

Caracterización de baculovirus autóctonos para el control de la oruga militar tardía (*Spodoptera frugiperda*)

Tomás Masson

Dirección: Prof. Dr Víctor Romanowski y Dra María Leticia Ferrelli



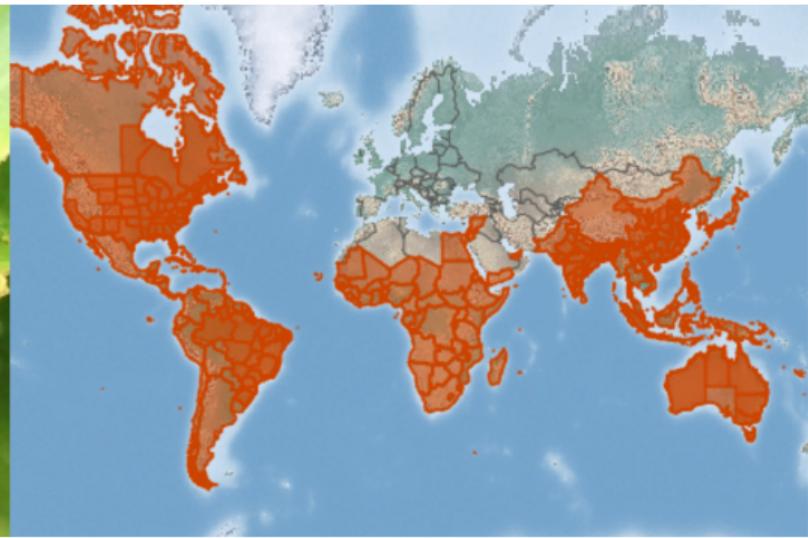
13 de agosto, 2021



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Introducción

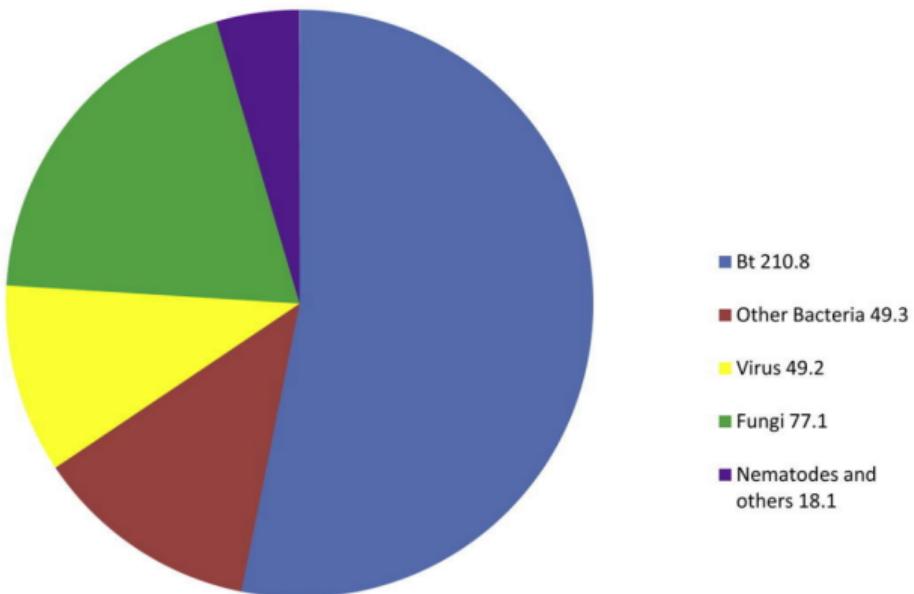
El cogollero del maíz, también conocido como oruga militar tardía, provoca enormes pérdidas agrícolas a nivel mundial



S. frugiperda genera pérdidas por US\$2000 millones en África (estimaciones del CABI, Centre for Agriculture and Biosciences International)

Existen diversas herramientas para el control de *S. frugiperda*

Ventas en biopesticidas para el año 2010 (millones de US\$)



CPL Business Consultants (2010) The 2010 Worldwide Biopesticides Market Summary,
CAB International Centre. Wallinford

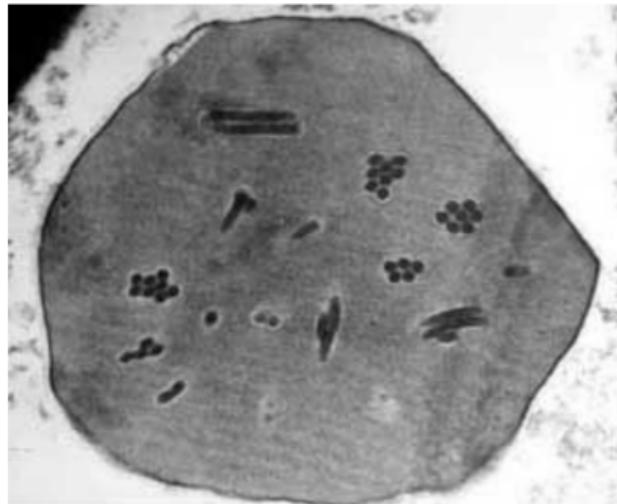
Los baculovirus pueden aplicarse como pesticidas biológicos específicos de lepidópteros

- ▶ Genoma circular a DNA con un tamaño de 80 a 200 kpb
- ▶ Codifican entre 60 y 180 genes
- ▶ Rango de hospedador estrecho
- ▶ Potencial como biopesticidas para el control de diversas plagas

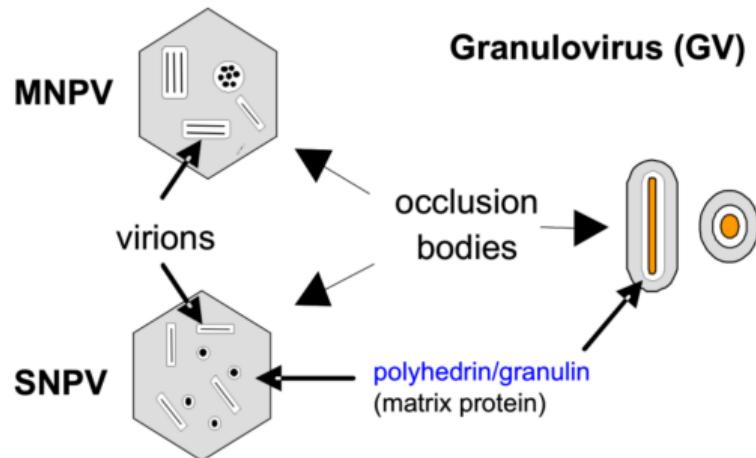


Se han descripto diversos baculovirus capaces que infectar a *S. frugiperda* (SfMNPV y SfGV)

Los cuerpos de oclusión (OB) de los baculovirus les confieren estabilidad frente a los factores ambientales

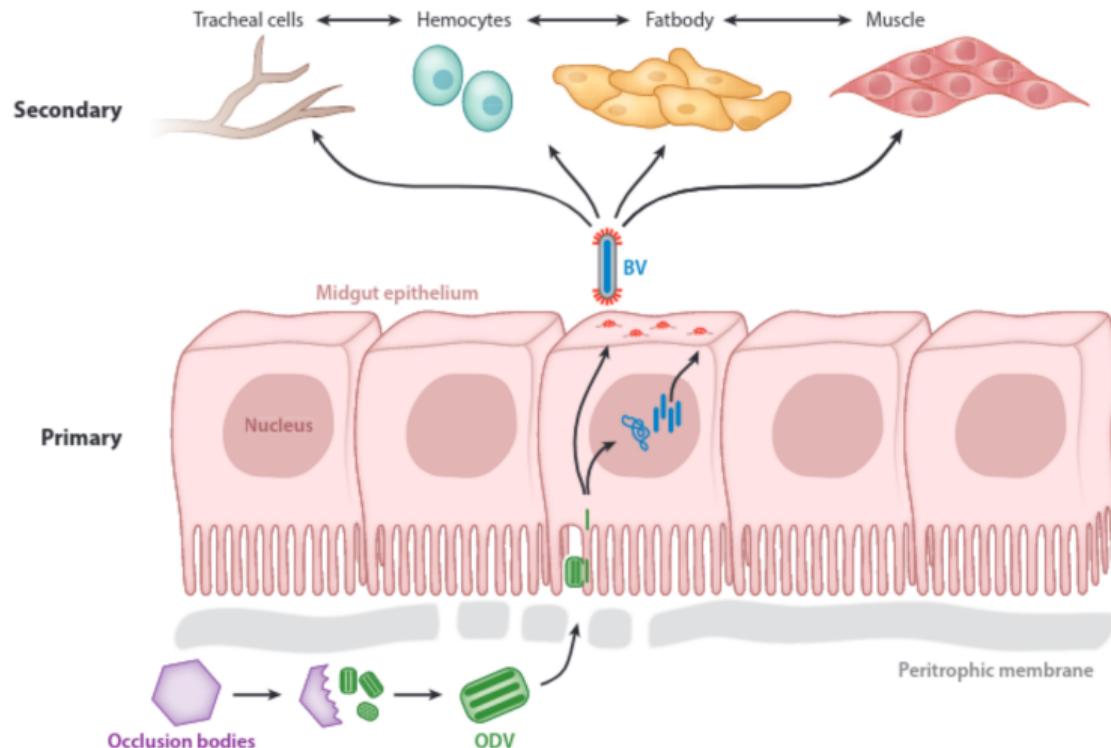


Nucleopolyhedrovirus (NPV)

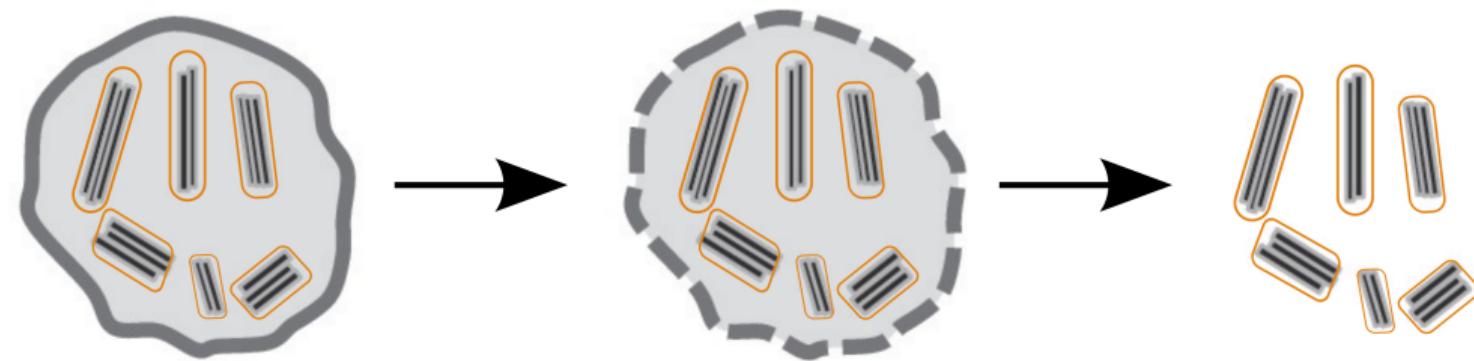


van Oers and Vlak 2007

El ciclo infectivo de los baculovirus involucra la entrada a través del epitelio intestinal y la posterior dispersión dentro del hospedador



La partícula infectiva en los Nucleopoliedrovirus se compone de múltiples genotipos virales

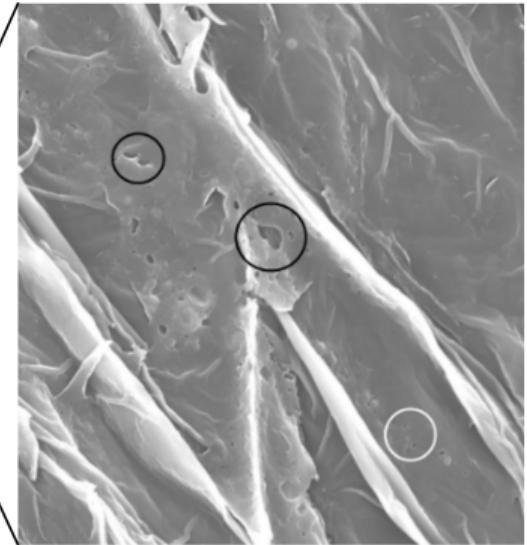
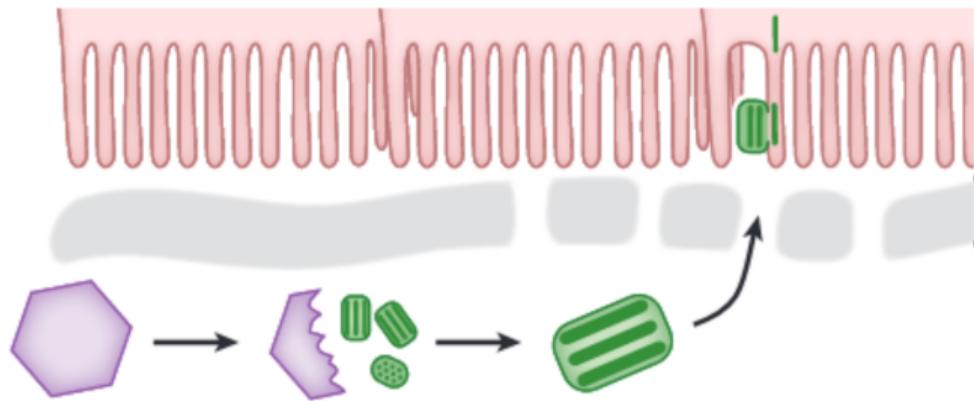


Cuerpo de oclusión
(medioambiente)

Liberación de los ODV
(intestino larval)

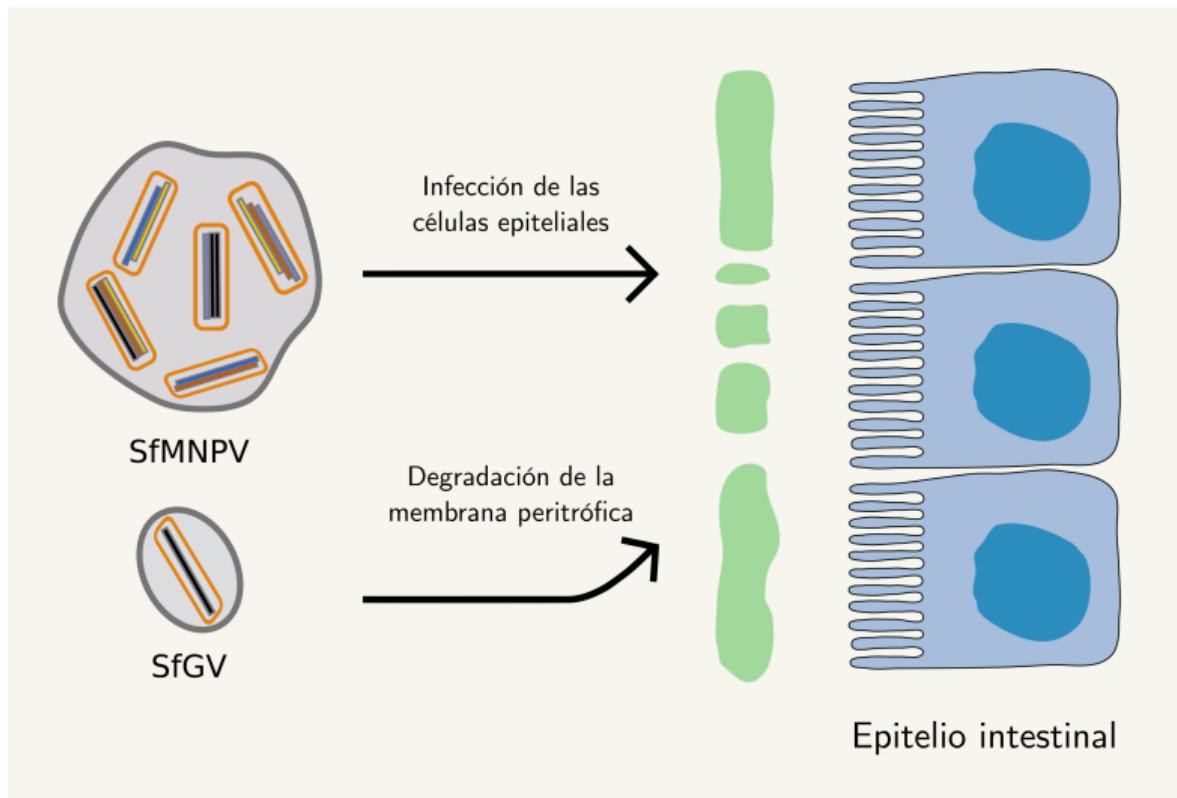
Unidades infectivas
(múltiples genotipos)

Los OB de los Granulovirus contienen proteínas capaces de potenciar la infectividad oral de los Nucleopoliedrovirus



Cuartas-Otalora *et al.* 2019

La combinación de un Nucleopoliedrovirus y un Granulovirus específicos para *S. frugiperda* podría resultar en biopesticidas más eficaces

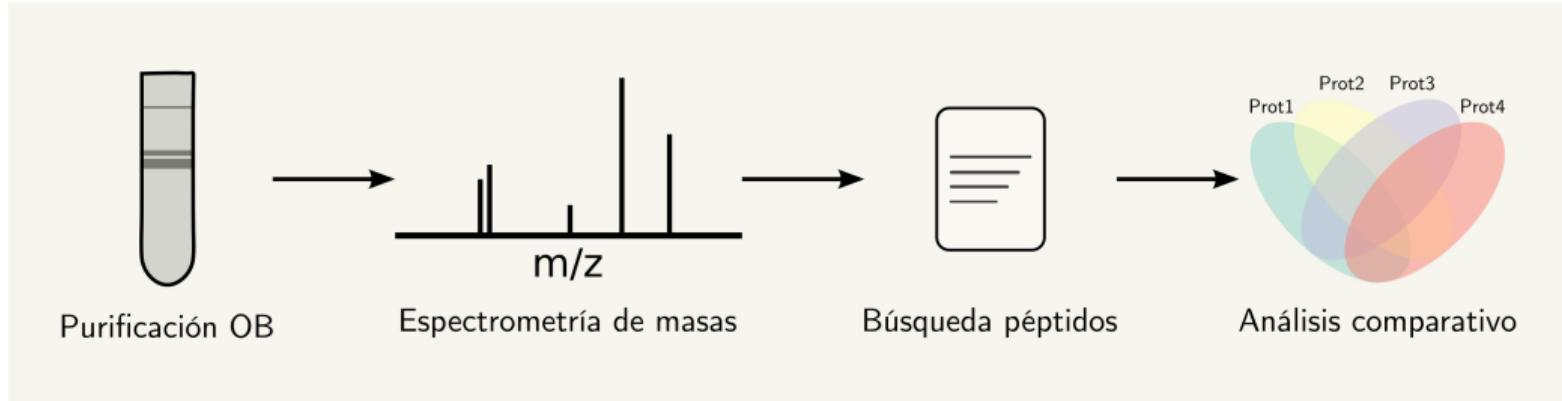


Estudiar los aspectos moleculares que contribuyen a la efectividad de las formulaciones mixtas (SfMNPV/SfGV) frente a *S. frugiperda*

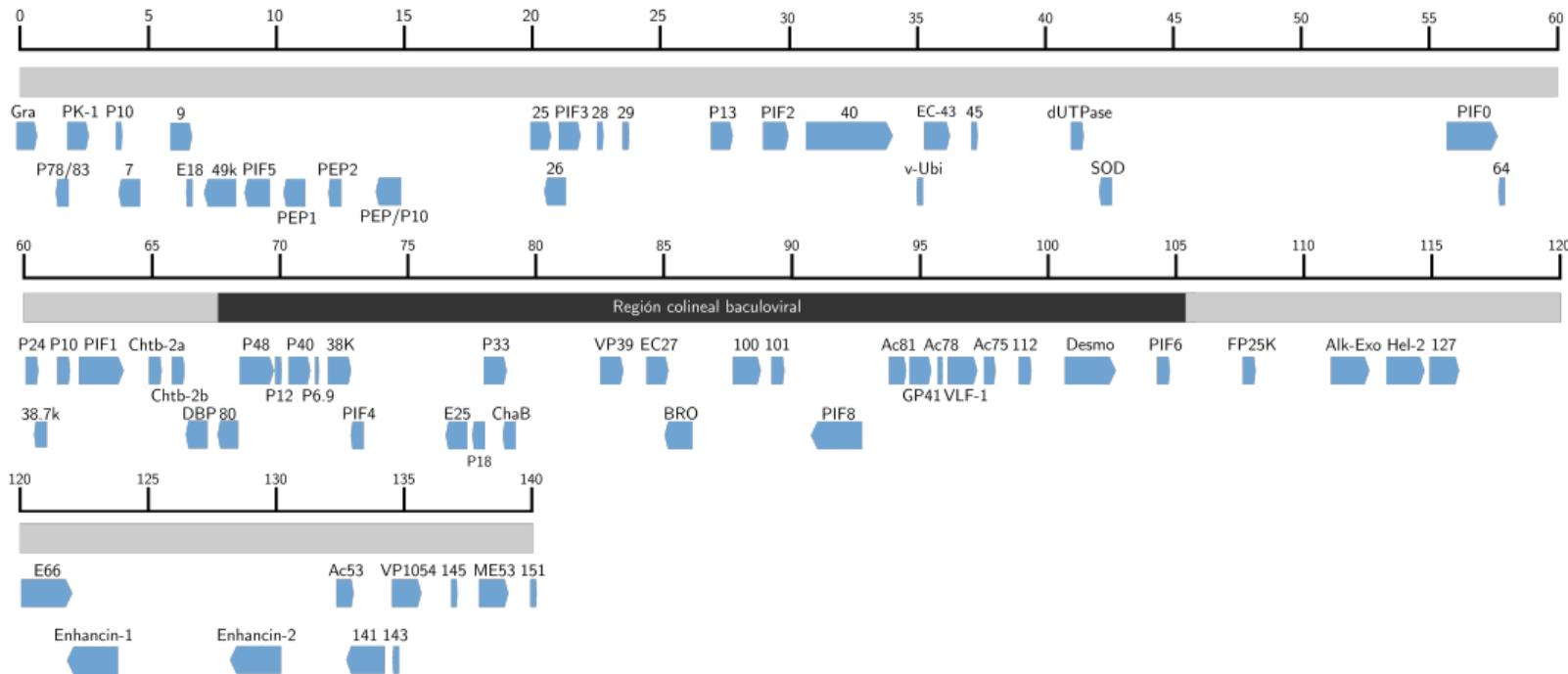
- ▶ Caracterizar los componentes proteicos conservados en los OB de granulovirus
- ▶ Investigar la diversidad genética presente en un aislamiento argentino de SfMNPV
- ▶ Evaluar la posibilidad de producir OB de SfGV mediante cultivo celular

Estudio de la composición proteica de los cuerpos de oclusión de SfGV y EpapGV

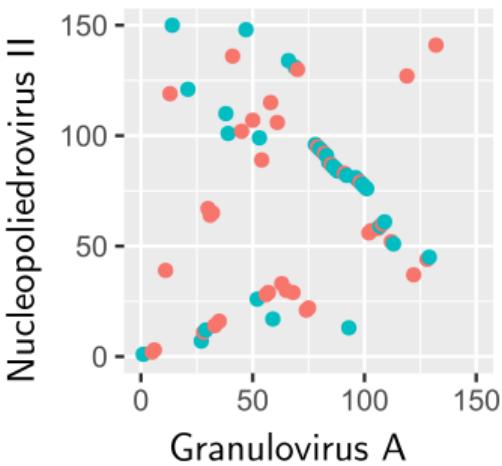
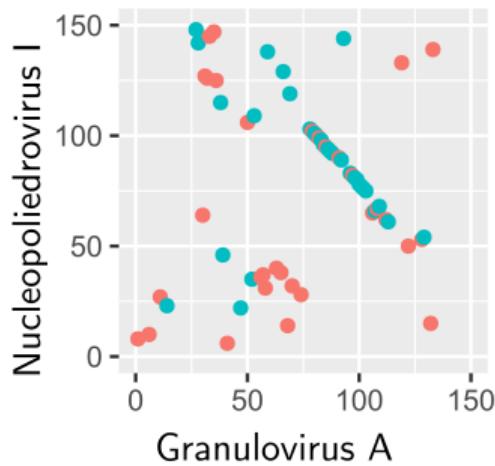
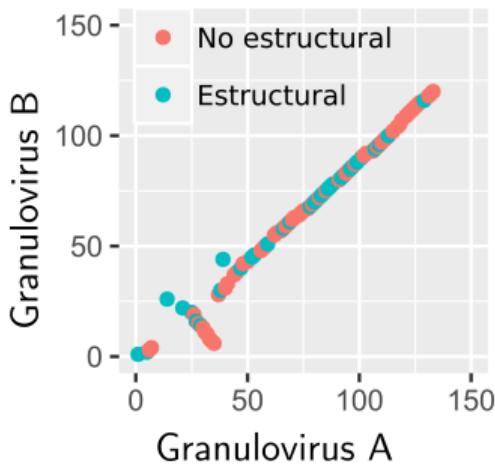
Metodología experimental para el estudio del proteoma de granulovirus



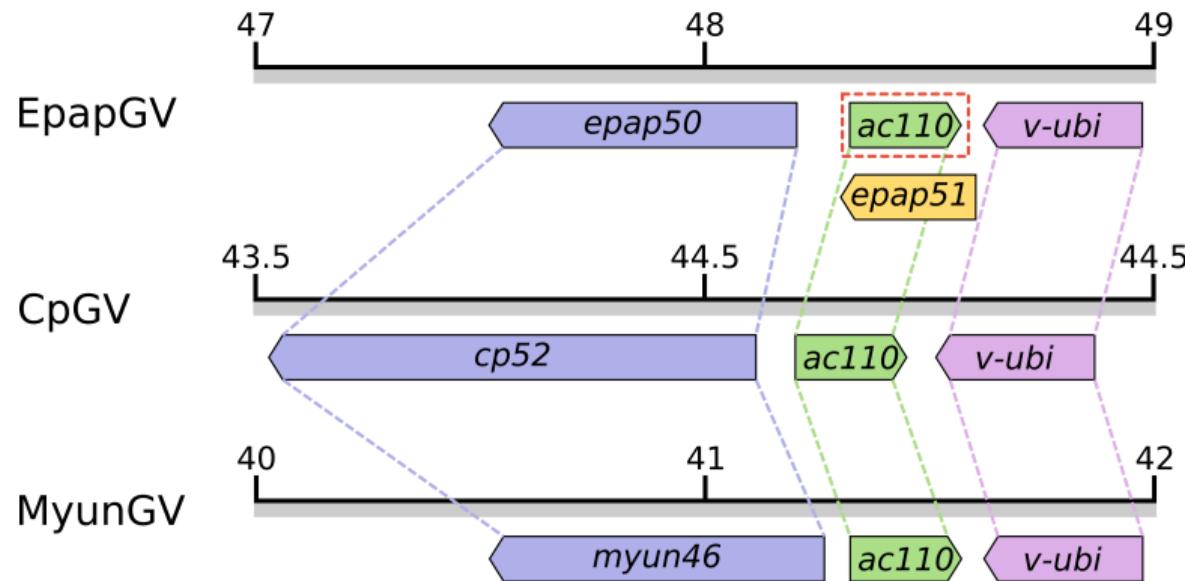
Los OB de ganulovirus incorporan un gran número de proteínas “no estructurales”



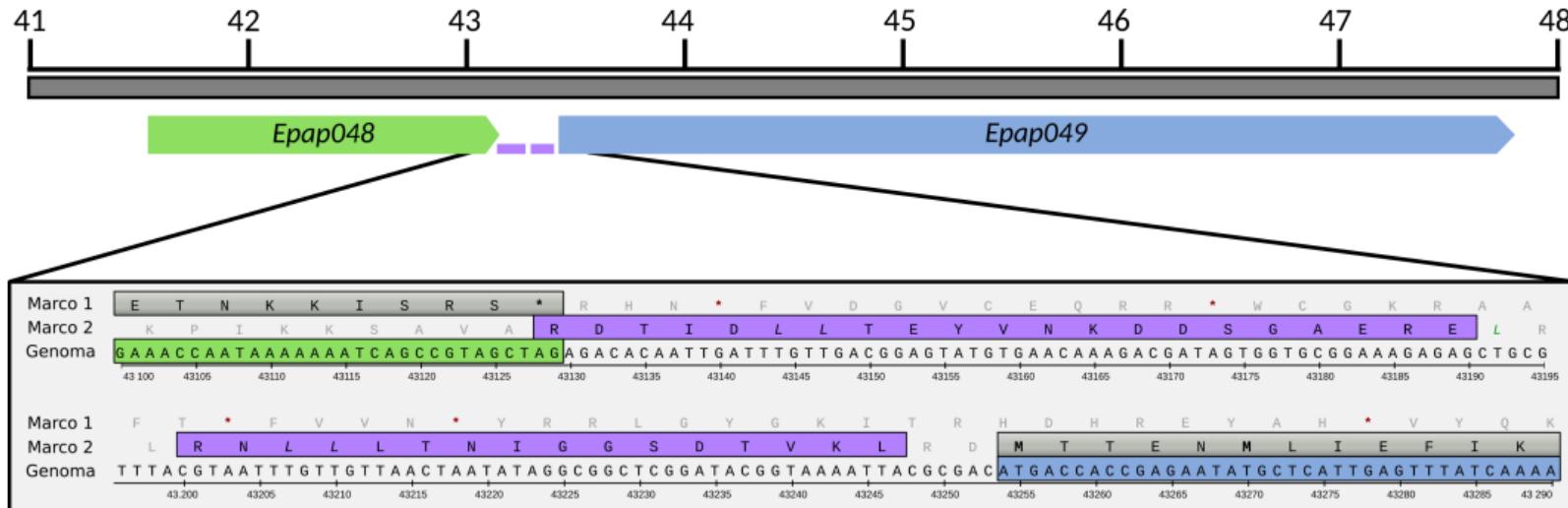
Una región genómica densamente poblada con genes estructurales está conservada en los genomas de NPV y GV



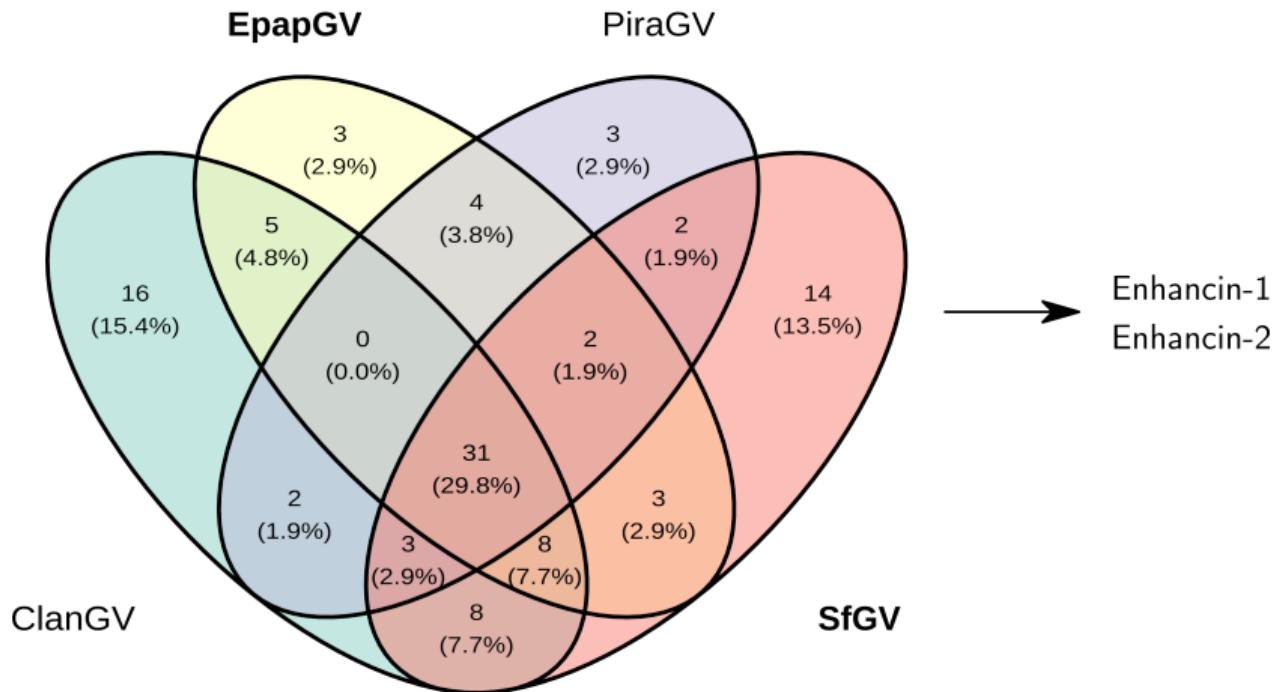
Mediante una búsqueda proteogenómica se identificó un homólogo del *core gene ac-110* presente en EpapGV



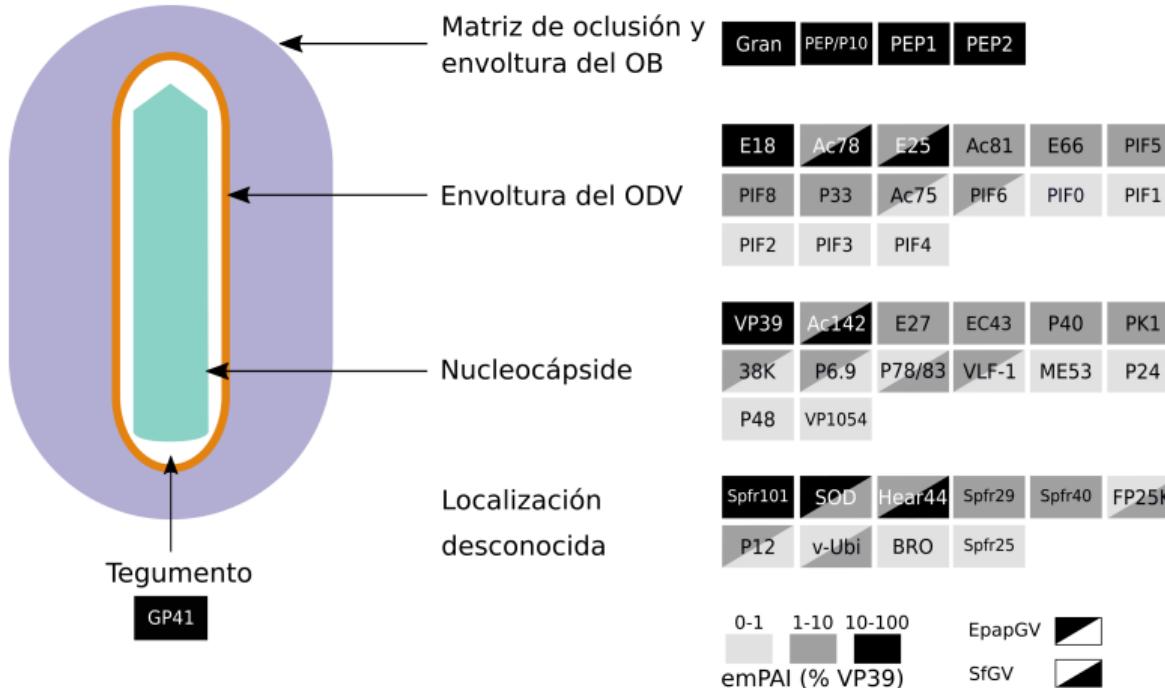
Los datos espectrales proveen evidencia de una posible proteína de fusión Epap48-Epap49



Los OB de los granulovirus presentan un grupo de proteínas estructurales conservadas

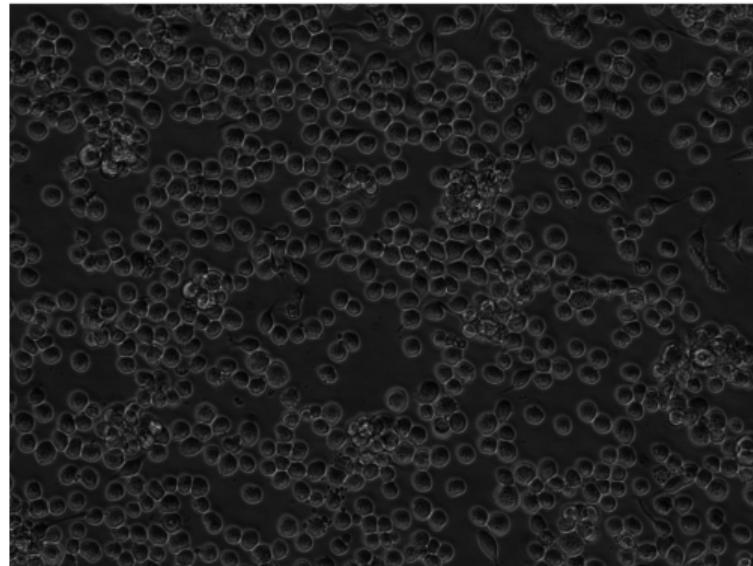


A partir de los datos de abundancia de MS se construyó un modelo semi-cuantitativo del proteoma del OB de granulovirus

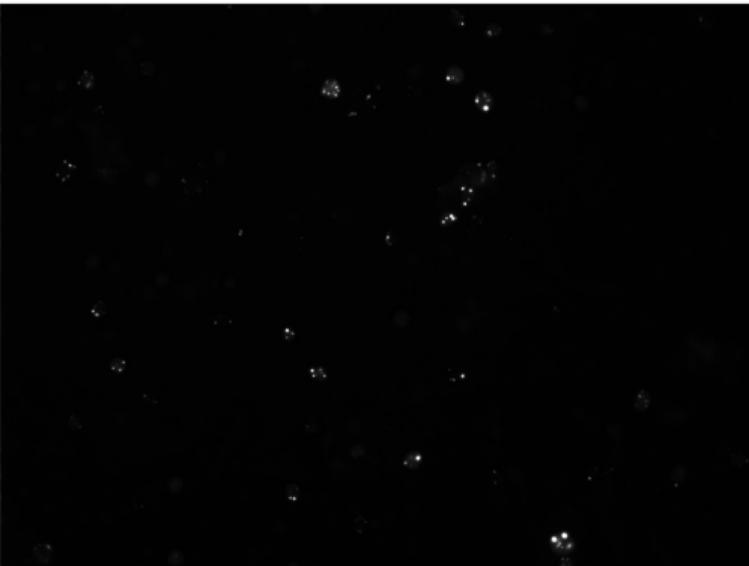


Spfr101, uno de los componentes mayoritario del OB de SfGV, forma agregados en cultivo celular

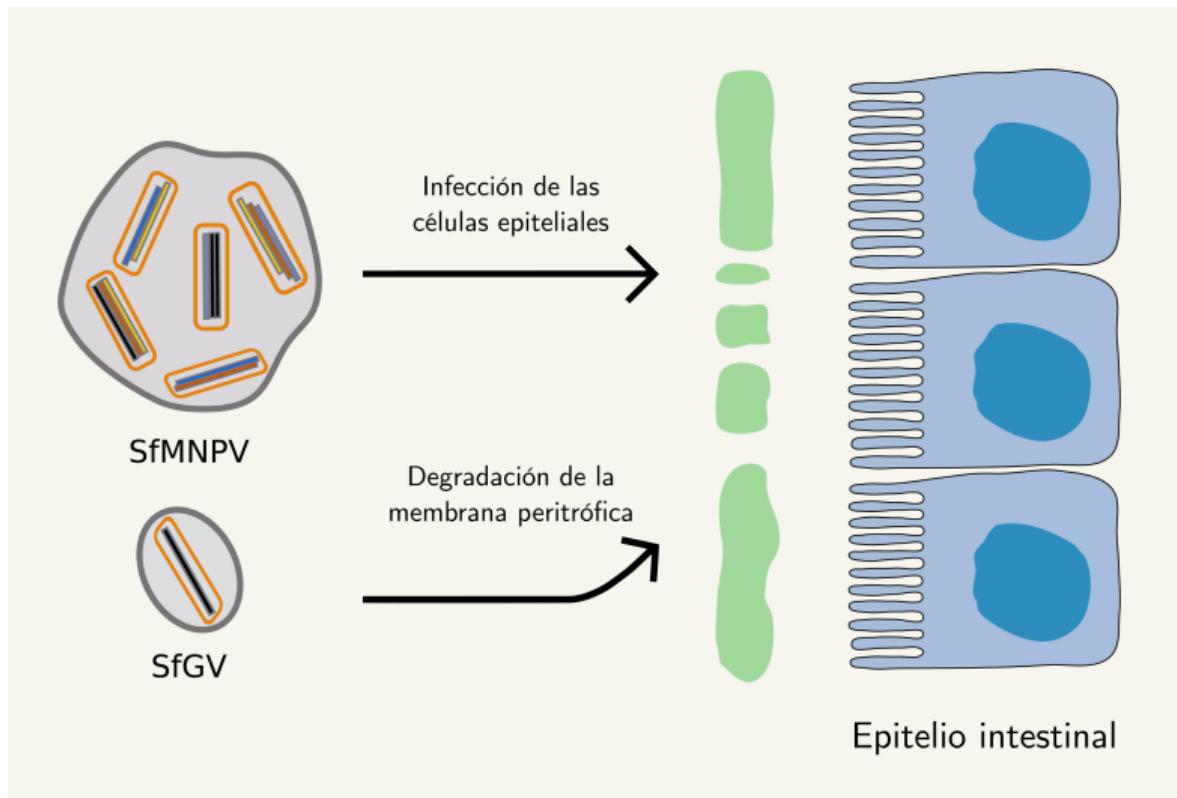
Campo claro



Spfr101::eGFP

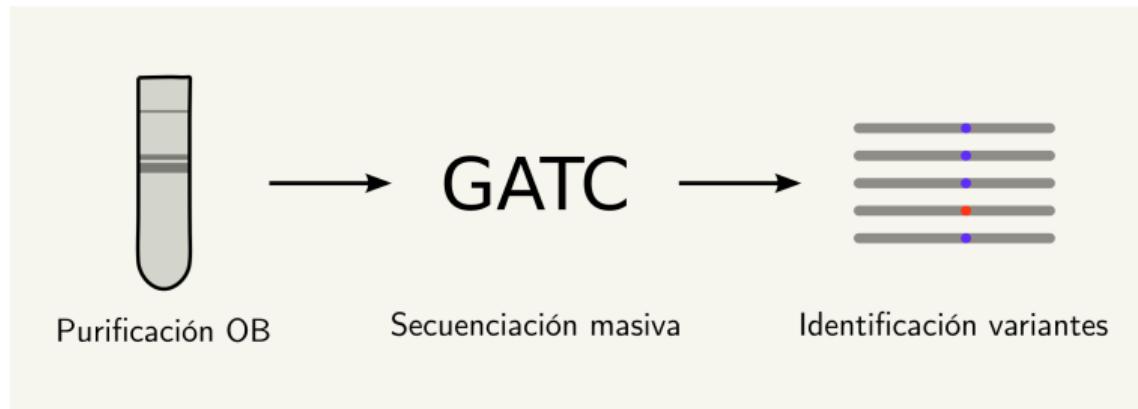


Los OB de granulovirus presentan un repertorio de proteínas amplio y dinámico

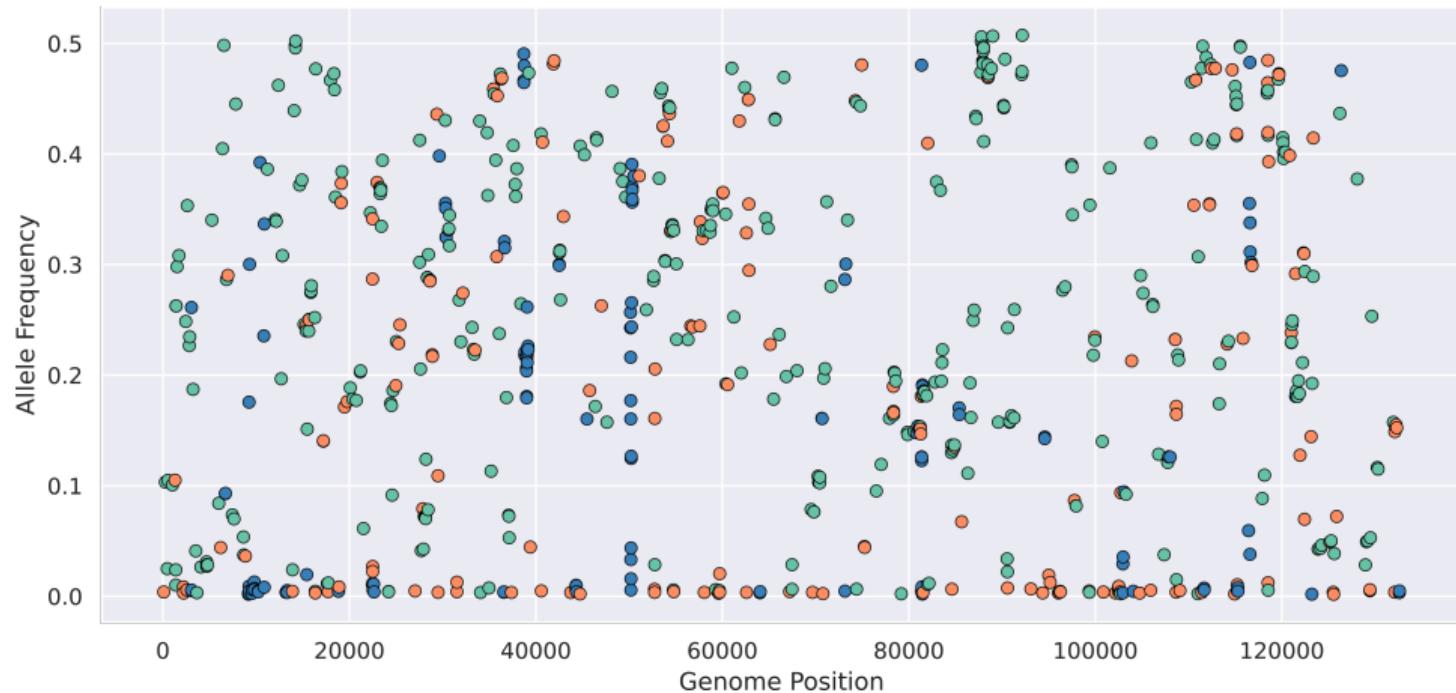


Diversidad genómica en una población de SfMNPV

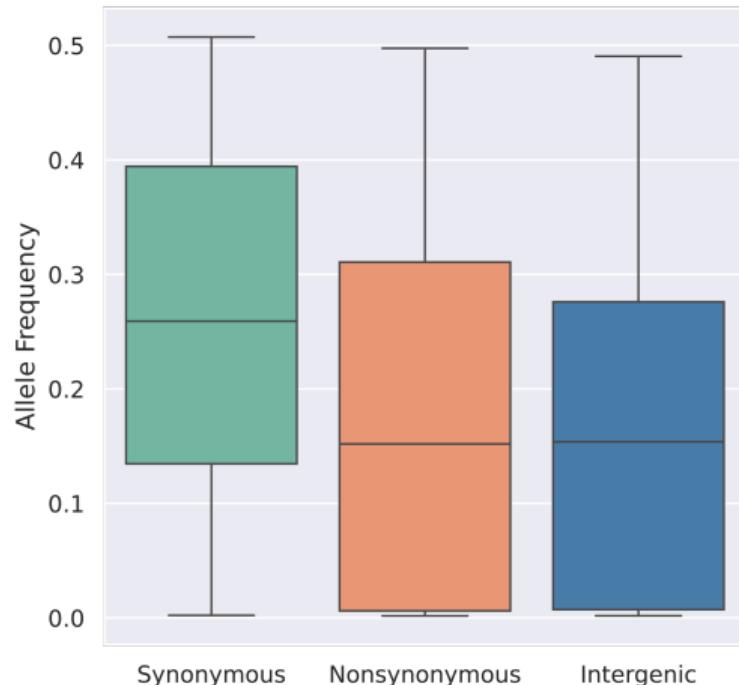
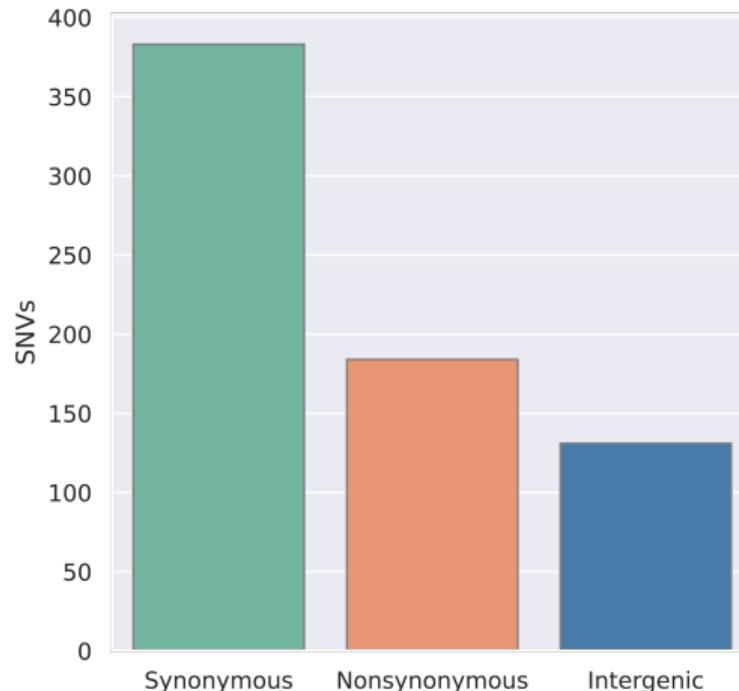
Metodología experimental para el estudio de la diversidad genética dentro de SfMNPV-M



El aislamiento argentino SfMNPV-M presenta niveles apreciables de diversidad genética



Los polimorfismos puntuales muestran distintas frecuencias alélicas de acuerdo a su impacto en las secuencias codificantes

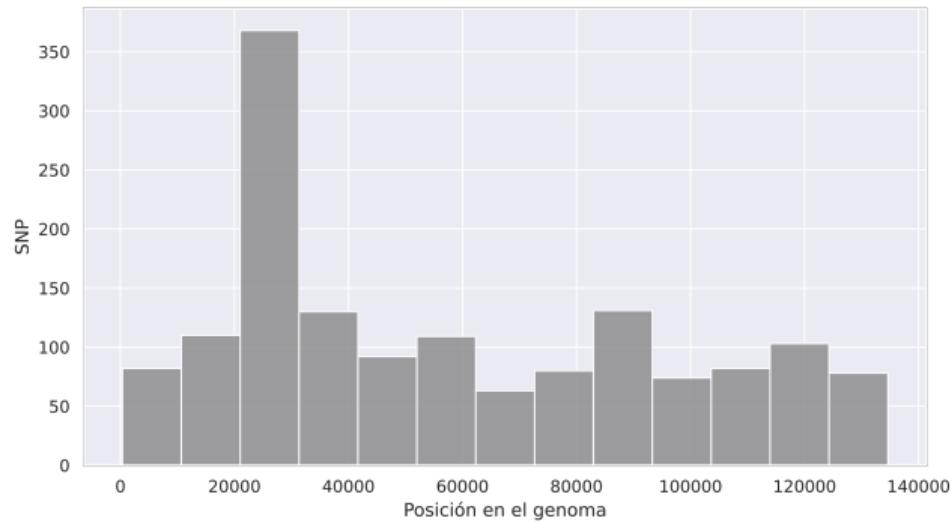
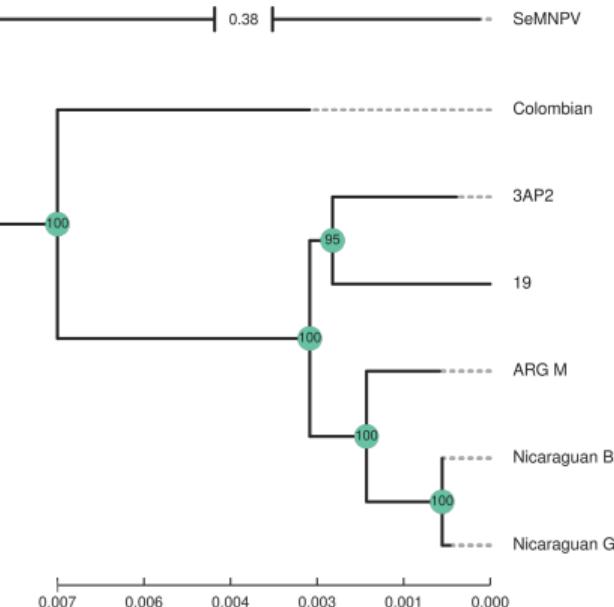


Sumado a las mutaciones puntuales, también se detectaron variantes estructurales en el aislamiento de SfMNPV-M

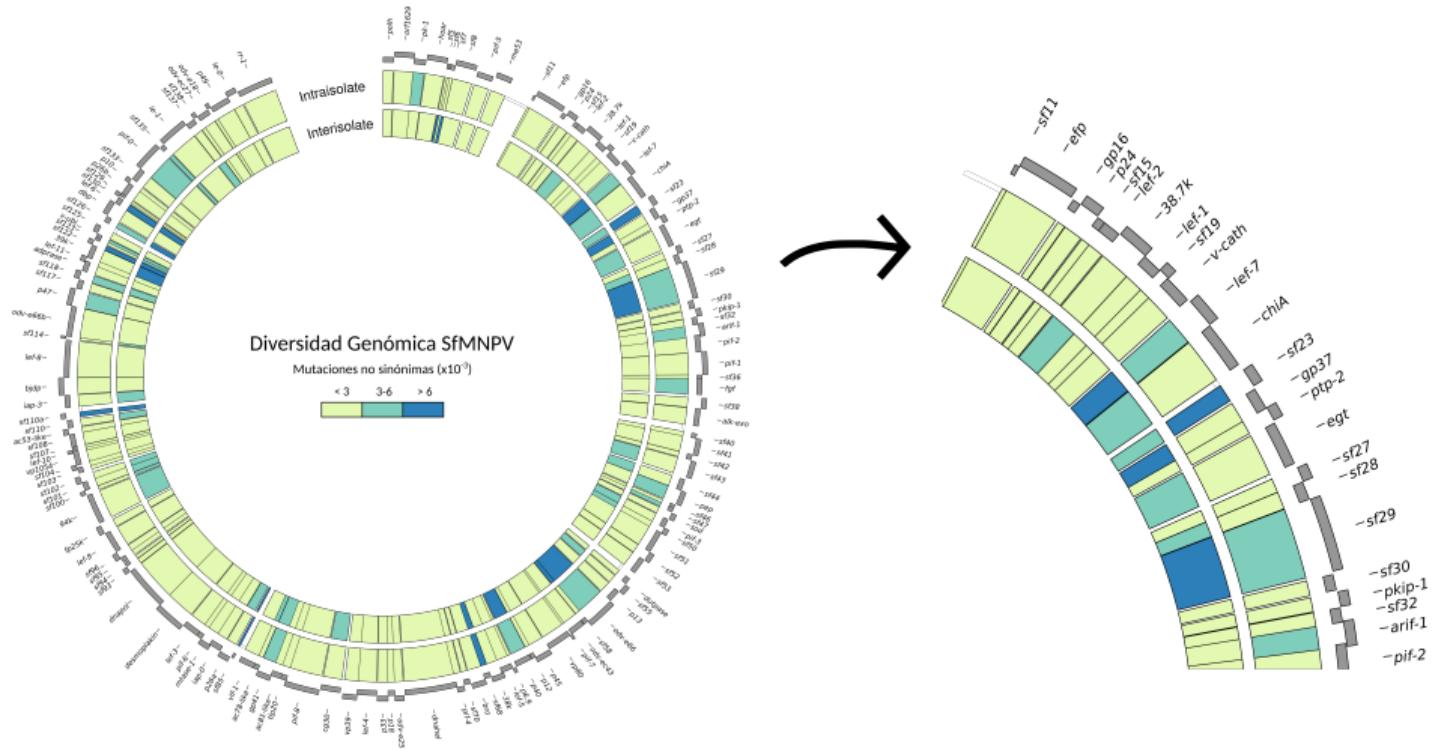
Cuadro 3.2: Variantes estructurales detectadas con Delly (D) y Lumpy (L)

Clase_SV	Pos_D	Pos_L	Tamaño_D	Tamaño_L	Freq_D	Freq_L	Lecturas_D	Lecturas_L
Deleción	6505	6506	36498	36496	0.0003	0.00044	16	23
Deleción	9548	9562	324	309	0.00069	0.00019	36	10
Deleción	13603	13603	54189	54188	0.0013	0.00051	69	30
Deleción	12600	12609	316	306	0.00022	0.00011	12	6
Deleción	21336	21336	4756	4755	0.0089	0.0035	465	181
Deleción	24401	24402	1691	1689	0.012	0.0056	639	293
Deleción	33629	33639	466	455	0.0017	0.0008	89	42
Inversión	50168	50191	52832	52808	0.16	0.0089	8610	467
Deleción	53651	53666	529	513	0.0066	0.0023	345	121
Deleción	73264	73275	403	391	0.0021	0.00076	110	40
Duplicación	80710	80689	9826	9853	0.000095	0.00059	5	31
Duplicación	104708	104707	4330	4331	0.00019	0.0004	10	21
Duplicación	121445	121444	5001	5007	0.000095	0.00038	5	20

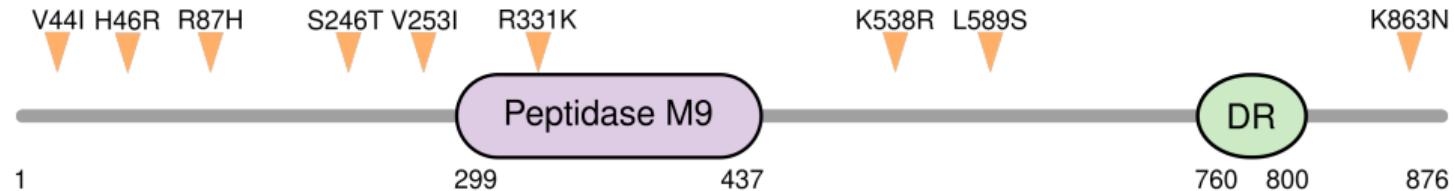
Existen diferencias en la composición genómica entre los diversos aislamientos geográficos de SfMNPV



Un pequeño grupo de genes exhibe elevados niveles de diversidad genética tanto a nivel intra- como inter-aislamiento

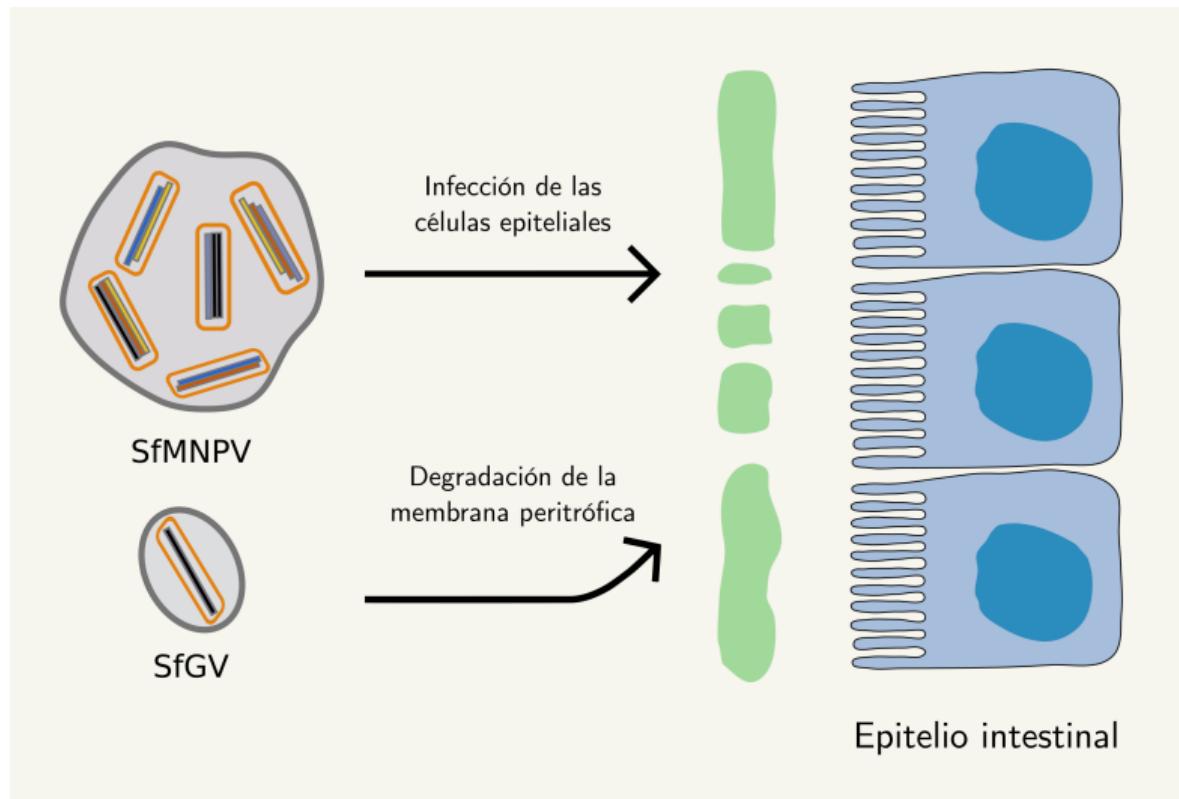


Una de las proteínas con un elevado nivel de diversidad genética, Sf29, codifica una collagenasa putativa



	347	364
SfMNPV	VPHAFNH E LFHCLMYTTN	
SpltMNPV	IPNAFG H ELFHCLLFSTN	
MyunNPV	IPNAFG H ELFHCLQFTSN	
ChchNPV	LPNAYGHEFHHCLLFTLQ	
HearNPV	LPLNFG H EIHHALMYAVD	
AMEV	KPLNFG H ELHHALMYMIY	
CREV	YPYNFG H ELYHALMFSVH	
E_canis	EILNL K HELTHALESYAS	
C_Rickettsiella	NFRNL G HEIQHALFYALL	

La diversidad genética de ciertos genes de SfMNPV podría mejorar su adaptación al cogollero del maíz

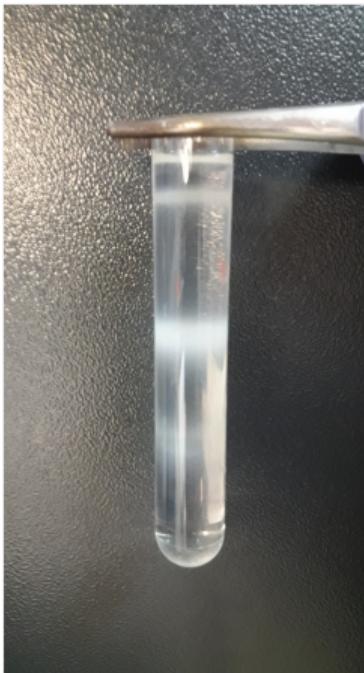
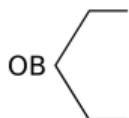


Estudio de la replicación de SfGV en cultivo celular

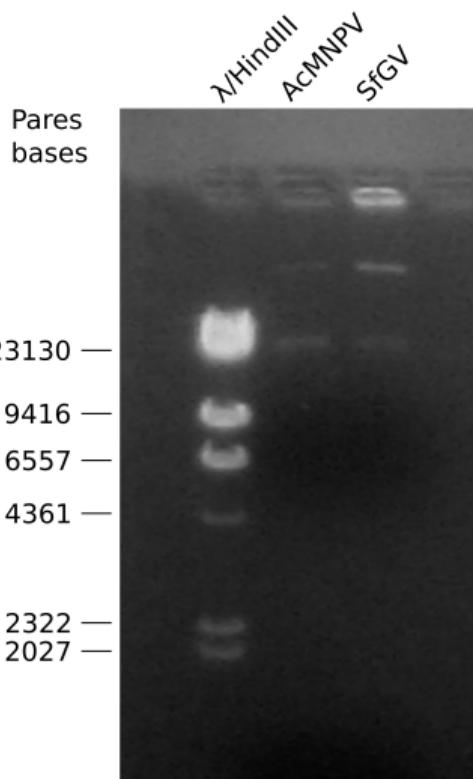
Preparación de DNA viral para transfección en cultivo celular

A

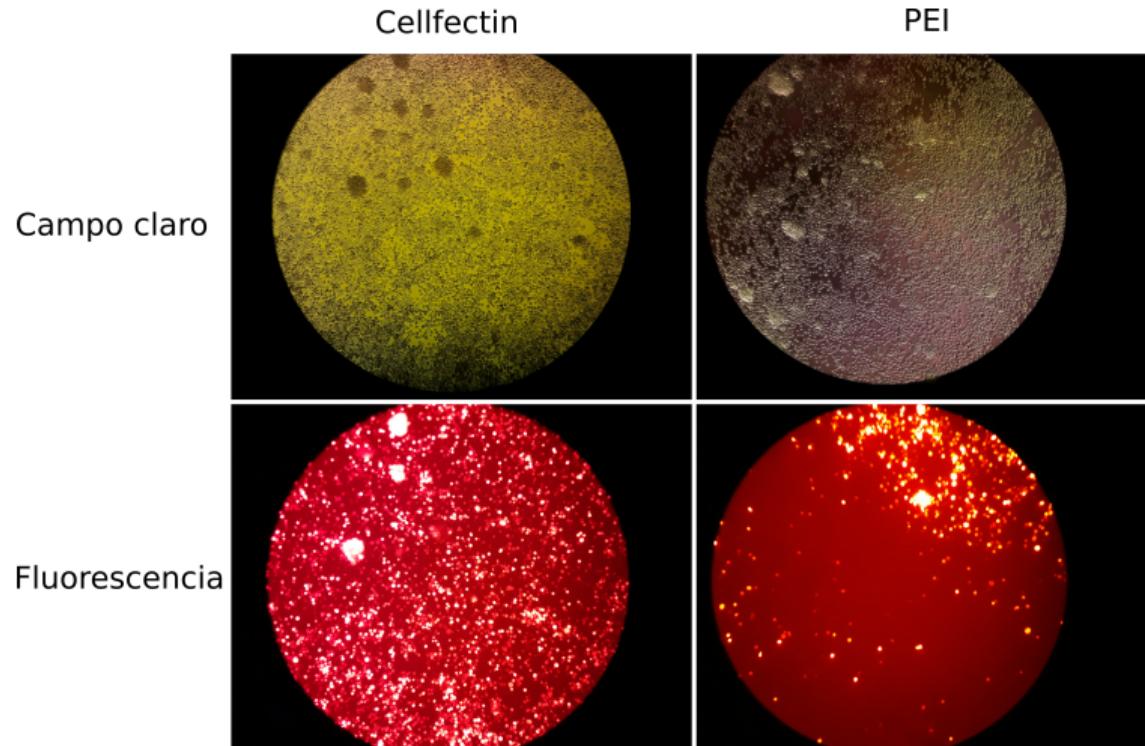
Lisado larvas infectadas



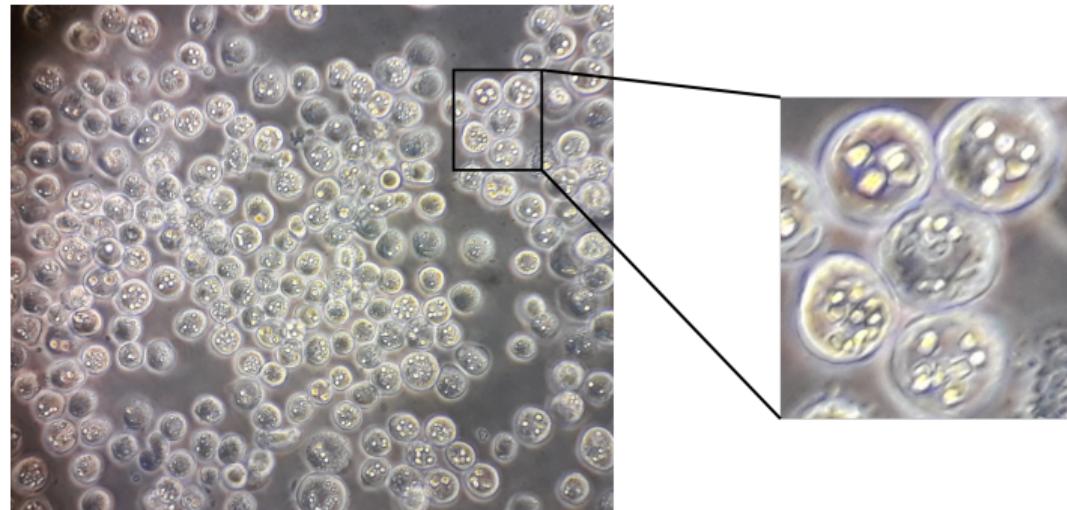
B



La transfección de células Sf9 con DNA de AcMNPV-DsRed es más eficiente con Cellfectin

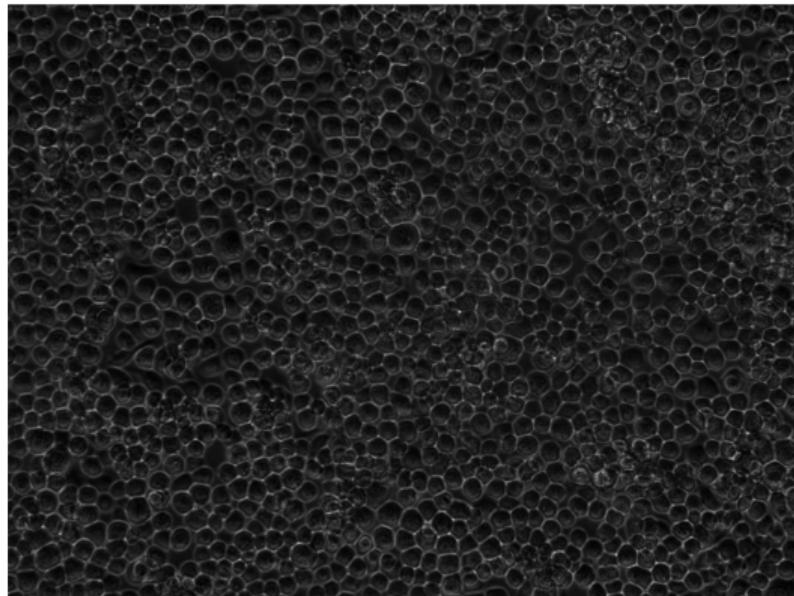


AcMNPV-DsRed puede completar su ciclo infectivo en células Sf9 transfectadas

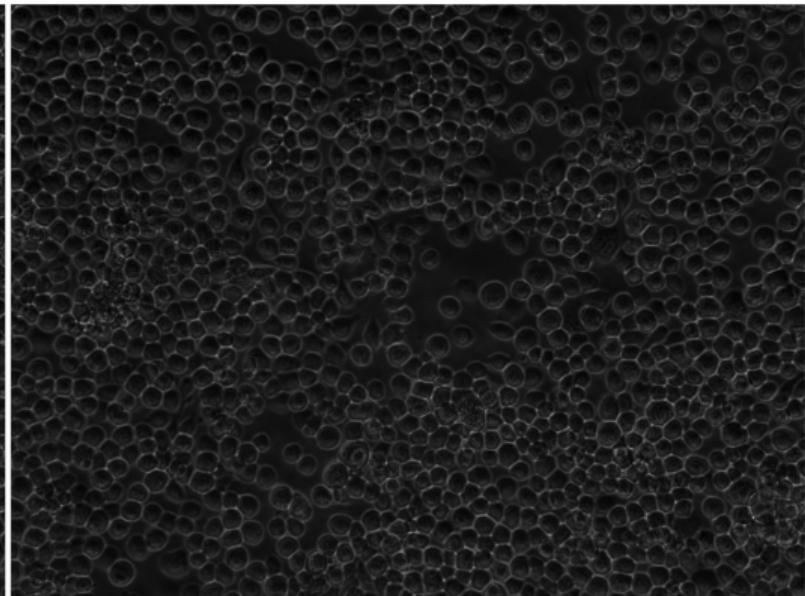


SfGV no produjo un efecto citopático evidente en células Sf9 transfectadas

Control negativo (sin DNA)

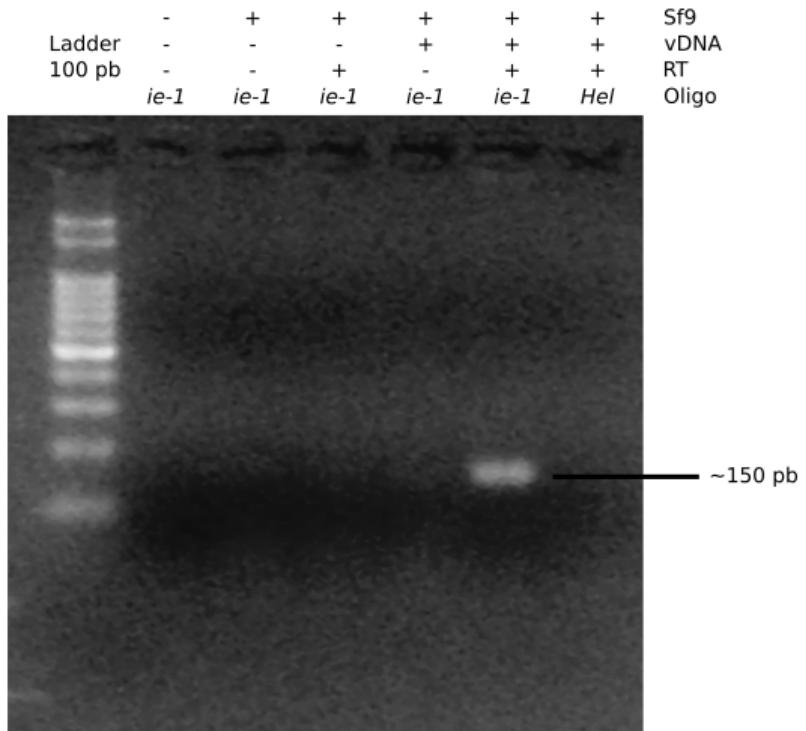
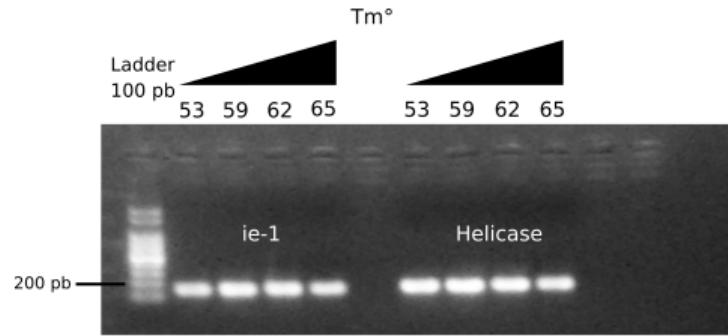


DNA genómico SfGV

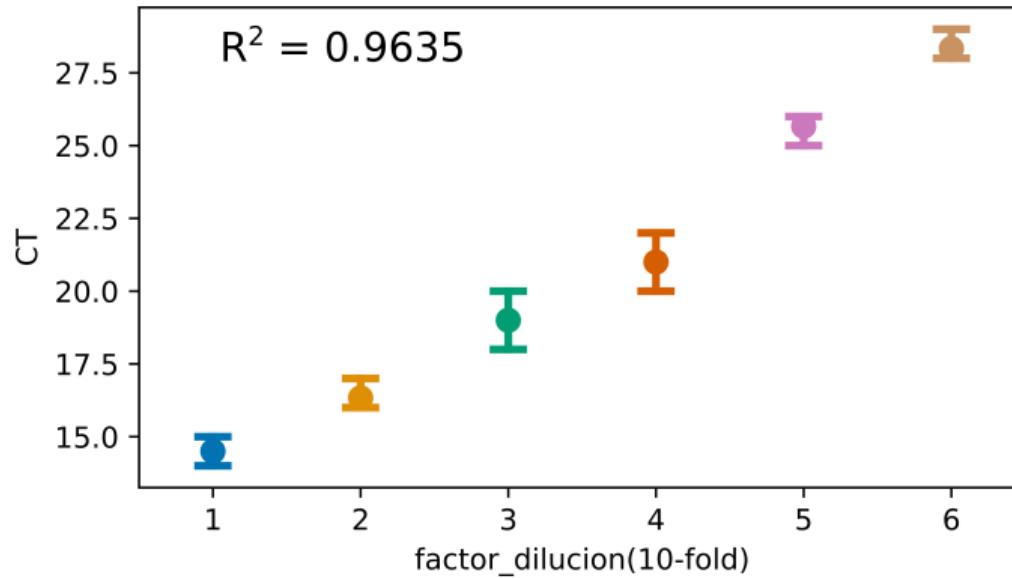


Sf9 7 dpt

Existe expresión temprana del gen *ie-1* en células Sf9 transfectadas con DNA de SfGV

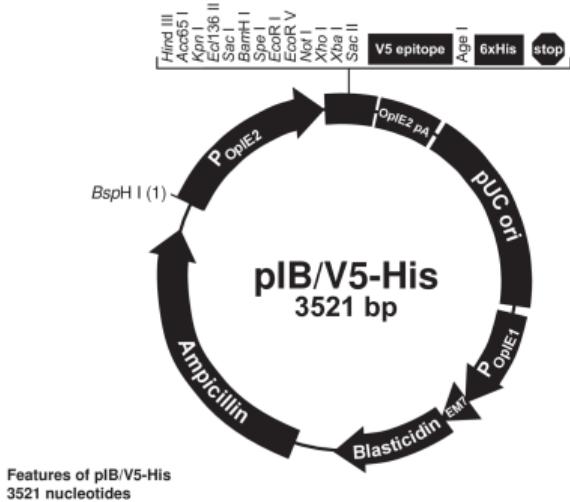


Cuantificación de los niveles de DNA mediante qPCR como una alternativa para evaluar el progreso del ciclo infectivo



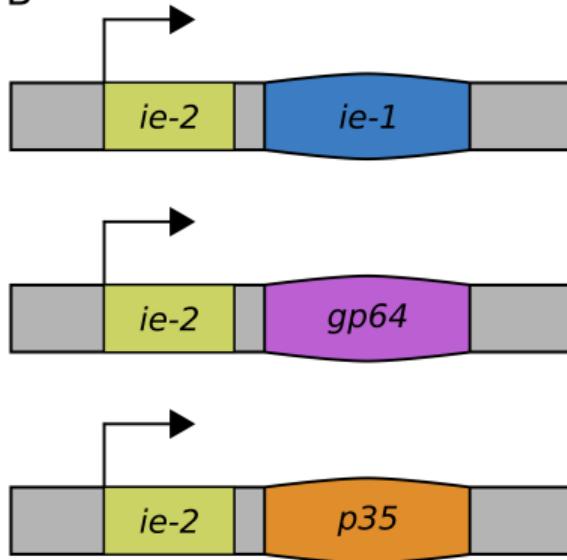
Construcciones auxiliares para mejorar la replicación de SfGV

A



OpIE2 promoter: bases 1-548
OpIE2 Forward priming site: bases 511-530
Multiple cloning site: bases 557-652
V5 epitope: bases 659-700
6xHis tag: bases 710-727
OpIE2 Reverse priming site: bases 737-762
OpIE2 polyadenylation sequence: bases 745-874
pUC origin bases 943-1616 (c)
OpIE1 promoter: bases 1665-1956
EM7 promoter: bases 1971-2029
Blasticidin resistance gene (*bsd*): bases 2048-2447
Ampicillin resistance gene (*bla*): 2566-3426

B



Hu & Li 2014

Conclusiones

Profundizamos el estudio del proteoma del OB de granulovirus

- ▶ Los OB de granulovirus son estructuras complejas.
- ▶ Los datos proteómicos pueden ayudar a mejorar la anotación de genomas virales.
- ▶ Las proteínas hipotéticas representan una fuente de funciones biológicas poco caracterizadas.

Caracterizamos la diversidad genética presente dentro del aislamiento SfMNPV-M

- ▶ Primer estudio de la diversidad genómica en SfMNPV.
- ▶ Un número reducido de genes en SfMNPV presentan una diversidad genética elevada.
- ▶ Los variantes estructurales contribuyen a la adaptación del virus a su hospedador.

Estudio inicial de la replicación de SfGV en cultivo celular

- ▶ El DNA genómico de SfGV desencadena la expresión de genes virales inmediatamente tempranos en cultivo celular.
- ▶ Por si solo, el DNA genómico de SfGV no soporta su replicación en cultivo celular.

Perspectivas

- ▶ Realizar los ensayos de purificación por afinidad seguida de espectrometría de masas para caracterizar los posibles interactores celulares de Spfr101.
- ▶ Confirmar mediante expresión, purificación y ensayo bioquímico la actividad peptidasa putativa del gen *sf29* de SfMNPV.
- ▶ Evaluar la replicación de SfGV en ensayos de co-transfección junto con los plásmidos de expresión de genes sinergizantes.

Agradecimientos

- ▶ A mis directores
- ▶ Laboratorio de Virología Molecular
- ▶ Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
- ▶ CONICET y UNLP

Muchas gracias por su atención.