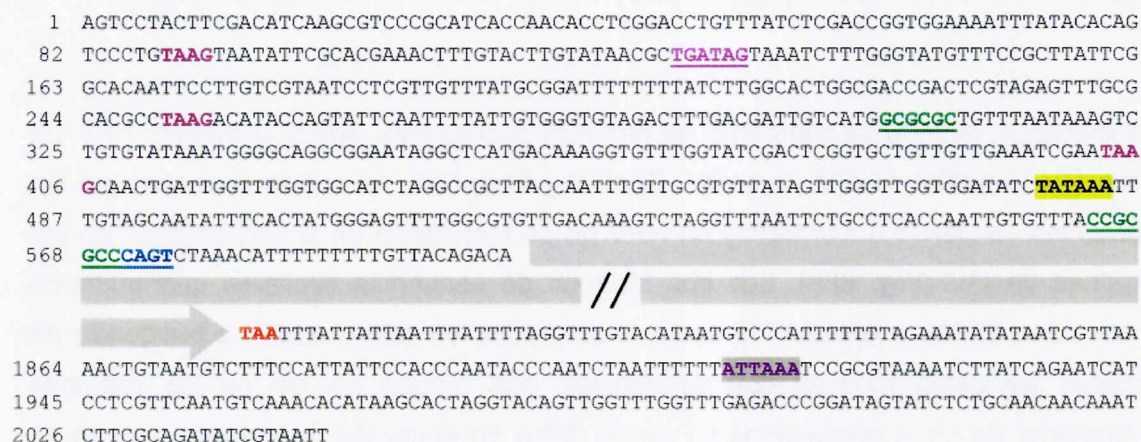


Figura III.7: Secuencias nucleotídicas flanqueantes del ORF IE-1 de EpapGV.

El ORF IE-1 se representa con una flecha gris. El posible sitio de inicio de la transcripción temprano CAGT, se muestra subrayado en azul (la A corresponde al nt +1 del producto de transcripción). El motivo TATA box, se resalta en amarillo (posición -83); varios elementos de UAR (*upstream activation regions*) están subrayados con líneas violetas: secuencias del tipo GATA (cuya secuencia consenso es T/A GATA A/G), en verde motivos ricos en GC. Los sitios de inicio de transcripción tardío TAAG, se indican en morado. La señal de poliadenilación no canónica ATTAAA (ubicada 116 nt *downstream* del codón de terminación de la traducción, resaltado en rojo) aparece en violeta en un rectángulo gris.

Los elementos de secuencia encontrados en la región *upstream* ATG de *ie-1* de EpapGV, fueron similares a los descriptos para los promotores tempranos de otros baculovirus. Estos incluyen el tetranucleótido CAGT, secuencia relacionada con la velocidad de inicio de transcripción (Pullen y Friesen, 1995a), así como también el motivo TATA *box* que determina el sitio de inicio de la transcripción (Blissard *et al.*, 1992), ambos ampliamente estudiados. El alineamiento de la región promotora 300 nt *upstream* del ATG, que abarca estos dos motivos de los genes *ie-1* de cinco NPV (AcMNPV, BmNPV, CfMNPV, LdMNPV y SeMNPV) se muestra en la **Fig. III.8**. Como puede observarse, tanto el motivo CAGT, ubicado *upstream* del ATG, como el motivo TATA *box* (TATAAA) posicionado unos 30 nt *upstream* del CAGT, se encuentran conservados dentro de esta región, también se mantienen a distancias similares en los cinco NPV que se usaron en el alineamiento.

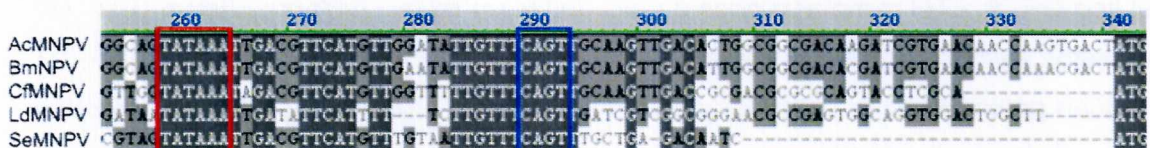


Figura III.8: Alineamiento nucleotídico de la región 300 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción del gen *ie-1* de NPV.

Los alineamientos fueron realizados mediante el programa Vector NTI Advance 10.0.1 (Invitrogen). Las regiones resaltadas en gris oscuro indican 100% de identidad, las regiones resaltadas en gris indican el nt más representativo del alineamiento. Recuadrado en azul se indica el sitio de inicio de la transcripción, CAGT y en rojo el motivo TATA *box* (TATAAA). Tomado de van Strien *et al.* (2000).

Sin embargo, cuando se comparan las regiones promotoras, 300 nt *upstream* ATG, de cinco GV (AdorGV, CoGV, CypoGV, CrleGV y EpapGV), se puede observar que los elementos consenso encontrados en NPV no se mantienen en el alineamiento de las regiones de GV (**Fig. III.9**). Los dos bloques de secuencia similares que pudieron encontrarse (CAG y AACATT) están recuadrados en rojo y azul. La búsqueda de similitud de estos motivos con secuencias que actúan en *cis* en las regiones promotoras de otros organismos no arrojó datos consistentes. Asimismo, cuando se agregan al alineamiento las siete secuencias que no se utilizaron en el alineamiento anterior, de las regiones promotoras del gen *ie-1* de GV (SpliGV, XcGV, PhopGV, PxGV, CfGV, HaGV y AgseGV) estos bloques de similitud no se conservaron (**Fig. III.10**).



Figura III.9: Alineamiento nucleotídico de la región 300 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción del gen *ie-1* de GV.

Los alineamientos fueron realizados mediante el programa Vector NTI Advance 10.0.1 (Invitrogen). Las regiones resaltadas en negro indican 100% de identidad, las regiones resaltadas en gris indican el nt más representativo del alineamiento. Recuadrado en azul se indica el bloque de similitud AACATT y en rojo CAG.

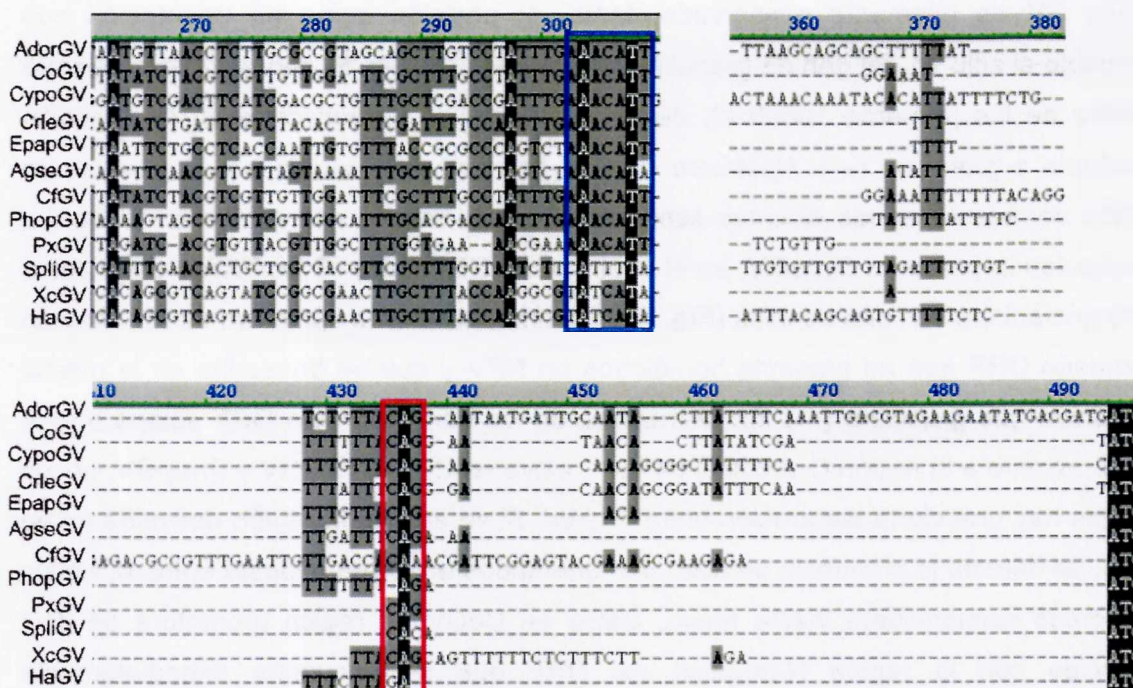


Figura III.10: Alineamiento nucleotídico de la región 300 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción del gen *ie-1* de GV.

Los alineamientos fueron realizados mediante el programa Vector NTI Advance 10.0.1 (Invitrogen). Las letras resaltadas en negro indican 100% identidad, las regiones resaltadas en gris indican el nt. más representativo del alineamiento. Recuadrado en rojo se indica la región que corresponde al bloque de similitud, CAG presentado en la Fig. III.5 y en azul la región que se corresponde al consenso AACATT presentado anteriormente.

El análisis de las regiones promotoras de los genomas de GV secuenciados hasta el momento ha revelado que *upstream* al ATG de IE-1 no hay una conservación de elementos promotores tempranos como TATA box, o el sitio de inicio de transcripción

CAGT. En algunos genomas están presentes mientras que en otros sólo algunos motivos se encontraron dispersos. Esto se relaciona directamente con la falta de similitud en el alineamiento realizado (**Fig.III.10**). Sin embargo, esta región correspondería a la región N-terminal del ORF que se encuentra inmediatamente *downstream* a IE-1 (ver orden génico, **Fig.III.11**).

Por otra parte, si se localizaron elementos promotores tardíos, DTAAG, aunque la abundancia difiere entre los genomas secuenciados, y no se distribuyen regularmente en la región promotora analizada.

Orden génico

Si se analizan los ORF que rodean a IE-1 en el genoma de los GV secuenciados hasta el momento, puede inferirse que la organización genómica alrededor del gen *ie-1* de éstos GV es altamente conservada, tanto en posición como en orientación con respecto al sitio +1 del gen de granulina (Crook *et al.*, 1997). El gen *ie-1*, se encuentra dentro de los primeros 10000 nt, desde el sitio +1 y se transcribe en la dirección contraria a granulina (←). *Upstream* de IE-1 hay dos ORF contiguos, dispuestos en forma semejante en las distintas especies, y con la misma orientación en todos. La excepción la presenta CypoGV, en el cual hay un ORF extra (CypoORF5) entre estos dos que solapa con uno de ellos (**Fig. III.11**). Inmediatamente *upstream* de IE-1 hay un pequeño ORF que no presenta homólogos en NPV y que se transcribe en la misma dirección que granulina (→). En la mayoría de los genomas este ORF solapa o está muy próximo a la región C-terminal de IE-1, salvo en CoGV, CrleGV y PhopGV, en los cuales hay una cierta separación entre ambos. Si se analiza la región *downstream* de IE-1, se detecta la presencia de dos ORF orientados en forma opuesta entre sí, en los genomas secuenciados hasta ahora. Salvo en CoGV, la región promotora de IE-1 coincide con la región N-terminal del ORF que se encuentra inmediatamente *downstream*, con función desconocida y con homólogos en NPV.

El análisis previo del genoma de EpapGV (Parola *et al.*, 2002), identificó una región invertida que incluye al ORF IE-1, por lo que la orientación y posición del mismo difiere en comparación con el resto de los GV secuenciados. Inmediatamente *downstream* del gen *ie-1* de EpapGV, no se encontró el pequeño ORF que solo se mantiene en GV (posición *upstream* *ie-1* en el resto de los GV). Mientras que *upstream* de IE-1 EpapGV se encontró un ORF con alta similitud al ORF9 de AgseGV, lo que se correspondería con la disposición génica *downstream* en el resto de GV. El siguiente ORF que se encontró, con similitud al ORF12 de PxGV, seguiría con los lineamientos

anteriores. Sin embargo, la orientación es contraria a lo esperado. Notar que en PxGV, IE-1 y el ORF 12 tienen la misma orientación (Fig. III.11), lo que difiere en la organización de EpapGV.

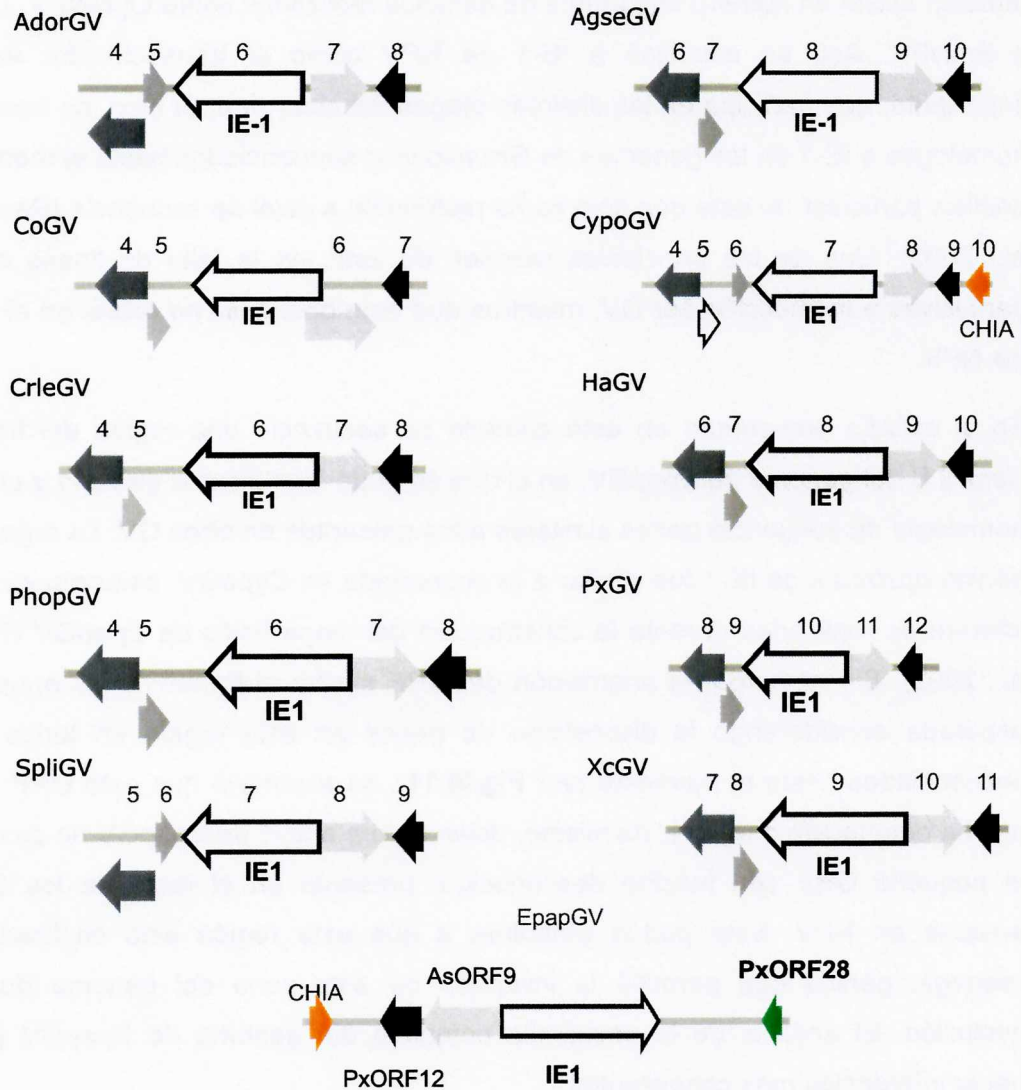


Figura III.11: Esquema de la organización genómica alrededor del gen *ie-1* en los GV secuenciados.

Las flechas indican la posición y orientación de los genes que se encuentran alrededor de IE-1 (flecha blanca, bordes negros). Colores similares indican genes con alta similitud según BLAST. Los números por encima de las flechas indican la posición con respecto al gen inicial del genoma (granulina).

Discusión

La mayoría de las investigaciones enfocadas a aspectos moleculares de la infección por baculovirus se han realizado sobre virus pertenecientes al género *Nucleopolyhedrovirus*; en su mayor parte, se usó como modelo AcMNPV, pero también existe un número importante de estudios realizados sobre OpMNPV, LdMNPV y BmNPV. Así, se identificó a IE-1 de NPV como el transactivador viral más importante, que participa en las distintas etapas del ciclo viral. Si bien, se encontraron homólogos a IE-1 en los genomas de *Granulovirus* secuenciados hasta el momento, el análisis particular de este gen sólo se ha restringido a nivel de secuencia (Rashidan *et al.*, 2002). Una de las principales razones de esto, es la falta de líneas celulares permisivas a la infección por GV, mientras que este obstáculo no existe en el caso de los NPV.

En el estudio presentado en este capítulo se secuenció una región del fragmento *Bam*HI B del genoma de EpapGV, en el que se pudo identificar al gen *ie-1* y ubicar por homología de secuencia genes similares a los presentes en otros GV. La organización génica *upstream* de IE-1 fue similar a la encontrada en CypoGV, coincidiendo con las inferencias realizadas durante la construcción del mapa físico de EpapGV (Parola *et al.*, 2002). Sin embargo, la orientación del ORF similar al PxORF12 es opuesta a la esperada considerando la disposición de genes en esta región en todos los GV secuenciados hasta el momento (ver **Fig.III.11**), se esperaría que este ORF tenga la misma orientación que IE-1. Asimismo, *downstream* a IE-1 de EpapGV no se encontró el pequeño ORF con función desconocida, presente en el resto de los GV pero ausente en NPV. Esto podría atribuirse a que esta región está implicada en el rearrreglo génico que permitió la inversión de esta zona del genoma durante la evolución. El análisis de la secuencia completa del genoma de EpapGV permitirá hacer inferencias más consistentes.

En otros baculovirus, particularmente en NPV, se ha mostrado que el motivo CAGT es suficiente para un inicio de la transcripción correcta en ausencia del motivo TATA *box* (Pullen y Friesen, 1995a). Además, se ha descrito previamente (Friesen, 1997), que algunos promotores son inusuales y carecen de los elementos promotores típicos tales como un motivo TATA *box* y elementos de iniciación transcripcionales conocidos. El gen *ie-1* se extiende en 1197 nt. el análisis de la región 600 nt *upstream* del ATG permitió identificar la presencia de varios elementos característicos de promotores tempranos. Sin embargo, la disposición y conservación de los mismos no se correlaciona con los encontrados en NPV (**Fig. III.8, III.9 y III.10**). Por ello, el estudio

de la región promotora, permitiría verificar si estos elementos de secuencia encontrados pueden funcionar en forma similar a los presentes en NPV.

El gen *ie-1* de EpapGV codifica una proteína de 398 aminoácidos con un peso molecular estimado de 47.1 kDa. La composición aminoacídica es similar a la encontrada en las proteínas IE-1 de GV. El análisis de secuencia demuestra que es la segunda proteína más pequeña descrita dentro de la familia de IE1 de GV. El análisis de similitud de secuencia con las secuencias de IE1 de GV, muestran una mayor similitud en las regiones C-terminales que en las N-terminales. La región C-terminal es la que está relacionada con la dimerización y transporte al núcleo, en NPV. En esta región se encontró similitud con la superfamilia de transactivadores transcripcionales (TATR), la cual está definida para IE-1 de NPV. Sin embargo, se requiere de estudios de funcionalidad para determinar si IE-1 de EpapGV cumple roles similares a los observados en IE-1 de NPV.

El análisis filogenético realizado en base a la secuencia nucleotídica que codifica para este polipéptido produjo agrupamientos consistentes con los derivados de la comparación de otros genes virales. Sin embargo, dado que *ie-1* está ausente en los genomas de baculovirus que infectan Himenópteros y Díptero secuenciados, el estudio evolutivo no puede realizarse en base a este gen solamente. Además, dada la importancia del gen en el ciclo de infección de los NPV que infectan Lepidópteros, su ausencia en otros NPV y la falta de información acerca de su función en GV, sería necesario verificar experimentalmente si *ie-1* de EpapGV es funcional.

Referencias

- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Balinsky, C. A., Moser, B. A., Becnel, J. J., Rock, D. L. & Kutish, G. F. (2001). Genome sequence of a baculovirus pathogenic for *Culex nigripalpus*. *J Virol* **75**, 11157-11165.
- Ahrens, C. H., Pearson, M. N. & Rohrmann, G. F. (1995). Identification and characterization of a second putative origin of DNA replication in a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata*. *Virology* **207**, 572-576.
- Altschul, S. F. & Gish, W. (1996). Local alignment statistics. *Methods Enzymol* **266**, 460-480.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M. & Possee, R. D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**, 586-605.
- Berretta, M. F. & Passarelli, A. L. (2006). Function of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus late gene expression factors in the insect cell line SF-21. *Virology* **355**, 82-93. Epub 2006 Aug 2009.
- Blissard, G. W., Kogan, P. H., Wei, R. & Rohrmann, G. F. (1992). A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. *Virology* **190**, 783-793.
- Carson, D. D., Summers, M. D. & Guarino, L. A. (1991). Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J Virol* **65**, 945-951.
- Carstens, E. B., Liu, J. J. & Dominy, C. (2002). Identification and molecular characterization of the baculovirus CfMNPV early genes: ie-1, ie-2 and pe38. *Virus Res* **83**, 13-30.
- Croizier, L., Taha, A., Croizier, G. & Lopez Ferber, M. (2002). The complete sequence of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*, granulovirus (AF499596).
- Crook, N. E., James, J. D., Smith, I. R. & Winstanley, D. (1997). Comprehensive physical map of the *Cydia pomonella* granulovirus genome and sequence analysis of the granulin gene region. *J Gen Virol* **78**, 965-974.
- Cherbas, L. & Cherbas, P. (1993). The arthropod initiator: the capsid consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochem Mol Biol* **23**, 81-90.
- Choi, J. & Guarino, L. A. (1995). Expression of the IE1 transactivator of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus during viral infection. *Virology* **209**, 99-107.
- Friesen, P. D. (1997). Regulation of Baculovirus Early Gene Expression. In *The Baculoviruses*, pp. 141-170. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Garcia-Maruniak, A., Maruniak, J. E., Zanutto, P. M., Doumbouya, A. E., Liu, J. C., Merritt, T. M. & Lanoie, J. S. (2004). Sequence analysis of the genome of the *Neodiprion sertifer* nucleopolyhedrovirus. *J Virol* **78**, 7036-7051.
- Guala, M. A., Buller, P. L. & Weaver, R. F. (1981). alpha-Amanitin-Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells. *J Virol* **38**, 916-921.
- Guarino, L. A., Gonzalez, M. A. & Summers, M. D. (1986). Complete Sequence and Enhancer Function of the Homologous DNA Regions of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J Virol* **60**, 224-229.
- Guarino, L. A. & Smith, M. (1992). Regulation of delayed-early gene transcription by dual TATA boxes. *J Virol* **66**, 3733-3739.

- Guarino, L. A. & Summers, M. D. (1986a).** Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J Virol* **57**, 563-571.
- Guarino, L. A. & Summers, M. D. (1986b).** Interspersed Homologous DNA of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Enhances Delayed-Early Gene Expression. *J Virol* **60**, 215-223.
- Guarino, L. A. & Summers, M. D. (1987).** Nucleotide Sequence and Temporal Expression of a Baculovirus Regulatory Gene. *J Virol* **61**, 2091-2099.
- Harrison, R. L. & Lynn, D. E. (2007).** Genomic sequence analysis of a nucleopolyhedrovirus isolated from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Virus Genes* **35**, 857-873.
- Hashimoto, Y., Hayakawa, T., Ueno, Y., Fujita, T., Sano, Y. & Matsumoto, T. (2000).** Sequence analysis of the *Plutella xylostella* granulovirus genome. *Virology* **275**, 358-372.
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S. I., Goto, C. & Maeda, S. (1999).** Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology* **262**, 277-297.
- Huh, N. E. & Weaver, R. F. (1990).** Identifying the RNA polymerases that synthesize specific transcripts of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol* **71**, 195-201.
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M. & Vlak, J. M. (2006).** On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol* **151**, 1257-1266.
- Kang, W., Imai, N., Kawasaki, Y., Nagamine, T. & Matsumoto, S. (2005).** IE1 and hr facilitate the localization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF8 to specific nuclear sites. *J Gen Virol* **86**, 3031-3038.
- Kawasaki, Y., Matsumoto, S. & Nagamine, T. (2004).** Analysis of baculovirus IE1 in living cells: dynamics and spatial relationships to viral structural proteins. *J Gen Virol* **85**, 3575-3583.
- Kogan, P. H. & Blissard, G. W. (1994).** A baculovirus gp64 early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. *J Virol* **68**, 813-822.
- Kool, M., Ahrens, C. H., Goldbach, R. W., Rohrmann, G. F. & Vlak, J. M. (1994).** Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11212-11216.
- Kovacs, G. R., Choi, J., Guarino, L. A. & Summers, M. D. (1992).** Functional dissection of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early 1 transcriptional regulatory protein. *J Virol* **66**, 7429-7437.
- Kovacs, G. R., Guarino, L. A. & Summers, M. D. (1991).** Novel regulatory properties of the IE1 and IEO transactivators encoded by the baculovirus *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **65**, 5281-5288.
- Lange, M. & Jehle, J. A. (2003).** The genome of the *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus. *Virology* **317**, 220-236.
- Lauzon, H. A., Garcia-Maruniak, A., Zanotto, P. M., Clemente, J. C., Herniou, E. A., Lucarotti, C. J., Arif, B. M. & Maruniak, J. E. (2006).** Genomic comparison of *Neodiprion sertifer* and *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedroviruses and identification of potential hymenopteran baculovirus-specific open reading frames. *J Gen Virol* **87**, 1477-1489.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1995).** The roles of eighteen baculovirus late expression factor genes in transcription and DNA replication. *J Virol* **69**, 975-982.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1997).** Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In *The baculoviruses*, pp. 193-211. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum.
- Luque, T., Finch, R., Crook, N., O'Reilly, D. R. & Winstanley, D. (2001).** The complete sequence of the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *J Gen Virol* **82**, 2531-2547.

- Mans, R. M. & Knebel-Mörsdorf, D. (1998). In vitro transcription of pe38/polyhedrin hybrid promoters reveals sequences essential for recognition by the baculovirus-induced RNA polymerase and for the strength of very late viral promoters. *J Virol* **72**, 2991-2998.
- Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hao, L., He, S., Hurwitz, D. I., Jackson, J. D., Ke, Z., Krylov, D., Lanczycki, C. J., Liebert, C. A., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G. H., Mullokandov, M., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yin, J. J., Zhang, D. & Bryant, S. H. (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* **35**, D237-240.
- Nagamine, T., Kawasaki, Y., Iizuka, T. & Matsumoto, S. (2005). Focal distribution of baculovirus IE1 triggered by its binding to the hr DNA elements. *J Virol* **79**, 39-46.
- Nissen, M. S. & Friesen, P. D. (1989). Molecular analysis of the transcriptional regulatory region of an early baculovirus gene. *J Virol* **63**, 493-503.
- Olson, V. A., Wetter, J. A. & Friesen, P. D. (2001). Oligomerization mediated by a helix-loop-helix-like domain of baculovirus IE1 is required for early promoter transactivation. *J Virol* **75**, 6042-6051.
- Olson, V. A., Wetter, J. A. & Friesen, P. D. (2002). Baculovirus transregulator IE1 requires a dimeric nuclear localization element for nuclear import and promoter activation. *J Virol* **76**, 9505-9515.
- Olson, V. A., Wetter, J. A. & Friesen, P. D. (2003). The highly conserved basic domain I of baculovirus IE1 is required for hr enhancer DNA binding and hr-dependent transactivation. *J Virol* **77**, 5668-5677.
- Ooi, B. G., Rankin, C. & Miller, L. K. (1989). Downstream sequences augment transcription from the essential initiation site of a baculovirus polyhedrin gene. *J Mol Biol* **210**, 721-736.
- Parola, A. D. (2004). Caracterización molecular de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, p. 350. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Parola, A. D., Manzan, M. A., Lozano, M. E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002). Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* **25**, 329-341.
- Passarelli, A. L. & Miller, L. K. (1993). Three baculovirus genes involved in late and very late gene expression: ie-1, ie-n, and lef-2. *J Virol* **67**, 2149-2158.
- Possee, R. D. & Howard, S. C. (1987). Analysis of the polyhedrin gene promoter of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Nucleic Acids Res* **15**, 10233-10248.
- Pullen, S. S. & Friesen, P. D. (1995a). The CAGT motif functions as an initiator element during early transcription of the baculovirus transregulator ie-1. *J Virol* **69**, 3575-3583.
- Pullen, S. S. & Friesen, P. D. (1995b). Early transcription of the ie-1 transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region. *J Virol* **69**, 156-165.
- Rankin, C., Ooi, B. G. & Miller, L. K. (1988). Eight base pairs encompassing the transcriptional start point are the major determinant for baculovirus polyhedrin gene expression. *Gene* **70**, 39-49.
- Rapp, J. C., Wilson, J. A. & Miller, L. K. (1998). Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *J Virol* **72**, 10197-10206.
- Rashidan, K. K., Nassoury, N., Merzouki, A. & Guertin, C. (2002). Identification and characterization of a putative baculoviral transcriptional factor IE-1 from *Choristoneura fumiferana* granulovirus. *J Biochem Mol Biol* **35**, 553-561.
- Rodems, S. M. & Friesen, P. D. (1995). Transcriptional enhancer activity of hr5 requires dual-palindrome half sites that mediate binding of a dimeric form of the baculovirus transregulator IE1. *J Virol* **69**, 5368-5375.
- Rodems, S. M., Pullen, S. S. a. & Friesen, P. D. (1997). DNA-dependent transregulation by IE1 of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: IE1 domains required for transactivation and DNA binding. *Virology* **71**, 9270-9277.

- Schultz, K. L., Wetter, J. A., Fiore, D. C. & Friesen, P. D. (2009). Transactivator IE1 is required for baculovirus early replication events that trigger apoptosis in permissive and nonpermissive cells. *J Virol* **83**, 262-272.
- Slack, J. M. & Blissard, G. W. (1997). Identification of two independent transcriptional activation domains in the *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus IE1 protein. *J Virol* **71**, 9579-9587.
- Stewart, T. M., Huijskens, I., Willis, L. G. & Theilmann, D. A. (2005). The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ie0-ie1 gene complex is essential for wild-type virus replication, but either IE0 or IE1 can support virus growth. *J Virol* **79**, 4619-4629.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 4.0 Molecular Biology and Evolution **24**:1596-1599. edn, p. .
- Theilmann, D. A. & Stewart, S. (1991). Identification and characterization of the IE-1 gene of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **180**, 492-508.
- Theilmann, D. A. & Stewart, S. (1993). Analysis of the *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus trans-activators IE-1 and IE-2 using monoclonal antibodies. *J Gen Virol* **74** (Pt 9), 1819-1826.
- Thiem, S. M. & Miller, L. K. (1989). Identification, sequence, and transcriptional mapping of the major capsid protein gene of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol* **63**, 2008-2018.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Todd, J. W., Passarelli, A. L., Lu, A. & Miller, L. K. (1996). Factors regulating baculovirus late and very late gene expression in transient-expression assays. *J Virol* **70**, 2307-2317.
- van Strien, E. A., Ijkel, W. F., Gerrits, H., Vlak, J. M. & Zuidema, D. (2000). Characteristics of the transactivator gene *ie1* of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus. *Arch Virol* **145**, 2115-2133.
- Wormleaton, S., Kuzio, J. & Winstanley, D. (2003). The complete sequence of the *Adoxophyes orana* granulovirus genome. *Virology* **311**, 350-365.
- Xiao, H. & Qi, Y. (2007). Genome sequence of *Leucania seperata* nucleopolyhedrovirus. *Virus Genes* **35**, 845-856.
- Xie, W. D., Arif, B., Dobos, P. & Krell, P. J. (1995). Identification and analysis of a putative origin of DNA replication in the *Choristoneura fumiferana* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology* **209**, 409-419.
- Xiulian, A., Zhifang, W., Bo, W., Wei, Z., Jianhong, F., Chunsheng, C., Yuhu, S. & Mei, H. (2004). *Agrotis segetum* Granulosis Virus complete genome (AY522332).
- Yang, S. & Miller, L. K. (1999). Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. *J Virol* **73**, 3404-3409.
- Zanotto, P. M., Kessing, B. D. & Maruniak, J. E. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *J Invertebr Pathol* **62**, 147-164.

CAPÍTULO IV
Transactivación de
promotores de EpapGV

Resumen

Se analizaron las actividades de diferentes promotores virales derivados del virus de la granulosis de *Epinotia aporema* (EpapGV) en cultivo de células heterólogas.

El análisis comenzó con la evaluación del promotor del gen inmediato temprano *ie-1* de EpapGV. La región que comprende 600 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción fue insertada delante de los genes β -galactosidasa o Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) de *E. coli*. Los ensayos de expresión transitorios, por transfección de células derivadas de *Anticarsa gemmatalis* (UFLAg-286) y derivadas de *Spodoptera frugiperda* (SF9), indican que la región clonada es reconocida por la maquinaria transcripcional de las células ensayadas. Para evaluar la actividad autorregulatoria de IE-1 de EpapGV sobre su propio promotor, el marco abierto de lectura fue expresado constitutivamente bajo el control del promotor de *Drosophila melanogaster*, *hsp70*. Los resultados obtenidos demuestran que IE-1 de EpapGV no es capaz de aumentar la transcripción sobre su propio promotor en las condiciones ensayadas.

Posteriormente, se analizó la actividad de los promotores *egt* y *granulina* de EpapGV. En los sistemas más estudiados, estos genes requieren factores virales para su activación. Para ello, las regiones que abarcan 600 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción de estos genes fueron ubicadas delante del ORF de la β -galactosidasa de *E. coli* en el plásmido pCH110. Los plásmidos reporteros fueron transfectados individualmente en la línea celular UFLAg-286, no permisiva para EpapGV, en ausencia o presencia de infección por el virus que la infecta naturalmente (AgMNPV). Los ensayos de expresión transitorios indican que el gen *lacZ* bajo el control de los promotores *egt* o *granulina* de EpapGV, es expresado en condiciones de infección. Estos resultados indican que los promotores de este virus responden a la transactivación por factores virales de AgMNPV en un contexto heterólogo. Como control se hicieron además, construcciones semejantes, conteniendo las regiones promotoras de los genes ortólogos del virus de *A. gemmatalis* (AgMNPV).

Introducción

Diversos miembros de la familia *Baculoviridae* son utilizados como agentes de control biológico con excelentes resultados (Inceoglu *et al.*, 2001; Moscardi, 1999); sin embargo, la aplicabilidad de algunas especies en el manejo de plagas agrícolas ha sido limitada por su lenta velocidad de acción y estrecho rango de hospedantes.

Si bien la modificación genética dirigida ha permitido mejorar la actividad insecticida en el caso de algunos NPV (Inceoglu *et al.*, 2006; Inceoglu *et al.*, 2001), el progreso de este tipo de trabajos con GV ha sido significativamente más lento (Hilton *et al.*, 2008). En particular, el estudio de GV se ha dificultado por la ausencia de líneas celulares permisivas que facilitan la modificación genética y los análisis moleculares. Solamente se ha desarrollado una línea celular a partir de embriones de *Cydia pomonella* (Winstanley y Crook, 1993) en la cual puede replicarse el GV de *C. pomonella* (CypoGV). Sin embargo, los avances de los estudios a nivel molecular del ciclo infectivo de CypoGV han sido muy lentos (Hilton y Winstanley, 2007) debido a las condiciones de crecimiento no convencionales (23 °C), a los prolongados tiempos de duplicación de las células (3,5-5 días) y de replicación del virus (Miller *et al.*, 2002). En consecuencia el estudio y caracterización funcional de algunos genes de GV se ha realizado mediante análisis de complementación funcional en otras especies (Daimon *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2002) o mediante análisis de su actividad *in vivo* (Manzan *et al.*, 2002; Smith y Goodale, 1998).

Considerando que AgMNPV y EpapGV están siendo evaluados para su uso como agentes de control de los lepidópteros *A. gemmatalis* y *E. aporema*, y que estas plagas se presentan en forma simultánea durante cierta época del año, sería interesante contar con un baculovirus modificado con rango de hospedante ampliado a ambas plagas. Una posible estrategia consiste en generar recombinantes de AgMNPV en células derivadas de *A. gemmatalis* con genes de EpapGV y seleccionarlos por su infectividad sobre *E. aporema*. La expresión de los genes de EpapGV en el entorno heterólogo dependerá de la activación de los promotores por parte de la maquinaria transcripcional de la célula y productos génicos de AgMNPV. Para comenzar a evaluar este problema, se requiere estudiar la regulación transcripcional de genes de EpapGV en el contexto del genoma de AgMNPV y del sistema heterólogo de *A. gemmatalis*.

Es por ello, que en este capítulo de la tesis, se evaluó la actividad promotora del gen temprano *ie-1* de EpapGV y la capacidad autorreguladora de la expresión de su producto génico (IE-1) en líneas celulares no permisivas a la infección por EpapGV. Asimismo, se evaluó la capacidad de activación de los promotores de *egt* y *granulina*

de EpapGV en células derivadas de *A. gemmatilis*, en ausencia o presencia de infección por AgMNPV.

Materiales y métodos

Clonado de promotores de EpapGV y AgMNPV. Para evaluar la funcionalidad de los promotores, en una primera etapa, se generaron los plásmidos recombinantes tomando como base el vector de expresión pCH110 (Amersham), el cual contiene el marco abierto de lectura del gen que codifica para la β -galactosidasa de *E. coli*, bajo el control del promotor procariota *gpt*, el cual es no funcional en células de insecto (Pfeifer *et al.*, 1997). En base a las secuencias disponibles de los genomas de AgMNPV (NC_008520) y EpapGV (capítulo III y AF373031.1), se diseñaron *primers* (con sitios *HindIII*) que permitieron amplificar la región promotora de los genes *ie-1* (EpapGV), *egt* (EpapGV y AgMNPV), *granulina* (EpapGV) y *poliedrina* (AgMNPV). Los *primers* utilizados se detallan en la **Tabla IV.1**. El plásmido con el promotor de *ie-1* de AgMNPV, fue gentilmente provisto por los Dres. Pablo Daniel Ghiringhelli y Marcos Bilen (UNQ). Este plásmido (pIEUp491) contiene la región promotora de 434 pb del gen *ie-1* de AgMNPV dirigiendo la expresión del gen indicador *lacZ*. Las regiones que incluyen entre 550 y 600 nt *upstream* del ATG de los genes seleccionados fueron clonadas en el vector pGEMT-easy (Promega) o pZErO™-2 (Invitrogen) (digerido previamente con *EcoRV*). Luego, el DNA de los plásmidos con las regiones promotoras y el DNA de pCH110 fueron digeridos con *HindIII*; los productos fueron separados por electroforesis, purificados del gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen), ligados y transformados en células *E. coli* Top 10 (Invitrogen), generando los vectores *pieEp-LacZ*, *pegtEp-LacZ*, *pegtAg-LacZ*, *ppolh-LacZ* y *pgra-LacZ*. Dado que los promotores fueron clonados en forma no direccionada, se diseñó un ensayo de PCR para verificar la orientación de clonado del promotor. Para ello se diseñó un *primer reverse* que amplifica 150 nt del gen *lacZ* y se utilizó como *primer forward* el *primer* correspondiente a cada uno de los promotores en cuestión. Ver esquema en **Fig. IV.1**. El correcto clonado de las regiones promotoras fue verificado mediante secuenciación.

Tabla IV.1: *Primers* utilizados para la amplificación de las regiones promotoras de EpapGV y AgMNPV.

En negrita e *itálica* se indica el sitio de corte para la enzima *HindIII*.

Virus	Gen	Nombre	Secuencia	Tm	% GC
EpapGV	<i>ie-1</i>	PieEpap-Up	5' CATCAAGCTTCCCGCATCAC 3'	59.4	55.0
		PieEpap-Dw	5' CACACTCCATAAGCTTTGTCTG 3'	58.4	45.5
	<i>egt</i>	PegtEp-Up	5' TCGTCCAAGCTTTGCGCACCTATCAGCT 3'	68.7	53.6
		PegtEp-Down	5' GTCCACAAGCTTACTGATGTTGGAG 3'	55.9	48
	<i>granulina</i>	PgraEp-Up	5' AAATAATGAAGCTTAAGCATGTGGA 3'	53.5	32
		PgraEp-Down	5' ACCTCAAAGCTTTGTTATATCCTATAAT 3'	51.7	28.6
AgMNPV	<i>egt</i>	PegtAg600-Up	5' CCTCTAAGCTTTTCGTCTATGTACATGTT 3'	56.2	37.9
		PegtAg-Down	5' AAAAAAGCTTCGTAAATGCAGTTCAAT 3'	56.5	28.6
	<i>poliedrina</i>	PpolhAg600-Up	5' TGTACAAAGCTTCTAATTGCGTAAAAATG 3'	57.6	31
		PpolhAg-Down	5' TAATCAAGCTTAGTTATAGCAAATTTTA 3'	50.1	21.4
	LacZ		5' TGGATCTGCAACATGTCCAGGTGA 3'	70	52

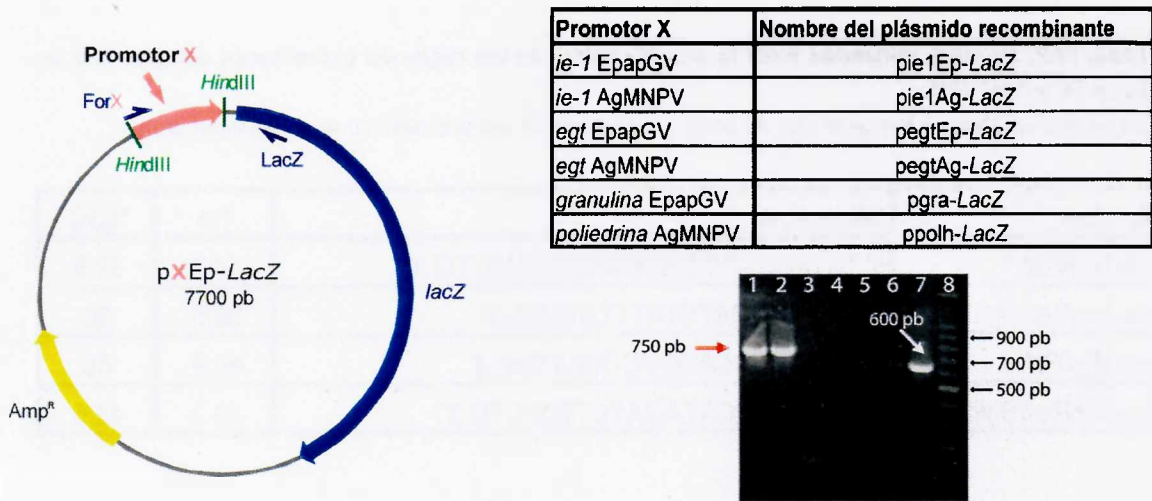


Figura IV.1: Esquema general de los plásmidos recombinantes generados para la evaluación de las regiones promotoras.

La región promotora (flecha rosada) fue clonada en el sitio *HindIII* *upstream* del gen indicador (*lacZ*, flecha azul). La orientación de clonado fue determinada mediante un ensayo de PCR, utilizando los *primers* ForX (específico del promotor) y LacZ (Tabla IV.1). Las semiflechas coloreadas en azul indican los sitios de pegado de los *primers*.

En la tabla de la derecha se indican los promotores clonados y los nombres de los plásmidos obtenidos. El gel de agarosa 1,5% muestra uno de los productos de PCR obtenido durante el *screening* de los clones recombinantes *pgra-LacZ*. Calles 1 a 4, PCR de orientación: 1, clon 1; 2, clon 2; 3, pCH110 (control negativo); 4, agua. Calles 5 a 7, PCR control: 5, pCH110, 6, Agua; 7, clon 1 (*primers* PieEpap-Up + PieEpap-Dw). Calle 8: marcador de peso molecular (100 pb, PBL).

En una segunda etapa se clonaron las regiones promotoras de los genes *ie-1* de EpapGV y de AgMNPV, respectivamente, delante del gen reportero Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT). Para ello, se utilizó como vector base pCAPCATΔHNΔSE

(Berretta *et al.*, 2006), el cual contiene la región promotora del gen *vp39* de AcMNPV dirigiendo la expresión de CAT. Para la generación de estos plásmidos recombinantes el vector pCAPCAT Δ HN Δ SE (5049 pb), fue digerido con *Pst*I y *Bgl*II, con el fin de eliminar un fragmento de 729 pb que contiene al fragmento *hr5* y al promotor del gen *vp39* de AcMNPV. Las regiones promotoras de EpapGV y de AgMNPV fueron amplificadas utilizando los *primers* detallados en la **Tabla IV.2** y los productos fueron digeridos con las mismas enzimas de restricción *Pst*I y *Bgl*II. La región del vector de interés (4297 pb) y los productos de PCR digeridos, fueron purificados de gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) ligados y transformados en células *E. coli* Top 10 (Invitrogen), obteniendo los plásmidos pieEpap-CAT y pieAg-CAT (**Fig. IV.2**), que contienen las regiones promotoras del gen *ie-1* de EpapGV y de AgMNPV, respectivamente. El correcto clonado de las regiones promotoras fue verificado por secuenciación.

Tabla IV.2: Primers utilizados para la amplificación de las regiones promotoras del gen *ie-1* de EpapGV y AgMNPV.

En negrita e itálica se indica el sitio de corte para la enzima especificada en el nombre del primer.

Nombre	Secuencia	Tm	%GC
pie-1Ag/ <i>Pst</i> I	5' TATAAGATCTGCAGGGTACAATTG 3'	50.2	37.5
pie-1AgRev/ <i>Bgl</i> II	5' CATGAAGATCTATTTATACC 3'	35.5	30
pie-1Ep/ <i>Pst</i> I	5' CATCCTGCAGCCCGCATCAC 3'	60.9	65
pie-1EpRev/ <i>Bgl</i> II	5' CACACTCCATAGATCTTGCTG 3'	46.3	45.5

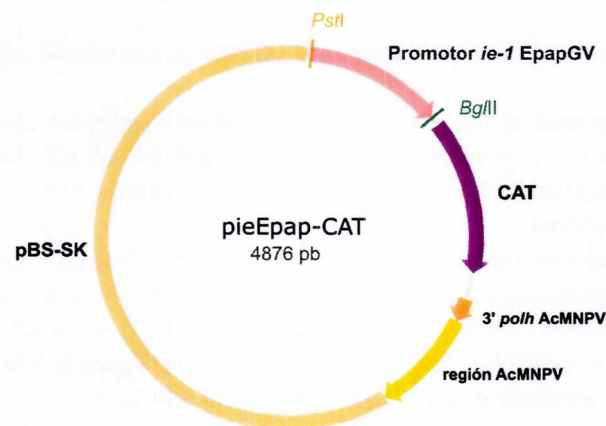


Figura IV.2: Esquema general de los plásmidos recombinantes generados para la evaluación de las regiones promotoras.

La región promotora (flecha rosada) fue clonada *upstream* del gen reportero Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT, flecha morada), entre los sitios *Pst*I y *Bgl*II.

Clonado del marco abierto de lectura del gen *ie-1* de EpapGV y AgMNPV. Los marcos abiertos de lectura (ORF) de los genes *ie-1* de EpapGV y AgMNPV, respectivamente, fueron clonados en el vector pHSEpiHisVI+ (Rapp *et al.*, 1998) bajo el control del promotor de la proteína de *heat shock* 70 (*hp70*) de *Drosophila melanogaster* (Torok y Karch, 1980). Los ORF fueron insertados en fase, a continuación de las secuencias que codifican para un epítotope HA (Field *et al.*, 1988) seguido de seis codones de histidinas (*his tag*). Así se generaron los plásmidos pHIE-Ep y pHIE-Ag, que contienen los ORF de EpapGV y AgMNPV, respectivamente, ver esquema **Fig. IV.3**. Para ello, se amplificaron los ORF de *ie-1* de EpapGV y AgMNPV mediante PCR desde el segundo codón hasta el codón de terminación utilizando como moldes los DNA virales de EpapGV y AgMNPV-2D y *primers* específicos (ver **Tabla IV.3**). Los productos de PCR fueron purificados de gel, digeridos con *Bgl*III y *Not*I y ligados con el vector pHSEpiHisVI+ previamente digerido con las mismas enzimas. Con estos productos de ligación se transformaron *E. coli* Top10 competentes. La secuencia correcta de los ORF fue confirmada por secuenciación.

Tabla IV.3: *Primers* utilizados para amplificar los ORF IE-1 de EpapGV y AgMNPV.

En negrita e *itálica* se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas en el clonado, indicadas en el nombre del *primer*.

Nombre	Secuencia	Tm	% GC
ie-1Ag-Up- <i>Bgl</i> III	5' CACCGACA <i>AGATCT</i> AAACGAATT 3'	52.1	39.1
ie-1Ag-Down- <i>Not</i> I	5' AAAGCTAAAGCGG <i>CCGCTCATATTTG</i> 3'	63.3	46.2
ie-1Ep-Up- <i>Bgl</i> III	5' GTTACAGAG <i>ATCTTTTATGGAGTG</i> 3'	46.6	37.5
ie-1Ep-Down- <i>Not</i> I	5' CCTAAAATAAATTAG <i>CGGCCGCTTATTCAA</i> 3'	63.1	36.7

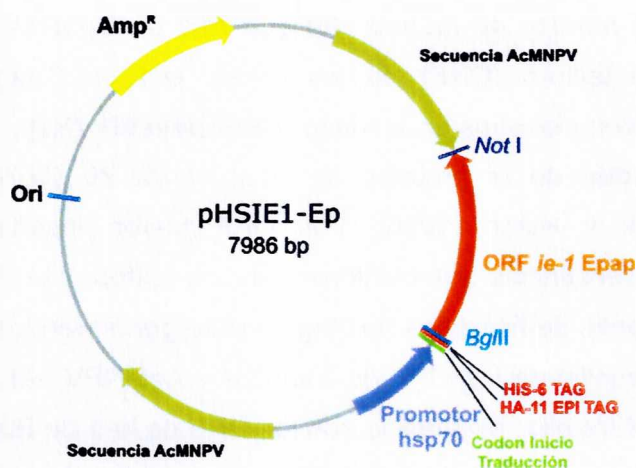


Figura IV.3: Esquema del vector de expresión del ORF IE-1 de EpapGV.

El promotor de *hsp70* (flecha lila) dirige la expresión del ORF IE-1 de EpapGV (flecha naranja) indicado entre los sitios *BglII* (remarcado en celeste) y *NotI* (remarcado en azul). Un tag de 6 histidinas y un epítipo HA (coloreados en rojo) se encuentran en la porción N-terminal del ORF. El plásmido que contiene el ORF IE-1 de AgMNPV tiene la misma estructura.

Células y virus. Las células derivadas de *Spodoptera frugiperda* (SF-9, Vaughn *et al.*, 1977) y derivadas de *Anticarsia gemmatalis* (UFLAG-286, Sieburth y Maruniak, 1988) fueron mantenidas a 27 °C en medio TC-100 (JRH Bioscience) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser) y 50 µg/ml de gentamicina (Parafarm). El virus AgMNPV-2D (Johnson, 1989) fue propagado en monocapa de células UFLAG-286, y cuantificado mediante ensayo de placas siguiendo el protocolo de O'Reilly *et al.* (1992).

Transfecciones. Las células SF-9 y UFLAG-286 fueron sembradas en placas *multiwell* de 48 pocillos con 0.5×10^6 células y transfectadas con 1 µg de DNA utilizando el reactivo de transfección *Insect GeneJuice*[®] (Novagen) siguiendo las especificaciones y recomendaciones del fabricante. Las células fueron mantenidas a 27 °C por 4 h con la mezcla lípidos-DNA y luego la mezcla fue reemplazada con medio TC-100 suplementado con 10% de suero fetal bovino y la incubación a 27 °C se extendió hasta el momento del revelado. Alternativamente, las transfecciones fueron realizadas en placas de 35 mm y transfectadas con 2 µg de DNA.

Todas las transfecciones fueron realizadas al menos tres veces.

Medida de expresión *in situ* de β-galactosidasa (tinción histoquímica con X-Gal).

La medida de la expresión *in situ* de β-galactosidasa se realizó a distintos tiempos pos-transfección, según el ensayo. Para ello, se eliminó el medio sobrenadante de las placas *y/o wells* y se lavó con 1 ml de PBS 1X. Luego, las células se incubaron

durante 5 min a temperatura ambiente con 500 μ l de solución fijadora [formaldehído 2% (v/v), glutaraldehído 0,2% (v/v), en PBS 1X]. A continuación, las células se lavaron 2 veces con 1 ml de PBS y posteriormente, se incubaron con 1 ml de solución de tinción (ferricianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM y X-Gal 1 mg/ml) durante un mínimo de 2 h a 37 °C. Finalmente, las células se observaron al microscopio (Olympus CK2) para detectar aquellas que estaban teñidas y hacer un recuento de las mismas. Se tomaron fotos con la cámara digital Olympus SP-320.

Medición de actividad CAT. Los extractos celulares se obtuvieron 48 h post-transfección. Los volúmenes de soluciones usadas variaron según el tamaño de la placa usada en el ensayo. Lo que se describe corresponde al tratamiento realizado en placas de 35 mm. Las células fueron lavadas tres veces con 500 μ l de PBS. Luego se incubaron las células a temperatura ambiente con 200 μ l de *buffer* de lisis 1X (Promega), con agitación constante. Pasado el tiempo de incubación las células fueron levantadas de la placa y trasvasadas a un tubo *eppendorf* de 1,5 ml. Luego se agitaron con *vortex* durante 30 segundos y se incubaron por 10 min a 60 °C para inactivar la deacetilasa endógena. Se centrifugó por 2 min y se trasvasó el sobrenadante a un tubo limpio, para medir actividad enzimática. La mezcla de reacción contenía: 70 μ l del sobrenadante del extracto celular, 3 μ Ci de [^{14}C] cloranfenicol (50 μ Ci/mmol; Promega Corp.), 5 μ l de n-butil-coenzima A y 47 μ l de agua, en un volumen final de 125 μ l. Las reacciones fueron incubadas a 37 °C durante un mínimo de 3 h. El producto de reacción (cloranfenicol butirilado) fue extraído con 300 μ l de xileno. El sustrato sin reaccionar (cloranfenicol) fue extraído de la fase orgánica con Tris-HCl 0,25 M (pH 8), este paso se repitió dos veces. Posteriormente, se transfirieron 200 μ l de la fase orgánica al tubo de centelleo con 2 ml de líquido de centelleo. La medición fue realizada en un contador WinSpectral 1414 (PerkinElmer).

Infecciones. Las infecciones fueron realizadas siguiendo protocolos estándar (O'Reilly *et al.*, 1992). En los ensayos de transactivación, la monocapa fue infectada a una MOI de 5. Brevemente, se retira el medio sobrenadante de la monocapa celular, se agrega la solución conteniendo virus, se deja adsorber durante 1 h con agitación constante a temperatura ambiente, con el fin de que el virus entre en contacto con todas las células de la monocapa. Pasado el tiempo de incubación, se retira el inóculo viral y se agrega el medio completo.

Resultados

Evaluación de la actividad promotora del gen *ie-1* de EpapGV

El análisis de la secuencia nucleotídica del gen *ie-1* de EpapGV permitió identificar en la región promotora elementos característicos de un promotor temprano (capítulo III), los cuales serían reconocidos por la maquinaria transcripcional de la célula hospedante, permitiendo su expresión sin la necesidad de la participación de factores virales (Blissard *et al.*, 1992). Entonces, para corroborar si la región promotora identificada, puede ser reconocida por factores transcripcionales presentes en la célula hospedante, se generaron plásmidos recombinantes para evaluar la actividad de esta región promotora, los cuales posteriormente se utilizaron en ensayos de expresión transitoria en células UFLAg-286 (derivadas de *A. gemmatalis*) y Sf-9 (derivadas de *S. frugiperda*), dado que no se cuenta con líneas celulares susceptibles a EpapGV.

Los plásmidos utilizados, pieEp-LacZ y pieEp-CAT, contienen los genes indicadores *lacZ* o *CAT*, respectivamente, a continuación de la región de 600 pb *upstream* del sitio de inicio de la traducción del gen *ie-1* de EpapGV.

Para evaluar la actividad del promotor de *ie-1* de EpapGV se utilizaron líneas celulares de insectos en las que este virus no se replica: UFLAg-286 y SF-9. Para ello se transfectaron monocapas de estas células con DNA del plásmido que contiene el ORF del gen indicador *lacZ* bajo el control del promotor *ie-1* de EpapGV. Como control positivo se utilizó otro plásmido con el promotor *ie-1* de AgMNPV (Bilen *et al.*, 2007). A distintos tiempos post-transfección (24, 48 y 72 h) se realizó la detección de la expresión de LacZ mediante ensayos con *X-Gal* (**Fig. IV.4**). Se graficaron los números de células teñidas de azul que se observaron por placa, tomando como 100% el número máximo de células coloreadas observadas a las 48 h en la placa transfectada con el plásmido utilizado como control positivo.

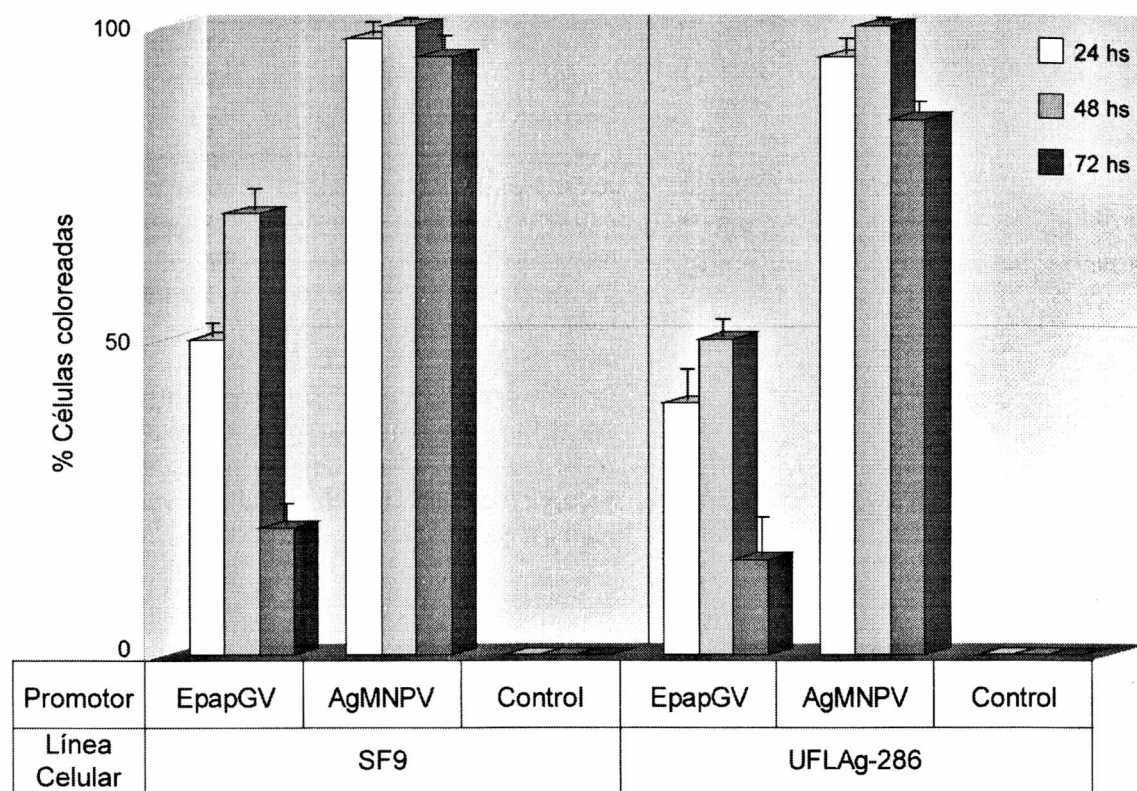


Fig. IV.4: Actividad del promotor del gen *ie-1* de EpapGV y AgMNPV en células SF-9 y UFLAg-286.

EpapGV: promotor del gen *ie-1* de EpapGV fusionado al gen *lacZ*, pieEp-LacZ.

AgMNPV: promotor del gen *ie-1* de AgMNPV fusionado al gen *lacZ*, pIEUp491.

Control Negativo: plásmido pCH110.

Las células fueron transfectadas con las construcciones pieEp-LacZ o pIEUp491 y la expresión de β -galactosidasa fue ensayada *in situ* a 24, 48 y 72 h post-transfección. Se grafica el promedio de 3 ensayos y se indican los valores de 2 desviaciones estándar sobre cada barra.

Los resultados anteriores indican que el promotor *ie-1* de EpapGV es funcional por sí solo en las líneas celulares ensayadas, sin necesidad de la presencia de factores virales, en forma semejante a los resultados obtenidos con promotores del gen *ie-1* de distintos NPV (Bilen *et al.*, 2007; Guarino y Dong, 1991; Theilmann y Stewart, 1991). Sin embargo, el número de células que expresan el gen indicador bajo el control del promotor de *ie-1* de EpapGV, fue superior en la línea celular SF-9 comparado al número de células obtenido en la línea celular UFLAg-286, lo que estaría directamente relacionado con los comportamientos del cultivo al momento de realizar las transfecciones. Asimismo, a las 48 h, se observan más cantidad de células teñidas que a tiempos menores o mayores.

Se obtuvieron resultados similares cuando se realizaron ensayos de transfección de células SF-9 con las construcciones que expresan el gen CAT bajo el control de los promotores *ie-1* de AgMNPV y EpapGV, respectivamente (Fig. IV.5).

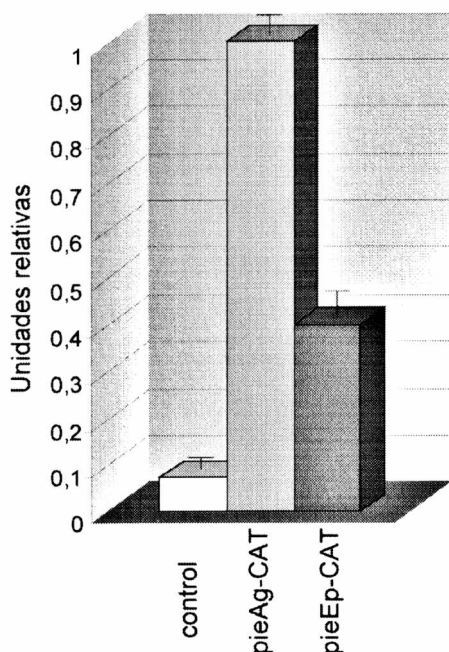


Fig. IV.5: Actividad promotora de *ie-1* de AgMNPV y EpapGV en células SF-9.

Las células SF-9 fueron transfectadas con los plásmidos reporteros pieAg-CAT o pieEp-CAT, que expresan CAT bajo el control del promotor *ie-1* de AgMNPV o EpapGV, respectivamente.

Las células fueron lisadas 48 h post-transfección y se midió actividad CAT de acuerdo a lo descrito en MyM. Control, células no transfectadas. Los datos se grafican como unidades relativas con respecto a las células transfectadas con pieAg-CAT, considerado como 1 unidad relativa. Se grafica el promedio de 4 ensayos y se grafican los valores de 2 desviaciones estándar por encima de cada barra.

Efectos de la transactivación por IE-1 sobre el promotor de *ie-1* en células SF-9

La autorregulación de IE-1 ha sido estudiada en varios NPV (Bilen *et al.*, 2007; Guarino y Summers, 1986; Theilmann y Stewart, 1991). Sin embargo, no existen datos sobre la regulación del gen *ie-1* en GV. Los ensayos descritos en la sección anterior indican que la región promotora de *ie-1* de EpapGV es reconocida por la maquinaria celular. Siguiendo con la caracterización de este gen, se procedió a evaluar si IE-1 de EpapGV posee la capacidad de autorregulación observada en los homólogos de NPV. Para ello, se realizaron ensayos de co-transfección con los plásmidos utilizados en el apartado anterior incorporando, además, los vectores que expresan el ORF IE-1 de EpapGV o de AgMNPV. A su vez, se analizó la transactivación cruzada entre ellos.

Los vectores recombinantes se obtuvieron insertando los ORF IE-1 de EpapGV y de AgMNPV en el plásmido pHSEpiHisVI1 (Rapp *et al.*, 1998). Los ORF fueron ubicados bajo el control del promotor de *hsp70* de *D. melanogaster* en el plásmido pHEpiHisVI1 (ver materiales y métodos). En estas construcciones el promotor *hsp70* asegura la expresión constitutiva del gen clonado a niveles moderados aún cuando las células transfectadas no se sometan a un *shock térmico*.

Las células SF-9 fueron co-transfectadas con el plásmido reportero pieEp-CAT o pieAg-CAT, que contiene CAT bajo el control del promotor de *ie-1* de EpapGV o AgMNPV, respectivamente, sólo o en presencia de los plásmidos que expresan el ORF IE-1 de EpapGV o de AgMNPV, respectivamente (pHIE-Epap o pHIE-Ag). Las

células fueron lisadas 48 h post-transfección y se determinó la actividad CAT. Un esquema del diseño experimental se puede ver en la **Tabla IV.4**.

Tabla IV.4: Esquema experimental de los ensayos de autorregulación de IE-1 sobre el promotor del gen *ie-1*.

pieEp-CAT, contiene la región promotora del gen *ie-1* de EpapGV, pieAg-CAT, contiene la región promotora del gen *ie-1* de AgMNPV, pHSIE-Ep, contiene el ORF IE-1 de EpapGV y pHSIE-Ag, contiene el ORF IE-1 de AgMNPV.

Plásmido	Ensayos						
	1	2	3	4	5	6	7
pieAg-CAT	X	X	X				
pieEp-CAT				X	X	X	
pHSIE-Ag		X				X	
pHSIE-Ep			X		X		
Células							X

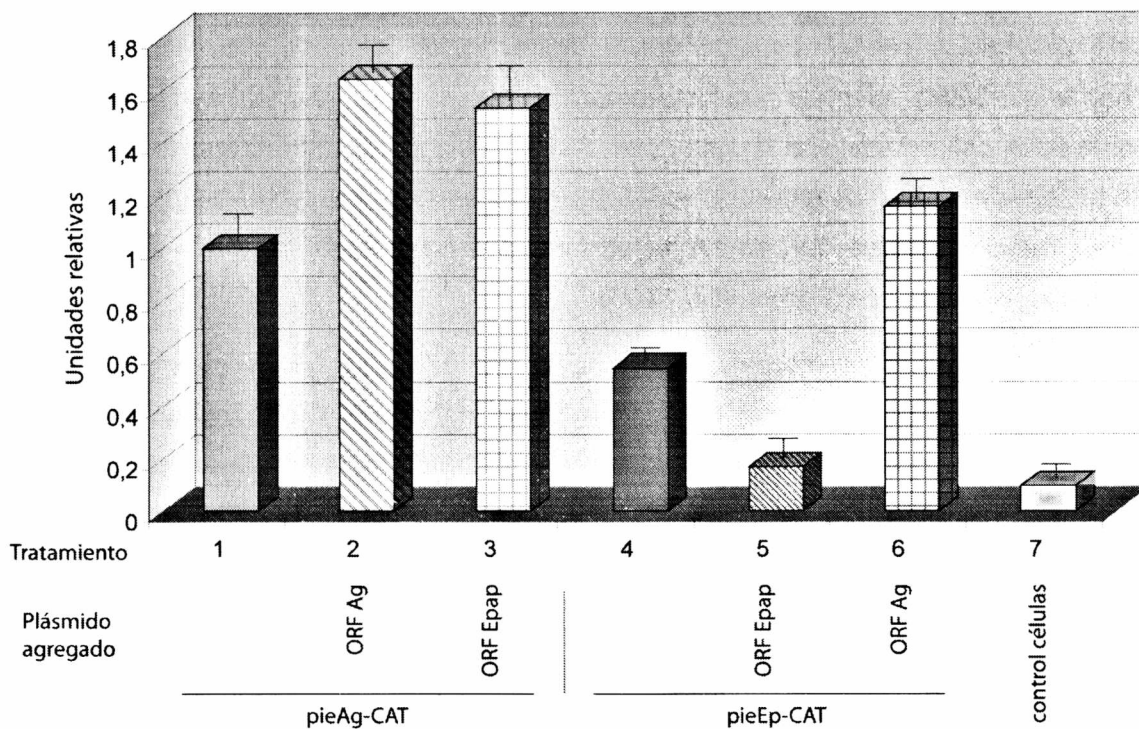


Figura IV.6: Ensayos de autorregulación del ORF IE-1 de AgMNPV y EpapGV sobre promotores de *ie-1*.

Células SF-9 fueron transfectadas con los plásmidos conteniendo las regiones promotoras de los genes *ie-1* (pieAg-CAT o pieEp-CAT, de AgMNPV o EpapGV, respectivamente) solas o con el agregado adicional del DNA plasmídico indicado debajo de cada columna. Las células fueron lisadas a las 48 h post-transfección y se determinó actividad CAT. Los datos se grafican como unidades relativas con respecto a las células transfectadas con pieAg-CAT, considerado como 1 unidad relativa. Se grafica el promedio de 3 ensayos y se indican los valores de 2 desviaciones estándar sobre cada barra.

Cuando se transfectaron las células con las construcciones conteniendo las regiones promotoras, los niveles de actividad CAT fueron similares a los obtenidos en el apartado anterior (**Fig. IV.6**, tratamiento 1 y 4). Al co-transfectar estos plásmidos con los vectores que expresan el ORF IE-1 de AgMNPV, hubo un incremento de la actividad CAT (de casi 2 veces) en ambos casos (**Fig. IV.6**, tratamiento 2 y 6). Resultados similares se obtuvieron con la co-transfección del promotor de AgMNPV y el ORF de EpapGV (**Fig. IV.6**, tratamiento 3). Por el contrario cuando se co-transfectó el promotor de EpapGV con el ORF de EpapGV, no se observó un aumento de la actividad sino una disminución de la misma, con valores que llegan a los niveles *background* (**Fig. IV.6**, tratamiento 5). Estos resultados muestran que el ORF IE-1 de EpapGV regula negativamente su propio promotor en las condiciones del ensayo descritas.

Ensayos de transactivación por AgMNPV

Los promotores tempranos retrasados requieren de proteínas virales, además de la RNA polimerasa celular, para su óptima transcripción (Guarino y Summers, 1986; Shen *et al.*, 2004). Mientras que los promotores tardíos y muy tardíos, son transcritos por la RNA polimerasa viral (Fuchs *et al.*, 1983; Grula *et al.*, 1981; Yang *et al.*, 1991). En los ensayos de transactivación que siguen, se usaron los promotores de los genes *egt* y *granulina* de EpapGV, de expresión temprana retrasada (Manzan *et al.*, 2002) y tardía respectivamente (Parola *et al.*, 2003).

Para evaluar estos promotores, se clonaron las regiones que contienen 600 pb *upstream* del codón de inicio de la traducción controlando la expresión del gen indicador *lacZ*, los cuales se denominaron *pegtEp-LacZ* y *pgra-LacZ*, respectivamente. Asimismo, se realizaron las construcciones correspondientes de AgMNPV para ser utilizadas como control positivo (promotores de *egt* y *poliedrina*, *pegtAg-LacZ* y *ppolh-LacZ*, respectivamente) (ver MyM).

Se estudió la expresión del gen indicador *lacZ* bajo el control de los promotores mencionados en células UFLAg-286, en presencia y en ausencia de infección con AgMNPV. El ensayo consistió en la transfección de estas células con las diferentes construcciones (tiempo 0 h). Para ver la influencia de los productos génicos de AgMNPV sobre la expresión del gen indicador, se realizaron infecciones de estas células a distintos tiempos, antes o después de la transfección (esquema en **Fig. IV. 7**).

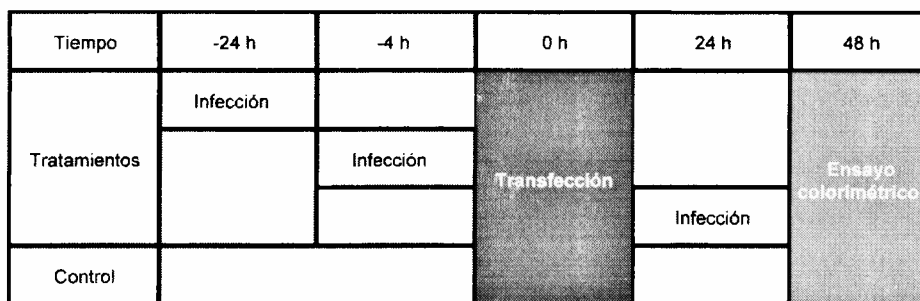


Figura IV.7: Esquema experimental de los ensayos realizados para evaluar transactivación.

Se utilizaron las construcciones que contienen las regiones promotoras de los genes *egt* y *granulina* de EpapGV y las regiones promotoras de los genes *egt* y *poliedrina* de AgMNPV (usados como control positivo), dirigiendo la expresión del gen indicador *lacZ*. La infección se realizó a una MOI de 5 usando el virus AgMNPV-2D. El ensayo colorimétrico se realizó a las 48 h post-transfección.

En todos los casos, la expresión del gen indicador se detectó a las 48 h post-transfección. Se contaron células teñidas con *X-gal* en cada placa y se tomó como 100% el número de células contadas en la placa que se transfectó con plásmido pIEUp491 (que contiene el promotor del gen *ie-1* de AgMNPV) y se infectó con AgMNPV. En ausencia de infección sólo pudo observarse expresión del gen indicador cuando las células fueron transfectadas con el plásmido utilizado como control positivo (**Fig. IV.8**). Mientras tanto no se detectó expresión del gen indicador en las células transfectadas con el resto de las construcciones utilizadas, *pegEp-LacZ*, *pgra-LacZ*, *pegAg-LacZ* y *ppolh-LacZ*.

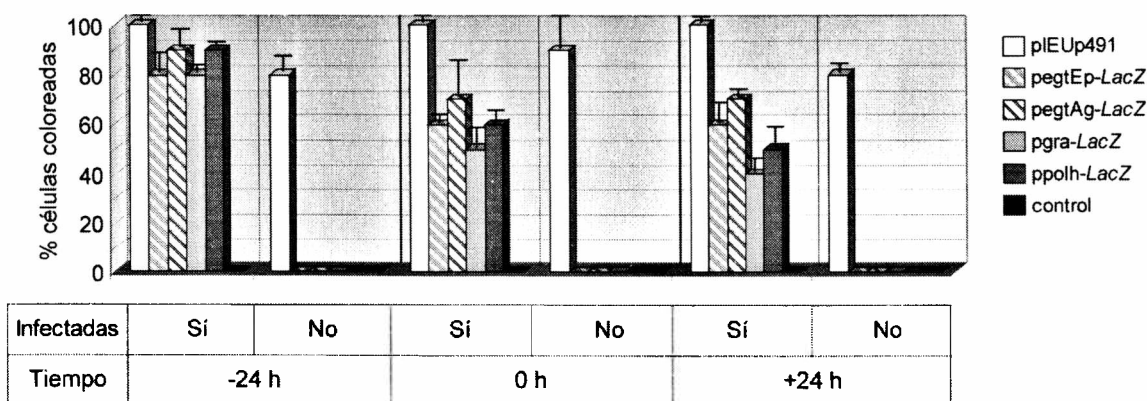


Fig. IV.8: Ensayos de Transactivación:

Expresión de *LacZ* en células UFLAg-286 (infectadas o no, con AgMNPV) transfectadas con los plásmidos reporteros y reveladas a 48 h post-transfección. Los plásmidos reporteros contienen los promotores de *ie-1*, *egt* y *poliedrina* de AgMNPV [pIEUp491 (blanco), *pegAg-LacZ* (fondo blanco rayas gris oscuro) y *ppolh-LacZ* (gris oscuro)] usados como control positivo; o los promotores de *egt* y *granulina* de EpapGV [*pegEp-LacZ* (fondo gris claro rayas blancas) y *pgra-LacZ* (gris claro)]; como control negativo se usó el plásmido base, pCH110 (negro). Se grafica el promedio de 3 ensayos y se grafican los valores de 2 desviaciones estándar sobre cada barra.

Se observó que la infección con AgMNPV, permitió la expresión de *lacZ* tanto bajo el control de promotores de AgMNPV (homólogos) como de EpapGV (heterólogos). Este efecto fue máximo cuando la infección se realizó 24 h antes de la introducción de los plásmidos.

En la **Fig. IV.9** se muestran micrografías de las células correspondientes a uno de los ensayos descritos, en el que se observa que en ausencia de infección solamente se expresa LacZ bajo el control del promotor *ie-1* de AgMNPV y de EpapGV.

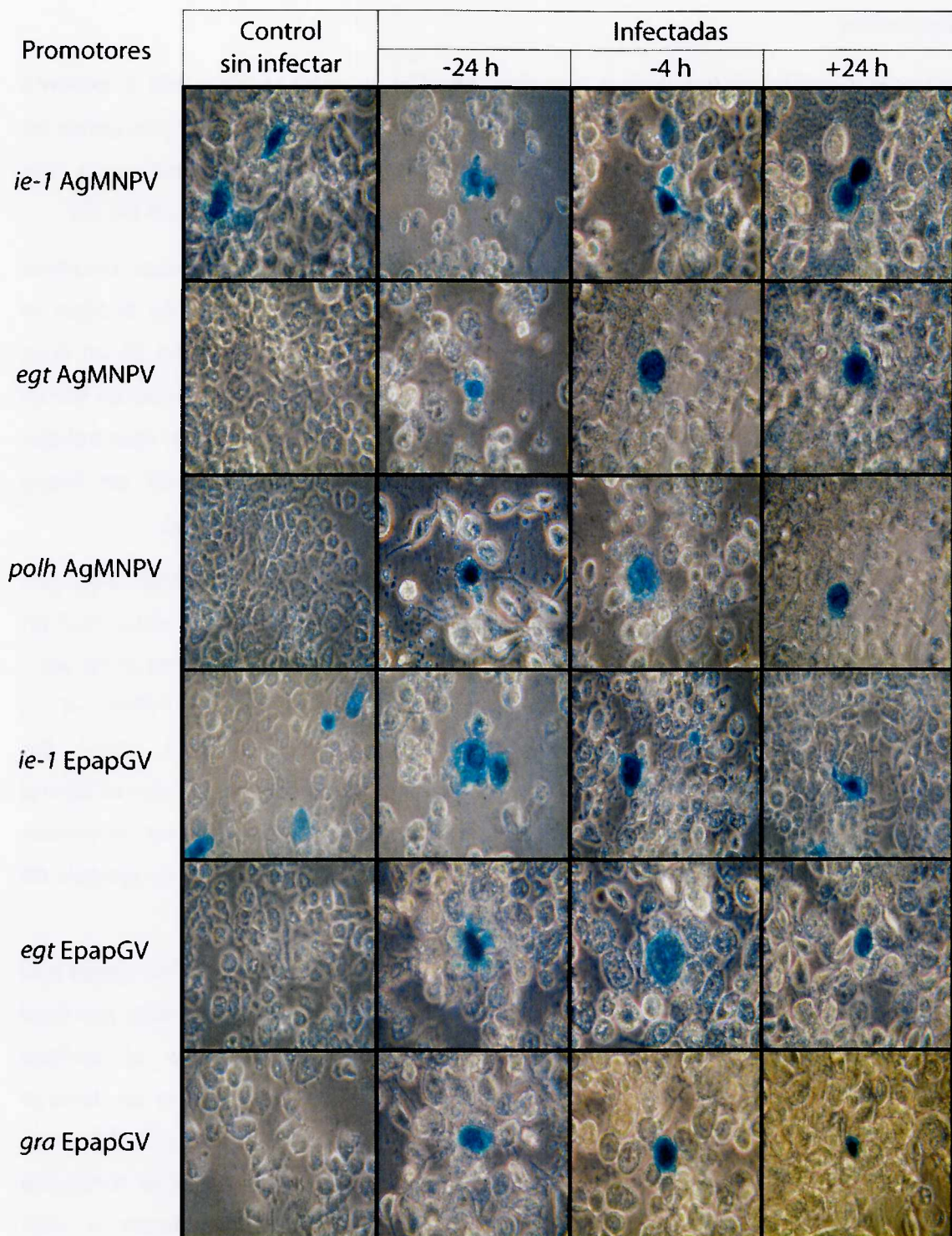


Figura IV.9: ensayo de Transactivación.

In situ tinción X-Gal de células UFLAg-286 transfectadas con las construcciones reporteras que contienen los promotores indicados en la izquierda de la figura e infectadas con AgMNPV-2D a distintos tiempos (-24 h, -4 h y 24 h), tomando como tiempo 0 h, el momento de transfección con las construcciones reporteras. El control negativo de transactivación negativa corresponde a la primera columna de fotos: células no infectadas (ver Fig. IV.8). Las fotos correspondientes al control negativo (pCH110: *LacZ* sin promotores de baculovirus) no se muestran. Fotos 400X.

Discusión

Una gran cantidad de baculovirus han sido aislados, y se ha secuenciado el genoma de más de cuarenta (ICTV, 2008); sin embargo, sólo un pequeño número de genes ha sido caracterizado a nivel funcional. Una de las principales razones de esto es la falta de líneas celulares susceptibles a la infección, principalmente en el caso de los GV.

Como se mencionó en la introducción, cuando no se dispone de líneas celulares permisivas a la infección por el virus de interés, una de las formas de analizar la función y el comportamiento de un gen viral es mediante la construcción de un virus recombinante que exprese el gen heterólogo y evaluar su funcionamiento en líneas celulares susceptibles a la infección por el virus usado como vehículo. En este trabajo, se evaluó el comportamiento de las regiones promotoras de EpapGV en líneas celulares heterólogas utilizando vectores plasmídicos e infecciones virales.

Los experimentos de expresión transitoria demuestran que la región promotora del gen temprano inmediato *ie-1* de EpapGV permite la expresión del gen indicador *lacZ* en ausencia de factores virales propios o heterólogos. En las líneas celulares ensayadas su comportamiento fue similar al demostrado en el caso de varios NPV (Bilen *et al.*, 2007; Carson *et al.*, 1991; Guarino y Summers, 1986; Kovacs *et al.*, 1991). Sin embargo, se observó un menor número de células teñidas, comparado con el control positivo. Estos resultados se repitieron en ensayos realizados con diferentes preparaciones de DNA plasmídico. El estudio presentado aquí es el primer ejemplo de activación del promotor de *ie-1* de un GV en un sistema heterólogo.

Mediante ensayos de co-transfección se demostró que IE-1 de EpapGV no ejerce una modulación positiva sobre su propio promotor. Sin embargo, sí ejerció esta actividad sobre el promotor heterólogo (*ie-1* de AgMNPV). Considerando el análisis bioinformático presentado en el capítulo anterior, en el que se muestra un dominio perteneciente a la superfamilia de transactivadores transcripcionales (TATR) en la región C-terminal, se puede especular que IE-1 de EpapGV podría tener funciones similares a las descritas en NPV (cuyas proteínas IE-1 pertenecen a esta superfamilia) y, en consecuencia, su función se evidenciaría a través de la modulación ejercida sobre el promotor heterólogo de un NPV. La falta de autorregulación positiva puede ser una propiedad diferencial de éste y, eventualmente, otros genes *ie-1* de GV o podría estar asociada al requerimiento de secuencias genómicas de EpapGV no incluidas en los plásmidos contruidos para estos estudios. Otra posibilidad se relaciona con la ausencia de algún factor viral o celular necesario para ejercer una

óptima actividad sobre este promotor, ausente en estos experimentos. La evaluación de estas y otras posibilidades requiere una serie de experimentos adicionales.

Para comenzar a evaluar la transactivación de promotores tempranos retrasados (*egt*) y muy tardíos (*granulina*) de EpapGV, el cultivo de células UFLAg-286 fue infectado a distintos tiempos con AgMNPV y transfectado con las distintas construcciones descritas. Tanto los promotores de *egt*, gen retrasado temprano y tardío (Manzan *et al.*, 2002), como el de *poliedrina* o *granulina*, genes de expresión muy tardía (Parola *et al.*, 2003; Rohel *et al.*, 1983), fueron activados solamente cuando las células fueron infectadas, independientemente del momento de infección. El aspecto más importante de estos resultados es que la transcripción de los genes de EpapGV estudiados puede ser transactivada por factores heterólogos codificados por AgMNPV y/o en el genoma de la célula hospedante, expresados durante el proceso de infección.

Como se observa en la **Fig. IV.4**, pudo detectarse la expresión del gen indicador *lacZ* y el número de células teñidas con *X-Gal* fue similar cuando se usaron promotores "homólogos" (promotores de *egt* o promotores de *granulina* o *poliedrina*), independientemente del origen viral (EpapGV o AgMNPV).

El número de células coloreadas, transfectadas con los plásmidos reporteros conteniendo los promotores de *granulina* o *poliedrina*, en presencia de infección fue disminuyendo a medida que disminuía el tiempo entre la disponibilidad de factores virales y el tiempo de revelado (+24 h de infección). En todos los ensayos, el número de células teñidas fue algo menor cuando se utilizaron los vectores con los promotores de EpapGV en comparación con el número de células teñidas cuando se utilizaron los promotores de AgMNPV. En este caso también podría especularse sobre los requerimientos de diferentes factores de las células hospedantes para la expresión a partir de los promotores de AgMNPV y de EpapGV, respectivamente. Para explicar los diferentes números de células teñidas con *X-Gal*, deberíamos suponer que en cultivos no sincronizados habría diferentes porcentajes de células expresando esos factores (diferentes, al menos en parte, para cada promotor viral particular).

Estos resultados son promisorios y permiten especular sobre la posibilidad de generar virus recombinantes de AgMNPV-EpapGV, con genes de EpapGV expresados bajo el control de sus propios promotores. Eventualmente, algunos de estos recombinantes podrían ser usados para el control biológico simultáneo de *A. gemmatalis* y *Epinotia aporema*.

Referencias

- Berretta, M. F., Deshpande, M., Crouch, E. A. & Passarelli, A. L. (2006). Functional characterization of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus late gene transcription and genome replication factors in the non-permissive insect cell line SF-21. *Virology* **348**, 175-189. Epub 2006 Jan 2024.
- Bilen, M. F., Pilloff, M. G., Belaich, M. N., Da Ros, V. G., Rodrigues, J. C., Ribeiro, B. M., Romanowski, V., Lozano, M. E. & Ghiringhelli, P. D. (2007). Functional and structural characterisation of AgMNPV ie1. *Virus Genes* **35**, 549-562.
- Blissard, G. W., Kogan, P. H., Wei, R. & Rohrmann, G. F. (1992). A synthetic early promoter from a baculovirus: roles of the TATA box and conserved start site CAGT sequence in basal levels of transcription. *Virology* **190**, 783-793.
- Carson, D. D., Summers, M. D. & Guarino, L. A. (1991). Transient expression of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene, IE-N, is regulated by three viral elements. *J Virol* **65**, 945-951.
- Daimon, T., Katsuma, S., Kang, W. K. & Shimada, T. (2007). Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Arch Virol* **152**, 1655-1664. Epub 2007 Jun 1658.
- Field, J., Nikawa, J., Broek, D., MacDonald, B., Rodgers, L., Wilson, I. A., Lerner, R. A. & Wigler, M. (1988). Purification of a RAS-responsive adenyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Mol Cell Biol* **8**, 2159-2165.
- Fuchs, L. Y., Woods, M. S. & Weaver, R. F. (1983). Viral Transcription During *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infection: a Novel RNA Polymerase Induced in Infected *Spodoptera frugiperda* Cells. *J Virol* **48**, 641-646.
- Gruha, M. A., Buller, P. L. & Weaver, R. F. (1981). alpha-Amanitin-Resistant Viral RNA Synthesis in Nuclei Isolated from Nuclear Polyhedrosis Virus-Infected *Heliothis zea* Larvae and *Spodoptera frugiperda* Cells. *J Virol* **38**, 916-921.
- Guarino, L. A. & Dong, W. (1991). Expression of an enhancer-binding protein in insect cells transfected with the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE1 gene. *J Virol* **65**, 3676-3680.
- Guarino, L. A. & Summers, M. D. (1986). Functional mapping of a trans-activating gene required for expression of a baculovirus delayed-early gene. *J Virol* **57**, 563-571.
- Hilton, S., Kemp, E., Keane, G. & Winstanley, D. (2008). A bacmid approach to the genetic manipulation of granuloviruses. *J Virol Methods* **2**, 2.
- Hilton, S. & Winstanley, D. (2007). Identification and functional analysis of the origins of DNA replication in the *Cydia pomonella* granulovirus genome. *J Gen Virol* **88**, 1496-1504.
- ICTV (2008). *Baculoviridae* In <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmctcqi>.
- Inceoglu, A. B., Kamita, S. G. & Hammock, B. D. (2006). Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Adv Virus Res* **68**, 323-360.
- Inceoglu, A. B., Kamita, S. G., Hinton, A. C., Huang, Q., Severson, T. F., Kang, K.-d. & Hammock, B. D. (2001). Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest Management Science* **57**, 981-987.
- Johnson, D. W. a. M., J.E. (1989). Physical map of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV-2) DNA. *J Gen Virol* **70**, 1877-1883.
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E. & O'Reilly, D. R. (1998). Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. *J Gen Virol* **79**, 2283-2292.
- Kovacs, G. R., Guarino, L. A., Graham, B. L. & Summers, M. D. (1991). Identification of spliced baculovirus RNAs expressed late in infection. *Virology* **185**, 633-643.

- Manzan, M. A., Lozano, M. E., Sciocco-Cap, A., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2002).** Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glycosyltransferase gene of *Epipotia aporema* granulovirus. *Virus Genes* **24**, 119-130.
- Miller, D. P., Luque, T., Crook, N. E., Winstanley, D. & O'Reilly, D. R. (2002).** Expression of the *Cydia pomonella* granulovirus iap3 gene. *Arch Virol* **147**, 1221-1236.
- Moscardi, F. (1999).** Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* **44**, 257-289.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. & Luckow, V. A., (1992).** *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Parola, A. D., Sciocco-Cap, A., Glikmann, G. & Romanowski, V. (2003).** An immunochemical method for quantitation of *Epipotia aporema* granulovirus (EpapGV). *J Virol Methods* **112**, 13-21.
- Pfeifer, T. A., Hegedus, D. D., Grigliatti, T. A. & Theilmann, D. A. (1997).** Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin resistance gene for use as a dominant selectable marker in dipteran and lepidopteran insect cell lines. *Gene* **188**, 183-190.
- Rapp, J. C., Wilson, J. A. & Miller, L. K. (1998).** Nineteen baculovirus open reading frames, including LEF-12, support late gene expression. *J Virol* **72**, 10197-10206.
- Rohel, D. Z., Cochran, M. A. & Faulkner, P. (1983).** Characterization of two abundant mRNAs of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus present late in infection. *Virology* **124**, 357-365.
- Shen, X. J., Yi, Y. Z., Tang, S. M., Zhang, Z. F., Li, Y. R. & He, J. L. (2004).** The ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene promoter from *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Z Naturforsch [C]* **59**, 749-754.
- Sieburth, P. J. & Maruniak, J. E. (1988).** Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **24**, 195-198.
- Smith, I. & Goodale, C. (1998).** Sequence and in vivo transcription of *Lacanobia oleracea* granulovirus egt. *J Gen Virol* **79**, 405-413.
- Theilmann, D. A. & Stewart, S. (1991).** Identification and characterization of the IE-1 gene of *Orgyia pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **180**, 492-508.
- Torok, I. & Karch, F. (1980).** Nucleotide sequences of heat shock activated genes in *Drosophila melanogaster*. I. Sequences in the regions of the 5' and 3' ends of the hsp 70 gene in the hybrid plasmid 56H8. *Nucleic Acids Res* **8**, 3105-3123.
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & McCawley, P. (1977).** The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13**, 213-217.
- Winstanley, D. & Crook, N. E. (1993).** Replication of *Cydia pomonella* granulosis virus in cell cultures. *J Gen Virol* **74**, 1599-1609.
- Yang, C. L., Stetler, D. A. & Weaver, R. F. (1991).** Structural comparison of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-induced RNA polymerase and the three nuclear RNA polymerases from the host, *Spodoptera frugiperda*. *Virus Res* **20**, 251-264.

CAPÍTULO V

Desarrollo de un sistema de recombinación para AgMNPV

Resumen

Se desarrolló un vector de transferencia (pI2) para facilitar la inserción de genes en un sitio múltiple de clonado y permitir la generación de baculovirus con fenotipo ocluido (*polh+*), mediante experimentos de cotransfección con el genoma del virus de la poliedrosis múltiple de *Anticarsia gemmatalis*. La expresión de los genes que se insertan en el sitio múltiple de clonado se encuentran bajo el control del promotor de *poliedrina*, mientras que el gen de *poliedrina* se expresa bajo el control de una copia del promotor de *p10*, en un sitio *upstream* y en orientación opuesta al promotor de *poliedrina*. El clonado del gen *egfp* (*enhanced green fluorescent protein*) permitió evaluar la funcionalidad del vector. Se ha generado una serie de virus recombinantes derivados de AgMNPV que expresan genes seleccionados del virus de la granulosis de *Epinotia aporema* (EpapGV).

Por otra parte, se construyó, un vector de transferencia (pR) que permite el clonado de grandes fragmentos de DNA y contiene el gen de la *poliedrina* bajo el control de su propio promotor. En este vector, se clonaron distintos fragmentos del genoma EpapGV. Los plásmidos generados fueron cotransfectados con el virus recombinante AgMNPV-I-Ppo I en células derivadas de *A. gemmatalis* (UFLAg-286) y se pudieron identificar cuatro baculovirus recombinantes, que incluyen distintos fragmentos del genoma de EpapGV.

Introducción

Los baculovirus son virus de insectos, utilizados como vectores de expresión de proteínas heterólogas (Jordan *et al.*, 2008; Kawaoka *et al.*, 2007) y como agentes de control biológico (Moscardi, 1999). El virus prototipo de la familia *Baculoviridae*, virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV), se ha usado como modelo del ciclo de replicación de la familia y como base para el desarrollo de sistemas de expresión de genes en células de insecto. Sin embargo, el desarrollo de sistemas de clonado y expresión basados en otros virus, es de gran importancia, para el desarrollo de baculovirus mejorados en su condición de agentes de control de plagas, tal es el caso del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV).

En la naturaleza, el proceso de infección comienza cuando un hospedante susceptible consume los cuerpos de oclusión (OB), presentes en la vegetación contaminada, producto de un ciclo de infección previo. Estos se disuelven en contacto con los fluidos alcalinos en el lumen del intestino de la larva (pH 9-11), liberando los viriones, los cuales posteriormente entran a las células del intestino. En la mayoría de los casos, los virus se replican en estas células y la progenie viral emerge a través de la lámina basal hacia el hemocele en forma de virus brotantes (BV). Los BV son los encargados de infectar el resto de los tejidos (Federici, 1997). En principio, cualquier paso del ciclo de infección puede ser interrumpido dentro del insecto, a nivel celular o a nivel de tejido o por la actividad de factores del sistema inmune del hospedante. Si bien se han realizado varios estudios con el fin de determinar cuáles son los determinantes genéticos que permiten ampliar el rango de hospedantes (Birnbaum *et al.*, 1994; Katou *et al.*, 2006; Lu y Miller, 1995; McCarthy *et al.*, 2008; Thiem *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2008), no se ha podido establecer un esquema válido para todas las especies. Cabe destacar, que la disponibilidad de líneas celulares y el desarrollo de bácmidos replicables en bacterias han facilitado estos estudios.

Si bien, el esquema del ciclo de infección descrito previamente, representa los procesos correspondientes a ambos géneros de la familia *Baculoviridae*, *Granulovirus* y *Nucleopolyhedrovirus* ((Slack y Arif, 2007), el análisis de las secuencias genómicas disponibles ha permitido identificar que sólo una pequeña proporción de genes se encuentran conservados entre sus genomas (Jehle *et al.*, 2006).

Los estudios descritos en el capítulo II han permitido corroborar que en la administración conjunta de AgMNPV y EpapGV a larvas de *A. gemmatalis* se produce una disminución del tiempo letal medio, y se ha determinado que es el agregado de

EpapGV lo que provoca este efecto, pero no existen evidencias de ingreso de EpapGV a las células de *A. gemmatalis*. Por otra parte, AgMNPV tampoco es capaz de infectar a *E. aporema*.

En ensayos de expresión transitoria en cultivos celulares, se ha observado que la infección por AgMNPV permite la expresión de un gen indicador que se encuentra bajo el control de promotores de EpapGV, correspondientes a genes que se expresan en distintas etapas del ciclo infectivo (ver capítulo IV).

Dentro del marco planteado, y considerando que se dispone de las herramientas para modificar el genoma de AgMNPV, resultaría interesante generar virus recombinantes apuntando a dos objetivos: aumentar su efectividad contra el hospedante natural y extender su rango de hospedantes hacia *E. aporema*.

En este capítulo, se describe el desarrollo de un sistema de expresión basado en AgMNPV, la construcción de una serie de virus recombinantes de AgMNPV que expresan un gen marcador (*egfp*) y una serie de genes de EpapGV bajo el control del promotor de *poliedrina*. Asimismo, se generaron recombinantes con fragmentos del genoma de EpapGV.

Materiales y métodos

Construcción del vector de transferencia pl2. La construcción del vector de transferencia pl2 se resume en la **Fig. V.1**. La región 1 fue obtenida mediante SOE PCR (Horton *et al.*, 1989). La región que contiene los promotores de *poliedrina* y *p10* dispuestos en orientación opuesta (región A) fue obtenida mediante PCR utilizando como molde el plásmido pIERUPOD-p10 (McCarthy, 2005) y los *primers* Lpr10-SgfI 5' **GCCCCGCGATCGCGACGATATTGAAATGGTTGAAATAAATATAC** 3' (en negrita se indica el sitio de corte de la enzima SgfI) y Ppolhf-Plac 5' **TCCAGT**AGTTATAGCAAATTTTACTACAAAG 3' (en itálica, subrayado y fondo gris se indica la región de homología con el promotor de *lacZ*). La región que abarca el marcador de selección y el sitio múltiple de clonado (región B) fue obtenido mediante PCR utilizando como molde el plásmido pZErO™-2 (Invitrogen) y los *primers* PLacZi 5' **ATAACT**ACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAA 3' y CcdBf/SV40-XmaI 5' **GTGGTGGCCCGGG**CGCCATTCAGGCCTGACA 3'. Los fragmentos de DNA generados por PCR (región A y región B) fueron utilizados directamente en la siguiente reacción de amplificación por solapamiento. Se realizó una primera reacción de PCR sin *primers*. La mezcla de reacción consistió de 1 µl de cada producto de PCR, utilizado como molde, 1 µl de *buffer* Taq (PBL), dNTPs, MgCl₂ 1.5 mM, H₂O y Taq en un volumen final de 10 µl. La segunda reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 µl a la cual se le agregaron los *primers* externos Lpr10-SgfI y CcdBf/SV40-XmaI y el resto de los reactivos a concentraciones adecuadas. El producto obtenido de 1.2 kb (fragmento 1) fue purificado de gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) y clonado en pGEMT-easy (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante generando el plásmido pG-1.2.

La región 2 fue amplificada por PCR (molde pIERUPOD-p10) usando como *primers* Polhi-SgfI 5' AAATTT**GCGATCGCT**ATGCCAGATTATACG 3' y SV40/CcdB-XmaI 5' ATGGACCAC**CCCGGGT**TCTGTAGCGGCCGCG 3'. El fragmento obtenido de 4.5 kb fue purificado de gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen) y clonado en pGEMT-easy (Promega) según instrucciones del fabricante generando el plásmido pG-4.5.

Los plásmidos pG-1.2 y pG-4.5 fueron digeridos con SgfI y XmaI, los fragmentos 1 y 2 liberados fueron purificados de gel, ligados y la mezcla de ligación utilizada para transformar la cepa *E. coli* DB3.1™ (Invitrogen). Estas células tienen el alelo *gyrA462* que convierten a la cepa resistente a los efectos tóxicos del gen *ccdB* (Bernard y Couturier, 1992). El plásmido resultante fue denominado pl2 y su estructura fue determinada por PCR, análisis de restricción y secuenciación.

Clonado de genes. Con el fin de evaluar la funcionalidad del vector de transferencia generado se le insertó el gen que codifica para la proteína fluorescente verde EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). El ORF de EGFP fue obtenido mediante PCR utilizando como molde el plásmido peGFP-N3 (Clontech) y los *primers* eGFP/Up-*EcoRI* 5' TCCATCGAATTCATGGTGAGCAAGGGC 3' y eGFP/Down-*XhoI* 5' CTGATAAGCTTCTCGAGTCGCGGCCG 3' (en negrita se indican los sitios de restricción). El producto obtenido fue purificado de gel (PureLink Quick Gel Extraction Kit, Invitrogen), digerido con *EcoRI* y *XhoI* y ligado al vector pI2, previamente linealizado con *EcoRI* y *XhoI*. Este plásmido fue designado pI2-*egfp* y utilizado en los experimentos de recombinación homóloga.

Se han construido una serie de clones de pI2-X conteniendo distintos ORF de EpapGV. Los ORF de EpapGV fueron amplificados mediante PCR utilizando como molde DNA viral de EpapGV y *primers* específicos detallados en la **Tabla V.1**. Los productos de PCR fueron aislados de gel y digeridos con las enzimas correspondientes directamente, excepto *gp37* que fue previamente clonado en pGEMT-easy (Promega). Los productos de digestión fueron clonados en pI2, previamente digerido con las mismas enzimas. Los plásmidos obtenidos fueron: pI2-*gp37*, pI2-*efp* y pI2-*chiA*, los cuales contienen los ORF de los genes *gp37*, *efp* y *chiA* de EpapGV, respectivamente. La estructura de los mismos fue corroborada por análisis de restricción y secuenciación.

Tabla V.1: Primers utilizados para amplificar el ORF del gen indicador *egfp*, y para amplificar los ORF de EFP, GP37 y CHIA de EpapGV. En negrita se indican los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas para el clonado, indicadas en el nombre del *primer*. El tamaño del fragmento amplificado se indica a la derecha de la tabla.

Nombre	Secuencia	Tm	%GC	Producto amplificado
<i>egfp</i> -Up- <i>EcoRI</i>	5' TCCATCGAATTCATGGTGAGCAAGGGC 3'	68	51.9	760 pb
<i>egfp</i> -Down- <i>HindIII/XhoI</i>	5' CTGATAAGCTTCTCGAGTCGCGGCCG 3'	68.1	61.5	
<i>efp</i> Ep-Up- <i>HindIII</i>	5' AATTAAGCTTGCACAATGTTGTTAC 3'	49.7	24	1594 pb
<i>efp</i> Ep-Down- <i>XhoI</i>	5' TAACAGACCCCTCGAGAAATC 3'	45.8	45	
<i>gp37</i> Ep-Up- <i>EcoRI</i>	5' GGAATTCAGATATGATAGTACTGATAATATTG 3'	55.4	30.3	689 pb
<i>gp37</i> Ep-Down- <i>PstI</i>	5' AACTGCAGTAAAACCTCGTCATTTTGT 3'	56	33.3	
<i>chiA</i> -Up- <i>KpnI</i>	5' TGGTACCGTATGAACTAGCAATTGTGTC 3'	59.6	41.4	1731 pb
<i>chiA</i> -Down- <i>XhoI</i>	5' GGCTCGAGGCTATCCTTTACAGAACGCGTCAAGTCC 3'	63.9	55.6	

Generación del vector de transferencia pR. El vector pAgPHRA1EH-*ccdB16A* (6530 pb, Amp^R), fue digerido con *EcoRI* con el fin de eliminar la secuencia Int-*ccdB* de 400 pb. El producto de digestión fue sembrado en un gel de agarosa 0,8%, el fragmento de interés de 6,1 kb fue purificado de gel utilizando el procedimiento de extracción con lana de vidrio, religado y transformado en bacterias *E. coli* DB3.1TM (Invitrogen).

Para corroborar la integridad del vector se procedió a su análisis por digestión con la enzima *Xho*I y secuenciación.

Clonado de fragmentos de DNA de EpapGV de gran tamaño en el vector pR.

Como material de partida se utilizaron los plásmidos de la biblioteca *Eco*RI de EpapGV (Manzán, 2002) realizada en pZErO™-2 (Kan^R, Invitrogen). El vector de transferencia pR y los distintos clones de la biblioteca fueron digeridos con la enzima *Eco*RI y los productos obtenidos fueron ligados en *bulk* y transformados en bacterias *E. coli* Top 10 (Invitrogen). Se seleccionaron los clones de interés mediante estrías en placas de ampicilina y kanamicina. Los plásmidos recombinantes positivos (Kan^S-Amp^R) fueron analizados mediante PCR y digestión enzimática.

Células y virus. Las células derivadas de *Anticarsia gemmatalis* (UFLAG-286, Sieburth y Maruniak, 1988) fueron mantenidas a 27 °C en medio TC-100 (JRH Bioscience) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser) y 50 µg/ml de gentamicina (Parafarm). El virus AgMNPV-*I-Ppol* (McCarthy, 2005) fue propagado en monocapa de células UFLAG-286, y cuantificado mediante ensayo de placas siguiendo el protocolo de O'Reilly (1992).

Purificación de DNA viral a pequeña escala. Los BV se aislaron a partir del sobrenadante del cultivo de células infectadas. El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 1000 x g a 4 °C durante 5 min. La precipitación de los viriones se realizó centrifugando 1,5 ml de este sobrenadante a 14-18000 X g y 4 °C durante 30 min en un tubo *ependorf*. Luego se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces en el mismo tubo. El *pellet* de viriones se resuspendió delicadamente en *buffer* de lisis [Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM; EDTA 10 mM; SDS 0,25%], se agregó proteinasa K (500 µg/ml) y se incubó a 60 °C durante un mínimo de 2 h. Se realizaron tres extracciones sucesivas (fenol/ fenol-cloroformo-isoamílico/ cloroformo-isoamílico) agregando 500 µl de solvente orgánico en cada caso. Se llevó la fase acuosa a una concentración final de 0,2 M NaCl, se agregó 500 µl de isopropanol para precipitar y posteriormente se lavó el *pellet* con 500 µl de etanol 70%, se centrifugó a 14000 rpm a 4 °C por 30 min. El *pellet* se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril.

Digestión del DNA viral con la enzima *I-Ppol*. Para la reacción de digestión del DNA viral AgMNPV-*I-Ppol*, se siguió el protocolo propuesto por McCarthy (2005). En el cual se utiliza *buffer* E (Promega) en lugar del *buffer* recomendado por el fabricante. Las

condiciones de incubación y cantidad de enzima que se usaron fueron las recomendadas por el proveedor.

Obtención de virus recombinantes. Se sembraron 1×10^6 células UFLAg-286 sobre placas de 35 mm y se incubaron ON a 27 °C para favorecer su adhesión a la superficie. Las células fueron cotransfectadas con una mezcla de 500 ng de DNA genómico de AgMNPV-I-*Ppol* linealizado y 1 µg del plásmido de transferencia correspondiente, se usaron los lípidos InsectGeneJuice (Novagen) siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones. Brevemente, los DNA viral y plasmídico fueron diluidos en 100 µl de TC-100 libre de suero (solución A), 2 µl del reactivo de transfección fue diluido en 100 µl de TC-100 libre de suero (solución B), la solución B fue agregada gota a gota a la solución A y esta mezcla incubada a temperatura ambiente por 45 min. Pasado este tiempo se agregaron 800 µl de TC-100 libre de suero. La mezcla final fue agregada a la monocapa celular, previamente lavada dos veces con PBS 1X, e incubada por 4 h a 27 °C. Luego de este tiempo, se agregaron 2 ml de TC-100 suplementado con 10% de suero. Luego de seis días, se recolectó el medio sobrenadante, conteniendo la progenie viral. Los virus recombinantes fueron purificados mediante ensayos de placa sucesivos (O'Reilly *et al.*, 1992). La detección de los virus recombinantes fue monitoreada por la formación de placas blancas y la aparición de poliedros luego del agregado de 500 µg/ml de X-Gal por placa.

Los virus recombinantes potenciales fueron monitoreados mediante PCR, siguiendo las consideraciones descritas por McCarthy (2008).

Extracción de DNA total. Las larvas recolectadas fueron maceradas en baño hielo-agua, esta mezcla se filtró a través de una gasa colocada en un tubo *ependorf* de 0.5 ml perforado en su base. El filtrado fue tratado con Na_2CO_3 a concentración final de 0,1 M durante 30 min, se neutralizó la solución mediante agregado de Tris-HCl (pH 6.2). Las muestras fueron hervidas por 5 min y se utilizó 1 µl de esta solución para la reacción de PCR.

PCR. La presencia del DNA viral recombinante en larvas infectadas con poliedros obtenidos de cultivo celular fue determinada mediante PCR (Sambrook, 1989) utilizando *primers* específicos (**Tabla V.2**) que detectan la presencia del virus parental (rAgMNPV/I-*Ppol*), la zona de recombinación *downstream*, descriptos previamente (McCarthy, 2005) y el gen de interés (**Tabla V.1**). Los productos de amplificación

fueron analizados en geles de agarosa 1,5% y visualizados bajo luz UV mediante tinción con Bromuro de etidio.

Tabla V.2: Primers utilizados para la detección de virus recombinantes (rAgMNPV).

Los sitios de pegado de los *primers* se esquematizan en la Fig. V.1. El par de *primers* 17d-5 y 17d-3 fue utilizado para detectar el fragmento H de la biblioteca *EcoRI* de EpaGV.

Nombre	Secuencia	Producto amplificado
LB	5' GATCGCTACCTTAAGAGAG 3'	198 pb
phnBack	5' CTCCTCTGGAGCTGTA 3'	
Udw-Spe	5' GCGTATTAAGTAGTGGCGCCGACAAATCGTTGGT 3'	517 pb
Ldw-Bgl	5' GGAAAGATCTATACACACGTTAGGCGAGCGCCG 3'	
17d-5	5' TCTCGAACTCACGCAGAG 3'	178 pb
17d-3	5' CCTCTGAACTTATAAGGGT 3'	

Resultados

Construcción del vector de transferencia pl2

El vector de transferencia pl2, permite el clonado de genes seleccionados para su expresión bajo el control del promotor de *poliedrina* y *poliedrina* bajo el control del promotor de *p10*. Estas características permiten generar virus recombinantes de AgMNPV con la capacidad de generar poliedros. La construcción del vector pl2 se realizó en cuatro etapas, que incluyen: obtención del fragmento 1 mediante SOE PCR (Horton, 1989), obtención del fragmento 2 mediante PCR, clonado de ambos fragmentos en pGEMT-easy (Promega), liberación de los fragmentos 1 y 2 de pGEMT-easy mediante corte con enzimas de restricción específicas, purificación de los fragmentos y ligación de los mismos para obtener la construcción final (**Fig. V.1**).

Para generar el fragmento 1 se utilizaron como molde en las reacciones de PCR los plásmidos p1ERUPOD-p10 (región A) (McCarthy, 2005) y pZErO™-2 (región B) (Invitrogen). La región A, de 364 pb, aportó los promotores de *poliedrina* y *p10* dispuestos en orientación opuesta, y la región B, de 833 pb, el marcador de selección y sitio múltiple de clonado (ver región derecha de la **Fig. V.1**). Los *primers* que finalmente se usaron para generar el fragmento 1 de 1185 pb, tienen sitios de restricción específicos en los extremos. Los *primers* internos fueron diseñados de forma tal que los fragmentos A y B posean una región de solapamiento. Esta característica es la que permite finalmente amplificar la región entera, de 1185 pb, en una reacción de PCR (SOE-PCR).

El fragmento 2, de 4496 pb, fue obtenido mediante PCR a partir de *primers* diseñados específicamente con los mismos sitios de restricción que tiene en sus extremos el fragmento 1. Se amplificó una región del plásmido p1ERUPOD-p10, que abarca el ORF de *poliedrina*, la señal de poliadenilación de SV40 (polyA) y las zonas de recombinación *upstream* y *downstream* del gen de *poliedrina*. Los fragmentos 1 y 2 fueron clonados en pGEMT-easy (Promega), generando los plásmidos pG-4.5 y pG-1.2 (estas construcciones no se muestran en la **Fig. V.1**). Posteriormente, los fragmentos fueron liberados de pG-4.5 y pG-1.2 por digestión con *XmaI* y *SgfI*, purificados de gel y ligados. El vector de transferencia obtenido se denominó pl2, su estructura fue confirmada por PCR, digestión enzimática (ver **Fig. V.2**) y, posteriormente, secuenciación.

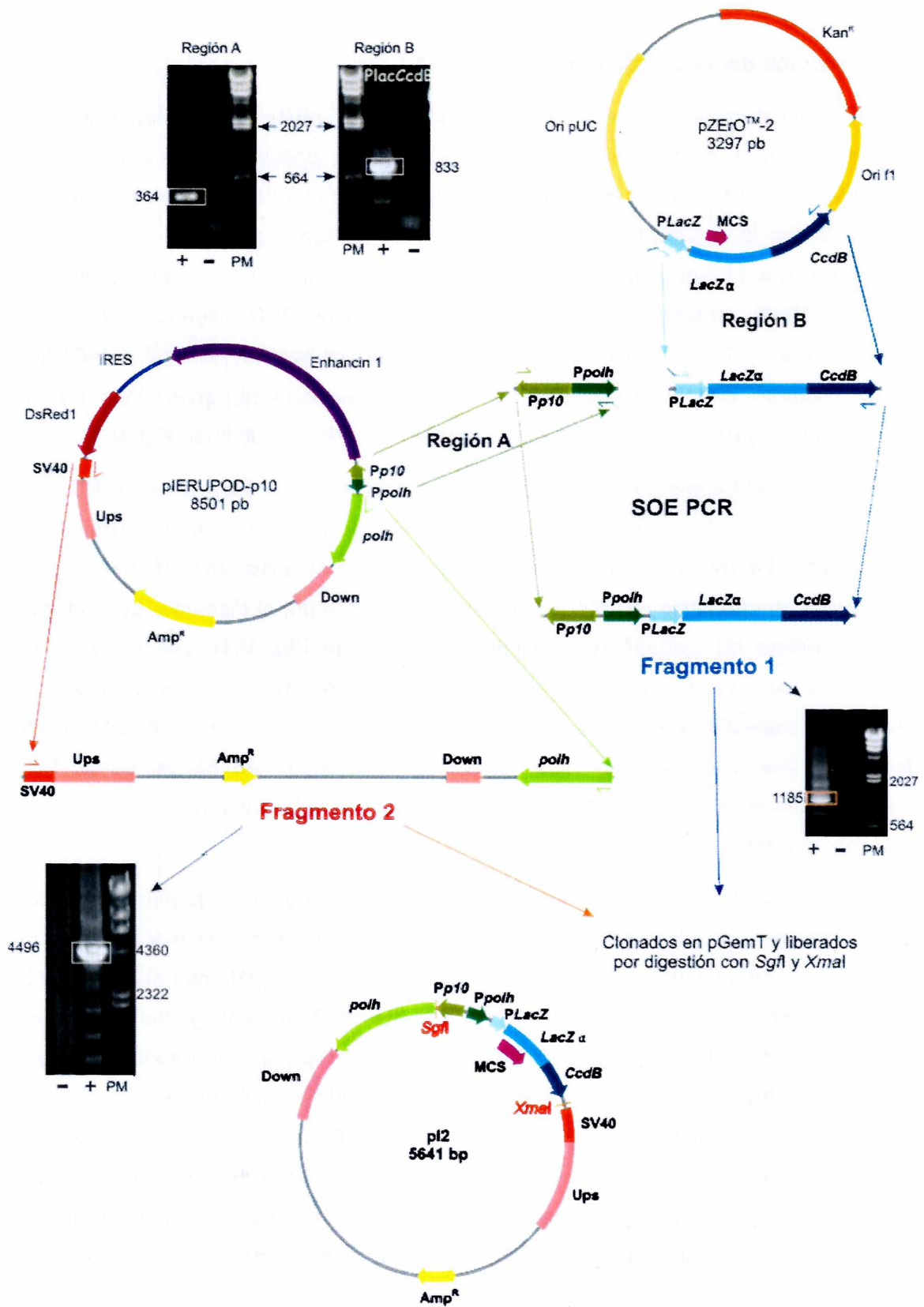


Figura V.1: Estrategia de construcción del vector de transferencia pI2. [Ver la leyenda en la siguiente página].

Sitio Múltiple de Clonado (MCS) y región de pegado de *primers* universales, en pl2:

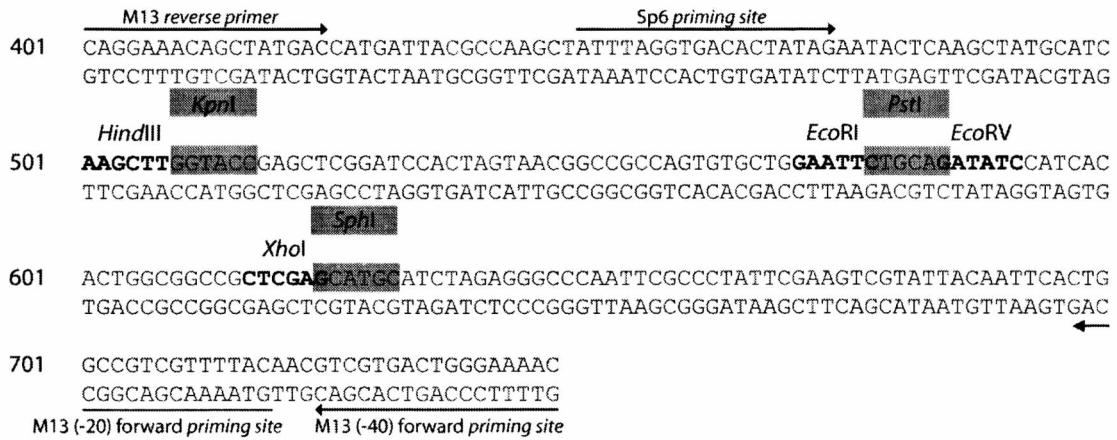


Figura V.1: continuación.

El fragmento 1 de 1185 pb fue obtenido mediante SOE-PCR (Horton, 1989), mediante unión de la región A y B. La región A, de 364 pb fue obtenida por PCR a partir del vector pIERUPOD-p10, la región B de 833 pb, fue obtenida por PCR a partir del vector pZErOTM-2. Los *primers* utilizados en cada PCR se indican con semiflechas de distintos colores, los nombres y secuencias se especifican en la **Tabla V.1** y MyM.

El fragmento 2 de 4496 pb, fue obtenido por PCR a partir del vector pIERUPOD-p10. Ambos fragmentos fueron clonados en pGEMT-easy y liberados por digestión con *SgfI* y *XmaI*. Los fragmentos fueron ligados y transformados en bacterias DB3.1, obteniéndose el vector pl2, de 5641 pb.

Las PCR confirmatorias de cada etapa se encuentran incluidas en la figura. Control positivo: + (molde correspondiente), control negativo: agua y PM: marcador de peso molecular. Los tamaños de los fragmentos amplificados están recuadrados en blanco y el tamaño de algunos fragmentos del marcador de PM (*λHindIII*, PBL) se indica al lado del mismo.

En esta página, se muestra la secuencia del **sitio múltiple de clonado** en el cual se indica con negrita o sombreado en gris el sitio de corte de las enzimas de restricción. Las regiones de pegado de los *primers* universales Sp6 y M13 se indican con flechas por encima y por debajo de la secuencia.

En la **Fig. V.2 A** y **B**, se muestra el patrón de restricción de pl2 obtenido con distintas enzimas de restricción. La presencia de distintos sitios de restricción en el MCS se verificó por linealización del plásmido luego de la digestión con enzimas de restricción seleccionadas (**Fig. V.2 C**). El fragmento adicional que aparece en la calle 3 de la **Fig. V.2.C** se debe a la actividad estrella que presenta la enzima *EcoRI*, cuando la digestión se prolonga por más tiempo de lo habitual. Se realizó una digestión en menor tiempo, y se corroboró que la enzima linealiza al plásmido, de acuerdo a lo esperado (no se muestra). La secuencia del sitio múltiple fue confirmada además mediante secuenciación con los *primers* universales M13 (ver región de pegado en la segunda parte de la **Fig. V.1**). El patrón de restricción y, posteriormente, la secuenciación del vector pl2 generados permitieron confirmar la estructura del mismo.

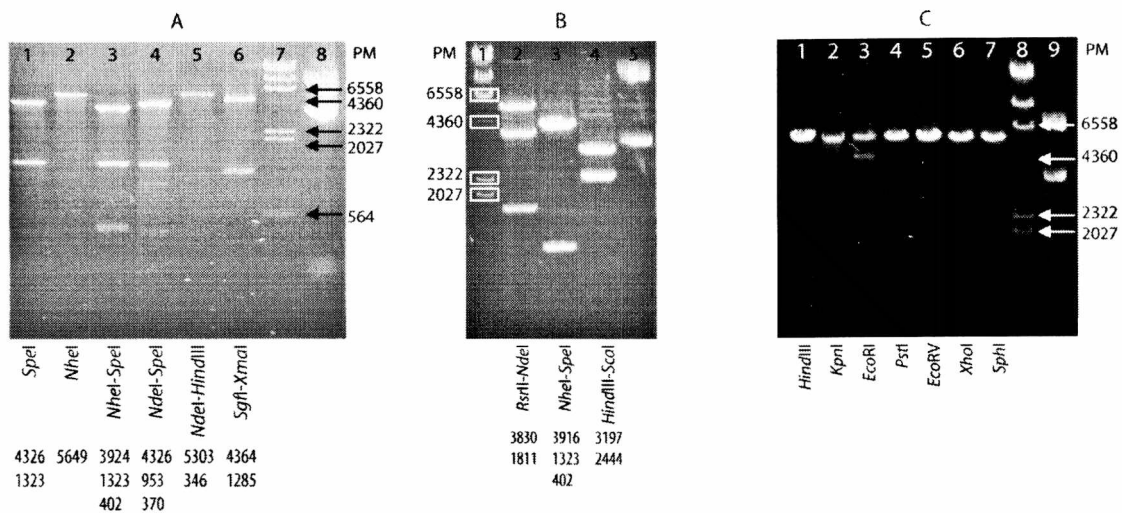


Figura V.2: Patrón de restricción del vector pI2.

Gel A: Calles 1 a 6, digestiones del vector pI2 con las enzimas de restricción indicadas al pie del gel. Los tamaños de los fragmentos de restricción están indicados luego de las enzimas. Calle 7 marcador de PM (λ HindIII, PBL), calle 8 miniprep de pI2 sin digerir.

Gel B: Calle 1 marcador de PM (λ HindIII, PBL), calles 2 a 4, digestiones del vector pI2 con las enzimas de restricción indicadas debajo del gel. Los tamaños de los productos de digestión se indican debajo de éstas. Calle 5 miniprep de pI2 sin digerir.

Gel C: Digestión del sitio múltiple de clonado. Calles 1 a 7, digestiones del MCS con las enzimas de restricción que lo conforman, indicadas debajo del gel, calle 8 marcador de PM (λ HindIII, PBL) y calle 9 miniprep pI2 sin digerir.

Algunos de los fragmentos que forman el marcador de PM se indican a un costado del gel, las bandas se señalan con flechas o están recuadradas. El fragmento de 402 pb de la digestión con *NheI-SpeI*, en el gel B, no se observa debido al tiempo de corrida del mismo, la banda eluyó. Sin embargo la banda de 402 pb puede observarse en la calle 3 del gel A.

Se eligió este sistema de selección positiva para simplificar la construcción de vectores recombinantes, dado que elimina el *background* de plásmidos sin insertos. El sistema está compuesto por la porción *lacZ* α del gen *lacZ* fusionado al gen letal *ccdB* bajo la regulación del promotor *lacZ*. El CcdB es un potente inhibidor de la DNA girasa bacteriana e induce la introducción de cortes en el DNA bacteriano, provocando la muerte celular (Bahassi *et al.*, 1999). El sistema está diseñado para que cualquier modificación que interrumpa el marco de lectura impida la expresión del gen letal *ccdB*.

Evaluación del vector de transferencia

Para investigar el potencial y evaluar la funcionalidad del vector pI2, se ensayó el sistema para generar un virus recombinante de AgMNPV que expresa la proteína fluorescente verde EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). El gen *egfp* fue

insertado en forma direccionada en los sitios *EcoRI*/*XhoI* del MCS de pI2 bajo el control del promotor de *poliedrina*, generando el vector pI2-*egfp* (Fig. V.3).

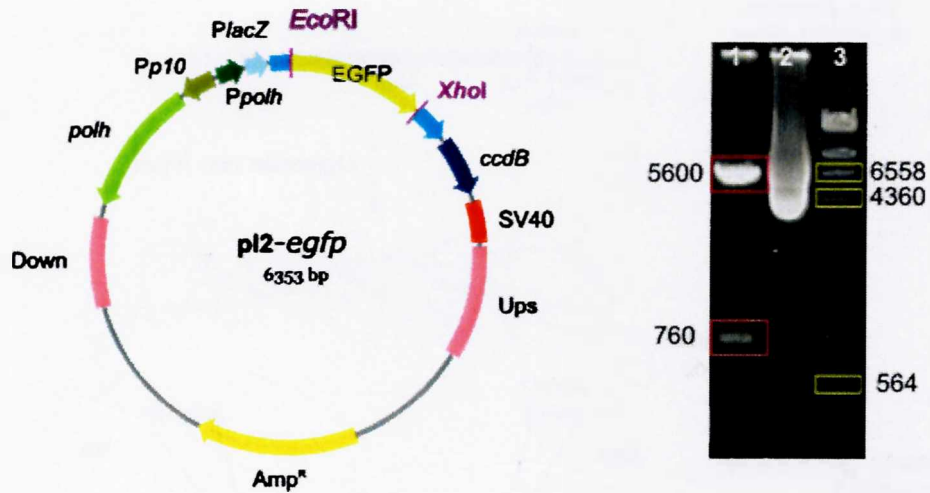


Figura V.3: Esquema del vector de transferencia pI2-*egfp*.

Izquierda, esquema del vector indicando los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*, entre los cuales se insertó el gen *egfp*.

Derecha, gel de agarosa 0,8%. Calle 1: digestión del vector pI2-*egfp* con *EcoRI* y *XhoI*, en rojo se remarcen los tamaños del vector pI2 y el fragmento clonado liberado (*egfp*), calle 2: miniprep del vector pI2-*egfp* y calle 3: marcador de PM (*NHindIII*, PBL), en recuadros amarillos se indican las posiciones y los tamaños en pb de 3 de las bandas que corresponden con el marcador.

Para obtener el virus rAgMNPV/*egfp-polh+*, se utilizó la estrategia clásica de intercambio alélico. Para lo cual, células UFLAg-286 fueron cotransfectadas con el plásmido recombinante (pI2-*egfp*) y el DNA viral AgMNPV-*IPpol* linealizado (Fig. V.4). El virus usado como parental en todos los experimentos de generación de virus recombinantes, posee el gen *lacZ* flanqueado por las secuencias de corte para la enzima *IPpol*. Las cuales están rodeadas por las secuencias no-codificantes *upstream* y *downstream* del gen de poliedrina. Dos eventos de recombinación homóloga intercambiarán las secuencias presentes en el vector de transferencia por las del DNA viral utilizado como parental, generando así un doble recombinante. Para detectar la presencia de los recombinantes se utilizó un ensayo de PCR que amplifica regiones específicas del virus parental y del virus recombinante (esquema Fig. V.4).

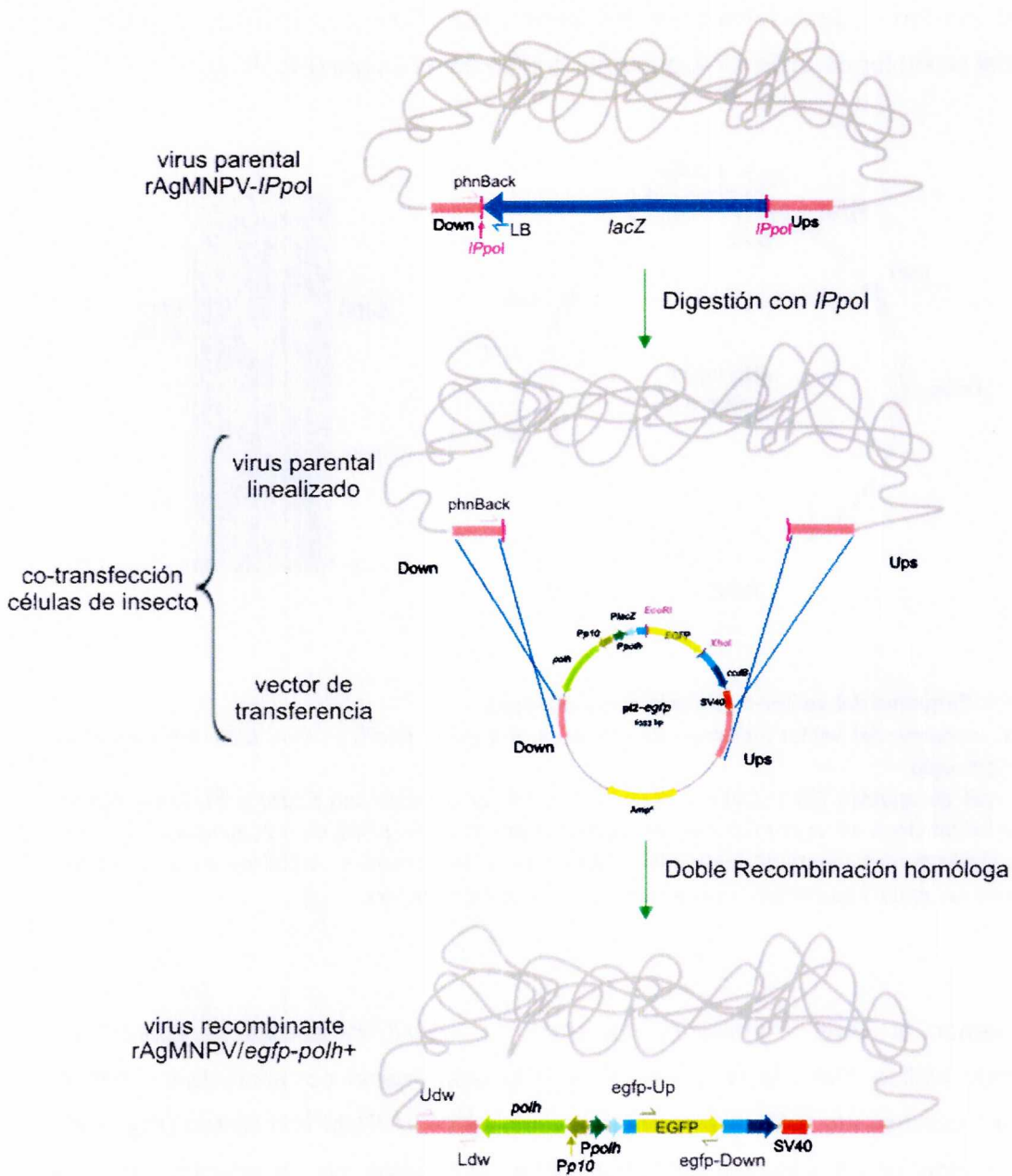


Figura V.4: Estrategia de obtención de virus recombinantes. El siguiente esquema muestra la obtención del virus recombinante rAgMNPV/egfp-polh+.

El DNA viral parental AgMNPV/*IPpol*, contiene el gen *lacZ* flanqueado por los sitios de corte para la enzima *I-Ppol* (indicadas con una barra rosada) y por las secuencias no codificantes *upstream* y *downstream* del gen de poliedrina. La co-transfección de células se realizó con el virus parental linealizado y el vector de transferencia (p12-*egfp*). Luego hay una sustitución alélica cuando ocurren dos eventos independientes de recombinación homóloga, en cada una de las regiones que flanquean al gen heterólogo en el plásmido de transferencia. En este caso, la especie resultante sería el doble recombinante (rAgMNPV/*egfp-polh+*).

La presencia del virus parental se detectó mediante PCR utilizando los *primers* *phnBack* y *LB*, los cuales amplifican la región de unión entre el gen *lacZ* y la región *downstream* del gen de poliedrina. La presencia del virus recombinante se detectó mediante PCR utilizando *primers* que amplifican la región *downstream* del gen de poliedrina (*Udw* y *Ldw*) y *primers* específicos del fragmento clonado, en esta figura *egfp-Up* y *egfp-Down*.

El virus recombinante rAgMNPV/*egfp-polh+*, fue purificado mediante ensayos de placa sucesivos, reconocido por la aparición de poliedros y ausencia de coloración azul en las placas (Fig. V.5). En los distintos pasos de purificación se inocularon larvas de *A. gemmatalis* con los sobrenadantes de placas de purificación (Fig. V.6).

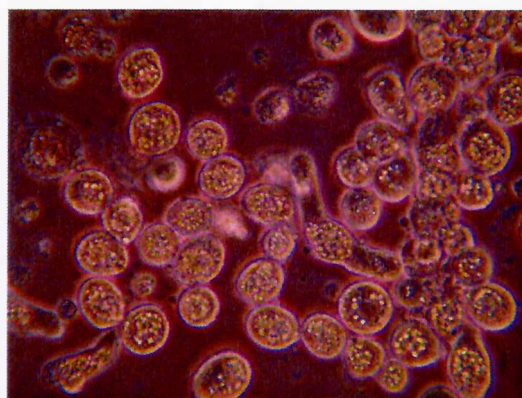


Figura V.5: Fotos de células UFLAg-286 infectadas con el virus recombinante AgMNPV/*egfp-polh+* (400X).

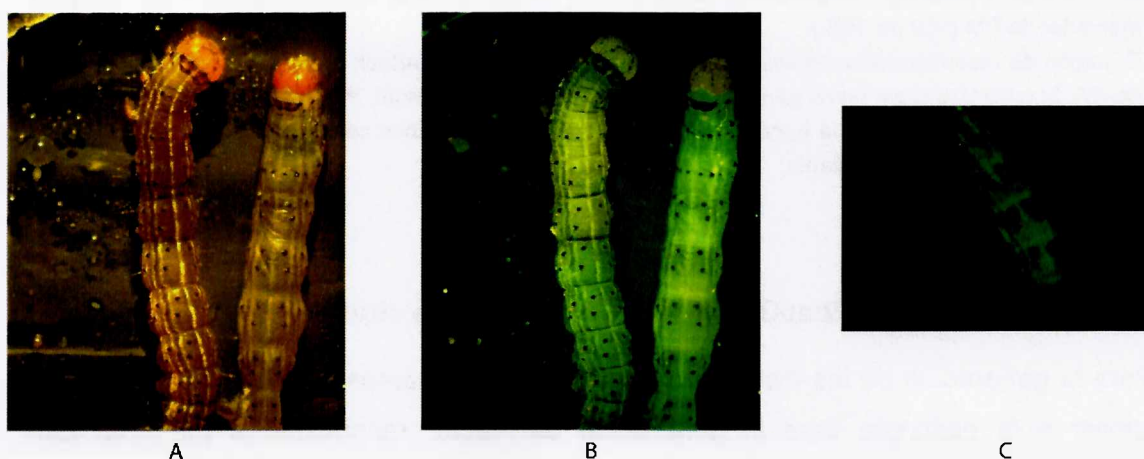


Figura V.6: Fotos de larvas inoculadas con el sobrenadante de infección del virus rAgMNPV/*egfp-polh+* (derecha) y larva inoculada con agua (izquierda).

A: foto tomada con luz blanca; B: foto tomada con luz UV (360 nm); C: foto tomada con luz UV (360 nm)

Las larvas inoculadas con sobrenadantes de infección correspondientes al 3° ensayo de placas (Fig. V.6) nos permite inferir que el sistema de producción de virus modificados mediante recombinación con el vector pI2 resultó eficaz. Si bien se tropezó inicialmente con el problema de autofluorescencia de las larvas de *A. gemmatalis* no infectadas, al modificar los parámetros del capturador de imágenes

utilizado se pudo observar con mucha mayor intensidad la emisión de la fluorescencia debida a la expresión de EGFP (**Fig. V.6.C**). La presencia del virus recombinante se detectó mediante PCR (McCarthy y Romanowski, 2008), dirigida a la región *downstream* de *poliedrina* (517 pb), a *egfp* (gen de interés, 712 pb) y a una región del virus parental (198 pb)(**Fig. V.7**).

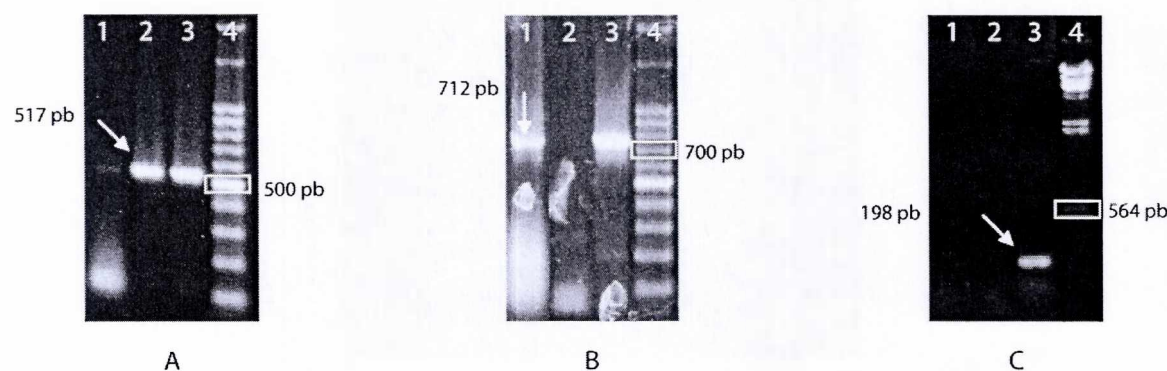


Figura V.7: Productos de amplificación obtenidos a partir del DNA extraído de larvas inoculadas con placas de rAgMNPV/egfp-polh+ (r26), sobre la región:

A: *downstream* de *polh* (Udw-Ldw) Calles 1: agua, 2: DNA de r26, 3: control positivo (pl2-*egfp*) y 4: marcador de PM (100 pb, PBL).

B: ORF EGFP (*egfp*-Up / *egfp*-Down). Calles 1: DNA de r26, 2: agua, 3: control positivo (pl2-*egfp*) y 4: marcador de PM (100 pb, PBL).

C: región de recombinación del virus parental (AgMNPV-*IPpol*) (*phnBack* / LB). Calles 1: agua, 2: DNA de r26, 3: control positivo (virus parental) y 4: marcador de PM (*NHindIII*, PBL).

Las flechas blancas indican la banda de interés, recuadrado en blanco se indica una de las bandas del marcador de PM correspondiente.

Clonado de genes de EpapGV en pl2 y generación de virus recombinantes

Para la generación de los distintos plásmidos recombinantes se utilizó una estrategia similar a la descrita para la generación del vector recombinante pl2-*egfp*. Esta consistió en la amplificación del marco abierto de lectura (ORF) mediante PCR, utilizando un juego de *primers* con sitios de restricción específicos (ver MyM), digestión de los productos y del vector de transferencia con las enzimas correspondientes, precipitación, ligación y el producto de ligación fue transformado en *E. coli* Top10. Los productos recombinantes obtenidos fueron examinados por *colony* PCR, digestión enzimática y posteriormente, secuenciación. La estructura de los vectores obtenidos se muestra en la **Fig. V.8**.

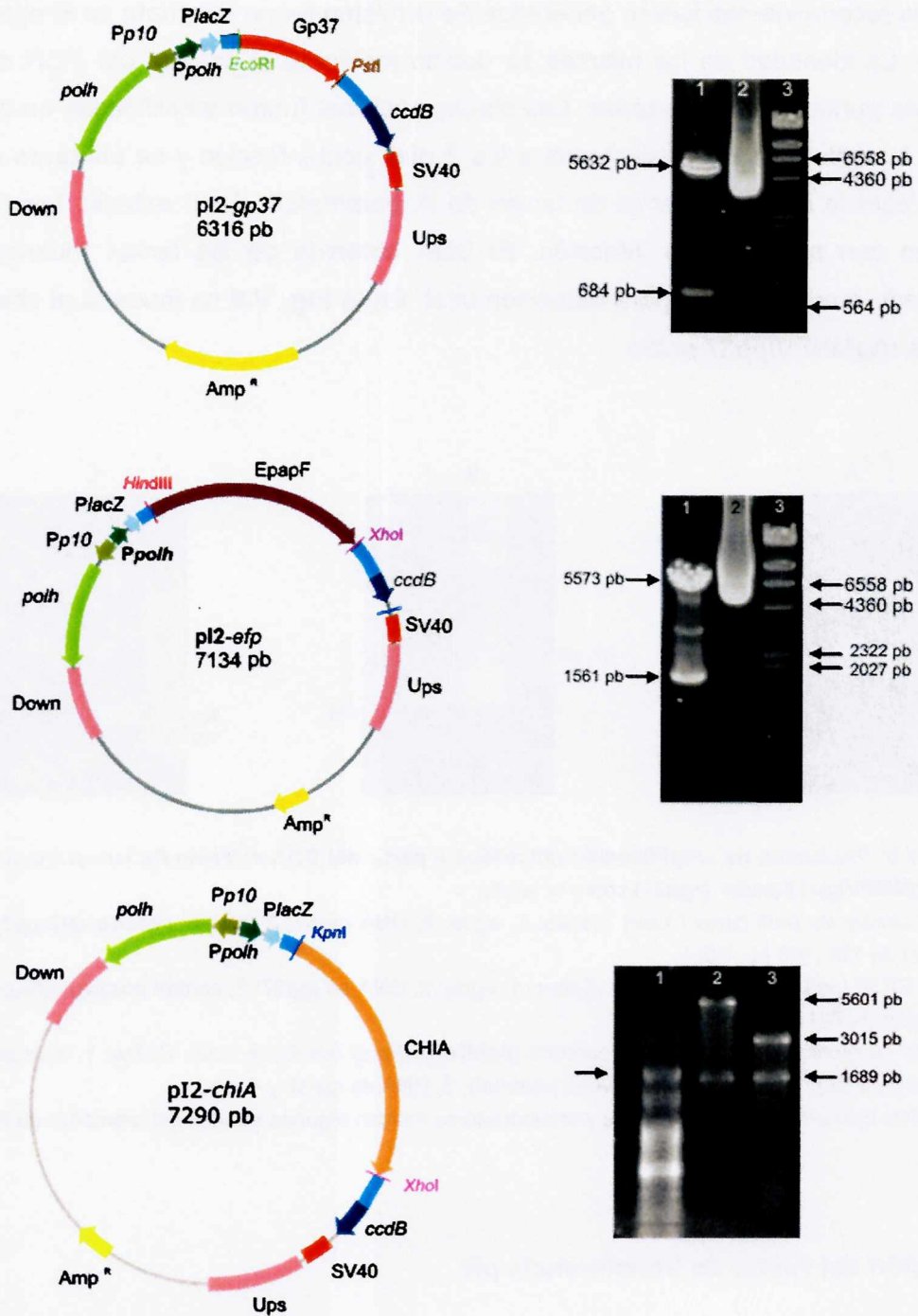


Figura V. 8: Esquema de los plásmidos de transferencia recombinantes obtenidos.

Esquema de los vectores de transferencia recombinantes obtenidos: pI2-gp37, pI2-efp y pI2-chiA.

A la derecha de los esquemas de los plásmidos pI2-gp37 y pI2-efp se muestran los análisis por electroforesis en gel de agarosa 1% en los cuales: calle 1: digestión del plásmido con las enzimas indicadas con letras rosadas en el esquema, calle 2: miniprep sin digerir y calle 3: marcador de PM (*NHindIII*, PBL).

A la derecha del esquema de pI2-chiA se muestra un gel de agarosa 0,8%. Calle 1: marcador de PM (100 pb, PBL), calle 2: pI2-chiA digerido con las enzimas indicadas en el esquema y calle 3: pGEMT-chiA digerido con las mismas enzimas.

A los costados de los gels se indica el tamaño de algunos fragmentos del marcador de PM (derecha) y de los productos de digestión de cada plásmido esquematizado (izquierda).

Los virus recombinantes fueron generados de la misma forma descrita en el apartado anterior. La identidad de los mismos se definió mediante el análisis por PCR de las placas de purificación procesadas. Las placas positivas fueron amplificadas en cultivo celular, las células fueron levantadas a los 7 días post-infección y se utilizaron como inóculo para la infección *per os* de larvas de *A. gemmatalis* de 3° estadio. Las larvas murieron con síntomas de infección. El DNA obtenido de las larvas muertas fue chequeado mediante PCR para detección viral. En la **Fig. V.9** se muestra el chequeo del virus rAgMNPV/gp37-polh+.

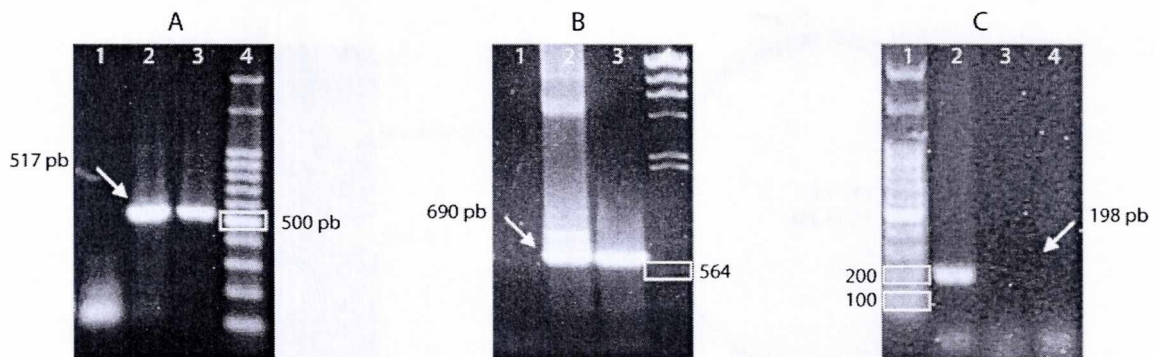


Figura V.9: Productos de amplificación obtenidos a partir del DNA extraído de larvas inoculadas con rAgMNPV/gp37-polh+ (rgp37) sobre la región:

A: *downstream* de *polh* (Udw / Ldw). Calles: 1, agua; 2, DNA rgp37; 3, control positivo (pl2-*gp37*) y 4 marcador de PM (100 pb, PBL).

B: ORF GP37 (*gp37-Up* / *gp37-Down*). Calles: 1, agua; 2, DNA de rgp37; 3, control positivo (pl2-*gp37*) y 4 marcador de PM (*NHindIII*, PBL).

C: región de recombinación del virus parental (AgMNPV-*IPpol*) (*phnBack* / LB). Calles: 1, marcador de PM (100 pb, PBL); 2, control positivo (virus parental); 3, DNA de rgp37 y 4, agua.

Las flechas indican la banda de interés y recuadrado se indican algunas bandas del marcador de PM.

Obtención del vector de transferencia pR

El vector de transferencia pR, se construyó con la idea de clonar grandes fragmentos de DNA genómico. Para generarlo se tomó como plásmido base a pAgPHRA1E-*ccdb16A* (Mendez *et al.*, 2001), el cual posee el mismo sistema de selección positiva usado para la generación de pl2 (la porción *lacZα* del gen *lacZ* fusionado al gen letal *ccdB* bajo la regulación del promotor *lacZ*, tomada de pZErO-2TM), interrumpido por un fragmento de 400 pb, el cual fue eliminado por digestión con *EcoRI* para obtener pR. Este vector de transferencia posee el gen de *poliedrina* bajo el control de su propio promotor para reconstruir el fenotipo salvaje. Ambas regiones, MCS y *poliedrina*, rodeadas por las regiones flanqueantes del gen de *poliedrina* de AgMNPV, las cuales,

son blanco de una doble recombinación homóloga con el genoma de AgMNPV parental. Una vez obtenido el vector, su secuencia fue confirmada por patrón de restricción (**Fig. V.10**) y posteriormente mediante secuenciación.

El desarrollo de este vector de transferencia permitió clonar fragmentos de DNA de gran tamaño pertenecientes a una librería genómica de EpapGV (Parola *et al.*, 2002).

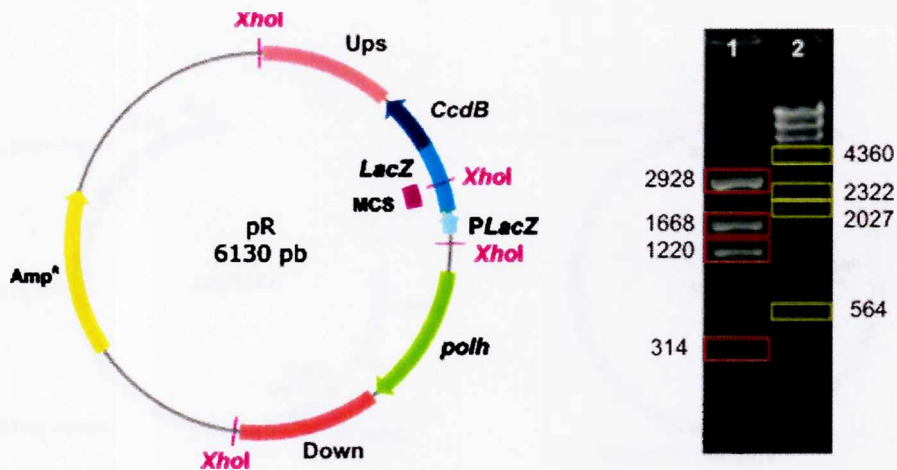


Figura V.10: Esquema del vector de transferencia pR y patrón de restricción.

Izquierda, esquema del vector, indicando los sitios de corte para la enzima *XhoI*.

Derecha, gel de agarosa 0,8%. Calle 1: patrón de restricción del vector pR obtenido por digestión con la enzima *XhoI*; calle 2: marcador de PM (*NHindIII*, PBL), remarcado en amarillo se encuentra alguna de las bandas representativas del marcador.

Clonado de fragmentos del genoma de EpapGV en el vector de transferencia pR

Los fragmentos del virus de EpapGV fueron obtenidos a partir de la biblioteca genómica *EcoRI* generada previamente (Manzán, 2002). Para obtener los vectores recombinantes pR-X EpapGV (X denota la letra correspondiente del fragmento de EpapGV, ver **Fig. V.11**) se realizaron distintas estrategias de clonado. La que produjo resultados positivos fue la ligación en *bulk* del vector de transferencia y de los productos de digestión de los plásmidos conteniendo los fragmentos. La confirmación de la identidad de los vectores recombinantes obtenidos se realizó mediante digestión con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (**Fig. V.11**).

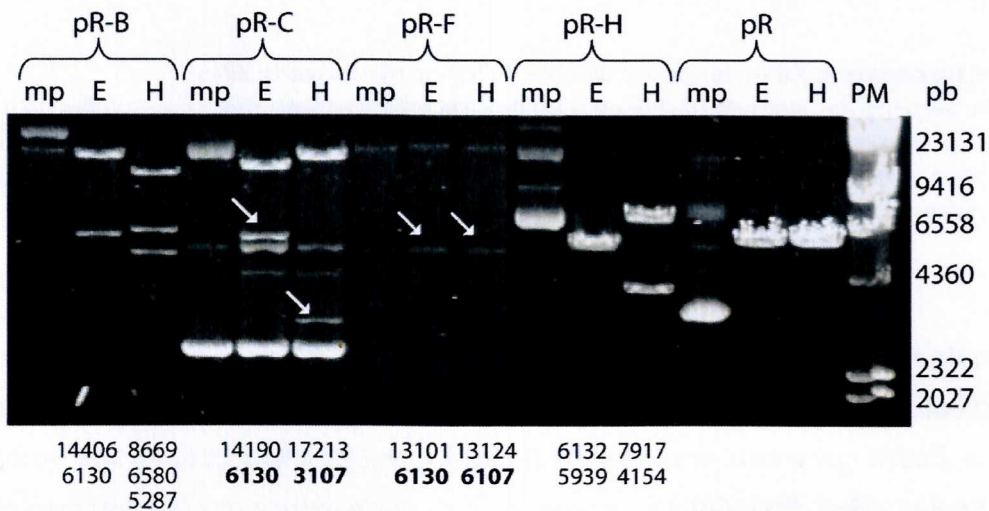
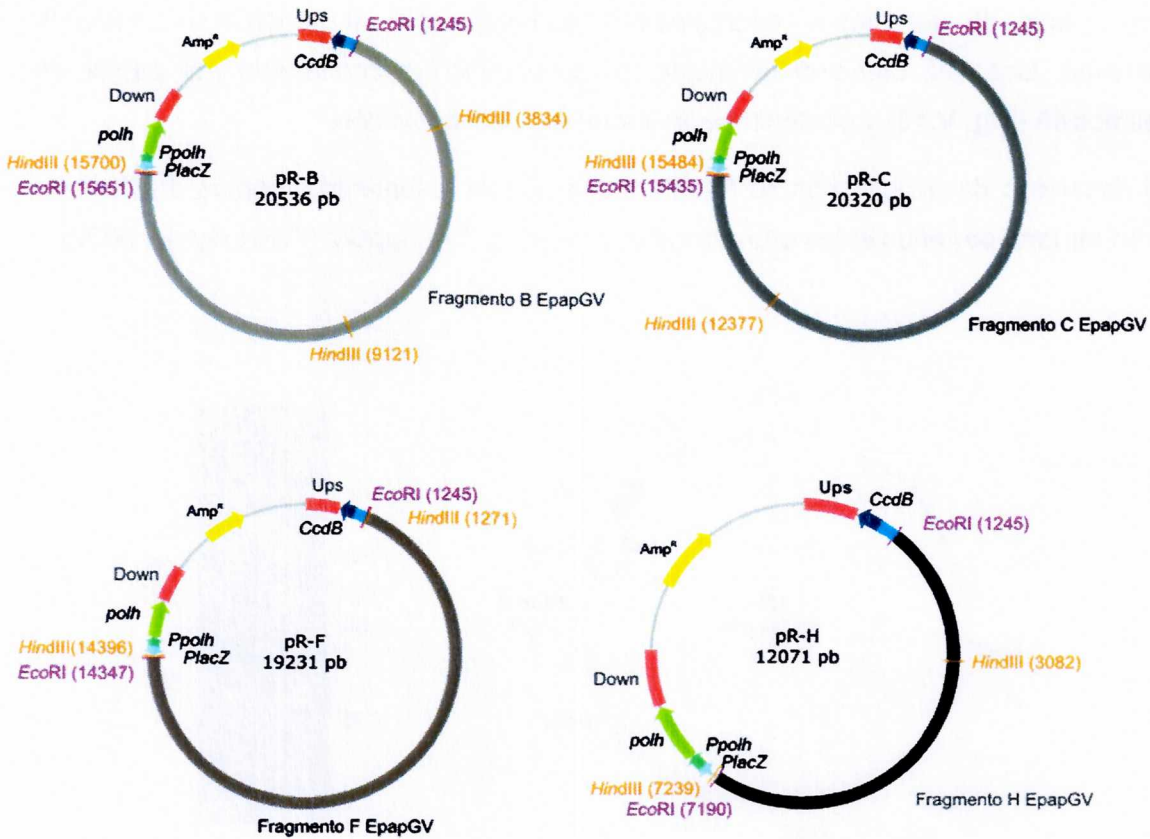


Figura V.11: Esquema y patrón de restricción de los vectores recombinantes pR-X (X indica el fragmento correspondiente de la biblioteca *EcoRI* de EpapGV).

Arriba: Esquema de los vectores de transferencia recombinantes obtenidos: pR-B, pR-C, pR-F y pR-H. Se indican los sitios de restricción de las enzimas *EcoRI* y *HindIII*, remarcados con naranja y violeta, respectivamente.

Abajo: Gel de agarosa 0,6%. mp: miniprep sin digerir, E: digestión con *EcoRI*, H: digestión con *HindIII*, PM: marcador de PM (*NHindIII*, PBL). Los tamaños del marcador de PM se indican a la derecha de la figura. Debajo del gel se indican los tamaños esperados de los fragmentos luego de la digestión. Las flechas en pR-C y en pR-F indican las bandas cuyos tamaños están indicados en negrita debajo del gel.

La obtención de los vectores recombinantes no fue una tarea fácil, dado el gran tamaño que presentan los plásmidos de la biblioteca y su difícil recuperación por métodos de extracción rutinarios. Para la recuperación del DNA se probaron distintas estrategias; aún así, la recuperación del plásmido conteniendo el fragmento F fue muy difícil. Para que la digestión del vector pR-F pudiera observarse en el gel, se tuvo que ajustar el contraste de esta región de la foto. También puede verse, que en la digestión del vector pR-C, tanto con *EcoRI* como con *HindIII*, aparecen tres bandas que están presentes también en la miniprep sin digerir. Estas bandas podrían corresponder a formas superenrolladas de DNA que no permiten el acceso de las enzimas de restricción, o a plásmidos replicativos generados por recombinación luego de su amplificación en el cultivo. Se probaron distintas condiciones de incubación para las reacciones de digestión enzimática en el caso de éste plásmido (pR-C); en todos los casos estas estructuras se mantuvieron presentes. No se han realizado aún estudios adicionales necesarios para identificar estas especies de DNA.

Generación de virus recombinantes

Para la generación de los distintos virus recombinantes se co-transfectaron células de insecto UFLAg-286 con DNA viral de AgMNPV-*I-Ppol* linealizado y los respectivos plásmidos de transferencia. Los virus recombinantes fueron seleccionados fenotípicamente en ensayos de placa, mediante la aparición del fenotipo ocluido y ausencia de coloración azul en presencia del sustrato cromogénico *X-gal*. Los virus fueron utilizados para infectar monocapas de células UFLAg-286. Los poliedros obtenidos a partir de la infección con los distintos virus rAgMNPV/X-EpapGV, fueron utilizados para la infección por vía oral de larvas de *A. gemmatalis* de 3° estadio, con el fin de enriquecer la progenie de viral. Las larvas inoculadas murieron con síntomas de infección viral (**Fig. V.12**).

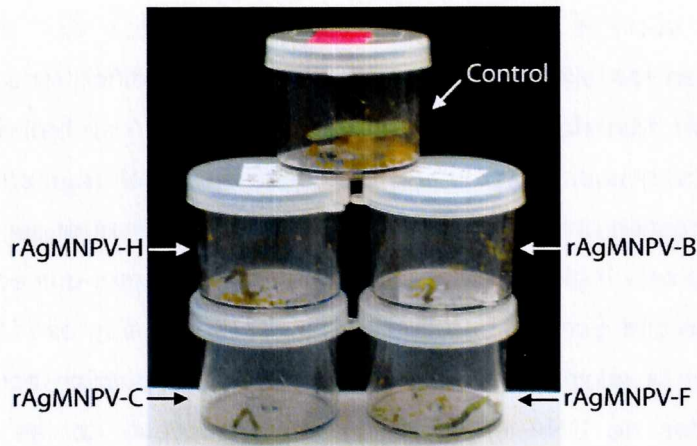


Figura V.12: Larvas de *A. gemmatalis* infectadas con poliedros provenientes de cultivo celular infectados con rAgMNPV/X-EpapGV (X, indica el fragmento correspondiente de la biblioteca *EcoRI* de EpapGV).

Para detectar la presencia del virus recombinante que contiene el fragmento H de EpapGV, se pudo utilizar la estrategia de PCR propuesta por McCarthy (2005), de la misma manera que se expuso en el apartado anterior, dado que se disponía de *primers* que permitieron detectar la presencia del fragmento H (Manzan *et al.*, 2008). En la **Fig. V.13**, se muestran los resultados obtenidos. Sin embargo, los recombinantes conteniendo los fragmentos B, C y F de EpapGV, sólo se caracterizaron por su fenotipo ocluido durante su amplificación en cultivo de células e infección en larvas de *A. gemmatalis*.

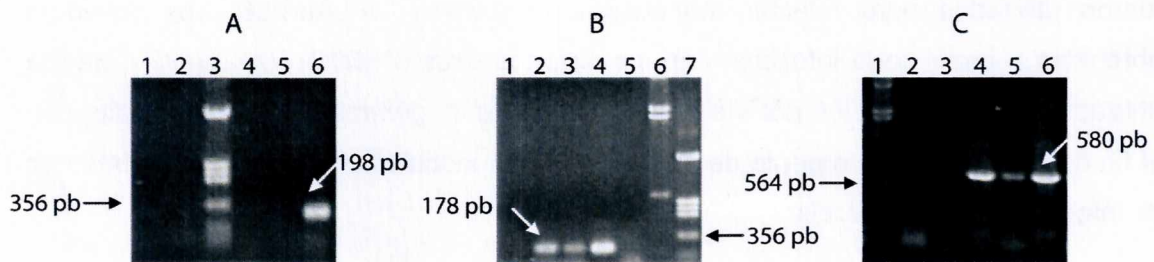


Fig. V.13: Estrategia de chequeo del virus recombinantes rAgMNPV/H-EpapGV (H6 y H30).

A: región de recombinación del virus parental (AgMNPV-*IPpol*) (*phnBack* / LB). Calles: 1, H6; 2: H30; 3: marcador de PM (*pCDNAII-Hinfl*); 4: agua; 5: pR-H y 6: control positivo (virus parental).

B: Detección del fragmento H (17d-5 / 17d-3). Calles: 1: agua; 2: H6; 3: H30; 4: pR-H (control positivo); 5: AgMNPV-*IPpol*; 6: marcador de PM (λ HindIII, PBL) y 7: marcador de PM (*pCDNAII-Hinfl*).

C: Se utilizó un par de *primers* que amplifican una región de 580 pb del gen de la *poliedrina*. Calles 1: marcador de peso molecular (λ HindIII, PBL); 2: agua; 3: AgMNPV-*IPpol*; 4: pR-H; 5: H6 y 6: H30.

Con flechas blancas se indican las bandas de interés. Con flechas negras se señalan algunos de los fragmentos del marcador de PM que corresponda.

Para corroborar la identidad de los virus recombinantes generados es necesario realizar un patrón de restricción y *Southern blot* que permitan identificar la correcta inserción del fragmento heterólogo.

Ensayos biológicos

Con el fin de evaluar la infectividad del virus recombinante que expresa el gen marcador *egfp* sobre larvas de *A. gemmatalis* se realizó un bioensayo similar a los realizados en el capítulo II. Para ello, se usaron larvas de 3º estadio de *A. gemmatalis*, a las cuales se les administró por vía oral el virus rAgMNPV/*egfp-polh+* o éste más el agregado de EpapGV. Las dosis utilizadas fueron las mismas a las utilizadas anteriormente (50 OB rAgMNPV/*egfp-polh+*, 300 OB rAgMNPV/*egfp-polh+* y 6000 OB EpapGV, o la combinación 50/6000, 300/6000 de los mismos). Los datos de mortalidad obtenidos se presentan en la **Tabla V.3**.

Tabla V.3: Mortalidad (%) producida por rAgMNPV/*egfp-polh+* o la combinación del mismo con EpapGV, en larvas de *A. gemmatalis* de 3º estadio.

OB	% mortalidad
Control	0
6000*	0
50**	66,66
300**	92
50/6000§	95,83
300/6000§	100

Larvas tratadas con: Control, agua en lugar del inóculo; * gránulos de EpapGV; ** poliedros de rAgMNPV/*egfp-polh+*; § mezcla viral, poliedros de rAgMNPV/*egfp-polh+*/ gránulos de EpapGV.

Si bien estos datos corresponden a un único ensayo, puede apreciarse que se obtuvieron resultados similares a los obtenidos previamente (cuando se utilizó el aislamiento *wt* AgMNPV-A, capítulo II). Para validar estos resultados deben realizarse más bioensayos.

Discusión

Como se ha indicado más arriba, existen limitantes para la difusión del uso comercial de los baculovirus a pesar de su potencial para el control de plagas. Para atacar el problema de su acción lenta, se iniciaron estudios de modificación genética dirigida utilizando la tecnología desarrollada para la expresión de genes heterólogos. Se ensayaron alternativas, que incluyen la expresión de toxinas específicas para insectos, hormonas y enzimas de insectos o deleciones de genes virales que afectan la metamorfosis (Inceoglu *et al.*, 2006; Thiem, 1997). En 1994, Cory *et al.* (1995) publicaron el primer trabajo en el que se utilizaron baculovirus mejorados genéticamente en un ensayo de campo y, en la actualidad, existen baculovirus modificados genéticamente que cuentan con registro para el uso experimental en diversos países (Black *et al.*, 1997; Inceoglu *et al.*, 2006; Vail *et al.*, 1999).

Finalmente, cuando ya se han logrado éxitos concretos en el mejoramiento genético de baculovirus en lo que respecta a su velocidad de acción, el limitado rango de hospedantes surge como un desafío (Thiem, 1997). Si bien, la selectividad de los baculovirus representa una ventaja comparativa con otros medios de control de plagas, resulta interesante la posibilidad de regular el rango de hospedantes. El atractivo, tanto para la industria como para los productores agrícolas, consiste en contar con una herramienta para el control de complejos de plagas simultáneas. La idea es lograr modificaciones genéticas que amplíen el rango de insectos susceptibles sin afectar sus cualidades de inocuidad hacia organismos benéficos (Inceoglu *et al.*, 2006).

En trabajos previos se ha demostrado que los productos génicos de CypoGV pueden retener su actividad cuando son expresados usando como vector AcMNPV (Kang *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2002) De esta forma se puede estudiar la función de un gen en el contexto de infección por baculovirus. Por otra parte, la funcionalidad de genes de EpapGV también comenzó a estudiarse mediante el uso de plásmidos recombinantes transfectados en células de insecto (Goldberg Cavalleri, 2003; Manzan *et al.*, 2002).

En este trabajo, se describe la construcción de vectores de transferencia (pI2 y pR) que pueden ser utilizados para la inserción de genes o fragmentos genómicos heterólogos en el virus de AgMNPV. Ambos vectores contienen el gen de poliedrina bajo el control de su propio promotor o el promotor de p10, lo que permite generar luego de la recombinación entre el DNA parental y el plásmido de transferencia, virus recombinantes infectivos por vía oral.

El desarrollo de estos vectores permitió tanto la inserción de genes heterólogos (indicadores y genes seleccionados de EpapGV) como la inserción de grandes fragmentos de DNA provenientes de EpapGV.

Estos rAgMNPV/*polh+*, que conservan la capacidad de replicar en cultivos de células UFLAg-286, resultaron infectivos por vía oral para *A. gemmatalis*. Se espera que con la inserción de los grandes fragmentos del genoma de EpapGV se incorporen genes que permitan infectar *E. aporema*, particularmente, y otras plagas de interés.

Se han elegido algunos genes de EpapGV que participan en distintos pasos de la infección. Así, se seleccionó el gen que codifica para la proteína de fusión EFP, que estaría involucrada en el proceso de endocitosis de los BV, durante la diseminación de la infección secundaria en su hospedante. En este sentido, en nuestro laboratorio se comprobó que esta proteína es capaz de producir fusión celular mediada por pH ácido (Goldberg Cavalleri, 2003). Otro gen seleccionado es *gp37*, que codifica una proteína implicada en la unión a quitina presente en la membrana peritrófica del insecto (Li *et al.*, 2003) y ésta es la primera barrera que debe atravesar el virus para causar una infección productiva. Por su parte, la quitinasa (proteína CHI-A), participa al final de la infección favoreciendo la diseminación de los virus ocluidos por licuefacción de las larvas muertas (Hawtin *et al.*, 1997). Resulta interesante notar que no se encuentran secuencias homólogas al gen *chi-A* ni el *gp37* en el virus de AgMNPV-2D (Oliveira *et al.*, 2006), que se utilizó como virus parental en la obtención de recombinantes.

Se han generado herramientas de clonado efectivas, así como también una serie de virus recombinantes de AgMNPV/EpapGV, conteniendo genes específicos o fragmentos genómicos. Los ensayos biológicos con estos virus permitirán determinar si en alguno de los fragmentos insertados se encuentran genes que permitan extender el rango de hospedantes de AgMNPV hacia *Epinotia aporema*.

Referencias

- Bahassi, E. M., O'Dea, M. H., Allali, N., Messens, J., Gellert, M. & Couturier, M. (1999).** Interactions of CcdB with DNA gyrase. Inactivation of Gyra, poisoning of the gyrase-DNA complex, and the antidote action of CcdA. *J Biol Chem* **274**, 10936-10944.
- Bernard, P. & Couturier, M. (1992).** Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol* **226**, 735-745.
- Birnbaum, M. J., Clem, R. J. & Miller, L. K. (1994).** An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *J Virol* **68**, 2521-2528.
- Black, B. C., Brennan, L. A., Dierks, P. M. & Gard, I. E. (1997).** Commercialization of baculoviral insecticides. In *The Baculoviruses*, pp. 341-387. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Cory, J. S. & Bishop, D. H. (1995).** Use of baculoviruses as biological insecticides. *Methods Mol Biol* **39**, 277-294.
- Federici, B. A. (1997).** *Baculovirus Pathogenesis*. New York: Plenum Press.
- Goldberg Cavalleri, A. V. (2003).** Estudio biológico y molecular del proceso de infección de un virus de la granulosis de *Epinotia aporema* y evaluación de su potencial como agente de control biológico. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires.
- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. & Possee, R. D. (1997).** Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* **238**, 243-253.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. & Pease, L. R. (1989).** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-68.
- Horton, R. M. H., H. D.; Ho, S. N.; Pullen, J. K. and Pease, L. R. (1989).** Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-68.
- Inceoglu, A. B., Kamita, S. G. & Hammock, B. D. (2006).** Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. *Adv Virus Res* **68**, 323-360.
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M. & Vlak, J. M. (2006).** On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch Virol* **151**, 1257-1266.
- Jordan, K. R., McMahan, R. H., Oh, J. Z., Pipeling, M. R., Pardoll, D. M., Kedi, R. M., Kappler, J. W. & Slansky, J. E. (2008).** Baculovirus-Infected Insect Cells Expressing Peptide-MHC Complexes Elicit Protective Antitumor Immunity. *J Immunol* **180**, 188-197.
- Kang, W., Tristem, M., Maeda, S., Crook, N. E. & O'Reilly, D. R. (1998).** Identification and characterization of the *Cydia pomonella* granulovirus cathepsin and chitinase genes. *J Gen Virol* **79**, 2283-2292.
- Katou, Y., Ikeda, M. & Kobayashi, M. (2006).** Abortive replication of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus in Sf9 and High Five cells: defective nuclear transport of the virions. *Virology* **347**, 455-465. Epub 2006 Jan 2018.
- Kawaoka, S., Katsuma, S., Daimon, T., Isono, R., Omuro, N., Mita, K. & Shimada, T. (2007).** Functional analysis of four Gloverin-like genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch Insect Biochem Physiol*.
- Li, Z., Li, C., Yang, K., Wang, L., Yin, C., Gong, Y. & Pang, Y. (2003).** Characterization of a chitin-binding protein GP37 of *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Res* **96**, 113-122.
- Lu, A. & Miller, L. K. (1995).** Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines. *J Virol* **69**, 6265-6272.

- Manzán, M. A. (2002).** Clonado molecular del genoma del virus de la granulosis de *Epinotia aporema*, EpapGV y caracterización del gen de la ecdisona glicosiltransferasa. *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas*, p. 156. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- Manzan, M. A., Aljinovic, E. M., Biedma, M. E., Sciocco-Cap, A., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2008).** Multiplex PCR and quality control of *Epinotia aporema* granulovirus production. *Virus Genes*.
- Manzan, M. A., Lozano, M. E., Sciocco-Cap, A., Ghiringhelli, P. D. & Romanowski, V. (2002).** Identification and characterization of the ecdysteroid UDP-glycosyltransferase gene of *Epinotia aporema* granulovirus. *Virus Genes* **24**, 119-130.
- McCarthy, C. B. (2005).** Generación de recombinantes del virus de la poliedrosis nuclear de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV). *Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas*, p. 339. La Plata: Universidad Nacional de La Plata.
- McCarthy, C. B., Dai, X., Donly, C. & Theilmann, D. A. (2008).** *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus ac142, a core gene that is essential for BV production and ODV envelopment. *Virology* **372**, 325-339.
- McCarthy, C. B. & Romanowski, V. (2008).** A simplified method for the extraction of baculoviral DNA for PCR analysis: a practical application. *J Virol Methods* **148**, 286-290. Epub 2008 Feb 2001.
- Miller, D. P., Luque, T., Crook, N. E., Winstanley, D. & O'Reilly, D. R. (2002).** Expression of the *Cydia pomonella* granulovirus iap3 gene. *Arch Virol* **147**, 1221-1236.
- Moscardi, F. (1999).** Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu Rev Entomol* **44**, 257-289.
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. & Luckow, V. A., (1992).** *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Oliveira, J. V., Wolff, J. L., Garcia-Maruniak, A., Ribeiro, B. M., de Castro, M. E., de Souza, M. L., Moscardi, F., Maruniak, J. E. & Zanotto, P. M. (2006).** Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* **87**, 3233-3250.
- Parola, A. D., Manzan, M. A., Lozano, M. E., Ghiringhelli, P. D., Sciocco-Cap, A. & Romanowski, V. (2002).** Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. *Virus Genes* **25**, 329-341.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*.
- Sieburth, P. J. & Maruniak, J. E. (1988).** Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology* **24**, 195-198.
- Slack, J. & Arif, B. M. (2007).** The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Adv Virus Res* **69**, 99-165.
- Thiem, S. M. (1997).** Prospects for altering host range for baculovirus bioinsecticides. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 317-322.
- Thiem, S. M., Du, X., Quentin, M. E. & Berner, M. M. (1996).** Identification of baculovirus gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line. *J Virol* **70**, 2221-2229.
- Vail, P. V., Hostetter, D. L. & Hoffmann, D. F. (1999).** Development of the Multi-nucleocapsid Nucleopolyhedroviruses (MNPVs) Infectious to Loopers (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae) as Microbial Control Agents *Integrated Pest Management Reviews* **4**, 231-257.
- Wang, L., Salem, T., Lynn, D. & Cheng, X. (2008).** Slow cell infection, inefficient primary infection and inability to replicate in the fat body determine the host range of *Thysanoplusia orichalcea* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol* **89**, 1402-1410.

**CONCLUSIONES GENERALES
Y PERSPECTIVAS**

Conclusiones generales

- La inoculación de larvas de *E. aporema* con AgMNPV-*lacZ* confirmó que este virus es incapaz de infectar a este insecto plaga. Por otra parte, en estudios previos se demostró que *A. gemmatalis* no es susceptible a EpapGV.
- *Rachiplusia nu* resultó susceptible a la infección por AgMNPV en altas dosis.
- En los ensayos de inoculación conjunta de EpapGV y AgMNPV en larvas de *A. gemmatalis* se observa un incremento de la virulencia de AgMNPV cuando es administrado en forma simultánea con EpapGV. Los efectos resultaron más notorios a dosis bajas.
- La secuenciación de una región del fragmento *Bam*HI E del mapa físico de EpapGV, permitió obtener la secuencia completa del gen *ie-1*. Asimismo, se identificaron dos ORF completos, homólogos a los presentes en otros *Granulovirus*. Uno tiene una alta similitud de secuencia con el ORF 12 de PxGV y el otro una alta similitud al ORF 9 de AgseGV, ambos con función desconocida. Se identificó, además, la región C-terminal del gen que codifica la quitinasa (*chiA*).
- La región promotora del gen *ie-1* de EpapGV, fue amplificada con *primers* específicos y se clonó dirigiendo la expresión de los genes indicadores *LacZ* y *CAT*. Se evaluó la funcionalidad de esta región en líneas celulares no permisivas a la infección por EpapGV, derivadas de *Anticarsia gemmatalis* (UFLAg-286) y de *Spodoptera frugiperda* (SF-9). Los resultados obtenidos, permitieron confirmar que el promotor de *ie-1* de EpapGV es reconocido por la maquinaria transcripcional de la célula hospedante.
- Los ORF IE-1 de EpapGV y de AgMNPV fueron amplificados y clonados en un vector de expresión constitutiva. Se evaluó la autorregulación de IE-1 sobre su propio promotor y el promotor heterólogo de AgMNPV. Los ensayos de co-transfección indican que IE-1 de EpapGV puede modular la transcripción del gen homólogo de AgMNPV. Es el primer trabajo que evalúa la actividad de IE-1 de un GV.
- Se construyeron vectores en los que la expresión del gen indicador *LacZ* se encuentra bajo el control de promotores tardíos de EpapGV (*egt* y *granulina*) y AgMNPV (*egt* y *poliedrina*). Se evaluó la transactivación transcripcional de estos genes en el entorno heterólogo de *Anticarsia gemmatalis* en presencia y ausencia de expresión de genes de AgMNPV.

- La transfección de cultivos celulares con estos plásmidos y la detección de la expresión del gen indicador permitió verificar que no se detecta expresión a partir de los promotores tardíos de EpapGV en el entorno heterólogo de *A. gemmatalis*. El resultado novedoso es que son transactivables por factores (celulares o virales) generados durante la infección por AgMNPV (transfección con el plásmido indicador + infección con AgMNPV).
- Se construyó un vector de transferencia con un sistema de selección positiva (pR) para la introducción de segmentos de DNA de gran tamaño en AgMNPV. Se clonaron cuatro fragmentos *EcoRI* del genoma de EpapGV en pR.
- Mediante SOE-PCR se construyó el vector pI2, para la producción de baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* recombinantes (poliedrina+) capaces de ser propagados tanto en cultivos celulares como en larvas del insecto. Este vector permite el clonado de genes particulares bajo el control del promotor fuerte de poliedrina.
- Se verificó el funcionamiento del sistema mediante la producción de un recombinante que expresa la proteína fluorescente verde EGFP (rAgMNPV/*gfp-polh+*) en cultivos celulares y en larvas de *A. gemmatalis*.
- Se clonaron tres genes de EpapGV relacionados con el proceso de infección: *chiA*, *efp* y *gp37*, en pI2.
- Por co-transfección y recombinación homóloga *in vivo* se obtuvieron AgMNPV recombinantes (rAgMNPV) con distintos segmentos genómicos y genes particulares de EpapGV.
- Se produjo un rAgMNPV “marcado” que expresa una proteína fluorescente (rAgMNPV/*egfp-polh+*). Esto permite el seguimiento de la infección en cultivos celulares y larvas. Su comportamiento biológico no parece ser diferente del virus parental AgMNPV. En este sentido, la administración conjunta de rAgMNPV/*egfp-polh+* y EpapGV a larvas de *A. gemmatalis* mostró un incremento de mortalidad equivalente al observado con AgMNPV *wt* y EpapGV.

Perspectivas

Los resultados obtenidos durante los ensayos de inoculación conjunta de EpapGV y AgMNPV indican que esta mezcla provoca una disminución del TL_{50} . Se podrían realizar bioensayos similares con dosis inferiores de EpapGV. En caso de obtenerse resultados similares, la mezcla de estos virus podría proponerse como una nueva formulación baculoviral con mayor poder insecticida.

Los ensayos de expresión transitorios de IE-1 de EpapGV indicaron una autorregulación negativa sobre su región promotora bajo las condiciones ensayadas. Es necesario identificar la región mínima promotora y evaluar la actividad de la misma en otras líneas celulares, así como la capacidad de autorregulación sobre estas zonas para corroborar los resultados obtenidos durante esta tesis.

Se debe confirmar la identidad de los virus recombinantes generados mediante *Southern blot* para confirmar la correcta inserción de los genes y de los grandes fragmentos de EpapGV insertados. Asimismo, con estos ensayos se podrá verificar si se produjeron rearrreglos genómicos durante el proceso de recombinación o se mantuvieron los grandes fragmentos en su totalidad. Posteriormente, se deberá evaluar la infectividad de los virus recombinantes sobre distintas especies de lepidópteros, lo cual posibilita la búsqueda de posibles determinantes genéticos implicados en el rango de hospedantes.

ANEXO

Materiales y Métodos generales

MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

MATERIALES GENERALES

Productos químicos y enzimáticos

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron reactivos de grado analítico o de grado biología molecular suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, USA) y Carlo Erba (Milano, Italia). Las enzimas utilizadas fueron provistas por las empresas Stratagene (La Jolla, USA), Promega (Madison, USA), New England Biolabs (Beverly, USA) y Gibco BRL-Life Technologies (Grand Island, USA). Los componentes de los medios de cultivo para bacterias se adquirieron en Difco (Detroit, EE.UU.). Los medios de cultivo de células eucariotas fueron suministrados por Gibco BRL (Grand Island, USA) y los sueros fetales por Bioser (Buenos Aires, Argentina). Las cajas de Petri y los frascos de poliestireno, utilizados en el cultivo de células fueron provistos por Nunc (Kamstrup, Dinamarca) y Corning (USA). El agua utilizada fue destilada, desionizada y esterilizada por autoclave a 120 °C, en el laboratorio de Virus del IBBM, dado el requerimiento de una máxima calidad y pureza en los protocolos de biología molecular. Las fotografías se obtuvieron con un equipo de Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak digital science) o capturador de imágenes Epichemi³ Darkroom (UVP Bioimaging Systems). Para la toma de imágenes se utilizó un scanner VistaScan 240. La cuantificación de muestras se realizó por medidas de absorbancia; con el programa LabWorksTM 4.6 (Image Acquisition and Analysis Software) o con Nanodrop Spectrophotometer ND-1000.

Cepas bacterianas

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron bacterias de la especie *Escherichia coli* con genotipos modificados genéticamente.

DH5 α TM: F⁻ ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (*r_k⁻, m_k⁺*) *phoA supE44* λ *thi-1 gyrA96 relA1 tonA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Top 10: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 endA1 ara* Δ 139 Δ (*ara, leu*)7697 *galU galK* λ *rpsL*(Str^R) *nupG* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

DB3.1: F⁻ *gyrA462 endA* Δ (*sr1-recA*) *mcrB mrr hsdS20* (*r_B⁻, m_B⁻*) *supE44 ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20*(Str^R) *xyf5* λ *leu mt1* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

MEDIOS

1) Medios para cultivo de bacterias

Medio LB: se disuelven 5 g de NaCl, 10 g de bacto triptona y 5 g de extracto de levadura en 900 ml de agua destilada, se lleva a pH neutro. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el volumen a 1000 ml con agua destilada. Se esteriliza en autoclave.

Para preparar medios sólidos se agregan 15 g de agar por cada 1000 ml de medio líquido.

1-1) Antibióticos para cultivo de bacterias

Ampicilina: se disuelven 100 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Kanamicina: se disuelven 500 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

2) Medios para cultivo de células de insectos

TC-100 (JHR Biosciences) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina) y gentamicina (50 µg/ml).

Grace's (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, Buenos Aires, Argentina) y gentamicina (50 µg/ml).

Eventualmente se utilizó Anfotericina B (1,5 µg/ml).

2-1) Antifúngicos y Antibióticos para cultivo de células

Anfotericina B: se disuelven 2,5 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

Gentamicina: se disuelven 50 mg en 1 ml de agua bidestilada estéril. Se esteriliza por filtración. Esta solución se considera 1000x.

SOLUCIONES

Todas las soluciones preparadas se esterilizaron por tratamiento de calor en autoclave a 121°C durante 20 min a 1 atmósfera (Atm.) de sobre presión, con la excepción de la solución de Dodecil sulfato de sodio (SDS). Las soluciones de antibióticos y antifúngicos, medios de cultivo, albúmina sérica bovina (BSA), fueron esterilizadas por filtración (poro: 0,22 µm). Para la preparación de las soluciones se empleó agua bidestilada, la cual, además, fue filtrada por columna de intercambio iónico y esterilizada en autoclave.

Soluciones para la extracción de plásmidos

Buffer TE 1 X

Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

10% SDS

10 g de SDS en 100 ml de agua destilada. Se esteriliza por autoclavado a 121 °C. Se mantiene a temperatura ambiente.

Solución I

Glucosa	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM

Se esteriliza por filtración. Se mantiene a 4°C.

Solución II

NaOH	0,2 N
SDS	1%

La solución se prepara en el momento de uso, a partir de soluciones stock de NaOH 0,4N y SDS 2%.

Solución III

AcK 5 M, pH 4,8.

La solución es 5 M con respecto al acetato y 3 M con respecto al potasio.

Preparación de RNasa libre de DNasa

La RNasa-pancreática (RNasa A), se disuelve a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 15 mM NaCl. Se calienta 15 min a 100 °C y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se mantiene a -20°C.

NaAc 3 M

Se disuelven 408,1 g de AcNa en 800 ml de H₂O. Se ajusta el pH a 5,2 con ácido acético glacial, se ajusta el volumen a 1 litro y se esteriliza por autoclave.

Solventes Orgánicos

Etanol 96% y 70%. Se preparan por dilución en H₂O destilada o bidestilada, según su posterior aplicación.

Fenol (pH 8): cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 25:24:1 (V/V).

Cloroformo: alcohol isoamílico, en proporciones 24:1 (V/V).

El alcohol isoamílico no es esencial y se utiliza para mejorar la separación de fases.

PEG8000 13% (P/V) en H₂O bidestilada estéril. Se esteriliza por autoclave.

Soluciones para el análisis de ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de agarosa nativos

Gel: agarosa 0.8%- 1%- 1,5% y 2%. Esta solución contiene *buffer* TAE 1 X y bromuro de etidio 0,5 µg/µl.

Buffer de corrida TAE 1 X

Tris-Acetato 40 mM

EDTA 1 mM

El TAE se prepara como solución concentrada **50 X**: 242 g Tris base; 57,1 ml ácido acético glacial y 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) por litro de solución.

Bromuro de etidio

Se prepara una solución concentrada hasta 20 mg/ml de bromuro de etidio en H₂O y se mantiene a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. Esta solución se debe manejar con precaución extrema debido al alto poder mutagénico del BrEt.

Solución para siembra de muestras

TAE 1 X, glicerol 30% y colorantes: 0,25% xylene cyanol FF, 0,25% azul de bromofenol.

Buffer fosfato salino PBS 10 X (POR LITRO): KCl 2 g, PO₄H₂K 2,4 g, NaCl 80 g, PO₄HNa₂ 14,4 g. Se esteriliza por autoclave.

Soluciones para el análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS**Geles de poliacrilamida Tris-glicina-SDS**

Gel separador: 18, 12, ó 10% dependiendo del experimento. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (29:1) diluyendo en *buffer* de separación 1 X: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente.

Gel concentrador: 5%. El gel se prepara a partir de una solución concentrada de acrilamida:bisacrilamida (30;0,8) diluyendo en *buffer* concentrador 1 X: 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS. Se agrega además persulfato de amonio y TEMED al 0,1 y 0,01%, respectivamente.

Buffer de corrida 1 X

Tris base 25 mM

glicina pH 8,3 250 mM

SDS 0,1%

Solución para siembra de muestras 4 X

Tris-HCl pH 6,8 200 mM

glicerol 40,0%

SDS 8,0%

β-mercaptoetanol 8,0%

azul de bromofenol 0,4%

Solución de tinción

Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25% p/v
metanol	45% v/v
ácido acético	10% v/v

Se lleva a 100 ml con H₂O.

Solución de destinción

etanol	30% v/v
ácido acético	10% v/v

Soluciones para tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata

Solución de fijación 1: ácido acético glacial 10% (v/v), metanol 40%, en agua bidestilada.

Solución de fijación 2: ácido acético glacial 5% (v/v), metanol 10%, en agua bidestilada.

Solución oxidante (10X): se prepara con H₂O bidestilada (Bio-Rad Silver stain oxidizer).

Agente de plata (10X): se prepara con H₂O bidestilada (Bio-Rad Silver reagent).

Developer: 32g en 1000 ml de H₂O bidestilada (Bio-Rad silver satin Developer).

Solución de stop: ácido acético glacial 5% (v/v) en H₂O bidestilada.

Digestión con endonucleasas

Las distintas reacciones de digestión se llevaron a cabo incubando el DNA a digerir con la enzima correspondiente, teniendo en cuenta la actividad de la enzima y utilizando el *buffer* de digestión, la cantidad de enzima y el tiempo de incubación recomendados por el proveedor.

Métodos

Técnicas que involucran DNA

Bacterias y vectores empleados

Para los clones generados en el vector pZErO-2TM (Invitrogen) y el resto de las construcciones utilizadas, salvo las que contienen el sistema de selección positiva basado en el *ccdB*, se emplearon las bacterias *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, CA) o bacterias *E. coli* DH-5 α . Los vectores que contienen el gen *ccdB* fueron propagados en bacterias DB3.1 (Invitrogen, CA).

Preparación de DNA plasmídico

La purificación de DNA plasmídico se efectuó por el método de lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979).

Método de lisis alcalina

Se crecieron bacterias *E. coli* (DH-5 α o TOP10) en medio LB hasta saturación con el antibiótico correspondiente. Se centrifugó 1 ml de estos cultivos a 14000-18000 x g durante 1 min en un tubo *Eppendorf* y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces sobre el mismo *Eppendorf*. Se añadieron 100 μ l de Solución I al sedimento obtenido y se lo resuspendió con *vortex*. Se centrifugó nuevamente a 14000-18000 x g durante 1 min y se retiró el sobrenadante. El sedimento lavado de esta manera se resuspendió en 200 μ l de Solución I, se agregó 150 μ l de Solución II. Después se invirtió suavemente el tubo 5 a 10 veces o hasta observar la clarificación de la suspensión y se incubó en agua-hielo durante 5 min. Luego se neutralizó el pH con 150 μ l de Solución III (a 4 °C) y se incubó durante 10 min en agua-hielo. El tubo *Eppendorf* se centrifugó 5 min a 14.000-18.000 x g a 4 °C y se extrajo el sobrenadante (DNA plasmídico) tratando de no tomar el precipitado de DNA cromosómico, restos celulares y

proteínas acomplejadas con el SDS. Los RNA celulares de esta solución se degradaron por incubación con RNAsa A (20 µg/ml) durante 30 min a 37 °C. EL DNA plasmídico se aisló de las proteínas por extracción con un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y se concentró por precipitación etanólica o con isopropanol.

Extracción fenólica

Este método se empleó para separar proteínas de soluciones de ácidos nucleicos de preparaciones de viriones de AgMNPV tratados con proteinasa K. El DNA se extrajo con un volumen de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) para eliminar proteínas. Una vez añadida la solución orgánica al tubo, se mezcló suavemente por inversión durante 10 min y se centrifugó durante 5 min a 14-18000 x g y se tomó la fase acuosa tratando de no extraer material de la interfase. El procedimiento se repitió con cloroformo-isoamílico (24:1).

Precipitación de ácidos nucleicos

Los DNA virales fueron precipitados mediante la adición de 0,1 volúmenes (vol) de AcNa 3 M más 2,5 volúmenes de etanol 96°. Alternativamente, se precipitaron los DNA por adición de 0,3 vol de AcNa 3 M más 0,6-0,9 volúmenes de alcohol isopropílico. En cualquiera de los dos protocolos, las soluciones fueron incubadas a -20 °C toda la noche y centrifugadas a 14.000 x g y 4 °C durante 30 min. Las sales fueron lavadas con solución de etanol 70%, preparado con agua bidestilada estéril. El sedimento se secó a temperatura ambiente. El DNA se resuspendió en agua bidestilada estéril.

Electroforesis en geles de agarosa

Se pesó agarosa en un frasco de vidrio, se añadió *buffer* TAE (con Bret 0,5 µg/ml) y se calentó en horno microondas hasta disolución de la agarosa en el *buffer*. Una vez que la agarosa se enfrió, pero aún se encontraba en estado líquido, se colocó un volumen conveniente sobre un molde acrílico con un peine para generar calles de siembra de muestra. Una vez gelificada la agarosa, el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se lo cubrió con *buffer* TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con *buffer* de muestra en una relación *buffer*/muestra correspondiente y se depositaron dentro de las calles del gel. Los DNA se resolvieron en geles de agarosa aplicando un voltaje entre 80-120 V en caso que los tamaños de los fragmentos fueran pequeños ó de 50-70 V para fragmentos grandes y porcentajes de geles bajos (0,3-0,6%). Los geles de agarosa se resolvieron en aparatos BIO-RAD. Los DNA se visualizaron por iluminación con transiluminadores de luz ultravioleta de 310 nm (Fotodyne, EE.UU. o Stratagen, EE.UU.) y las imágenes se capturaron con un aparato de documentación de geles Electrophoresis Documentation and Analysis System 120 (Kodak Digital Science).

Cálculo de peso de fragmentos de DNA

Los tamaños de los fragmentos de restricción obtenidos a partir del DNA de AgMNPV, de las digestiones de plásmidos o como productos de amplificación, se calcularon por comparación con patrones de peso molecular (PBL, UNQ).

Purificación de fragmentos de DNA por adsorción de DNA a polvo de sílice

Los fragmentos de DNA o de productos de amplificación, se purificaron a partir de geles de agarosa por adsorción a polvo de sílice (Geneclean Bio 101 Inc.). Se extrajo la porción del gel conteniendo la banda de interés y se incubó en 500 µl de NaI saturado durante 5 min a 60 °C. Posteriormente, se resuspendió en 5 µl de polvo de sílice y se incubó con agitación constante durante 5 min. La solución fue centrifugada durante 10 segundos a 14-18.000 X g. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue lavado con 700 µl de solución New Wash (NaCl, etanol y agua), este paso se repitió 3 veces. Este precipitado fue secado durante 5 min a 60 °C y luego resuspendido en 10 µl de agua bidestilada. Se centrifugó 30 seg a 14-18.000 X g y el sobrenadante conteniendo el DNA de interés se transfirió a otro tubo que fue conservado a -20 °C hasta su uso.

Purificación de fragmentos de DNA por filtrado a través de lana de vidrio

La lana de vidrio se colocó en un tubo *Eppendorf* de 500 μ l al cual se le había perforado el fondo. Este *Eppendorf* se colocó dentro de otro *Eppendorf* de 1,5 ml. El taco de agarosa, conteniendo el fragmento de interés, se colocó sobre la lana de vidrio del *Eppendorf* más pequeño. Se centrifugó a 14000 x g durante 1 min. Al filtrado se le agregaron 0,2 vol de CILi (4M) y 3 vol de etanol 96%. La muestra se homogeneizó por agitación y se colocó durante 30 min a -80°C . Luego se centrifugó durante 30 min a 14-18000 X g y 4°C . Se lavó con etanol al 70%. El *pellet* se secó a 60°C durante 5 min y se resuspendió en agua bidestilada.

Condiciones de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación de los ácidos nucleicos se realizaron principalmente en un ciclador térmico *Eppendorf* (Mastercycler Gradient) y algunas veces en un ciclador Perkin Elmer. En las reacciones en las que se iba a utilizar el producto de amplificación para clonación, se utilizó la Platinum Pfx DNA Polimerasa con actividad *proof-reading* (Promega). En estas reacciones se usó el *buffer* de esta enzima 1 X; 1 mM MgSO_4 ; 0,25 mM de cada dNTP; 1 μ M de los *primers* correspondientes (indicados en las tablas de cada capítulo); 0,5 U de la Platinum Pfx DNA Polimerasa y aproximadamente 0,1 a 0,3 ng de DNA molde (DNA de diferentes plásmidos), en un volumen final de 10 μ l. Cuando los productos de amplificación no se iban a utilizar para clonado, se usó *buffer* de *Taq* Polimerasa 1 X; 2 mM MgCl_2 ; 0,25 mM de cada dNTP; 1 μ M de los *primers* correspondientes (Tablas en cada capítulo); 1 U de la enzima *Taq* Polimerasa y aproximadamente 0,1 a 0,3 ng de DNA molde, en un volumen final de 10 μ l.

Clonado

Preparación de bacterias *E. coli* electrocompetentes

Se crecieron bacterias *E. coli* TOP 10 o las cepas *E. coli* DH 5 α o DB3.1 hasta saturación. Ese cultivo se diluyó 1/100 en medio LB sin NaCl (1.000 ml) y se cultivó a 37°C con agitación de 180-220 rpm hasta alcanzar 0,5 a 0,6 unidades de densidad óptica a 600 nm. En este punto, el cultivo se enfrió en agua hielo durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a 3000 X g durante 10-15 min a 4°C y el sedimento de bacterias se resuspendió en 1000 ml de glicerol 10% (v/v) preparado en agua bidestilada estéril. El proceso de resuspensión y centrifugación se repitió dos veces, disminuyendo el volumen de glicerol utilizado en los lavados, empleando 200 y 50 ml de glicerol 10% (v/v) en los lavados siguientes. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de glicerol 10%, se separaron en alícuotas y se congelaron rápidamente a -80°C ó a -135°C hasta el momento de su uso.

Alternativamente, se utilizó la misma metodología y se usó para los lavados agua bidestilada en lugar de glicerol 10%.

Clonado de productos de PCR

Los diversos productos de amplificación fueron purificados. Luego se los ligó alternativamente al vector pZerOTM-2 (Invitrogen) previamente linealizado por digestión con *EcoRV*, o al vector pGEMT-easy (Promega). En otras construcciones los fragmentos purificados y los vectores utilizados fueron digeridos con las enzimas correspondientes. Las reacciones de ligación se realizaron utilizando *buffer* de la enzima DNA ligasa del bacteriófago T4 1 X; 1.5 a 5 unidades de la enzima T4 DNA ligasa (USB) y una relación molar de inserto:vector variable de acuerdo al caso, pero que generalmente se encontraba entre los límites 10:1 y 50:1. Las mezclas se incubaron a 16°C 30 min o toda la noche, dependiendo del vector utilizado. Estas ligaciones se utilizaron para electrotransformar bacterias competentes TOP 10 (Invitrogen), DH 5 α o DB3.1, de acuerdo al ensayo. Las bacterias transformadas fueron plaqueadas en medio LB sólido conteniendo 100 μ g/ml de kanamicina o ampicilina, dependiendo del vector, para la selección de recombinantes. Las placas fueron incubadas durante toda la noche a 37°C .

Transformación de *E. coli* por electroporación

La transformación de bacterias electrocompetentes se realizó en un electroporador Gene Pulser TM (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). Se mezclaron 50 a 100 μ l de bacterias electrocompetentes con 5 μ l de las reacciones de ligación y se incubaron 2 min en hielo. Esta mezcla se colocó en una cubeta de electroporación fría de 0,2 cm de distancia entre los electrodos y la mezcla se sometió a un pulso de 2,2 kV. Las variables capacitancia y resistencia se fijaron en 25 μ F y 200 ohm (Ω), respectivamente. Posteriormente, se añadieron 500 μ l de medio LB sin antibiótico a las bacterias y se las incubó 1 h a 37 °C con agitación. Se sembraron 200 y 300 μ l de cultivo en placas de LB con el agregado de antibiótico de selección (Ampicilina 100 μ g/ml o Kanamicina 100 μ g/ml, según corresponda). Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C.

El sistema de clonado en pZErO-2TM/*E. coli* TOP 10, posee la ventaja de minimizar la obtención de colonias no recombinantes debido a la presencia de un gen letal para *E. coli*. Contiene el gen letal *ccdB* fusionado al C-terminal de la proteína LacZ. La inserción de DNA foráneo impide la expresión del gen de fusión *lacZ α -ccdB*, permitiendo el crecimiento de las bacterias recombinantes.

Colony PCR

Con palillos estériles se tomaron las colonias resultantes de las diferentes transformaciones y cada una se depositó en un tubo *ependorf* de 0,5 ml. El material remanente en el palillo se utilizó para realizar una estria en medio selectivo LB-agar con Kanamicina (100 μ g/ml) o Ampicilina (100 μ g/ml). Las bacterias depositadas en el tubo se resuspendieron en 10 μ l de agua bidestilada y se hirvieron durante diez minutos. Posteriormente, cada tubo se centrifugó a 14-18.000 X g durante 10 min. Las reacciones de amplificación se realizaron en las condiciones descritas anteriormente, utilizando 1 μ l del sobrenadante como molde en 10 μ l de volumen final y empleando los *primers* correspondientes. Las colonias que presentaron una señal positiva por PCR fueron cultivadas en medio líquido a partir de la estria correspondiente. Posteriormente se purificaron sus plásmidos y se los analizó por digestión con endonucleasas de restricción.

Secuenciamiento

El secuenciamiento nucleotídico se realizó mediante el método dideoxi, utilizando, un secuenciador automático ABI 377 (Applied Biosystems) del servicio de secuencias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Castelar). Los cromatogramas se visualizaron con el programa Chromas 1.51 (Technelysium, Pty. Ltd., Queensland, Australia) o ContigExpress (Vector NTI 10.0.1, Invitrogen).

Titulación por ensayo de placas

Las titulaciones de los *stocks* virales se realizaron en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro, utilizando células UFLAg-286. En cada placa se sembraron $1,5 \times 10^6$ células y se incubaron ON para permitir su adhesión. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo y se infectó cada una con 700 μ l de diferentes diluciones seriadas del inóculo viral. Se dejó 1 h a temperatura ambiente para favorecer la adsorción, con rotación suave para impedir que se seque la monocapa. Luego se retiró el inóculo viral y se agregaron 4 ml (por caja de cultivo) de una preparación agarosa/TC100 (1,5% final agarosa Sea Plaque, FMC Bioproducts, ME, USA y TC100 0,5X). Una vez solidificado este *overlay* o capa, se agregaron 2 ml de TC100 completo por caja, para impedir que se sequen, y se incubaron a 28 °C. Al sexto día se realizó la tinción con rojo neutro (RN) (O'Reilly *et al*, 1992). Para esto, se retiró el medio líquido de caja y, sobre el primer *overlay*, se agregaron 2 ml de una preparación agarosa + RN + TC100 (1,5% final agarosa Sea Plaque, RN 2 mg/ml final, TC100 0,5X). Nuevamente se incubó a 28 °C. Al séptimo día se visualizaron las placas de lisis (blancas). Alternativamente, cuando se utilizó el virus AgMNPV-*I-Ppol*, se agregó al segundo *overlay* 120 μ g/ml de X-*gal*.

