

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

Tomas Masson

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata

July 12, 2021

# Introducción

## Cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*)



# Control biológico de plagas

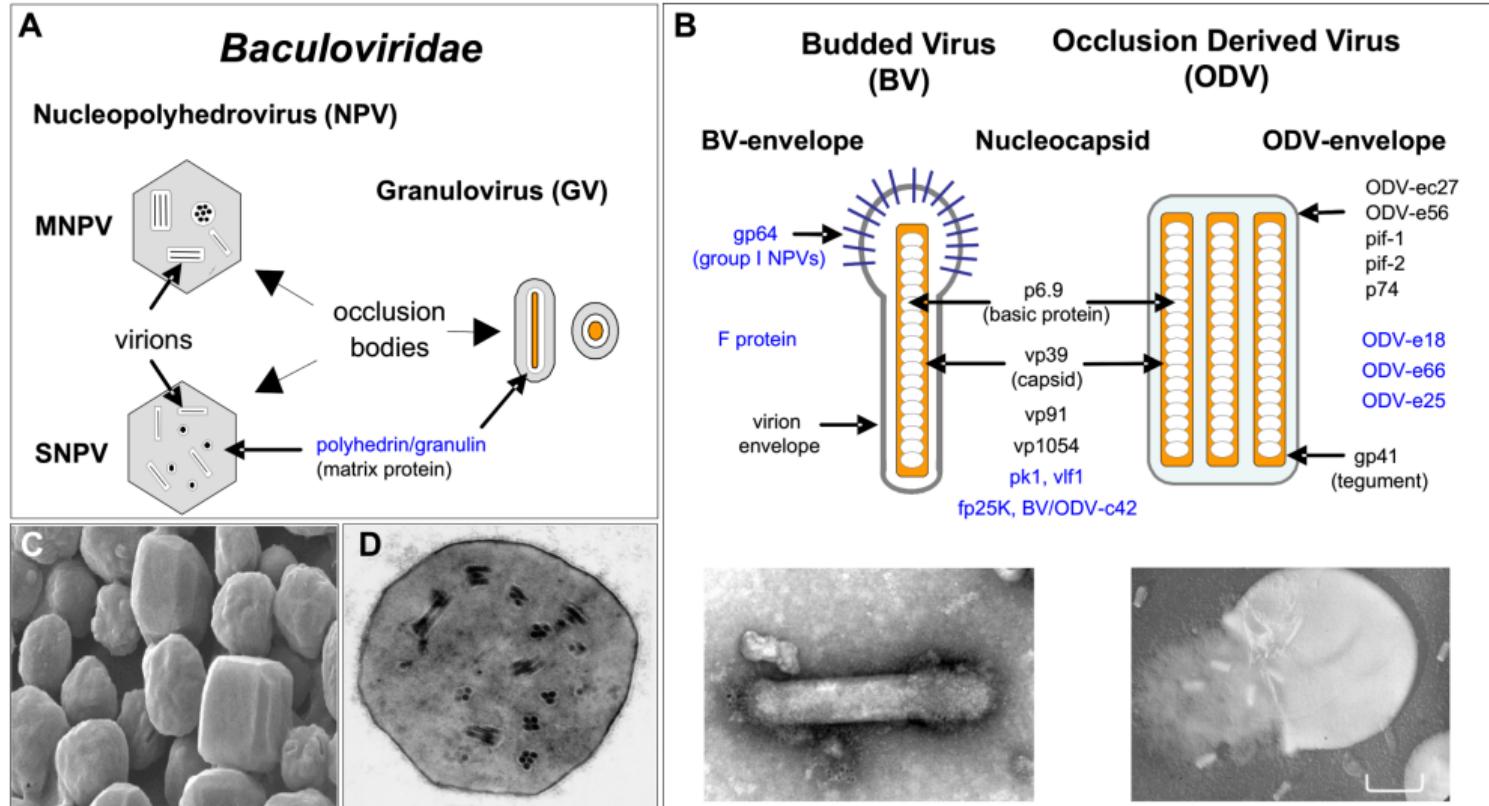


# Baculovirus

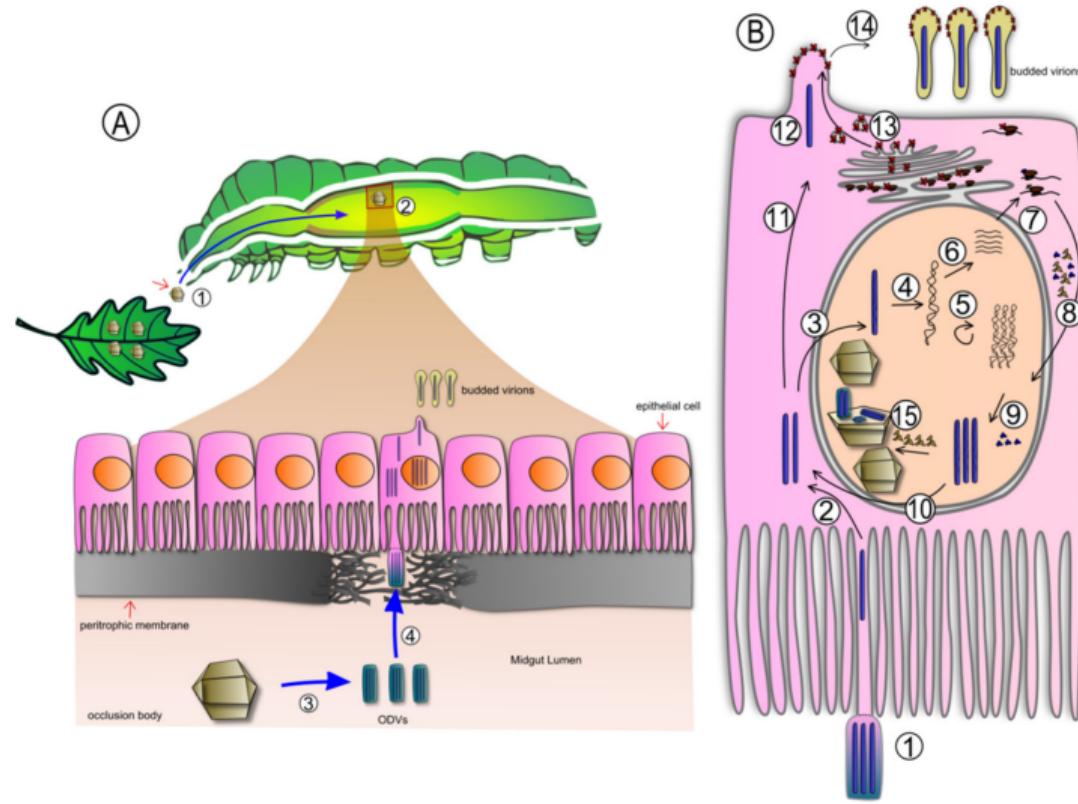
- ▶ Genoma circular a DNA con un tamaño de 80 a 200 Kpb
- ▶ Codifican entre 60 y 180 genes
- ▶ Rango de hospedador estrecho
- ▶ Potencial como biopesticidas para el control de diversas plagas



# Estructura del virión baculoviral



## Ciclo biologico baculovirus



# Baculovirus para el control de *S. frugiperda*

## Fundamento y alcance de este trabajo

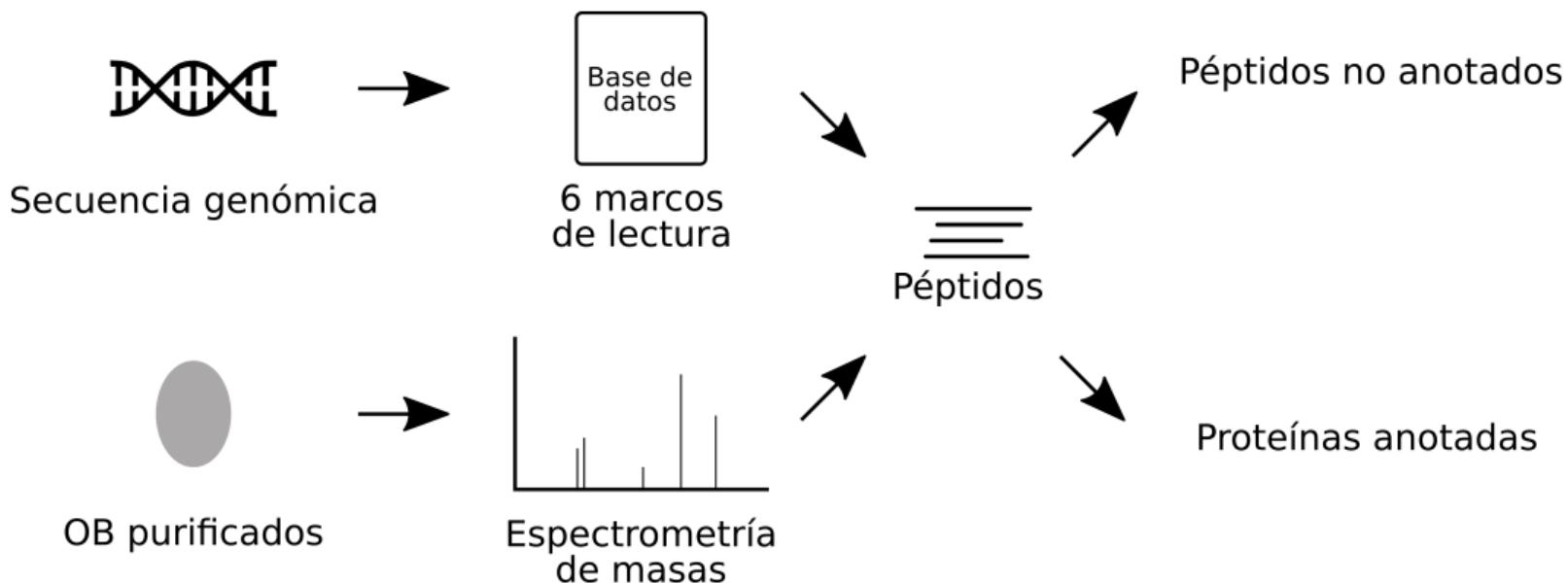
Buscamos investigar los factores moleculares involucrados en la adaptación de SfGV y SfMNPV al cogollero del maíz, con el fin de comprender las bases de su virulencia.

## Objetivos específicos

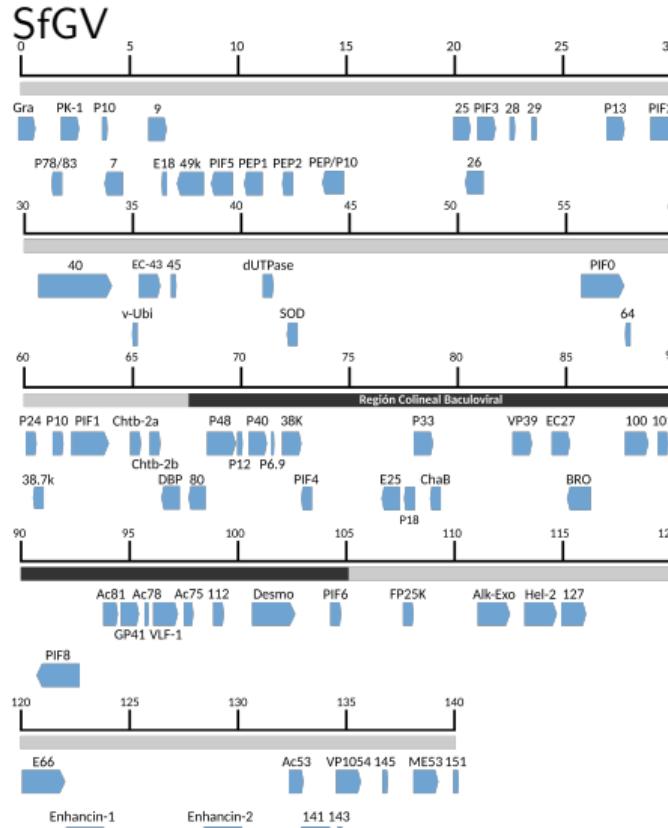
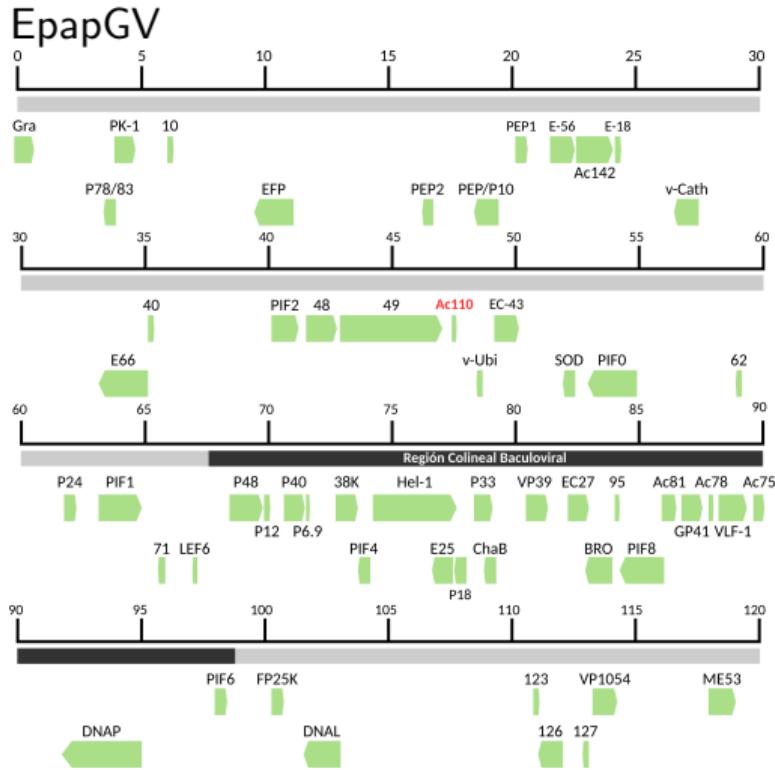
- ▶ Caracterizar el proteoma de los OB de SfGV y EpapGV, dos granulovirus con propiedades infectivas disímiles
- ▶ Investigar la diversidad genética presente en un aislamiento argentino de SfMNPV
- ▶ Evaluar la capacidad infectiva de SfGV en la línea celular Sf9

## Análisis proteómico de los cuerpos de oclusión de granulovirus

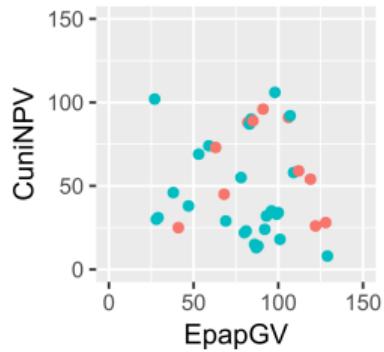
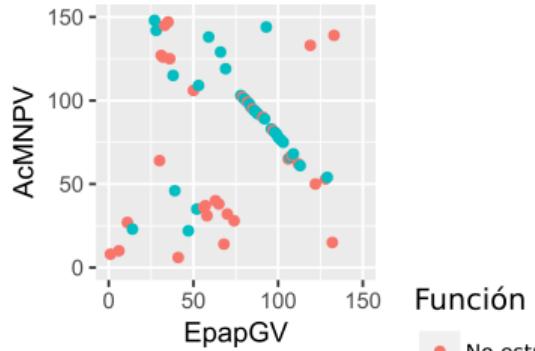
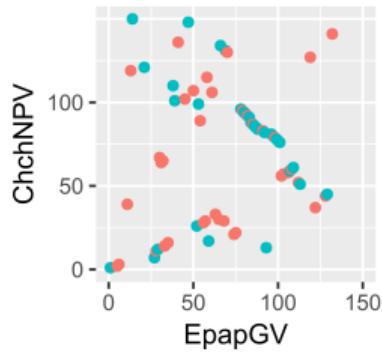
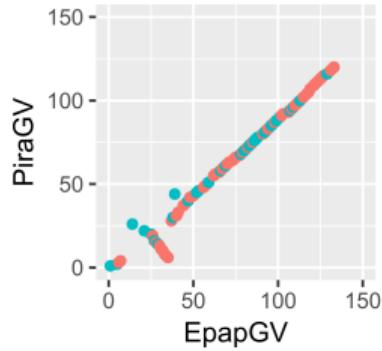
# Metodología experimental para el estudio del proteoma de granulovirus



# Proteoma de los cuerpos de oclusión de EpapGV y SfGV



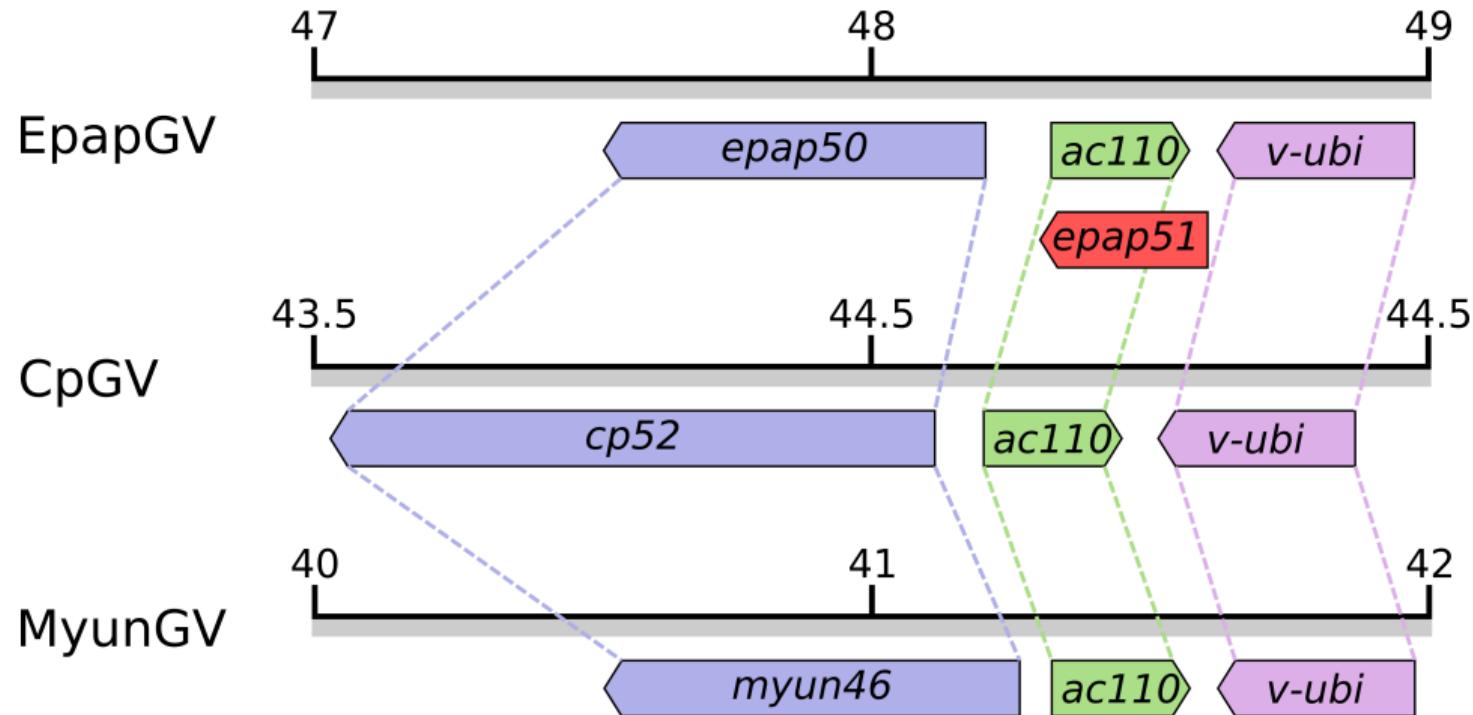
# Región colineal conservada en baculovirus



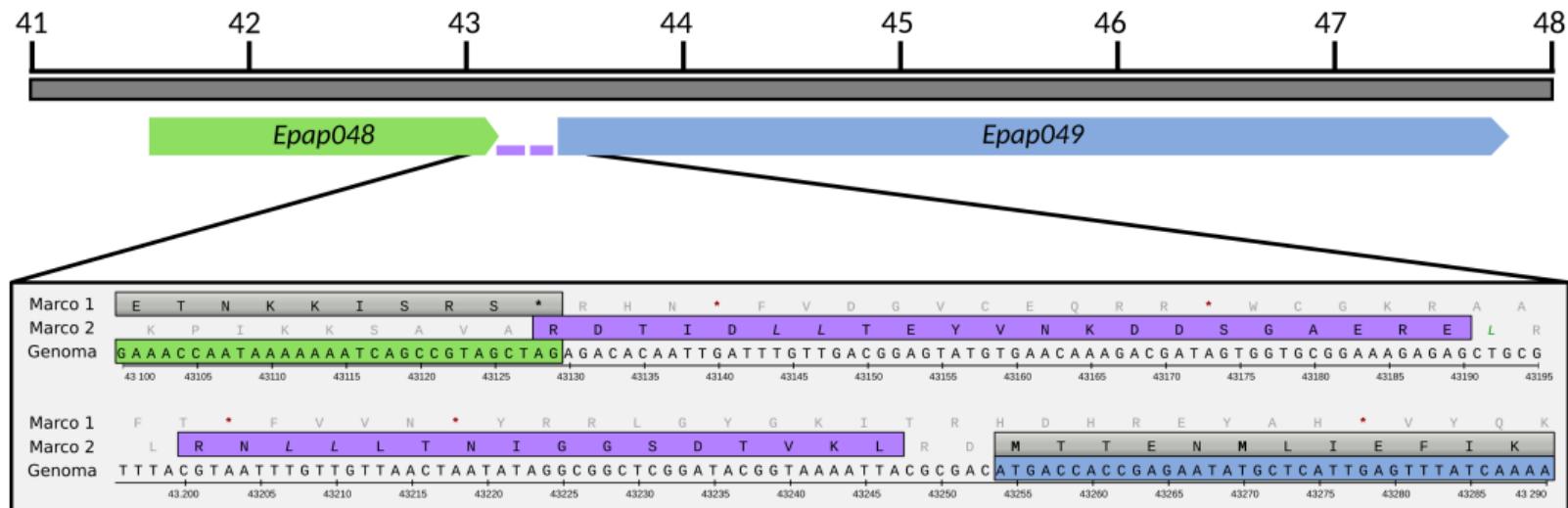
Función

- No estructural
- Estructural

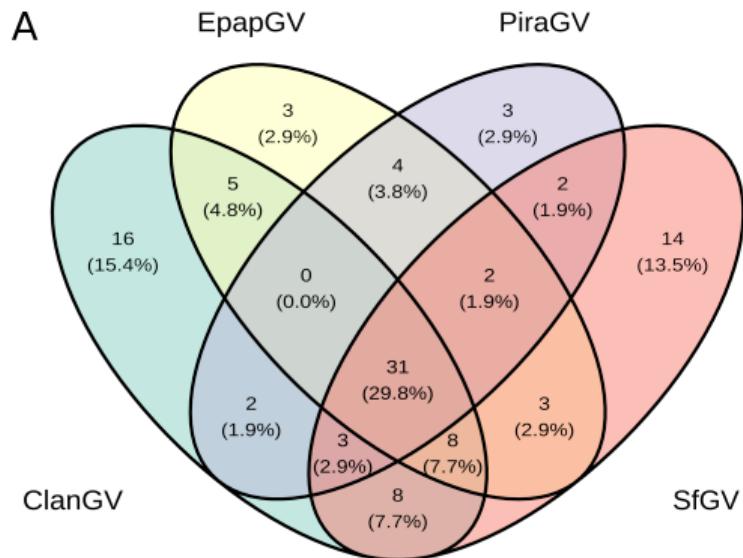
# Homólogo de *ac-110* presente en EpapGV



# Possible proteína de fusión Epap48-Epap49



# Conservación evolutiva del proteoma de OB en granulovirus



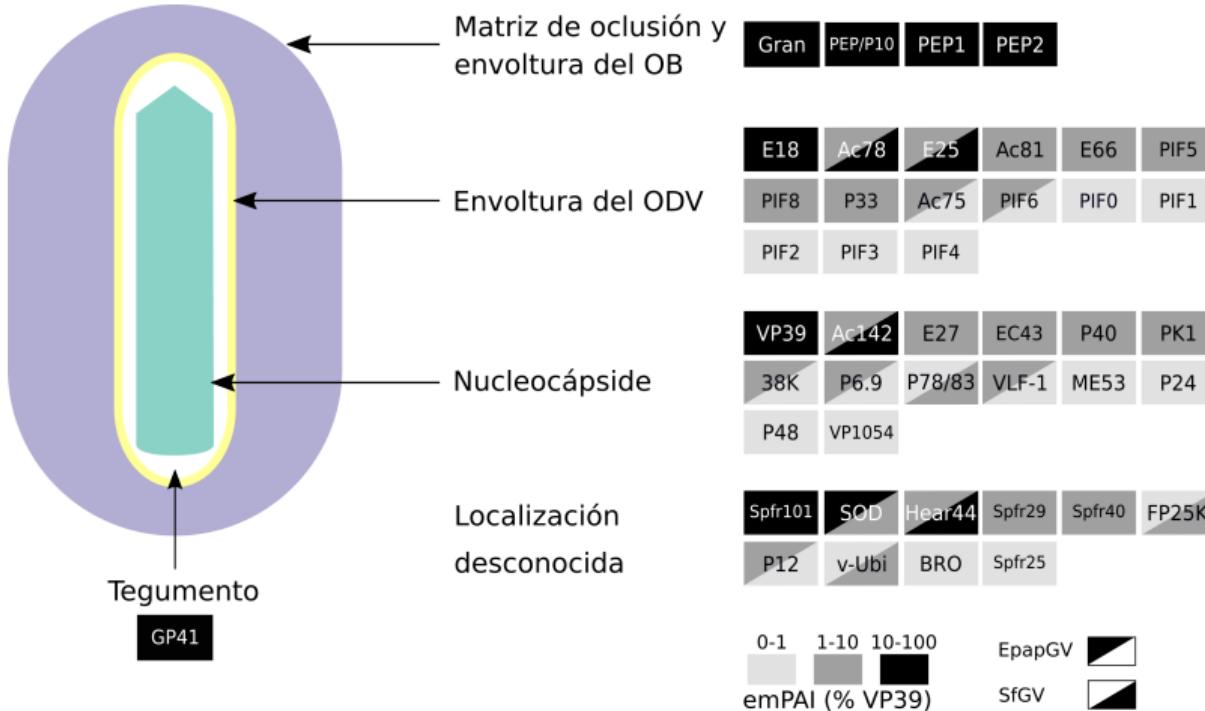
**B**

Proteínas Conservadas	ClanGV	SfGV	PiraGV
38K	ODV-EC43	PIF4	LEF5
Ac75	P33	PIF5	LEF8
Ac78	P48/45	PIF6	LEF9
Ac81	P6.9	PIF8	TLP-20
Ac142	P78/83	PK1	Chitinase
BRO	PEP1	SOD	GP37
FP25K	PEP2	Spfr25	P35
GP41	PEP/P10	Spfr29	P47
Granulin	P12	Spfr40	CBP
Hear44	P24	Spfr101	Clan17
ME53	P40	VLF-1	Clan18
ODV-E18	PIF0	VP1054	Clan20
ODV-E25	PIF1	VP39	Clan37
ODV-E66a	PIF2	v-Ubi	Clan42
ODV-EC27	PIF3		Clan79
			Clan93

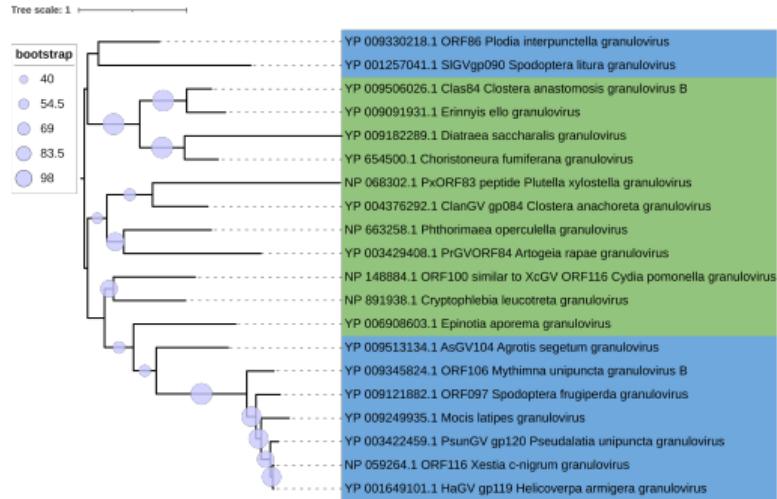
# de proteomas

- 4
- 3
- 1

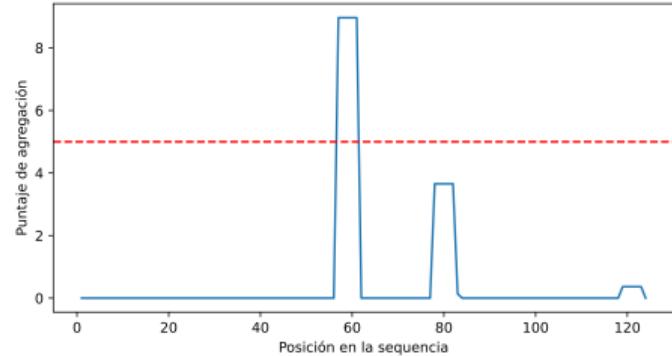
# Modelo semi-cuantitativo del proteoma de granulovirus



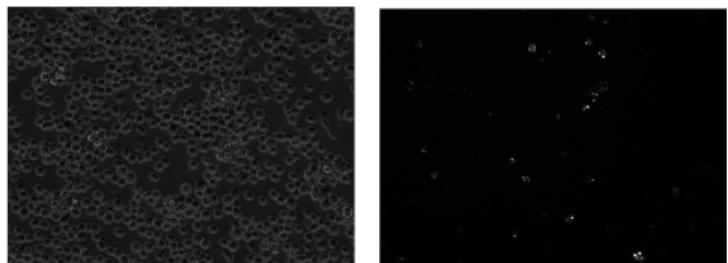
# Spfr101, una posible proteína amiloide?



A

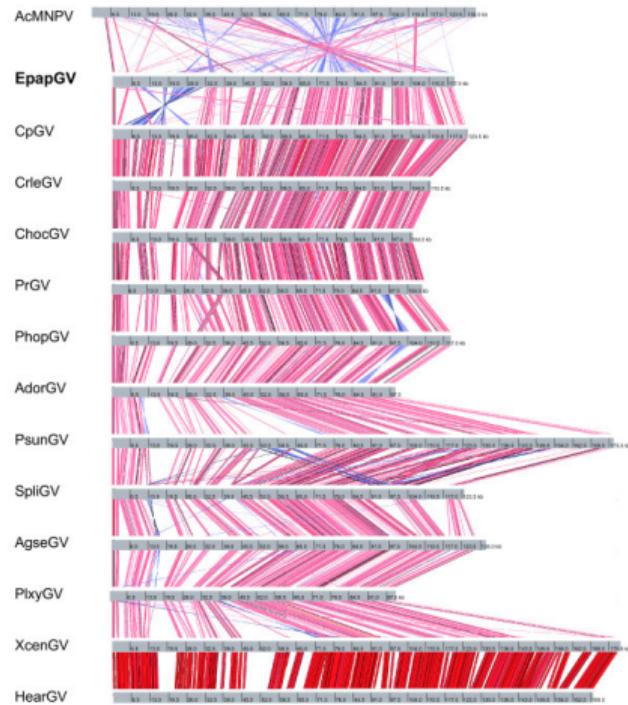


B

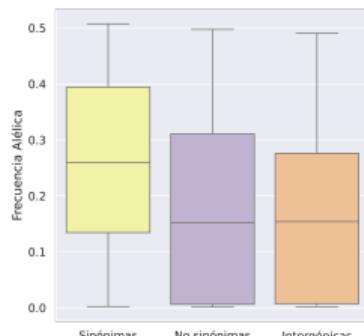
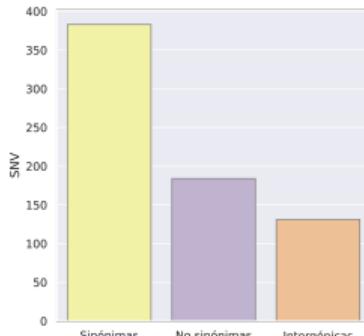
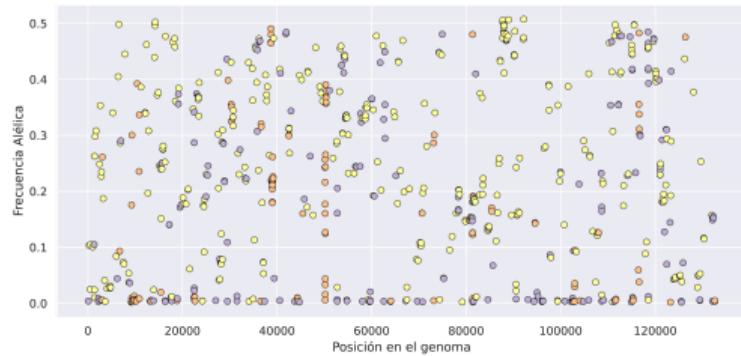


## Diversidad genómica en una población de SfMNPV

# Diversidad genómica en una población de SfMNPV



# Variantes puntuales presentes en el aislamiento argentino de SfMNPV

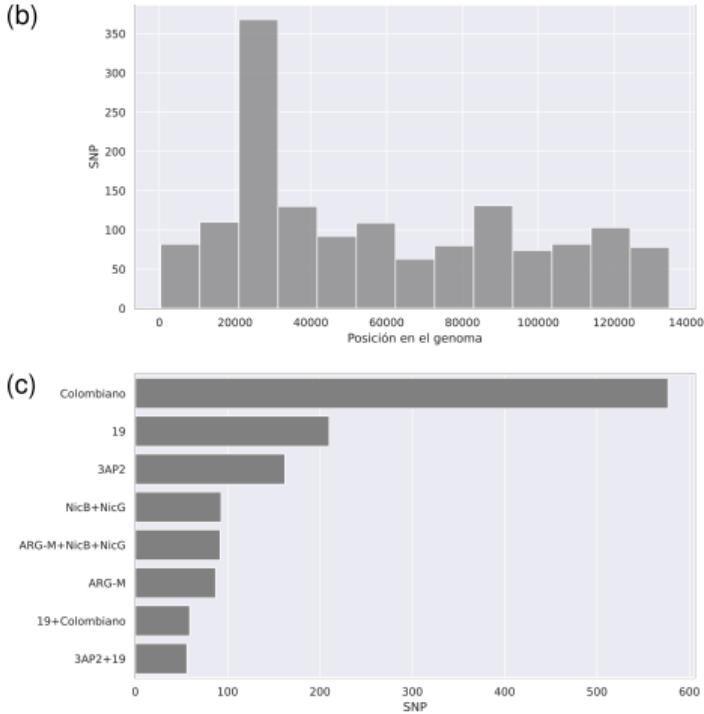
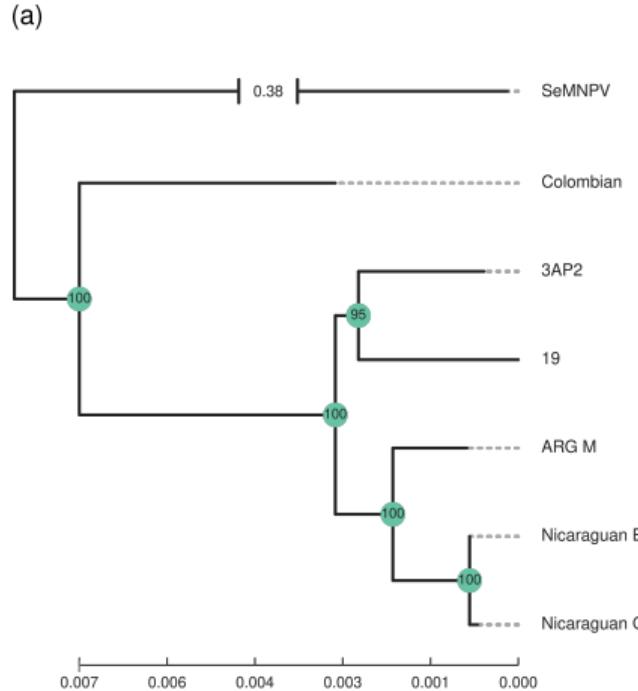


# Variantes estructurales detectadas en SfMNPV-M

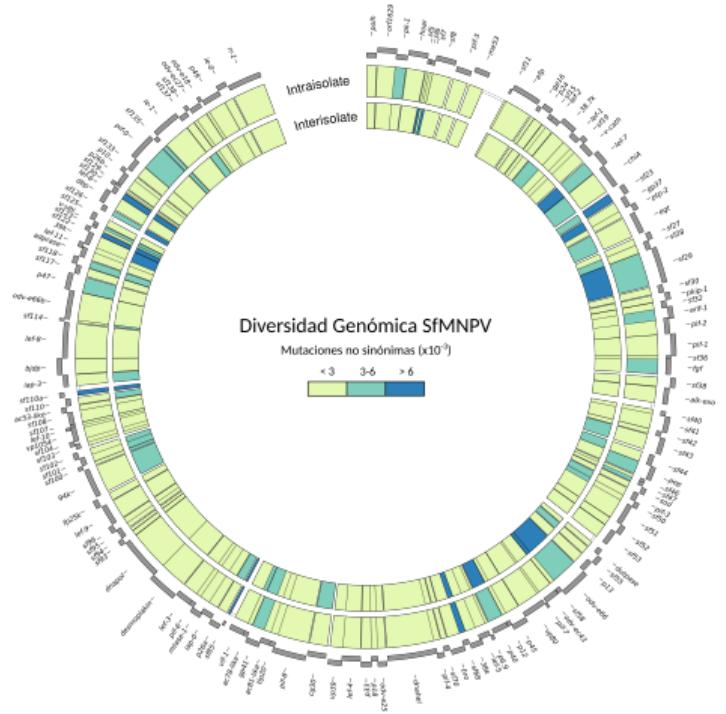
Cuadro 3.2: Variantes estructurales detectadas con Delly (D) y Lumpy (L)

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

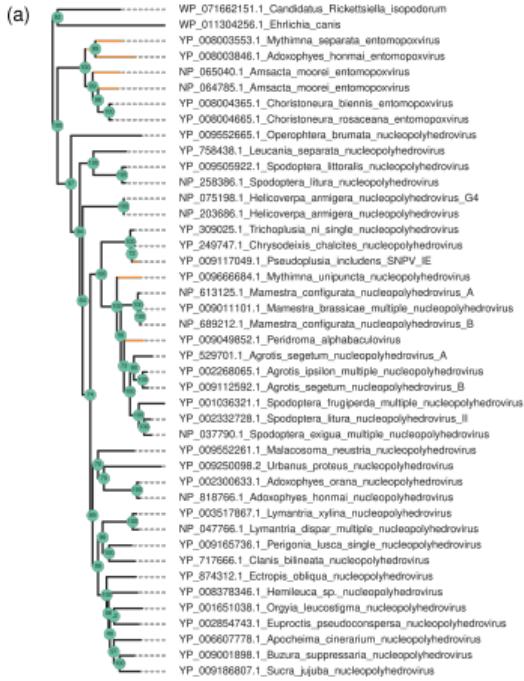
# Diversidad genética presente en aislamientos geográficos de SfMNPV



# Diversidad genética presente en el proteoma de SfMNPV



# Evolución molecular de Sf29, una posible collagenasa



(c)

	347	364
SfMNPV	VPHAFNHE <b>L</b> FHCLMYTTN	
SpLMNPV	IPNAFG <b>H</b> ELFHCLLFSNTN	
MyunNPV	IPNAFG <b>H</b> ELFHCLQFTSN	
ChchNPV	LPNAYG <b>H</b> EFHHCLLFTLQ	
HearNPV	LPLNFG <b>H</b> EIHHALMYAVD	
AMEV	KPLNF <b>G</b> HELHHALMYIY	
CREV	YPYNFG <b>H</b> ELYHALMFSVH	
E canis	EILNL <b>K</b> HELTAALESYAS	
C Rickettsiella	NFRNL <b>G</b> HEIQHALFYALL	

3.2 2.5 1.9 1.3 0.8 0.0

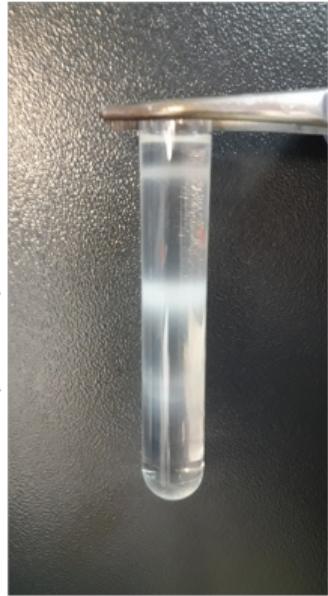
Replicación de SfGV en cultivo celular

# Preparación de DNA viral para transfección en cultivo celular

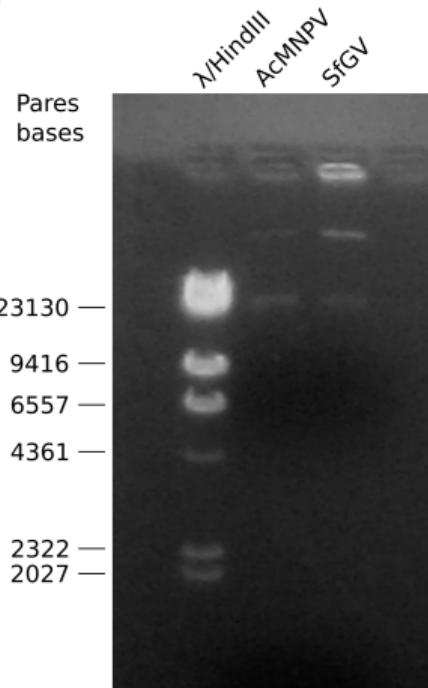
A

Lisado larvas infectadas

OB

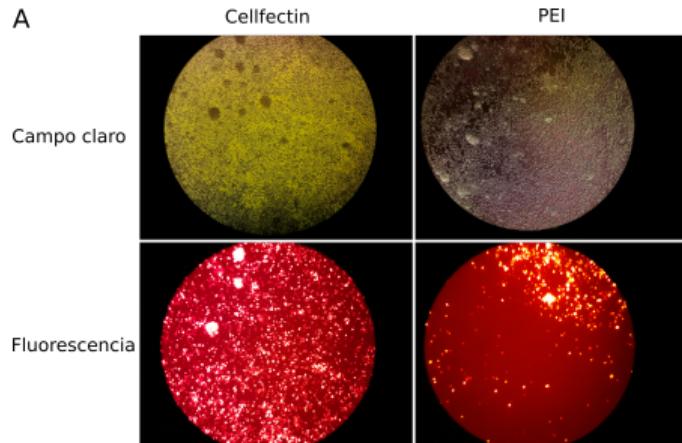


B

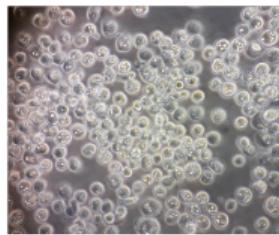


# Transfección de células Sf9 con AcMNPV-DsRed

A



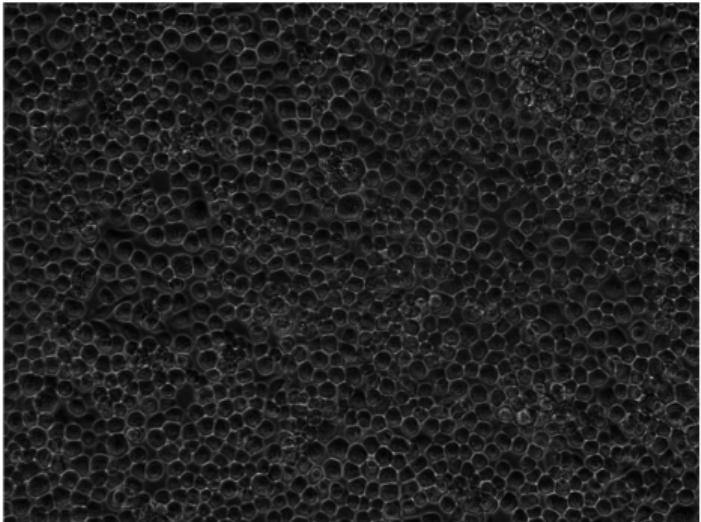
B



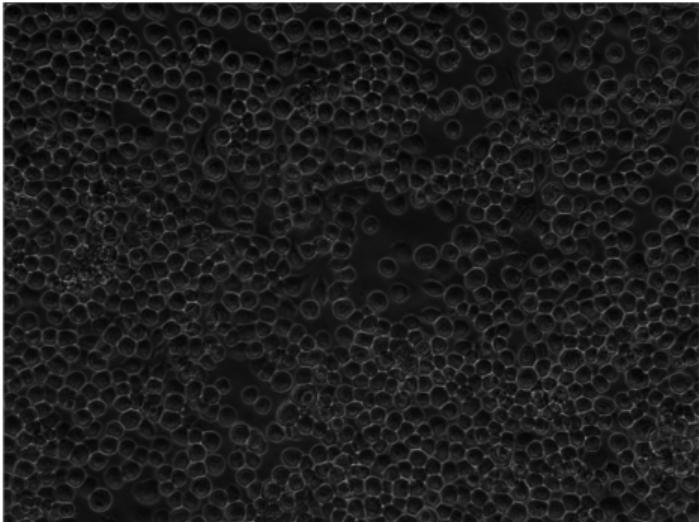
# Transfección de células Sf9 con SfGV

Sf9 7 dpt

Control negativo (sin DNA)

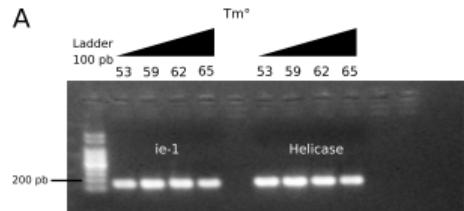


DNA genómico SfGV

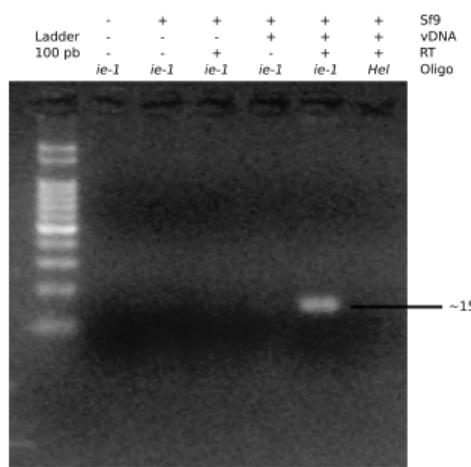


# Expresión temprana en células transfectadas con SfGV

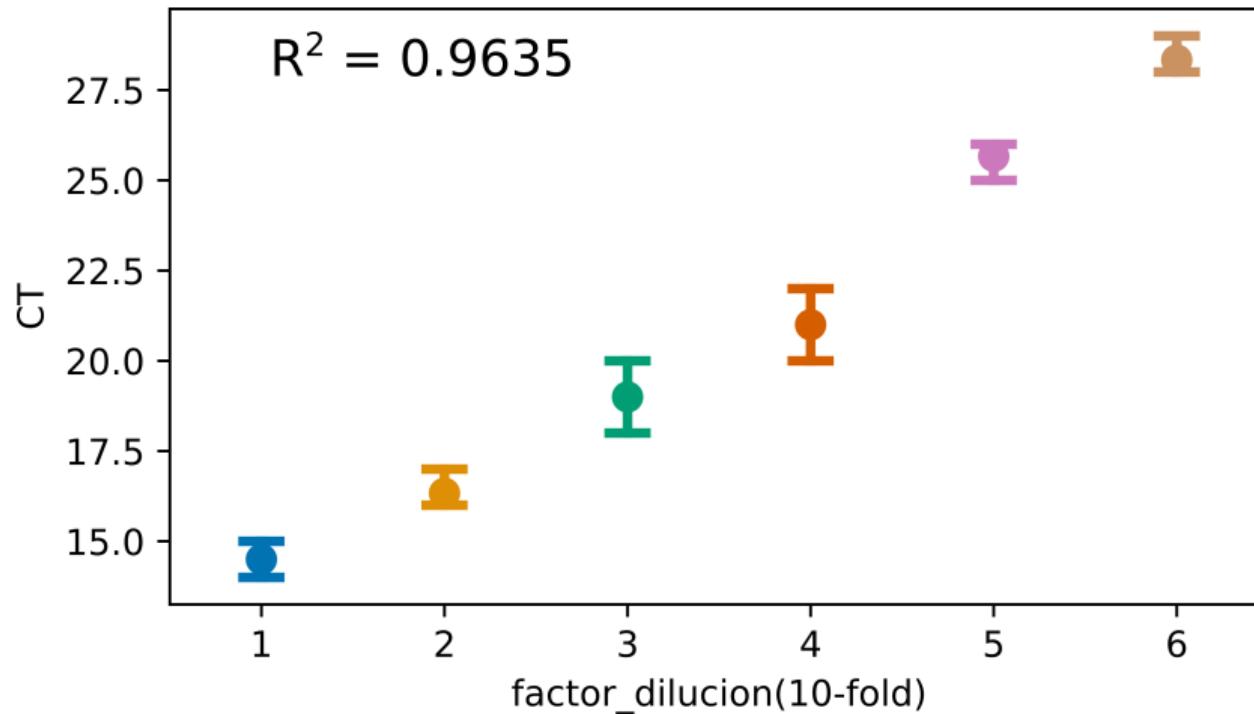
A



B

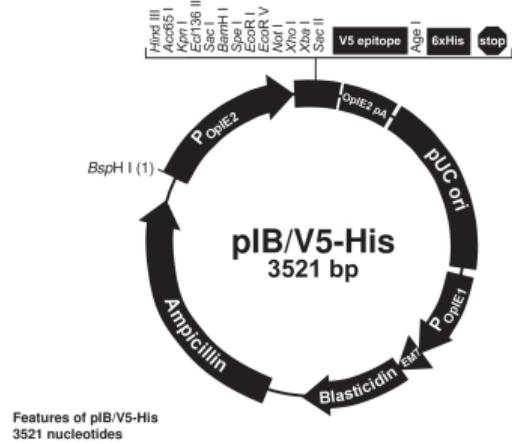


# Cuantificación de los niveles de DNA por qPCR

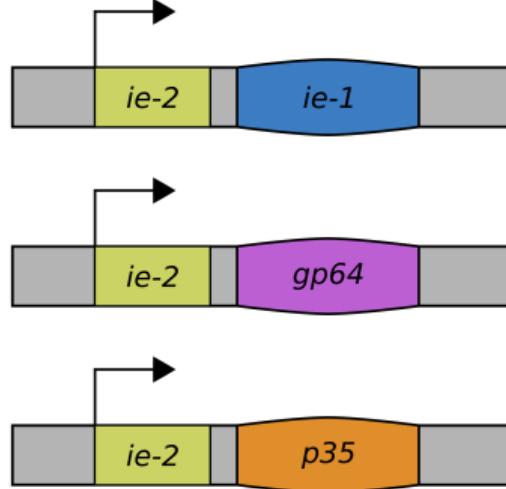


# Construcciones auxiliares para mejorar la replicación de SfGV

A



B



## Conclusiones

## Perspectivas

## Perspectivas

- ▶ Validar experimentalmente la presencia del producto de fusión Epap48-49 mediante el uso de anticuerpos específicos contra Epap48 o Epap49.
- ▶ Realizar los ensayos de purificación por afinidad seguida de análisis por espectrometría de masas para caracterizar los posibles interactores celulares de Epap95/Spfr101.
- ▶ Confirmar mediante expresión, purificación y ensayo bioquímico si el gen *sf29* de SfMNPV codifica una proteína con actividad peptidasa.
- ▶ Secuenciar y caracterizar los polimorfismos presentes dentro de distintos aislamientos geográficos y temporales de SfMNPV en Argentina.
- ▶ Mejorar la reproducibilidad en la extracción de DNA total desde cultivo celular previo a la reacción de qPCR.
- ▶ Evaluar mediante ensayos de co-transfección si los plásmidos de expresión de genes sinergizantes son capaces de incrementar los niveles de replicación viral en cultivo celular.

## Agradecimientos