

TESIS DE MÁSTER

“Efecto de las enhancinas sobre las
propiedades insecticidas de los
baculovirus”

Eduardo Aguirre Sánchez

Curso 2013-14

Directores: Dra. Oihane Simón De Goñi
Dr. Primitivo Caballero Murillo

La **Dra. OIHANE SIMÓN DE GOÑI**, Investigadora Ramón y Cajal del Instituto de Agrobiotecnología y el **Prof. Dr. PRIMITIVO CABALLERO MURILLO**, Catedrático del Área de Producción Vegetal del Departamento de Producción Agraria de la Universidad Pública de Navarra, como directores de D. Eduardo Aguirre Sánchez

INFORMAN

Que la presente memoria de Trabajo Fin de Master “Efecto de las enhancinas sobre las propiedades insecticidas de los baculovirus” elaborada por D. Eduardo Aguirre Sánchez, cumple las condiciones exigidas por la legislación vigente para ser presentada y defendida.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Pamplona a nueve de septiembre de 2014.

Dr. PRIMITIVO CABALLERO MURILLO

Dra. OIHANE SIMÓN DE GOÑI

Quisiera dar las gracias en primer lugar a Primitivo por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. En segundo lugar, a Oihane Simón por su paciencia y perseverancia, sin la cual este trabajo no habría sido posible. También quisiera acordarme de todos los compañeros de laboratorio que tanto me han ayudado y apoyado durante todo el máster, a Cris, Maite, Arkaitz, Leo, Isa, Rosa, Íñigo, Mireya, Inés, Mikel, Iskra, Javi y Dani. Y por último, a mi familia, por estar ahí siempre que los he necesitado.

ÍNDICE

Resumen	2
Abstract	3
Introducción	4
Objetivos	7
Material y métodos	8
1. Insectos, células y virus	8
2. Extracción de ADN a partir de OBs y análisis REN	8
3. Localización, clonaje y secuenciación de la <i>enhancina</i> de AgseGV de Badajoz	9
4. Construcción de los recombinantes Bac ϕ y BacENHAgseGV	11
5. Expresión temporal de la <i>enhancina</i> de AgseGV	16
6. SDS-PAGE	16
7. Bioensayos	17
Resultados y discusión	20
1. Localización de la <i>enhancina</i> en el aislado de Badajoz AgseGV	20
2. Clonaje y secuenciación de la <i>enhancina</i> de AgseGVBadajoz	21
3. Obtención de los virus recombinantes Bac ϕ y BacENHAgseGV	26
4. RT-PCR	30
5. SDS-PAGE	32
6. Bioensayos	34
Conclusiones	40
Referencias	41

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar molecularmente una *enhancina* (VEF, *virus enhancing factor*) localizada en el genoma de un granulovirus de *Agrotis segetum* (AgseGV) aislado en Badajoz y determinar su efecto sobre la actividad insecticida del *Alphabaculovirus* de *Autographa californica* (AcMNPV) para distintas especies de insectos susceptibles. La *enhancina* de AgseGV presentó un 99% de identidad con la *enhancina* de otro aislado del AgseGV de China (AY522332) mientras la identidad con las VEFs localizadas en el NPV de *A. segetum* AgseNPV (DQ123841) sólo fue del 24-28%. Las VEFs del AgseGV y del AgseNPV presentan una valina (HVMGH) y una alanina (HAISF), respectivamente, en el motivo de unión a zinc en vez del característico ácido glutámico (HEXXH) de las metaloproteasas lo que sugiere que carezcan de funcionalidad. Para determinar su posible funcionalidad se construyeron recombinantes mediante el sistema Bac-to-Bac con el AcMNPV, y las VEFs del AgseGV (BacENHAgseGV) y del AgseNPV (BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV). La incorporación del gen de la *enhancina* de AgseGV en BacENHAgseGV se comprobó mediante PCR, análisis de restricción y secuenciación; sin embargo, no se detectó expresión génica en células Sf21 infectadas con el BacENHAgseGV. El análisis de los componentes proteicos de OBs recombinantes en geles de SDS-PAGE tampoco reveló la presencia de bandas del tamaño correspondiente al de las *enhancinas* (100-115 kDa). Este dato sugiere que no ha habido síntesis de la *enhancina* o que si ha habido síntesis no se ha incorporado a los OBs. Finalmente, se cuantificó la actividad insecticida de los recombinantes en larvas L₂ y L₄ de distintas especies de lepidópteros. En ninguna de las especies ensayadas se pudo apreciar una mejora de la actividad insecticida de los virus recombinantes, mientras que en el control positivo, Bac ∞ al que se añadió Tinopal UNPA-GX, si hubo una mejora significativa de la actividad biológica del virus para las larvas L₄. En base a los resultados obtenidos, podríamos concluir que los baculovirus recombinantes no expresan las correspondientes *enhancinas*, lo cual sugiere la necesidad de abordar la construcción de nuevos recombinantes que contemplen la inclusión de los promotores nativos de los genes de las *enhancinas* que se quieran expresar.

ABSTRACT

The aim of the present study was to achieve a molecular characterization of an *enhancin* gene (VEF, virus enhancing factor) located in the genome of the *Agrotis segetum* granulovirus (AgseGV) isolated in Badajoz and to determine its effect in the insecticidal activity of the *Autographa californica* *Alphabaculovirus* (AcMNPV) for different susceptible insect species. The AgseGV *enhancin* showed a 99% identity to the *enhancin* of the Chinese isolate of AgseGV, whereas the identity to the VEFs of *A. segetum* NPV AgseNPV (DQ123841) was only of 24-28%. The AgseGV and AgseNPV VEFs present a valine (HVMGH) and an alanine (HAISF) residue, respectively, in the zinc-binding domain instead of the metalloproteases' characteristic glutamic acid (HEXXH), which may suggest a lack of functionality. To determine their possible functionality, AcMNPV recombinants were constructed using the Bac-to-Bac system that included the VEFs from the AgseGV (BacENHAgseGV) and AgseNPV (BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV and BacVEF3AgseNPV). The integration of the AgseGV *enhancin* gene into the BacENHAgseGV was confirmed by PCR, restriction enzyme analysis and sequencing. However, no gene expression was detected in Sf21 cells infected with the BacENHAgseGV. Analysis of the protein components of recombinant OBs by SDS-PAGE neither revealed the presence of protein bands of the expected size of the *enhancins* (100-115 kDa). This data suggests a lack of *enhancin* synthesis or if it has been synthesised it has not been incorporated into the OBs. Finally, insecticidal activity of recombinant viruses was quantified in L₂ and L₄ instar of different lepidopteran species. In none of the insects tested, an improvement of insecticidal activity was observed while the positive control, Bac ∞ in which Tinopal UNPA-GX was added, showed a significant increase of the viral activity in L₄ instar. According to the results obtained in the present work, we could conclude that recombinant viruses do not express the corresponding *enhancins*, suggesting the need to consider the construction of new recombinants that include the *enhancin* native promoters.

INTRODUCCIÓN

En la agricultura moderna, la disminución del rendimiento de los cultivos agrícolas debido a las plagas alcanza entre un 20-30%, llegando a producir miles de millones de dólares de pérdidas de producción al año (FAO, 2014). El control de las poblaciones de especies plagas se ha venido realizando, de forma sistemática y casi exclusiva, mediante la aplicación de insecticidas químicos (Caballero *et al.*, 2001), pero su eficacia es cada vez menor debido al desarrollo de resistencias frente a la mayoría de las moléculas activas utilizadas reiteradamente (Després *et al.*, 2007), lo cual ha originado grandes perjuicios económicos y sanitarios a los agricultores, llegando a registrar una mortalidad de 20.000 personas al año según la OMS, y a la fauna útil, además de serios problemas ambientales por el aumento de las dosis y del número de aplicaciones necesarias para un control efectivo (Devine *et al.*, 2007). Todo esto pone de manifiesto la necesidad de disminuir las aplicaciones de productos químicos potenciando el uso de plaguicidas biológicos, más selectivos y con un impacto medioambiental mínimo. Entre éstos se encuentran los baculovirus. La familia Baculoviridae agrupa a virus de ADN de doble cadena cuyos viriones están característicamente incluidos en un cuerpo de inclusión (OB) de forma poliédrica (Nucleopoliedrovirus, NPV) o granular (Granulovirus, GV) (Theilmann *et al.*, 2005). La familia se divide en cuatro géneros en base al huésped y caracteres filogenéticos; *Alphabaculovirus* y *Betabaculovirus* que engloban a todos los NPVs y GVs específicos de lepidópteros, respectivamente, y *Gammabaculovirus* y *Deltabaculovirus* que comprenden a los NPVs de himenópteros y dípteros, respectivamente (Jehle *et al.*, 2006).

Los baculovirus son una parte integrante de los ecosistemas e inciden en las poblaciones naturales de los insectos como un factor de mortalidad que contribuye a regular su densidad de población. El estado susceptible es el de larva que es infectada al alimentarse de un substrato vegetal contaminado con OBs del virus. En el intestino de la larva se dan las condiciones alcalinas (pH 9-11) que favorecen la disolución de la poliedrina (en los NPVs) ó granulina (en los GVs), principales componentes del OB, permitiendo la liberación de los viriones ó partículas infectivas (Fig. 1). Algunos baculovirus junto con la disolución de los OBs liberan enzimas proteolíticas denominadas enhancinas, que se unen a la mucina de la membrana peritrófica formando poros y favoreciendo su entrada (Lepore *et al.*, 1996). Los viriones derivados de los cuerpos de inclusión (ODVs, del inglés occlusion derived virus), que incluyen a la nucleocápsida, infectan así las células epiteliales del mesenterón y el virus se replica en su núcleo dando lugar a nuevos viriones ó viriones brotados (BVs, del inglés *budded virus*) que infectan las células de otros órganos y tejidos de la cavidad hemocélica. Los ODVs son responsables de la infección primaria en las células epiteliales del mesenterón, mientras que los BVs son responsables de la infección secundaria célula a célula de los tejidos susceptibles. Al final del proceso infeccioso, que se completa entre tres y seis días para los baculovirus más

virulentos, la larva muere conteniendo en su cavidad hemocélica grandes cantidades de OBs. Como consecuencia del proceso infeccioso, el tegumento de la larva se degrada liberando millones de OBs que contaminan el follaje de las plantas, los cuales constituyen el inóculo que sirve para dar origen a un nuevo proceso infeccioso en otros huéspedes susceptibles (Sciocco de Cap, 2001).

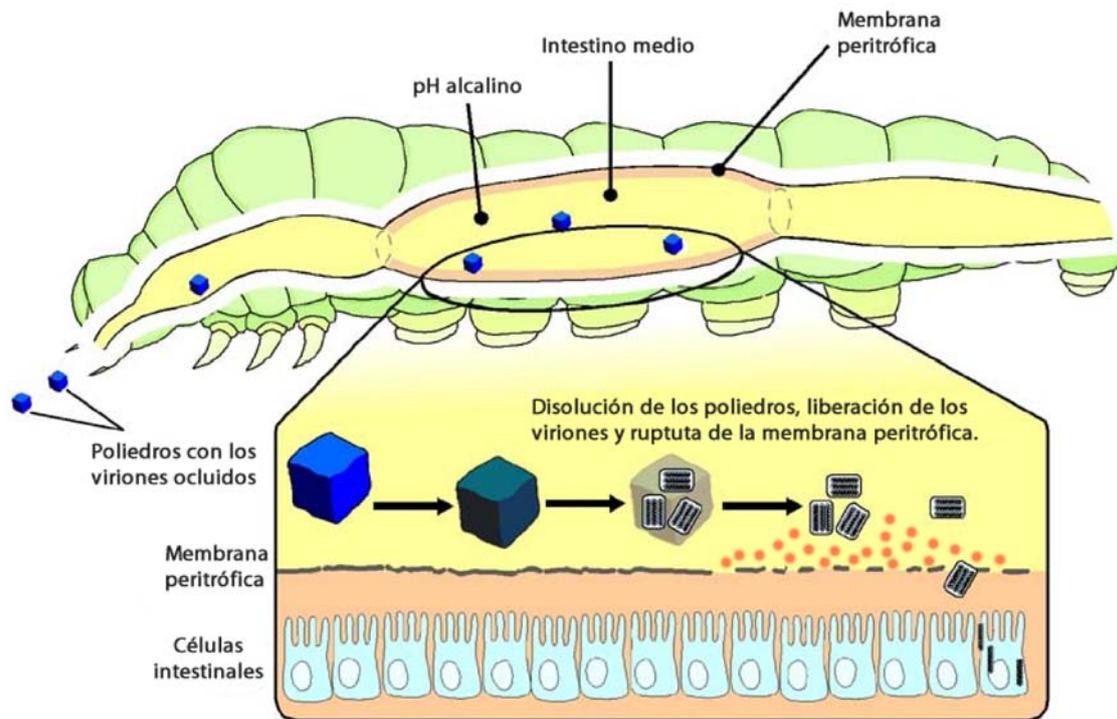


Figura 1. Esquema del proceso de infección de los baculovirus. Tras la ingestión de los poliedros por parte del insecto, éstos llegan hasta el intestino medio y, por causa del pH alcalino y de las proteasas presentes, se disuelven liberando los viriones. Durante este proceso se liberan también las enhancinas (en color rojo), que se unen a la mucina de la membrana peritrófica formando poros y favoreciendo la entrada de los ODVs.

Las características de los baculovirus hacen de ellos agentes de control ideales contra diferentes plagas de importancia económica, debido a su alta patogenicidad y virulencia y el mínimo impacto que producen sobre el medio ambiente y enemigos naturales, dado que son muy específicos. Por otro lado su elevada persistencia en el medio ambiente y su capacidad de producir epizootias facilita la propagación de la infección (Ibarra y Del Rincón Castro, 2001). Sin embargo, estos virus presentan algunas desventajas frente a los plaguicidas químicos, como su alto coste de producción, ya que al ser patógenos obligados deben producirse en larvas de un huésped susceptible y éstas han de ser criadas en grandes cantidades (Ibarra y Del Rincón Castro, 2001). Pero una de las características que se ha tratado de mejorar con más empeño ha sido su velocidad de acción que es lenta en comparación con la de los insecticidas químicos, ya que

durante el proceso de infección el insecto sigue alimentándose y por tanto produciendo daños en el cultivo (Inceoglu *et al.*, 2001). Sin embargo, el reciente avance en la biología molecular de estos virus ha favorecido el desarrollo de virus recombinantes más virulentos, al introducir en su genoma genes que expresan factores que aumentan su virulencia (Ibarra y Del Rincón Castro, 2001; Van Beek y Hughes, 1998). Varios han sido los factores utilizados, como la hormona juvenil, que al expresarse en grandes cantidades, el insecto para de alimentarse y comienza el inicio de la muda, que será letal para una larva que no ha adquirido aún el tamaño (Hammock *et al.*, 1990). La inclusión en el genoma de baculovirus de genes de toxinas, como la neurotoxina AaIT de escorpión (Stewart *et al.*, 1991) ó δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Chang *et al.*, 2003), ha mejorado de forma considerable la velocidad de acción, llegando a matar un 25% más rápido (Stewart *et al.*, 1991). La actividad insecticida de los baculovirus también se ha mejorado mediante la construcción de virus recombinantes que expresan otros genes como las *enhancinas*. Las *enhancinas* son metaloproteasas, sintetizadas por algunos GVs (Goto *et al.*, 1990; Wang y Granados, 1998) y NPVs (Jakubowska *et al.*, 2006; Popham *et al.*, 2001), que se localizan en los OBs, en el caso de los GVs, y en los ODVs y nucleocápsidas en el caso de NPVs (Slavicek, 2012). Estas enzimas proteolíticas afectan la integridad de la quitina que forma parte de la membrana peritrófica del insecto, favoreciendo la entrada de los ODVs y aumentando la probabilidad de infección de las células epiteliales del mesenterón (Gijzen *et al.*, 1995; Lepore *et al.*, 1996; Wang y Granados, 1998).

Agrotis segetum es una plaga polífaga que ataca plantas cultivadas pertenecientes a más de 15 familias, con amplia distribución por Europa, Asia y África (CABI, 2000). En condiciones naturales las poblaciones larvarias de *A. segetum* se ven afectadas por varios baculovirus como el granulovirus de *A. segetum* (AgseGV) y el nucleopoliedrovirus de *A. segetum* (AgseNPV). En el primero de ellos se ha descrito una *enhancina* (*viral enhancing factor*, VEF), mientras que en el AgseNPV se pueden encontrar tres VEFs (VEF1, VEF2 y VEF3). Por tanto, se espera que la construcción de virus recombinantes que expresan estas *enhancinas* contribuya a reducir las concentraciones de virus necesarias para conseguir un control efectivo del insecto causante de la plaga, así como una reducción del tiempo necesario para alcanzar dicho control. De ser así, esto tendría claras implicaciones en el desarrollo de nuevos formulados basados en baculovirus y consecuentemente en su desarrollo como bioinsecticidas.

OBJETIVOS

En este trabajo se abordó el objetivo general de caracterizar molecularmente una *enhancina* (VEF, *virus enhancing factor*) localizada en el genoma de un granulovirus de *Agrotis segetum* (AgseVG) aislado en Badajoz y determinar si esta metaloproteasa tiene algún efecto sobre la actividad insecticida del *Alphabaculovirus* de *Autographa californica* (AcMNPV) para distintas especies de insectos susceptibles. Para conseguir este objetivo general se abordaron los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de los genes y proteínas de las *enhancinas* de AgseGV y AgseNPV mediante análisis bioinformático.
2. Construcción de un baculovirus recombinante mediante el sistema Bac-to-Bac que incorpora la *enhancina* localizada en el AgseGV.
3. Comprobar la expresión de dicha *enhancina* en cultivos celulares de insecto infectados con el recombinante y detectar la presencia de la proteína en los OBs de los virus recombinantes.
4. Comparar de la actividad insecticida del recombinante que incorpora la *enhancina* de AgseGV con otros recombinantes previamente obtenidos y que expresan las *enhancinas* de AgseNPV.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Insectos, células y virus

Para la realización del presente trabajo se utilizaron larvas de distintas poblaciones de lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda*, *S. littoralis*, *Chrysodeixis chalcites* y *Mamestra brassicae*, criadas en el Insectario de la Universidad Pública de Navarra bajo condiciones controladas de temperatura ($25\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperiodo (16:8 h, luz:oscuridad), humedad relativa (50%), y alimentadas con una dieta semi-sintética basada en germen de trigo (Greene *et al.*, 1976) (Tabla 1). Por su parte, la línea celular Sf21, derivada de los ovarios de *S. frugiperda*, se mantuvo en medio de cultivo TC100 (Lonza) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (FCS, Gibco) a 28°C .

Tabla 1. Composición de la dieta semisintética adaptada a lepidópteros (Greene *et al.*, 1976), suministrada a las larvas utilizadas en este trabajo.

Ingrediente	gr/litro	Ingrediente	gr/litro
Germen de trigo	72	Nipagina	0,94
Proteína de soja	33	Aceite de lino	1,88 ml
Levadura de cerveza	14,25	Carragenina	18,75
Mezcla de sales Wesson	9,4	Agua destilada	800 ml
Ácido sórbico	1,5	Vitaminas y antibióticos	4,37
Colesterol	0,94	Cloruro de colina	0,93
Azúcar	29,25		

El granulovirus de *Agrotis segetum* (AgseGV) aislado en Badajoz se obtuvo de la colección de virus que el grupo de Bioinsecticidas Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología ha ido recolectando a lo largo de los últimos años. Por otro lado, los virus recombinantes del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) que expresan las *enhancinas* o *viral enhancing factors* (VEF1, VEF2 y VEF3) del nucleopoliedrovirus de *Agrotis segetum* (AgseNPV), denominados en el presente trabajo como BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV, fueron amablemente cedidos por Agata K. Jakubowska. Dichos recombinantes fueron construidos utilizando también el sistema Bac-to-Bac (Invitrogen).

2. Extracción de ADN a partir de OBs y análisis REN

Para las extracciones de ADN inicialmente se liberaron los ODVs mezclando 100 μl de OBs con 100 μl de Na_2CO_3 0.5 M y 50 μl de SDS 10% hasta un volumen final de 500 μl , tras lo cual se incubaron durante 10 min a 60°C . Los restos de OBs sin disolver y demás desechos se eliminaron mediante centrifugación a baja velocidad (5 min, 8.000 rpm). El sobrenadante conteniendo los viriones, se transfirió a un nuevo tubo y se trató con 25 μl de proteinasa K (20

mg/ml) durante 45 min a 50°C. Seguidamente, el ADN viral se extrajo mediante tratamiento con fenol saturado por dos veces y los restos de fenol se eliminaron con cloroformo. Para precipitar el ADN, la fase acuosa generada se trató con 2,5 volúmenes de etanol frío al 100% y 10% de acetato de sodio 3 M pH 5.6 para posteriormente centrifugarlo a 10.000 rpm 10 minutos. El precipitado se lavó con un volumen de etanol frío al 70% y después se resuspendió en un volumen de 100-200 µl de TE 0.1X (Tris-EDTA) durante 10 min a 60°C. Al final la muestra se guardó a 4°C. La concentración del ADN resultante se determinó posteriormente en un espectrofotómetro a 260 nm.

Para la digestión del ADN viral se mezclaron 2 µg del mismo con la enzima de restricción *Bam* HI y *Pst* I (10 unidades) durante 4 horas a 37°C, según las instrucciones del fabricante (New England Biolabs). Los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE (40 µM Tris-acetato; 1Mm EDTA) a 15 voltios durante 12 h aproximadamente. Los fragmentos de ADN se observaron por tinción sumergiendo el gel en una solución de bromuro de etidio (0,12 µg/ml) durante 10 min. Por último, el gel de electroforesis se sometió a una fuente de rayos uva y se fotografió en un transiluminador de UV usando el software Chemi.doc (Bio-Rad).

3. Localización, clonaje y secuenciación de la *enhancina* de AgseGV de Badajoz

Para el clonaje de la *enhancina* de AgseGV de Badajoz, primeramente se comparó los perfiles de restricción generados con *Pst* I y *Bam* HI con los obtenidos *in silico* a partir de la secuencia del genoma del AgseGV de China presente en la base de datos NCB1 (AY522332). Tras localizar la *enhancina* en el genoma del AgseGV de Badajoz se intentaron clonar los fragmentos *Pst* I donde se localiza la misma. Para ello, se construyó un banco genómico con dicha enzima. Brevemente, los fragmentos obtenidos tras la digestión con *Pst* I se clonaron en el vector de clonaje pUC19 (según las instrucciones del fabricante) y posteriormente se transformaron en *Escherichia coli* (DH5α) quimicompetentes. Dado que este vector tiene el sitio de clonaje múltiple dentro del gen *LacZ*, se seleccionaron las colonias transformantes blancas presentes en las placas de LB con ampicilina (100 mg/ml) y X-gal (20 mg/ml) que presentaban color blanco al interrumpir el inserto el gen *LacZ*. Estos transformantes se purificaron mediante lisis alcalina y se digirieron de nuevo con *Pst* I. El producto de la digestión se corrió en un gel de electroforesis de agarosa para seleccionar los clones con los fragmentos deseados. Estos clones se multiplicaron en 5 ml de LB líquido con ampicilina mediante incubación a 200 rpm y 37°C durante 24h. Posteriormente se llevó a cabo la purificación de ADN mediante lisis alcalina utilizando un kit comercial de purificación de plásmidos (Macherey-Nagel) y se comprobó la presencia del inserto en el vector mediante análisis REN. Los plásmidos purificados se mandaron a secuenciar a la empresa Stab Vida (Caparica, Portugal) y las secuencias obtenidas

se analizaron mediante el programa SeqMan II (DNASTAR) y se compararon con las presentes en GenBank.

En base a esta información se diseñaron los cebadores Agse55-FW y Agse55-RV (Tabla 2), con el fin de amplificar el gen de la *enhancina* del aislado de AgseGV de Badajoz y clonarlo en el vector pGEM-T Easy. En los extremos de estos cebadores se colocaron las dianas de restricción para *Nco* I (Agse55-FW) y *Nhe* I (Agse55-RV), con el fin de dirigir el clonaje en el pFBD^{polh}. El gen de la *enhancina* (3,1 Kb) se amplificó a partir del ADN viral purificado en el apartado 2, utilizando una Taq polimerasa de alta fidelidad (PrimeStar de Takara) y los cebadores específicos. Las condiciones utilizadas fueron 50°C y 1 min para la unión y 3 min de elongación durante 35 ciclos. El gen amplificado se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Conda), se recuperó del gel y se purificó mediante un kit comercial (Macherey-Nagel). El producto obtenido se ligó en el vector pGEM-T Easy siguiendo las instrucciones del fabricante (Promega) y se transformó mediante choque térmico en bacterias *E. coli* (DH5 α) quimicompetentes. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de LB con ampicilina (100 mg/ml) y X-gal (20 mg/ml) a 37°C durante 24h. Se seleccionaron 6 colonias blancas y se amplificaron en LB líquido con ampicilina mediante incubación a 200 rpm y 37°C durante 24h. Posteriormente se llevó a cabo la purificación de ADN mediante lisis alcalina utilizando un kit comercial de purificación de plásmidos (Macherey-Nagel) y se comprobó la presencia del inserto en el vector mediante análisis REN (doble digestión con *Nco* I y *Nhe* I) y PCR (con los cebadores Agse55-FW y Ags55-RV). Se seleccionó uno de los clones para la secuenciación completa del gen de la *enhancina* (mediante el método de *Primer Walking*), y dicha secuenciación fue realizada por la empresa StabVida (Caparica, Portugal).

Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el programa SeqMan II (DNASTAR) y se compararon con las presentes en GenBank NBI. Las secuencias de aminoácidos se alinearon utilizando MUSCLE (Edgar *et al.*, 2004) mientras que el análisis filogenético de las mismas se realizó con el programa informático MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando el método *neighbour-joining*, análisis *bootstrap* y modelo JTT+G+F. El alineamiento de la secuencia proteica de la *enhancina* de AgseGV de Badajoz junto con la de AgseGV de China y las VEF1, VEF2 y VEF3 de AgseNPV se realizó con el programa Clone Manager (SciEd software). Para determinar la naturaleza de la *enhancina* de AgseGV de Badajoz se utilizaron una serie de herramientas bioinformáticas. Así, para localizar los dominios proteicos se utilizó Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam/>), SignalP 3.0 para determinar los péptidos señal (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) y finalmente TMHMM para comprobar los dominios transmembrana (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo.

Cebador	Secuencia	Posición	Propósito
Agse55-FW	CATG <u>CCATGG</u> ATGTCGATTCAACGCACCTC	53845-53865*	Amplificación del gen de la <i>enhancina</i> de AgseGV. Las dianas vienen marcadas en negrita y subrayado .
Agse55-RV	CTAG <u>GCTAGC</u> CTAAAAACGGAAGAACAATG	56820-56840*	Comprobación de la correcta inserción del gen de la <i>enhancina</i> bajo el promotor p10. Cebadores localizados fuera de la región codificante, a unos 100 nt del start y del stop codón.
p10x-FW	GGACGGTATGAATAATCCGG	4573-4592 [#]	Comprobar la expresión del gen de la <i>enhancina</i> en el virus recombinante mediante RT-PCR. Cebadores localizados en el extremo 5' del gen que amplifican un fragmento de 532 pb.
p10x-RV	TTATTGCCGTCATAGCGCGG	4201-4220 [#]	
RT-FW	TTGATACGGGACACGGTAGC	54.008-54.028*	
RT-RV	AAAGATTGCGTGGTCACACC	54.520-54.540*	

* Posición en el genoma de AgseGV

Posición en pFBD

4. Construcción de los recombinantes Bac ϕ y BacENHAgseGV

Para la generación de los virus recombinantes se utilizó el sistema comercial de expresión en baculovirus Bac-to-Bac (Invitrogen). Este método se basa en la generación de baculovirus recombinantes mediante la transposición específica en células de *E. coli* en lugar de la recombinación homóloga en células de insecto, que a menudo resulta en una baja eficiencia además de ser más largo y tedioso (Luckow *et al.*, 1993). El vector de transformación, que contiene el gen de interés, recombina con el báciido de AcMNPV en células competentes de *E. coli* DH10Bac para formar el recombinante que expresa el gen de interés, para luego transformarlo en células de insecto y conseguir así la producción a gran escala de la proteína o de los OBs del recombinante. En el presente trabajo se utilizó como vector de transformación el pFastBac Dual (pFBD) que contiene dos sitios múltiples de clonaje que permiten la expresión de dos genes heterólogos (Fig. 2B). Uno de ellos está controlado por el promotor de la poliedrina y el segundo de ellos por el promotor p10. Ambos son promotores tardíos que se expresan en grandes cantidades durante la fase final del proceso infeccioso. Para que dichos virus recombinantes además de expresar el gen de interés fuesen capaces también de producir poliedros se clonó el gen de la poliedrina de AcMNPV bajo su mismo promotor (denominado en el presente trabajo pFBD^{+polh}) (Fig. 2B). De esta forma, nuestro gen de interés se expresará bajo el promotor p10. Esta construcción también fue amablemente cedida por A. Jakubowska.

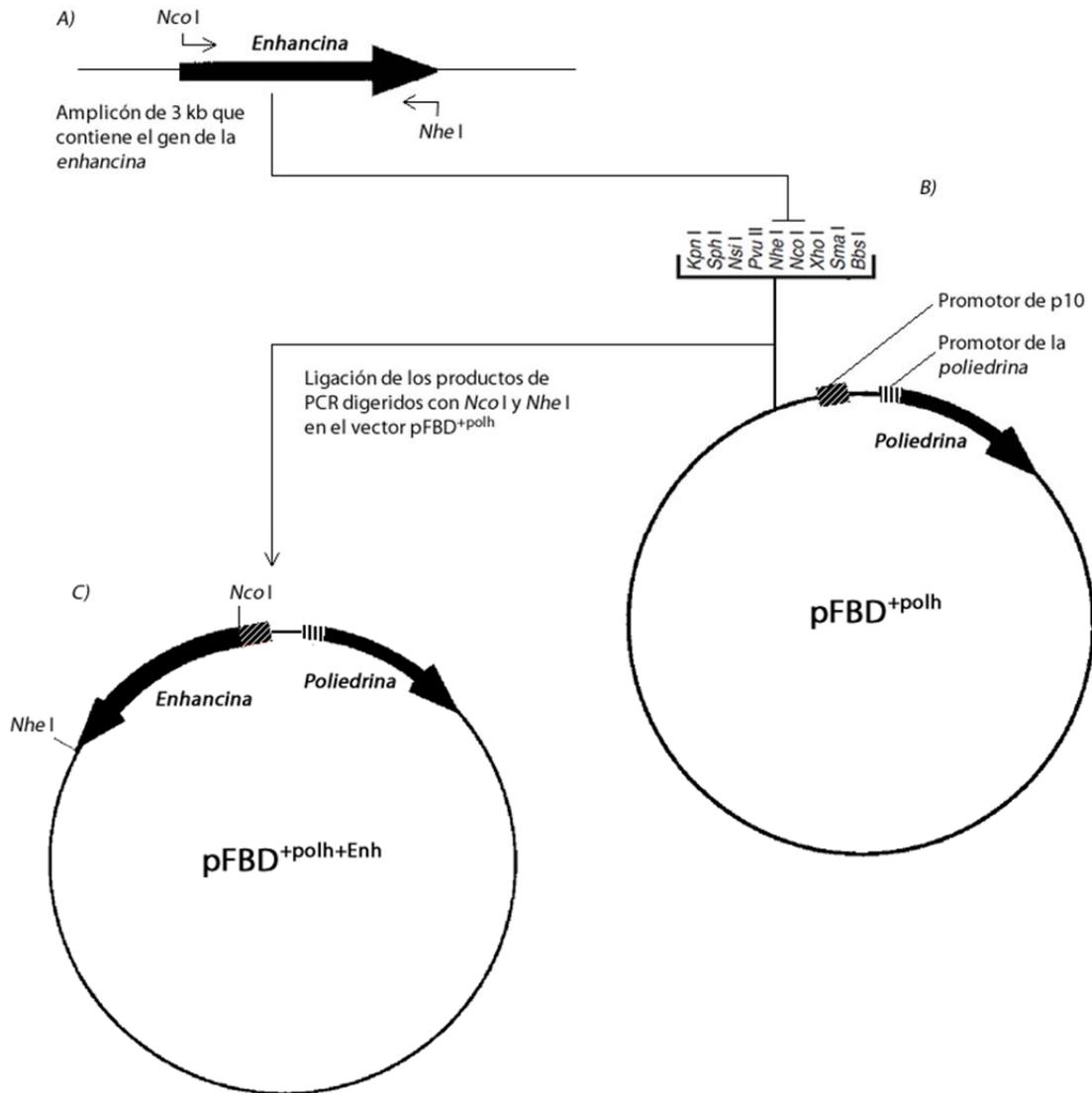


Figura 2. A) Gen de la *enhancina* de AgseGV amplificado mediante PCR con los cebadores Agse55-FW y Agse55-RV en los que se incluye los sitios de restricción *Nco* I y *Nhe* I. B) Representación esquemática del pFastBacDual que incluye el gen de la *poliedrina* bajo su propio promotor (pFBD^{+polh}) y el promotor p10 tras el cual se localiza el sitio múltiple de clonaje que incluye los sitios de restricción *Nco* I y *Nhe* I. C) Vector de transposición (pFBD^{+polh+Enh}) utilizado en este trabajo que contiene el gen de la *enhancina* de AgseGV en fase con el promotor p10 y en la dirección correcta.

4.1. Clonaje del gen de la *enhancina* de AgseGV en pFBD^{+polh}

Para construir el vector de transformación se dirigió el plásmido pGEM-T Easy que contenía la *enhancina* (punto 3) con las enzimas de restricción *Nco* I y *Nhe* I. Dicha digestión se corrió en un gel de bajo punto de fusión durante 24h a bajo voltaje (20V), para poder separar la banda del vector (pGEM-T Easy) y la banda del inserto (*enhancina*) ya que ambos presentan más o menos el mismo tamaño. El inserto se extrajo con un bisturí y se purificó de nuevo en columna comercial (Macherey-Nagel). Este fragmento digerido se clonó finalmente en el pFBD^{+polh},

previamente digerido con las enzimas *Nco* I y *Nhe* I y purificado con el kit de columna (Fig. 2C). Dicha ligación se transformó de nuevo en células quimicompetentes DH5 α y se sembraron en placas de LB con ampicilina. Se seleccionaron 10 colonias, y tras su amplificación en LB líquido se purificaron mediante lisis alcalina utilizando el kit de purificación de plásmidos. A continuación se analizaron los clones mediante digestión doble y PCR (utilizando los pares de cebadores Agse55-FW/Agse55-RV y p10x-FW/p10x-RV), obteniendo el pFBD^{+polh+Enh}. La correcta inserción del gen de la *enhancina* en el vector de transformación, y por tanto la posición en fase del gen de la *enhancina*, se comprobó mediante secuenciación del fragmento obtenido con los cebadores p10x-FW y p10x-RV, que se localizan fuera de la región codificante. Este fragmento resultante se clonó en el pGEM-T Easy y dos plásmidos que contenían el inserto se mandaron a secuenciar.

4.2. Construcción de los recombinantes BacENHAgseGV y Bac ϕ ,

Para la construcción del BacENHAgseGV se transformó el vector pFBD^{+polh+Enh} en células DH10Bac que contienen el b ϕ mido de AcMNPV y un plásmido *helper* que induce la transposición entre el b ϕ mido y el vector de transformación (Fig. 2C). De esta forma se genera un b ϕ mido recombinante que expresa el gen de interés y que además es capaz de producir poliedros. Como control negativo se construyó un recombinante que expresase únicamente la poliedrina, de forma que bajo el promotor p10 no hubiese gen, el cual se obtuvo utilizando como vector de transformación el pFBD^{+polh} (Fig. 2B). Así, se transformó 1 ng del pFBD^{+polh+Enh} y pFBD^{+polh} en células DH10Bac electrocompetentes y los transformantes se seleccionaron tras 48h en placas de LB agar con gentamicina (10 mg/ml, presente en el pFBD), tetraciclina (12,5 mg/ml, presente en el plásmido *helper*), kanamicina (50 mg/ml, presente en el b ϕ mido), X-gal (20 mg/ml, presente en el b ϕ mido) e IPTG (1 M, presente en el b ϕ mido). Los transformantes positivos, de color blanco, ya que el *cassette* de expresión se inserta dentro del gen *LacZ* y por tanto lo interrumpe, se volvieron a sembrar bajo las mismas condiciones pero esta vez durante 24h, para evitar contaminaciones. Se seleccionaron 5 colonias que contenían el recombinante positivo y se amplificaron en LB líquido con los antibióticos ya mencionados. Sin embargo durante la transposición se puede favorecer la formación de falsos recombinantes que presentan deleciones en el gen de interés o en otras zonas del genoma, de forma que se extrajo el ADN de las 5 colonias mediante lisis alcalina y se realizó posteriormente un análisis REN y PCR (con los cebadores p10x-FW/p10x-RV, Tabla 2). Tras comprobar los perfiles de restricción así como el correcto tamaño del fragmento de la PCR obtenido se seleccionó una de ellas tanto del b ϕ mido recombinante que expresa la *enhancina* del AgseGV y produce poliedros, BacENHAgseGV, como el b ϕ mido que únicamente produce poliedros, Bac ϕ , para obtener ADN de alta calidad. Para ello se amplificó cada recombinante en 100 ml de LB con los antibióticos gentamicina (10 mg/ml), tetraciclina (12,5 mg/ml) y kanamicina (50 mg/ml), y se

extrajo el ADN utilizando un kit de purificación de bácmidos (HiPure Plasmid Midiprep, Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente se cuantificó su concentración en espectrofotómetro y se analizó mediante REN (con *Pst* I) y PCR (con los cebadores p10x-FW/p10x-RV). La correcta construcción de ambos recombinantes se verificó mediante la secuenciación de la zona de inserción en el recombinante, para ello se amplificó la zona con los cebadores p10x-FW/p10x-RV (Tabla 2) y una Taq de alta fidelidad y el producto amplificado se clonó el pGEM-T Easy para su posterior secuenciación.

4.3. Transfección en cultivo celular

Para producir partículas virales infectivas (o *budded virus*, BVs) se realizó una transfección en células Sf21 con el ADN de alta calidad purificado en el apartado anterior. La transfección consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas. En este caso se utiliza como vehículo para la transfección liposomas (Lipofectin, Invitrogen), pequeños cuerpos formados por una membrana similar a la membrana plasmática de la célula de forma que puede fusionarse con la misma, liberando el ADN al interior celular. Así, en primer lugar, las muestras purificadas (Bac ∞ y BacENHAgseGV) se diluyeron hasta una concentración de 500 ng/ μ l. Un volumen final de 25 μ l (1 μ l de muestra + 24 μ l de H₂O) se mezcló con 25 μ l de lipofectina (2:1, lipofectina: H₂O) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, lo que permite la formación del complejo liposómico (liposomas + ADN).

Posteriormente se pasó a realizar la transfección en cultivo celular. Para ello, inicialmente se eliminó el medio presente en *flasks* de 75 cm² que contenían células a aproximadamente un 80-90% de confluencia y se sustituyó por medio TC100 sin suero ni antibióticos, ya que se han descrito tasas menores de unión de baculovirus a células en cultivos suplementados con suero (Maranga *et al.*, 2002). Posteriormente se llevó a cabo el conteo de células para así depositar 10⁶ células por pocillo en placas de 6 pocillos (35 mm de diámetro) durante 3h a 28°C. Tras las 3h de depósito y durante los 30 min de incubación del ADN con el lipofectin, se procedió al lavado de las células con 2ml de TC100 sin suero ni antibióticos por 2 veces para eliminar cualquier resto de suero. Finalmente se incluyó 1 ml de TC100 sin suero pero con antibióticos (1% ampicilina/penicilina, Gibco). Tras la media hora, se infectaron las células con los 50 μ l del complejo liposómico y se incubó a 28°C durante la noche. Pasado ese tiempo, se añadió 1 ml de TC100 suplementado con 10% de FCS y 1% antibióticos (1% ampicilina/estreptomicina) y se continuó la incubación durante cinco días, observando diariamente hasta comprobar la presencia de poliedros dentro de las células. Tras ello, se recuperaron las células y se centrifugaron a baja velocidad (5 min, 5.000 rpm), para separar los OBs de los BVs. El precipitado que contiene los OBs se utilizó para realizar una extracción de ADN para comprobar los perfiles, mientras que el

sobrenadante conteniendo los BVs, se utilizó bien para producir un stock viral mayor en cultivo celular o inyectar el ADN en larva para producir OBs.

Para la extracción de ADN, el precipitado conteniendo los OBs se lavó una vez con 500 μ l de PBS y se resuspendió en 250 μ l de TE, tras lo cual se añadió 250 μ l de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl, mercaptoetanol 5%, SDS 0,4% y 10 mM EDTA). Al volumen final de 500 μ l se añadió 12,5 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y 2,5 μ l de ribonucleasa A (10 mg/ml) para después incubarlo a 37°C durante 30 min. El lisado se extrajo mediante una mezcla 1:1 de fenol/cloroformo por dos veces. Para precipitar el ADN, a la fase acuosa se le añadieron 50 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.6 y 2,5 volúmenes de etanol frío al 100% y se centrifugó a 10.000 rpm 10 minutos. El precipitado se lavó con un volumen de etanol frío al 70% y después se resuspendió en un volumen de 50 μ l de TE 0.1X (Tris-EDTA) durante 10 min a 60°C. El ADN extraído se analizó mediante análisis REN y PCR .

El sobrenadante conteniendo los BVs se filtró y guardó a 4°C. Para la multiplicación de los virus recombinantes Bac ϕ y BacVEF ϕ AgseGV, y con el fin de producir gran stock viral, 1×10^6 células en *flasks* de 25 cm² se infectaron con 5 μ l de BVs. Inicialmente, se dejaron reposar las células durante 3 h a 28°C para permitir su adhesión al fondo de la placa, tras lo cual se eliminó el medio y se añadieron 5 μ l de BVs de cada de virus y se dejaron en agitación suave 1 h para favorecer una infección homogénea. Finalmente se añadieron 5 ml de TC100 con suero y antibióticos al 1% (penicilina/estreptomicina) y se incubaron durante 5 días a 28°C. Comprobada la presencia de OBs al microscopio óptico invertido, las células se centrifugaron a baja velocidad, el precipitado se analizó por REN y PCR siguiendo el protocolo antes descrito y el sobrenadante se filtró y guardó a 4°C.

4.4. Producción de OBs: inyección en larvas

Para producir OBs en grandes cantidades para su posterior análisis mediante bioensayos, es necesaria la multiplicación del virus en larva. Así se inyectaron larvas del cuarto estadio (L₄) de *S. frugiperda* con 5 μ l del stock de BVs a razón de 40 larvas por tratamiento: Bac ϕ , BacENH ϕ AgseGV, BacVEF1 ϕ AgseNPV, BacVEF2 ϕ AgseNPV y BacVEF3 ϕ AgseNPV. Las larvas se colocaron en placas de cultivo celular de 24 pocillos con dieta semi-sintética basada en germen de trigo (Tabla 1) y se incubaron a una temperatura constante de 25 \pm 2°C. Las larvas se inspeccionaron diariamente y aquellas muertas con la apariencia típica de infección por baculovirus se recogieron en un *falcon* de 15 ml y se purificaron los OBs. Para ello, las larvas del mismo tratamiento se homogeneizaron en 8 ml de SDS al 0,1% y se trituraron para liberar los OBs. Las suspensiones obtenidas se filtraron a través de un filtro de muselina para eliminar los restos de tegumento y el filtrado se centrifugó a 6.000 rpm durante 5 min. Los precipitados resultantes se resuspendieron dos veces en 2 vol. de SDS al 0,1% y se centrifugaron a 8.000 rpm

durante 5 min, resuspendiendo finalmente los OBs en 1 vol. de SDS 0,1% y guardándolos a 4°C. Una muestra de 100 µl de cada tratamiento se utilizó para extracción de ADN (tal y como se ha descrito en el apartado 2) para su posterior análisis por REN y PCR.

5. Expresión temporal de la *enhancina* de AgseGV

Para comprobar que el gen de la *enhancina* de AgseGV se expresa bajo el promotor p10 en el virus recombinante, se realizó un ensayo de RT-PCR. En placas de cultivo celular de 6 pocillos, 10⁶ células/pocillo se infectaron con 5 µl de BVs de BacENHAgseGV y se recuperaron las células a las 0, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h. El ARN total de la célula se extrajo con Trizol® (Invitrogen). Brevemente, se homogeneizaron las muestras en 500 µl de Trizol® y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 100 µl de cloroformo y tras agitar vigorosamente los tubos (unos 15 s aproximadamente) se volvieron a incubar durante unos 3 min. Para separar las fases se centrifugaron las muestras a 11.000 rpm 10 min y 4°C. A la fase acuosa se le añadieron 250 µl de isopropanol y tras incubar 10 min se volvió a centrifugar a 11.000 rpm 10 min y 4°C para así precipitar el ARN. Este precipitado se lavó con etanol al 75%, se resuspendió y se volvió a centrifugar, esta vez a 9.000 rpm 5 min y 4°C. El sobrenadante generado se eliminó y el ARN precipitado se secó durante 5 min a temperatura ambiente. Por último, se disolvió el ARN en 20 µl de agua DEPC y se incubó durante 10 min a 60°C para la completa disolución del ARN. Posteriormente las muestras se conservaron a -20°C.

Previo a la RT-PCR, el ARN se trató con 1 µl de DNasa (1 unidad/µl) durante 2 h a 37°C, para eliminar los posibles restos de ADN y evitar así la aparición de falsos positivos. La síntesis de la hebra complementaria de ADN (ADNc) se obtuvo mediante la AMV-RT (transcriptasa inversa, Promega) utilizando el primer reverso RT-RV (Tabla 2) en las siguientes condiciones: 5 min de unión a 25° C, 60 min de elongación a 42° C y 15 min a 70° C para inactivar la transcriptasa. La amplificación mediante PCR a partir del ADNc se llevó a cabo utilizando los cebadores específicos para la RT-PCR (Tabla 2), dando lugar a un amplicón de 532 pares de bases. Las condiciones utilizadas fueron 50°C 1 min para la unión y 1 min de elongación durante 35 ciclos. El producto de PCR se sometió a electroforesis, tinción en bromuro de etidio durante 10 min y posterior visualización en un transiluminador de UV (Chemi.doc, Biorad).

6. SDS-PAGE

Las enhancinas se encuentran encapsuladas en los OBs en el caso de GVs, mientras que en los NPVs están asociadas a los ODVs y nucleocápsidas, estructuras proteicas que albergan el ADN y quedan envueltos por una estructura lipoproteica formando los viriones (Funk *et al.*, 1997). De hecho se calcula que las enhancinas pueden llegar a representar el 5% del contenido de los gránulos (Gallo *et al.*, 1991), de forma que se debería identificar su presencia en un gel de

proteínas (SDS-PAGE) obtenido a partir de la solubilización los OBs. Así, para poder comprobar la presencia de las enhancinas en los OBs de Bac ∞ , BacENHAgseGV, BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV se solubilizaron 100 μ l de OBs a una concentración de 5×10^9 OBs/ml en tampón carbonato (50 mM Na₂CO₃, 100 mM NaCl, pH 11,3). Posteriormente, se añadió el tampón de carga (*laemmli sample buffer*, BioRad) en una proporción 3:1 (muestra:tampón de carga) y se hirvieron las muestras a 100°C durante 5 min. 10 μ l de cada muestra se cargaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 11% a 50 mA constantes durante 2 h. Al finalizar, se tiñó el gel durante unos 30 min con solución de tinción (Coomasie Brilliant Blue R) para después decolorarlo con solución decolorante (Escriche *et al.*, 2001). Finalmente se observaron los distintos perfiles obtenidos y se fotografió.

7. Bioensayos

7.1. Cuantificación de OBs

La titulación de los OBs se llevó a cabo en cámaras de conteo Neubauer Improved (Superior Marienfeld, Laude-Koeningshofen, Alemania) de 0,1 mm³ de volumen en un microscopio de contraste de fases a 400 aumentos. La concentración total de la suspensión vírica se calculó según la fórmula:

$$N = 5 \times n \times D \times 10^4$$

donde N es el número de OBs por ml de suspensión viral, *n* es el número medio de poliedros contados y D es el factor de dilución.

7.2. Ensayos de patogenicidad

El grado de potenciación de la actividad viral de las distintas enhancinas depende del sistema huésped-patógeno así como del estadio y concentración utilizada (Toprak *et al.*, 2012). Se sabe que las enhancinas de un baculovirus dado tienen mayor efecto sobre su huésped homólogo que sobre heterólogo (Uchima *et al.*, 1988). Igualmente, al degradar las enhancinas la mucina de la membrana peritrófica la potenciación es mayor en estadios avanzados ya que la membrana es más robusta que en estadios tempranos (Peng *et al.*, 1999). Así, se llevaron a cabo ensayos en los estadios larvarios L₂ y L₄ de distintas especies de insectos susceptibles como *S. frugiperda*, *S. littoralis*, *C. chalcites* y *M. brassicae*. La infectividad de los virus recombinantes BacENHAgseGV, BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV se comparó con un control negativo, Bac ∞ que no incluye el gen de la *enhancina*, y un control positivo, Bac ∞ junto con el abrillantador óptico Tinopal UNPA-GX al 1%. El Tinopal UNPA-GX es un reactivo químico incluido en el grupo de abrillantadores ópticos derivado del estilbena que se utilizan de forma habitual en la industria textil debido a su capacidad de absorber luz en la

región ultravioleta y violeta (340-370 nm) y re-emitirla en la región azul del espectro visible (420-470 nm), produciendo un efecto “blanqueador” en los tejidos. Aprovechando esta capacidad, los brillantadores ópticos se han utilizado como fotoprotectores en los formulados que incluyen baculovirus como insecticidas (Shapiro, 1992). Posteriormente, al igual que las enhancinas, se descubrió su capacidad potenciadora de la actividad al incrementar la permeabilidad de la membrana peritrófica, al unirse a la mucina y formar poros, y por tanto la probabilidad de infección (Wang y Granados, 2000).

7.2.1. Ensayos en L₂

En los ensayos en L₂ se probaron dos concentraciones de virus en *S. frugiperda* (5×10^6 y 2×10^5 OBs/ml; Simón *et al.*, 2004), *S. littoralis* (1×10^8 y 1×10^6 OBs/ml) y *C. chalcites* (1×10^7 y 1×10^5 OBs/ml; Bernal *et al.*, 2013). No se pudieron realizar ensayos en *M. brassicae* ya que en el momento de realización de los ensayos no se disponía de larvas. En todos los casos las larvas previamente mantenidas en ayunas durante unas 8 h se infectaron mediante el método de la gota descrito por Hughes y Wood (1981). Grupos de 24 larvas de cada estadio y especie se infectaron con una suspensión acuosa que contenía 10% sacarosa, 0,001% de Fluorella Blue y OBs a las distintas concentraciones. Del mismo modo se alimentó a un grupo de 24 larvas con una suspensión acuosa libre de virus, a modo de testigo negativo. Pasados 10 min durante los cuales se deja que las larvas ingieran la suspensión acuosa *ad libitum*, aquellas que la habían ingerido se tornaron de color azul y fueron seleccionadas para individualizarlas en cajas de plástico de 24 pocillos. Posteriormente, las larvas se mantuvieron a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con dieta artificial suficiente para su alimentación durante el ensayo. Los registros de mortalidad se realizaron cada 24 h comprobando que la causa de la muerte era infección por baculovirus, y siempre que hubiese dudas se observaba la muestra al microscopio óptico con el fin de comprobar la presencia de poliedros. El ensayo sólo se pudo realizar en una ocasión de forma que no se pudo aplicar ningún análisis estadístico.

Al mismo tiempo, se realizó un ensayo de patogenicidad en larvas L₂ de *S. frugiperda* con el fin de comprobar el grado de potenciación de la actividad insecticida de los virus recombinantes que incluyen a las *enhancinas*, comparándolo así con un control negativo (Bac ∞) y otro positivo (Bac ∞ + Tinopal UNPA-GX al 1%). Así se determinó la concentración letal media (CL₅₀) mediante bioensayos utilizando únicamente larvas L₂ de *S. frugiperda*. Las larvas, previamente mantenidas en ayunas, se infectaron con el método de la gota (Hughes y Wood, 1981) con 5 concentraciones diferentes que producen entre un 95% y 5% de mortalidad (Beperet, 2014; Simón *et al.*, 2008); $2,5 \times 10^7$, 5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^5 y 4×10^4 OBs/ml. Una vez las larvas habían ingerido el volumen del inóculo dentro de los 10 min, se individualizaron en cajas de plástico que contenían dieta artificial a razón de 24 larvas por concentración. Otro grupo de 24 larvas se

alimentaron con agua y con agua más Tinopal UNPA-GX pero sin virus, como controles negativos (como en el apartado 6.1). Los registros de mortalidad se realizaron cada 24h. El ensayo se repitió 3 veces y los resultados se analizaron estadísticamente mediante el programa informático POLO PLUS (Le Ora Software, 1987). Así se obtuvieron las rectas de regresión y la bondad de ajuste mediante un test χ^2 para un nivel de significación del 95 %. Partiendo de las ecuaciones obtenidas se calculó la CL_{50} para los distintos tratamientos. La diferencia entre los tratamientos se determinó mediante la potencia relativa, cuyo cálculo proviene del cociente de las CL_{50} de los tratamientos con la CL_{50} del tratamiento de referencia (en nuestro caso Bac ∞).

7.2.2. Ensayos en L_4

En aquellas especies en las que se vio infectividad en L_2 se realizó otro ensayo en L_4 , debido a que la membrana peritrófica es más robusta en estadios larvarios más avanzados y es posible constatar mejor el efecto de las enhancinas (Peng *et al.*, 1999). Por esto se ensayaron en larvas L_4 de *S. frugiperda* y *M. brassicae*. Al no existir referencias de las concentraciones a utilizar en estos estadios, se decidió utilizar un rango amplio de las mismas 1×10^9 , 1×10^8 y 1×10^7 OBs/ml. También se ensayó en larvas L_4 de *C. chalcites* pero sólo con dos concentraciones de virus; 1×10^9 y 1×10^7 OBs/ml. El ensayo en *M. brassicae* se realizó aún no habiendo realizado un test preliminar en L_2 por aprovechar un envío de larvas en L_4 que en aquel momento estaban disponibles, de esta forma se probó una especie más. Como control positivo se incluyó de nuevo Bac ∞ + Tinopal UNPA-GX al 1%. En todos los casos las larvas previamente mantenidas en ayunas durante unas 8 h se infectaron mediante el método de la gota descrito por Hughes y Wood (1981). Grupos de 24 larvas de cada estadio y especie se infectaron con una suspensión acuosa que contenía 10% sacarosa, 0,001% de Fluorella Blue y OBs a las distintas concentraciones y Tinopal UNPA-GX al 1%, en su caso. Del mismo modo se alimentó a un grupo de 24 larvas con una suspensión acuosa libre de virus, a modo de testigo negativo. Pasados 10 min durante los cuales se deja que las larvas ingieran la suspensión acuosa *ad libitum*, aquellas que la habían ingerido se tornaron de color azul y fueron seleccionadas para individualizarlas en cajas de plástico de 24 pocillos. Posteriormente, las larvas se mantuvieron a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con dieta artificial suficiente para su alimentación durante el ensayo. Los registros de mortalidad se realizaron cada 24 h comprobando que la causa de la muerte era infección por baculovirus, y siempre que hubiese dudas se observaba la muestra al microscopio óptico con el fin de comprobar la presencia de poliedros. El ensayo se repitió tres veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el análisis Weibull del programa Generalized Linear Interactive Modelling GLIM (Crawley, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Localización de la *enhancina* en el aislado de Badajoz de AgseGV

Los perfiles de restricción del aislado de Badajoz de AgseGV con las enzimas *Bam* HI y *Pst* I muestran gran similitud a los perfiles *in silico* del aislado chino de AgseGV (Fig. 3). Trabajos anteriores también han puesto de manifiesto diferencias mínimas en los perfiles de restricción entre aislados de una misma especie viral (Bernal *et al.*, 2013). El gen de la *enhancina* del aislado chino se localiza en el fragmento *Bam* HI-A (22.223 pb) y entre el fragmento *Pst* I-J (2.162 pb) y *Pst* I-D (15.954 pb) (Fig. 4), y el alto grado de similitud en los perfiles REN sugiere que en el aislado de Badajoz se localiza en la misma posición. Para confirmar esto, se llevó a cabo la construcción de un banco genómico con la enzima *Pst* I a partir de ADN del aislado en estudio, ya que los fragmentos son de un tamaño más apropiado para su clonaje. Se consiguieron un total de 10 fragmentos diferentes, clonando con éxito el fragmento *Pst* I-J de 2.162 pb, mientras que se falló en el fragmento de mayor tamaño *Pst* I-D. La secuenciación completa del fragmento *Pst* I-J demostró la presencia de la *enhancina* entre este fragmento y *Pst* I-D. Este fragmento contiene el extremo 5' (ATG) de la *enhancina*, en total 2.104 pb. También se localiza en este fragmento 58 pb del extremo 5' de la superoxido dismutasa (SOD). En el aislado chino ambos genes se localizan en la misma posición y orientación. El análisis de secuencias reveló que este fragmento de 2.104 pb presenta 100% de identidad a nivel de nucleótido excepto en las posiciones 42 y 1.839 con el fragmento correspondiente del aislado chino.

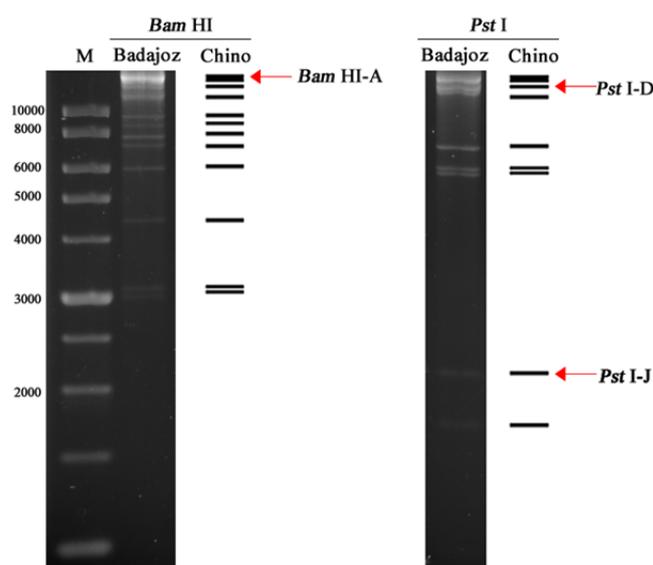


Figura 3. Perfiles de restricción del aislado de Badajoz de AgseGV. A la derecha de cada imagen aparece el perfil *in silico* del aislado chino de AgseGV. Con una flecha roja se indica el fragmento de *Pst* I (*Pst* I-J) que contiene la mayor parte del gen de la *enhancina* y que se consiguió clonar y secuenciar.

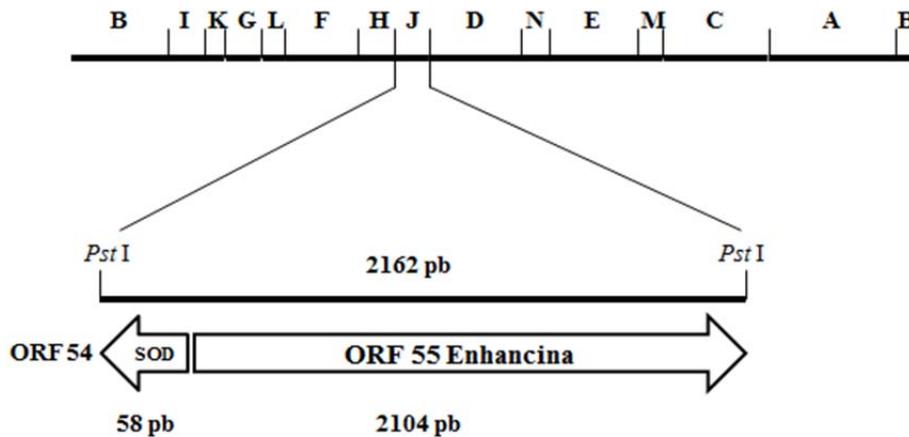


Figura 4. Mapa de restricción del genoma de AgseGV realizado con la enzima de restricción *Pst* I. El gen de la *enhancina* se encuentra entre los fragmentos *Pst* I-J y *Pst* I-D. El fragmento *Pst* I-J se clonó y se envió a secuenciar.

2. Clonaje y secuenciación de la *enhancina* de AgseGV de Badajoz

Por tanto, en base a esta información y al observar el alto grado de identidad, se decidió utilizar la secuencia del aislado chino de AgseGV (AY522332) como molde para diseñar los cebadores específicos con los que amplificar el gen de la *enhancina* (Tabla 2). Así, una vez amplificado el gen completo con dichos cebadores y con una Taq de alta fidelidad, el amplicón obtenido se clonó en el vector pGEMT-Easy y se envió a secuenciar.

El gen de la *enhancina* del aislado de AgseGV de Badajoz posee una secuencia de 3.135 pb, lo que se traduce en 1.044 aminoácidos. Tanto la secuencia a nivel de nucleótidos así como la de proteínas presenta una identidad del 99% con el ORF55 (3.015 pb, 1.004 aminoácidos) del aislado chino de AgseGV (AY522332), mientras que con las VEFs de AgseNPV baja a un 24-28% (DQ123841). Cuando se compara con el resto de *enhancinas* dicha identidad aún baja más siendo de media de un 20%, siendo la *enhancina* más próxima la *enhancina* 3 de *Pseudaletia unipuncta* GV (27%). Estudios anteriores también han puesto de manifiesto la baja identidad que hay entre las distintas *enhancinas* descritas (Li *et al.*, 2003). Por tanto, la *enhancina* del aislado de Badajoz es 119 pb más larga, lo que sugiere una delección en la *enhancina* del aislado chino. Dicha diferencia se localiza en el extremo C-terminal del gen, entre las posiciones 2.965 y 3.084 pb. Por otra parte, encontramos 8 sustituciones de nucleótidos en las posiciones 42 (C→A), 1.839 (A→G), 2.199 (C→T), 2.685 (C→T), 2.808 (C→T), 2.832 (T→C), 2.904 (A→C) y 2.905 (G→C). Por lo demás, el alineamiento de nucleótidos en BLAST nos da un 100% de identidad con la *enhancina* del aislado chino. Cuando se compara con las de AgseNPV, se observa que las VEF1 (2.633 pb; 877 aminoácidos), VEF2 (2.651 pb; 883 aminoácidos) y VEF3 (2.588 pb; 862 aminoácidos), son algo más pequeñas, siendo esta variabilidad mayor en el

extremo C-terminal (Fig. 5). Esto corrobora otras observaciones, donde se ha comprobado que las *enhancinas* de NPV son también del orden de 250-500 pb (20-100 aminoácidos) más pequeñas que las de los GVs. Así por ejemplo la *enhancina* de *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV) presenta dos bloques de aminoácidos, aminoácidos 724-758 y 807-902, deletados, los cuales se localizan también en el extremo C-terminal (Popham *et al.*, 2001). Esta zona se ha descrito anteriormente como una zona de gran variabilidad entre las distintas *enhancinas* (Popham *et al.*, 2001), no siendo por tanto vital para la función proteolítica (Popham *et al.*, 2001; Slavicek, 2012). En este extremo las *enhancinas* de NPVs poseen un dominio de anclaje a membrana (*transmembrane domain*) que está ausente en GVs, de ahí que las *enhancinas* de NPVs se localicen en los ODVs ó nucleocápsidas. Este dominio es característico de proteínas extracelulares de fusión, el cual es requerido para el anclaje o fusión a membranas como se ha descrito para muchas proteínas estructurales de los ODVs (Rohrmann, 2008).

En cambio en el extremo más conservado de la proteína, el N-terminal, se localiza el dominio de unión a zinc (*zinc-binding domain*, HEXXH), característico de enzimas con función proteolítica como las metaloproteasas (Jongeneel *et al.*, 1989; Murphy *et al.*, 1991). Hasta la fecha todas las *enhancinas* funcionales han presentado este dominio (HEXXH), lo que sugiere que dicho motivo es vital para su funcionalidad (Slavicek, 2012). Así mutaciones dirigidas en este dominio hacen que pierdan su función proteolítica y por tanto de potenciación de la actividad (Bischoff y Slavicek, 1997; Slavicek, 2012). Para este tipo de enzimas, el ion de zinc está unido a los dos residuos de histidina (H), y a un tercer residuo, que es típicamente una histidina (H), cisteína (C), ácido aspártico (D) ó glutámico (E) y que se localiza en cualquier lugar entre los aminoácidos 20-120 tras la secuencia HEXXH (Häse y Finkelstein, 1993; Jiang y Bond, 1992). En las metaloproteasas, el residuo de ácido glutámico (E) localizado dentro de la secuencia HEXXH es la base catalítica, que polariza una molécula de agua implicada en el ataque nucleofílico del enlace péptido de unión (Slavicek, 2012). Por tanto, este residuo de ácido glutámico es vital para la función proteolítica de las *enhancinas*.

El alineamiento de las 5 *enhancinas* de los baculovirus de *Agrotis segetum* ha puesto de manifiesto que las VEF1 y VEF2 de AgseNPV presentan este patrón HEXXH, mientras que la VEF3 de AgseNPV y las *enhancinas* de los dos aislados de AgseGV presentan un patrón diferente HAISF y HVMGH, respectivamente, en lugar de la secuencia consenso (Fig. 5). Alteraciones en el dominio de unión a zinc puede hacer que estas proteínas no sean funcionales. Así, la *enhancina* 4 de XcGV contiene una secuencia QXXDG, que probablemente le haga ser no funcional (Popham *et al.*, 2001), aunque en trabajos anteriores se ha comprobado que cuando se mezclan los gránulos de XcGV ó la *enhancina* purificada a partir de gránulos con poliedros del NPV de *Spodoptera litura* (SpliNPV) se incrementa la actividad de estos últimos, aunque no se especifica de entre las cuatro *enhancinas* descritas cuál es la funcional (Guo *et al.*, 2007).

Igualmente Zhang *et al.* (2012) pudo demostrar un efecto potenciador de la enhancina de AgseGV del aislado de china aún teniendo esa modificación en el motivo de unión a zinc. Así el siguiente objetivo que nos planteamos en este trabajo fue determinar la funcionalidad de dichas enhancinas mediante la construcción de virus recombinantes que expresasen las mismas.



Figura 5. Alineamiento de las enhancinas de AgseGV, aislado de Badajoz (AgseGV Badajoz ENH) y aislado chino (AgseGV China ENH) y las enhancinas de AgseNPV (AgseNPV VEF1, AgseNPV VEF2 y AgseNPV VEF3). El color azul muestra posiciones con un 60% o más de identidad. A) Extremo N-terminal donde se localiza el dominio conservado de unión a zinc (HEXXH) presente en todas las metaloproteasas: para las enhancinas de AgseGV se localiza entre la posición 247 y 251; mientras que en la VEF1, VEF2 y VEF3 de AgseNPV se localizan en la posiciones 228 a 232, 232 a 236 y 226 a 230. En color rojo están resaltados los cambios de aminoácidos que pueden hacer que el dominio de unión a zinc no sea funcional. B) Extremo C-terminal donde se resalta el dominio transmembrana para VEF1 (posición 798 a 817), VEF2 (posición 743 a 765) y VEF3 (posición 806 a 824) presente sólo en los NPV, en color amarillo, fucsia y gris, respectivamente.

Por otro lado, para poder determinar la relación entre las enhancinas de AgseGV y AgseNPV se llevó a cabo un análisis filogenético, mediante la construcción de un árbol filogenético utilizando el programa MEGA6, mientras que el análisis de *bootstrap* se llevó a cabo para determinar la variabilidad filogenética. El análisis filogenético reveló la presencia de dos clúster diferenciados claramente; en el primero de ellos se engloban las enhancinas de la mayoría de los granulovirus como son las enhancinas 1, 2 y 4 de los GVs de *Helicoverpa armigera* (HearGV), *Xestia c-nigrum* (XcGV) y *Pseudaletia unipuncta* (PsunGV). Mientras que en el segundo clúster se localizan la mayoría de enhancinas o viral enhancing factors (VEFs) de NPVs y las

enhancinas 3 de los GVs de HearGV, XcGV y PsunGV, junto con las enhancinas de los dos aislados de AgseGV (Fig. 6). Dentro de este segundo clúster se ven claramente diferenciadas las enhancinas de AgseGV de las de AgseNPV, y a su vez las VEF1 y 2 de AgseNPV de la VEF3. Las enhancinas de AgseGV parece ser que se diversificaron de las VEFs de NPVs y enhancinas 3 de GVs, las cuales siguieron una evolución similar. Así, podríamos especular que las enhancinas de AgseGV evolucionaron de las enhancinas 4 de GVs, ya que presentan un mayor grado de homología (25%) que con las enhancinas 1 (23%) y 2 (24%). Y a su vez las VEFs de AgseNPV podrían haber evolucionado a partir de un ancestro común junto con las enhancinas de AgseGV, dando lugar posteriormente a la diversificación de las VEFs de NPVs y enhancinas 3 de GVs, ya que parece que estas últimas poseen un ancestro común. Resultados anteriores también han puesto de manifiesto que las enhancinas de GVs, con la excepción de la AgseGV, forman un grupo, mientras que el resto de enhancinas de NPVs forman otro grupo diferenciado donde se localizan las de AgseGV. Sin embargo, por el alto grado de heterogeneidad que exhiben dichas enhancinas éstas podrían haber surgido de ancestros independientes (Slavicek, 2012).

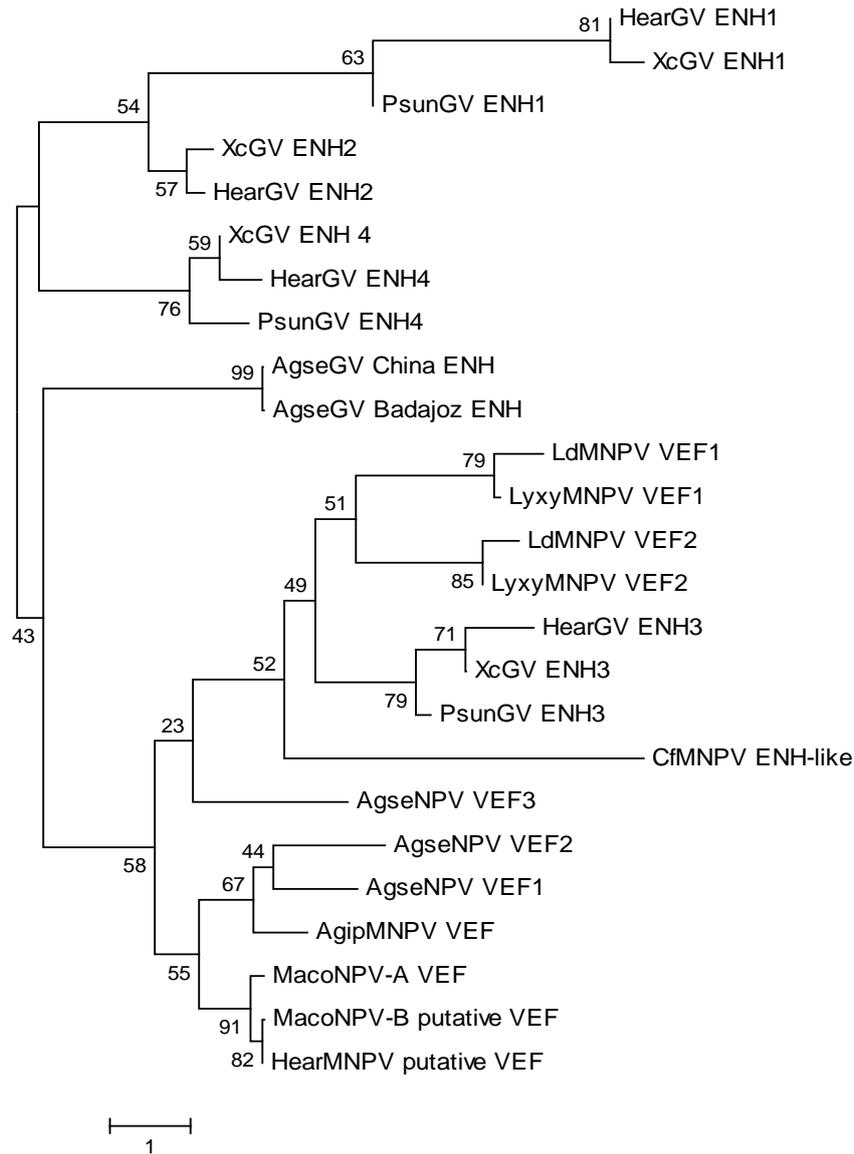


Figura 6. Análisis filogenético generado usando el método *Neighbor-Joining*, *bootstrap* de 500. Las distancias filogenéticas se calcularon utilizando el modelo JTT. El análisis incluye 25 secuencias de aminoácidos: *Helicoverpa armigera* GV (HearGV ENH1, YP_001649133.1; ENH2 YP_001649134.1; ENH3 YP_001649135.1; ENH4, YP_001649146.1), *Xestia c-nigrum* GV (XcGV ENH1, NP_059298.1; ENH2, NP_059300.1; ENH3, NP_059302.1; ENH4, NP_059314.1), *Pseudaletia unipuncta* (PsunGV ENH1, YP_003422496.1; ENH3, YP_003422498.1; ENH4, YP_003422509.1), *Agrotis segetum* GV (AgseGV ENH, YP_006289.1), *Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV VEF1, AHC69563.1; VEF2, AHC69672.1), *Lymantria xyliana* MNPV (LyxyMNPV VEF1, YP_003517802.1; VEF2, YP_003517893.1), *Choristoneura fumiferana* MNPV (CfMNPV ENH-like, NP_848341.1), *Agrotis segetum* NPV (AgseNPV VEF1, YP_529745.1; VEF2, YP_529746.1; VEF3, YP_529798.1), *Agrotis ipsilon* NPV (AgipNPV VEF, YP_002268112.1), *Mamestra configurata* NPV-A (MacoNPV-A VEF, AAQ11108.1), *Mamestra configurata* NPV-B (MacoNPV-B putative VEF, AAM95075.1) y *Helicoverpa armigera* MNPV (HearMNPV putative VEF, YP_002332617.1), y la secuencia en estudio. Todas las posiciones con huecos (*gaps*), es decir, con deleciones ó inserciones, fueron eliminadas. Los análisis se llevaron a cabo en MEGA6. Los valores en los nodos representan la probabilidad que otorga el programa a esa ramificación, basándose en el número de veces en que el programa ha llegado a esa conclusión.

3. Obtención de los virus recombinantes Bac \varnothing y BacENHAgseGV

En base a los resultados observados en el análisis de secuencias, el objetivo que nos planteamos en este trabajo fue el de determinar la funcionalidad de las distintas enhancinas de AgseGV y AgseNPV, sabiendo que la enhancina de AgseGV y la enhancina 3 de AgseNPV poseen alteraciones en el dominio de unión a zinc que les pueda hacer no funcionales. Así, se llevó a cabo la construcción de un virus recombinante de AcMNPV que expresase la *enhancina* de AgseGV bajo el promotor p10 (BacENHAgseGV), al igual que se hizo con las *enhancinas* del AgseNPV, BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV (budded virus, BVs, amablemente cedidos por A. Jakubowska). Así el gen de *enhancina* de AgseGV se clonó en pFBD^{+polh}, a partir del pGEM-T-Easy, y tras comprobar mediante secuenciación la correcta inserción del gen en el pFBD^{+polh+Enh} se transformó 1 ng de dicho vector en las células DH10Bac que contenían el báculo de AcMNPV. Como control se transformó también pFBD^{+polh} para obtener el virus recombinante poliedrina positivo pero sin gen de la *enhancina*. Se seleccionaron 5 colonias blancas y se realizó una PCR a partir de dichas colonias. De las cinco colonias analizadas, cuatro de ellas dieron el fragmento esperado, el clon número 4 que no dio amplificación probablemente sufriera algún tipo de fallo en el proceso de recombinación y por ello no obtuvimos señal en la PCR (Fig. 7A). Las cuatro colonias PCR positivas se crecieron en medio LB para realizar la lisis alcalina y el análisis REN. En el perfil de restricción con la enzima *Pst* I se puede apreciar cómo en el virus recombinante que contiene la *enhancina* de AgseGV presenta dos bandas a la altura de las 5.000 pb, mientras que el virus vacío no las presenta (Fig. 7B), lo que sugiere una diferencia a nivel genómico entre ambos virus. El hecho de que las cuatro colonias analizadas tanto del BacENHAgseGV como de Bac \varnothing presentasen el mismo perfil de restricción sugiere que se trata propiamente del perfil de BacENHAgseGV y Bac \varnothing y no el de algún falso recombinante.

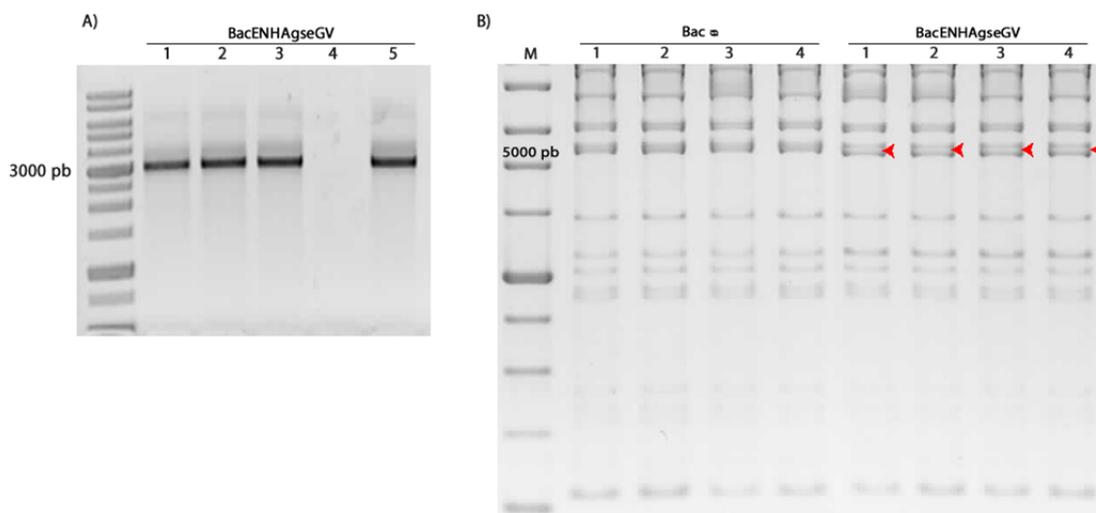


Figura 7. A) Imagen del gel de agarosa tras amplificar mediante PCR y a partir de las 5 colonias, el gen de la *enhancina* presente en los transformantes seleccionados con los cebadores Agse55-FW y AgseGV-RV. B) Perfiles de restricción con la enzima *Pst* I de Bac ∞ y BacENHAgseGV. La diferencia debido a la inserción del gen de la *enhancina* en el bacmido se aprecia en torno a las 5.000 pb (flechas rojas).

Una vez obtenidos los recombinantes y con el fin de determinar su correcta inserción en el genoma del bacmido de AcMNPV se realizó una PCR utilizando los cebadores p10x a partir de una de las colonias seleccionadas. La PCR de los dos virus (Bac ∞ y BacENHAgseGV) mostró claramente la presencia del gen de la *enhancina* en el BacENHAgseGV, dado que el Bac ∞ presenta una banda de unas 392 pb mientras que dicha banda incrementa a 3.300 pb en el BacENHAgseGV (dato no mostrado). Esto significa que nuestro gen está insertado tras el promotor p10, ya que los cebadores de éste se unen unas 100 pb antes y después del sitio de inserción de nuestro gen. Para comprobar su correcta inserción, el fragmento obtenido se clonó en el vector pGEM-T Easy y se mandó a secuenciar. El análisis de secuencia confirmó que el gen de la *enhancina* está insertado en la correcta posición y en fase con el promotor p10 en el bacmido de AcMNPV, lo que confirma la correcta construcción del recombinante. Al igual que en el presente trabajo, este sistema Bac-to-Bac se ha utilizado con éxito para la construcción de recombinantes (Ciccarone *et al.*, 1997; Lepore *et al.*, 1996; Miao *et al.*, 2006) así como para la expresión de proteínas heterólogas (Kost *et al.*, 2005; Takemoto *et al.*, 2008).

El siguiente paso fue la producción de un stock viral de Bac ∞ y BacENHAgseGV en cultivo celular. Para ello, se realizó una transfección en Sf21 con ADN de alta calidad. Tras tres días, se empezaron a observar la aparición de poliedros en las células (Fig. 9). Una vez obtenido el 100% de la células infectadas, aproximadamente tras el quinto día de infección, se separaron las células que contenían los poliedros de los viriones brotados (BVs) mediante centrifugación. El precipitado conteniendo los poliedros se utilizó para extraer el ADN viral y analizarlo mediante REN (Fig. 10 A).

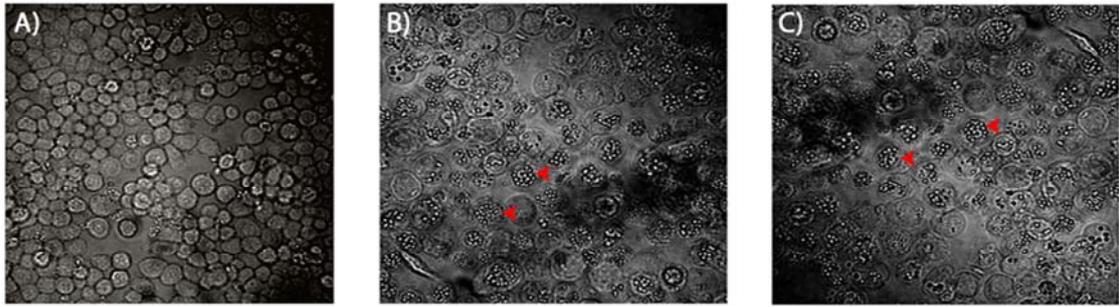


Figura 9. Células Sf21 A) sanas, B) tras haber sido transfectadas con el ADN de BacENHAgseGV que lleva el gen de *enhancina* de AgseGV y C) con el recombinante Bac ϕ sin el gen de interés pero con el gen de la poliedrina. Las células conteniendo los poliedros están señaladas con flechas rojas.

Después de la transfección y con el fin de obtener un gran *stock* viral de los recombinantes Bac ϕ y BacENHAgseGV, al igual que se disponía de stock viral de BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV, se utilizaron los BVs obtenidos de la transfección para infectar cultivos celulares en *flask* de 25 cm² y así poder recuperar mayor cantidad de BVs. De nuevo se observaron los cultivos hasta la aparición de poliedros, tras lo cual se centrifugaron para guardar el sobrenadante conteniendo los BVs y utilizar el precipitado para hacer un análisis REN y confirmar los perfiles de restricción (Fig. 10 B).

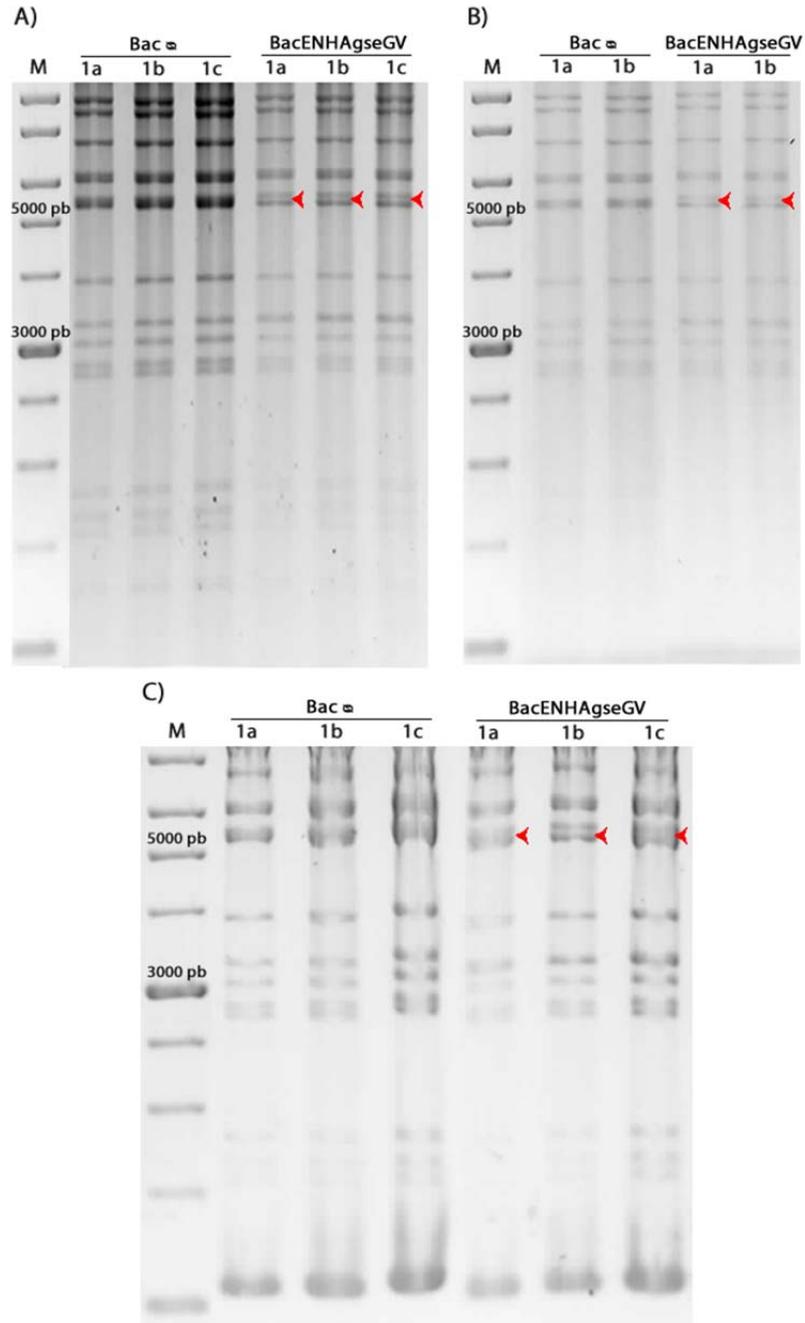


Figura 10. Perfiles de restricción con la enzima *Pst* I a partir del ADN extraído de los OBs obtenidos tras A) la transfección en cultivo celular, B) multiplicación viral en cultivo celular y C) inyección en larvas.

Finalmente, se pasó a producir OBs en gran cantidad infectando larvas con los BVs del stock viral de Bacsy BacENHAgseGV, mediante inyección directa en el hemocele. El mismo procedimiento se siguió para la producción de OBs de los recombinantes BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV a partir del stock viral cedido por A. Jakubowska. Tras aproximadamente una semana, las larvas muertas se recuperaron y se purificaron los OBs. Igualmente, se llevó a cabo una purificación de OBs y extracción de ADN con el fin de

comprobar los perfiles de restricción (Fig. 10 C). En la Fig. 10 se puede observar como los perfiles de restricción tanto de Bac ϕ como de BacENHAgseGV obtenidos en cada uno de los pasos son los mismos, lo que confirma la naturaleza de los recombinantes y la ausencia de contaminaciones cruzadas.

4. RT-PCR

El hecho de que la construcción del recombinante esté bien hecha no confirma que dicho gen se transcriba, y por tanto se pueda traducir en proteína. Así se llevó a cabo una RT-PCR a partir de ARN extraído de células infectadas con el virus recombinante BacENHAgseGV (Fig. 11). La expresión temporal del gen de la *enhancina* bajo el promotor p10 se esperaba que comenzase en torno a las 12 h post-infección, ya que el promotor p10 es tardío. Asimismo se esperaba que la expresión del gen fuese fuerte, por las características propias del promotor p10, y por tanto hubiese gran cantidad de ARN mensajero de la *enhancina*. Sin embargo, tras realizar la transcripción del ARN total de las células con el cebador reverso de la RT y posterior PCR con esa misma pareja de cebadores, no se obtuvo amplificación en ninguna de las horas analizadas (Fig. 11). Sin embargo, la PCR a partir de ADN de BacENHAgseGV resultó ser positiva, obteniendo una banda alrededor de las 500 pb. Estos resultados sugieren que no hay expresión de dicho gen, aunque la construcción esté correcta, o por el contrario que ha habido un problema metodológico con la extracción de ARN o la RT. Para corroborar este último caso convendría haber incluido como control positivo el análisis transcripcional de un gen que con seguridad se transcribiese como el de la *ADN-polimerasa* o *poliedrina*. El primero de ellos es un gen temprano necesario para la replicación del ADN previo a la expresión de genes tardíos y el segundo de ellos uno muy tardío necesario para la producción de poliedros (Romanowski y Ghiringhelli, 2001). Por tanto, el hecho de que hayamos sido capaces de recuperar poliedros indica que ha habido transcripción tanto de la *ADN-polimerasa* como del gen de la *poliedrina*, siendo así buenos candidatos como controles positivos. Por ello, convendría repetir el ensayo de RT-PCR incluyendo a estos dos genes como controles positivos. De igual modo convendría realizar este análisis para los recombinantes BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV, con el fin de determinar si estos virus recombinantes son capaces de expresar estas *enhancinas* heterólogas durante la infección viral.

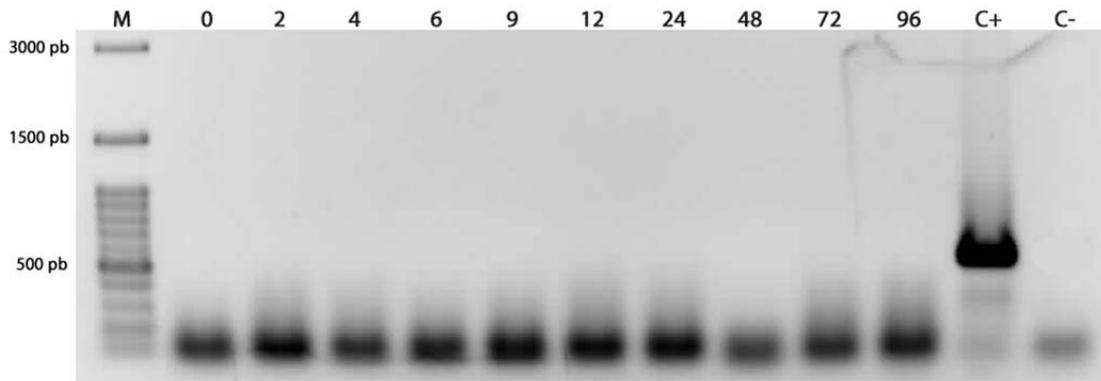


Figura 11. Imagen del gel de agarosa tras amplificar las muestras tomadas a las 0, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 48, 72 y 96 h con la pareja de cebadores de RT. No se obtuvo amplificación a ninguna hora. La señal obtenida en el control positivo y negativo dan validez a la PCR.

Por otro lado, también puede ser que la *enhancina* no se exprese bajo el promotor p10, ya que trabajos anteriores realizados con *enhancinas*, tanto de GVs como de NPVs, han demostrado que las *enhancinas* no se transcriben bajo promotores heterólogos, y si se expresan lo hacen en muy bajo nivel. Lepore *et al.* (1996) clonó el gen de la *enhancina* de TnGV en el plásmido pVEFBBgII bajo el promotor de la poliedrina y la expresión que obtuvo era muy baja, <1% del total de la proteína. Así, con el fin de mejorar el nivel de expresión, la secuencia localizada arriba del codón de iniciación AUG se restauró con la secuencia original propia del TnGV mediante mutagénesis, obteniendo niveles altos de expresión. De igual modo Li *et al.* (2003) construyó un recombinante de AcMNPV, AcMNPV-eMP2, que expresa la *enhancina* de MacoNPV bajo su propio promotor mientras que otros recombinantes se han construido utilizando como fuente un fragmento de restricción que incluye tanto la *enhancina* como su promotor (Hayakawa *et al.*, 2000). Otros estudios donde se ha demostrado el efecto potenciador de estas *enhancinas* han tenido de base la construcción de recombinantes deletados en estos genes, al observar una menor actividad que el aislado silvestre (Bischoff y Slavicek, 1997; Hoover *et al.*, 2010; Popham *et al.*, 2001). Por tanto, puede que realmente no haya transcripción de la *enhancina* de AgseGV en BacENHAgseGV, ya que este sistema Bac-to-Bac utiliza como vectores de transferencia plásmidos que contienen el gen de interés bajo el promotor de la poliedrina o p10 de AcMNPV, quedando de esta forma la expresión de la *enhancina* bajo un promotor heterólogo. Asimismo, los primeros estudios donde se demostró el efecto potenciador de estas *enhancinas* se llevaron a cabo mediante la infección con mezclas entre NPVs y GVs (Hara *et al.*, 1976; Tanada, 1959; Tanada *et al.*, 1973; Yamamoto y Tanada, 1978). Estudios posteriores con mezclas entre NPVs y GVs también han demostrado el efecto potenciador de los GVs (Granados *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2007). Finalmente, el efecto potenciador también se ha podido demostrar mediante la utilización de *enhancinas* purificadas por cromatografía de

filtración en gel utilizando columnas Sephacryl S-300 a partir de los OBs disueltos en carbonato de sodio (Gijzen *et al.*, 1995; Granados *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 1994). Por tanto, ninguno de los trabajos recogidos en la bibliografía ha podido demostrar el efecto potenciador de estas enhancinas mediante la construcción de virus recombinantes que expresan estos genes bajo promotores heterólogos.

Así, el próximo ensayo que nos planteemos ahora es comprobar si hay expresión bajo promotores heterólogos utilizando como control de la RT-PCR el análisis transcripcional de la *ADN-polimerasa* y *poliedrina*. Si la RT-PCR sale positivo para estos dos últimos genes, y en cambio sale negativo para la *enhancina* de AgseGV y VEFs de AgseNPV, podríamos concluir que no hay expresión de *enhancinas* bajo un promotor heterólogo. Por otro lado, otro ensayo que podría llevarse a cabo para corroborar esta hipótesis es la purificación de las *enhancinas* a partir de los gránulos de AgseGV o poliedros de AgseNPV mediante cromatografía de filtración en gel y realizar ensayos de actividad biológica en distintas especies de insectos susceptibles utilizando un baculovirus, ya sea AgseGV, AgseNPV u otro NPV junto con la proteína purificada como materia activa. Pero si por el contrario, esas proteínas purificadas tienen efecto potenciador estaremos demostrando que los plásmidos de transformación utilizados en el sistema Bac-to-Bac no son válidos para la expresión de *enhancinas*, ya que éstas no son capaces de expresarse bajo promotores heterólogos.

5. SDS-PAGE

El siguiente paso, al obtener resultados negativos en el ensayo de RT-PCR y, por tanto, no tener seguridad de que haya expresión de la *enhancina* de AgseGV en el recombinante BacENHAgseGV, fue el de realizar un SDS-PAGE con las proteínas obtenidas tras solubilizar los OBs. Estudios previos han puesto de manifiesto que las *enhancinas* de GVs se localizan en la matriz proteica de la granulina, formando el gránulo, mientras que las *enhancinas* de NPV se localizan en la envuelta de los ODVs y probablemente también en las nucleocápsidas (Slavicek y Popham, 2005). Las *enhancinas* de NPVs y GVs difieren principalmente en que las primeras poseen un dominio transmembrana que las une por su extremo C-terminal a la membrana del ODV mientras que las *enhancinas* de GV, al carecer de este dominio, son proteínas solubles y por tanto se co-ocluyen con la granulina sin interactuar con ésta (Slavicek y Popham, 2005; Slavicek, 2012). La presencia de las *enhancinas* en los ODVs puede sugerir la interacción directa de los ODVs con la membrana peritrófica, ya que los ODVs deben atravesar esa barrera del huésped a la infección. Por tanto si se sintetizan estas *enhancinas* deberían localizarse en el gránulo o en los ODVs, y por tanto, al solubilizar los OBs deberían observarse a la altura de 115 kDa, en el caso de las *enhancinas* de AgseGV, ya que las de AgseNPV son algo más pequeñas, de unos 100 kDa. Sin embargo, como se muestra en la Fig. 12 no se observa ninguna banda

clara a esta altura. Por otro lado, por encima de los 25 kDa se observa claramente la presencia de una gran banda en todos los virus, que corresponde a la poliedrina, además de una serie de bandas más que se corresponden con distintas proteínas de los OBs, lo que sugiere que tanto el gel de poliacrilamida como la solubilización han funcionado bien.

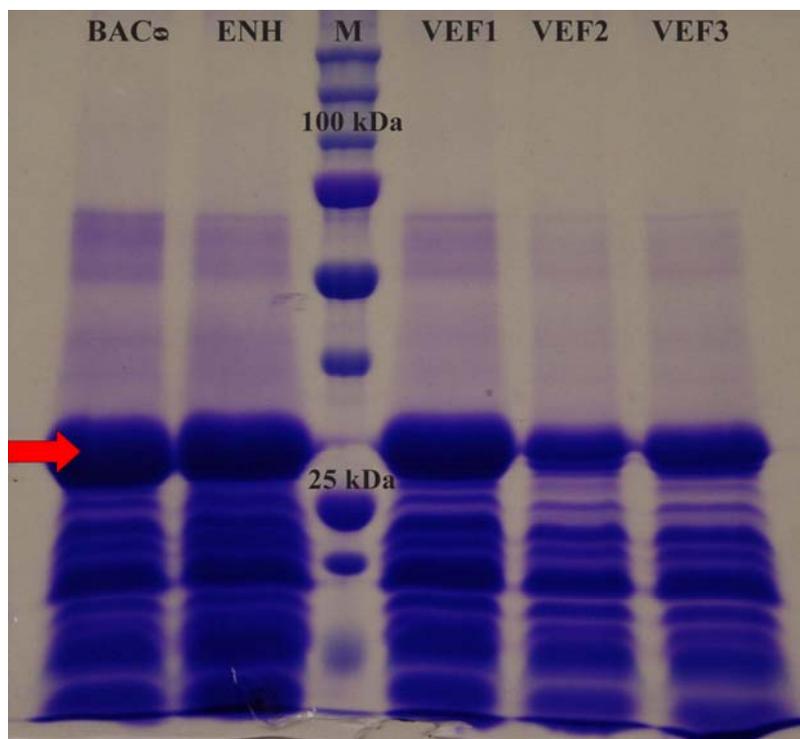


Figura 12. Gel de poliacrilamida desnaturalizante donde podemos ver el perfil proteico de los diferentes virus tras solubilizar sus OBs; Bac \varnothing (\varnothing), ENH (BacENHAgseGV), VEF1 (BacVEF1AgseNPV), VEF2 (BacVEF2AgseNPV) y VEF3 (BacVEF3AgseNPV). En este caso no se observa ninguna banda al tamaño esperado de 110-100 kDa y si se observa claramente la banda de la poliedrina a una altura algo superior de las 25 kDa (flecha roja).

De este resultado se puede concluir que, o bien las proteínas no se producen debido a que no hay expresión de dichos genes como se ha observado en el ensayo de RT-PCR, o que por el contrario dichas enhancinas una vez sintetizadas no se encapsulan en los OBs, dado que se trata de proteínas heterólogas no sintetizadas por el aislado silvestre de forma natural. Sin embargo, este último caso es más improbable ya que todos los trabajos realizados hasta la fecha han localizado las proteínas en los OBs (Slavicek, 2012). Por otro lado, las enhancinas de GVs pueden llegar a constituir el 5% del contenido proteico del granulo (Gallo *et al.*, 1991; Roelvink *et al.*, 1995), por lo que deberían haberse observado en el gel de proteínas. Además los OBs obtenidos a partir de virus recombinantes de AcMNPV que expresan *enhancinas* de GVs, bajo su propio promotor, son más activos que los OBs del aislado silvestre (Hayakawa *et al.*, 2000; Lepore *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2003), lo que significa que el factor potenciador se localiza en los OBs. Por tanto, el hecho de no haber localizado las enhancinas en los OBs probablemente sea

debido a que no se expresan en este sistema. Aunque deberían hacerse más ensayos para confirmar esta hipótesis.

6. Bioensayos

Finalmente, aún no habiendo detectado transcripción (punto 3) ni presencia de las enhancinas en los OBs (punto 4), se llevaron a cabo una serie de ensayos biológicos en distintos huéspedes susceptibles. Sin embargo, es de esperar que no haya efecto potenciador de la actividad de los distintos virus BacENHAgseGV, BacVEF1AgseNPV, BacVEF2AgseNPV y BacVEF3AgseNPV, y que su actividad sea similar a la del virus control que no contiene *enhancina*, Bac \emptyset .

6.1. Ensayos de patogenicidad

Los ensayos preliminares se realizaron con dos estadios diferentes, L₂ y L₄, de distintas especies de lepidópteros criadas en condiciones de laboratorio en el insectario. Concretamente se utilizaron las especies *S. frugiperda*, *S. littoralis*, *M. Brassicae* y *C. chalcites*. Se ensayaron distintas especies, ya que el efecto de las enhancinas es dependiente del huésped (Uchima *et al.*, 1988), y distintos estadios, ya que en estadios avanzados el efecto de las enhancinas es mayor (Peng *et al.*, 1999).

6.1.1. Ensayos en L₂

Sólo se pudieron realizar los ensayos con las especies *S. frugiperda*, *S. littoralis* y *C. chalcites*, ya que en el momento de la realización de dichos ensayos hubo disposición limitada de *M. brassicae*. Pero tampoco se obtuvieron resultados en *C. chalcites* ya que el ensayo realizado se contaminó con hongos.

Como se esperaba, las concentraciones utilizadas en el estadio L₂ de *S. frugiperda* produjeron las mortalidades esperadas, de aproximadamente un 30% para la concentración 2x10⁵ OBs/ml y un 85% para la de 5x10⁶ OBs/ml (Beperet, 2014; Simón *et al.*, 2008). Sin embargo, no se observa un efecto claro de las enhancinas, ya que las mortalidades obtenidas con los virus recombinantes que contienen en su genoma las *enhancinas* son similares a las obtenidas en el virus control. Así, la concentración alta produjo mortalidades entre el 78%-96% (Fig. 13A), un rango de mortalidad similar, lo que sugiere un efecto bajo o nulo de dichas enhancinas. La menor mortalidad la produjo el recombinante BacVEF3AgseNPV mientras que la más elevada fue para el BacVEF1AgseNPV. Por su parte, el control Bac \emptyset mató al 84% de los individuos ensayados. De la misma manera, los resultados obtenidos con la concentración baja no son nada concluyentes tampoco, ya que Bac \emptyset produce mortalidades superiores que BacVEF3AgseNPV o similares a BacVEF1AgseNPV. En base a estos resultados podríamos concluir que los virus

recombinantes que contienen las *enhancinas* no producen un efecto sinérgico en *S. frugiperda*, corroborando la idea de la ausencia de expresión de las mismas y localización en los OBs.

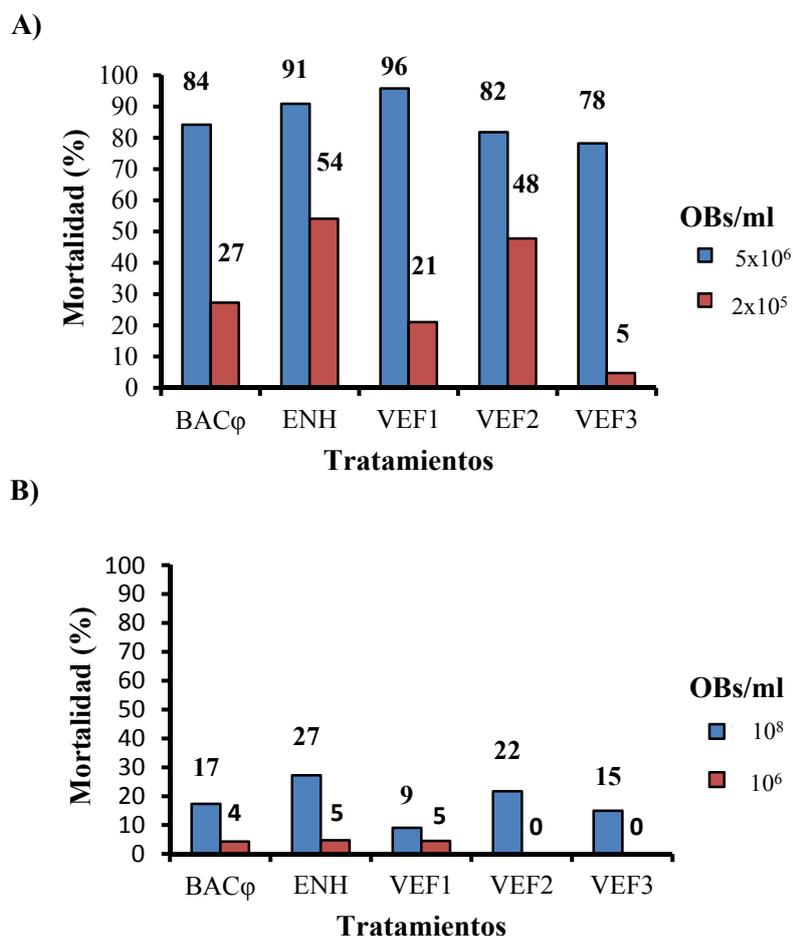


Figura 13. Porcentajes de mortalidad obtenidos en estadio L₂ de A) *S. frugiperda* y B) *S. littoralis* producidos por los distintos virus; BAC ϕ (ϕ), ENH (BacENHA ϕ gseGV), VEF1 (BacVEF1 ϕ gseNPV), VEF2 (BacVEF2 ϕ gseNPV) y VEF3 (BacVEF3 ϕ gseNPV). Las larvas de *S. frugiperda* se infectaron con 5x10⁶ y 2x10⁵ OBs/ml, mientras que las de *S. littoralis* con 10⁸ y 10⁶ OBs/ml.

En *S. littoralis* concentraciones tan elevadas como 1x10⁸ OBs/ml no llegaron a matar ni al 50% de la población (Fig. 13B), lo que confirma que *S. littoralis* es una especie semipermissiva para AcMNPV. AcMNPV induce apoptosis, muerte o destrucción celular, en *S. littoralis* como defensa a la infección viral (Chejanovsky y Gershburg, 1995), de ahí su menor infectividad ya que al virus no le da tiempo a replicarse antes de que el huésped se desprenda de las células epiteliales del mesenterón infectadas. Aún y todo los resultados obtenidos no muestran una diferencia clara entre el porcentaje de mortalidad producido por el Bac ϕ (17%) o por los BacENHA ϕ gseGV (27%), BacVEF1 ϕ gseNPV (9%), BacVEF2 ϕ gseNPV (22%) y BacVEF3 ϕ gseNPV (15%). De la misma forma, los resultados obtenidos utilizando la

concentración más baja no son concluyentes, ya que el Bac ∞ (4%) produce la misma mortalidad que BacENHAgseGV (5%) y BacVEF1AgseNPV (5%), mientras que BacVEF2AgseNPV (0%) y BacVEF3AgseNPV (0%) no mataron a ningún individuo. El hecho de obtener mortalidades tan bajas utilizando concentraciones tan elevadas, hizo descartar esta especie del análisis en estadio L₄, ya que sería muy difícil infectar con concentraciones tan elevadas.

Al mismo tiempo se llevó a cabo un ensayo de patogenicidad en larvas L₂ de *S. frugiperda*, ya que era una de las especies más susceptibles y fáciles de obtener en gran volumen. El objetivo de este ensayo fue cuantificar el grado de potenciación de cada virus, mediante el cálculo de la CL₅₀ y la potencia relativa, con el fin de poder seleccionar aquella enhancina que potenciase más la actividad. Aunque a la vista de los resultados anteriores podemos prever que no vaya a haber diferencias entre tratamientos.

Por otro lado, y debido a que no se observó un efecto claro de las enhancinas se decidió incluir como control positivo un abrillantador óptico, Tinopal UNPA-GX, ya estudios anteriores han demostrado que en *S. frugiperda* puede llegar a potenciar la actividad del virus homólogo del orden de 3 veces en L₂ y hasta 60 veces en L₄ (Martínez *et al.*, 2003).

Como era de esperar no se observan diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Las CL₅₀s de los distintos tratamientos van desde 4,02 x 10⁵ a 7,84 x 10⁵ OBs/ml. Las pendientes de regresión ($\chi^2=6,99$; g.l.=5; p=0,221), así como las distintas rectas ($\chi^2=15,00$; g.l.=10; p=0,132) fueron estadísticamente iguales, lo que indica que los distintos tratamientos presentan la misma potencia relativa.

Tabla 3. CL₅₀ y potencias relativas de BAC ∞ , BacENHAgseGV (ENH), BacVEF1AgseNPV (VEF1), BacVEF2AgseNPV (VEF2), BacVEF3AgseNPV (VEF3) y Bac ∞ + Tinopal (∞ + Tino) sobre larvas L₂ de *S. frugiperda*. Se indican sus límites de confianza al 95% (LC 95%) y los valores de la potencia relativa respecto a control Bac ∞ .

Tratamiento	CL ₅₀ (OBs/ml)	Potencia	Límites fiduciales (95%)	
			Inf.	Sup.
BAC ∞	4,68 x 10 ⁵	1	-	-
ENH	5,07 x 10 ⁵	0,92	0,56	1,51
VEF1	4,02 x 10 ⁵	1,16	0,68	1,98
VEF2	5,72 x 10 ⁵	0,82	0,48	1,40
VEF3	7,84 x 10 ⁵	0,60	0,37	1,05
∞ + Tino	6,45 x 10 ⁵	0,72	0,44	1,20

Las regresiones Logit se calcularon mediante el programa POLO-PLUS (LeOra Software, 1987). El test de igualdad ($\chi^2=15,00$; g.l.=10; P=0,132) y de paralelismo ($\chi^2=6,99$; g.l.=5; P=0,221) fueron estadísticamente iguales, lo que sugiere que todas las rectas son iguales y, por tanto, los distintos tratamientos presentan la misma actividad.

4.1.2. Ensayos en L₄

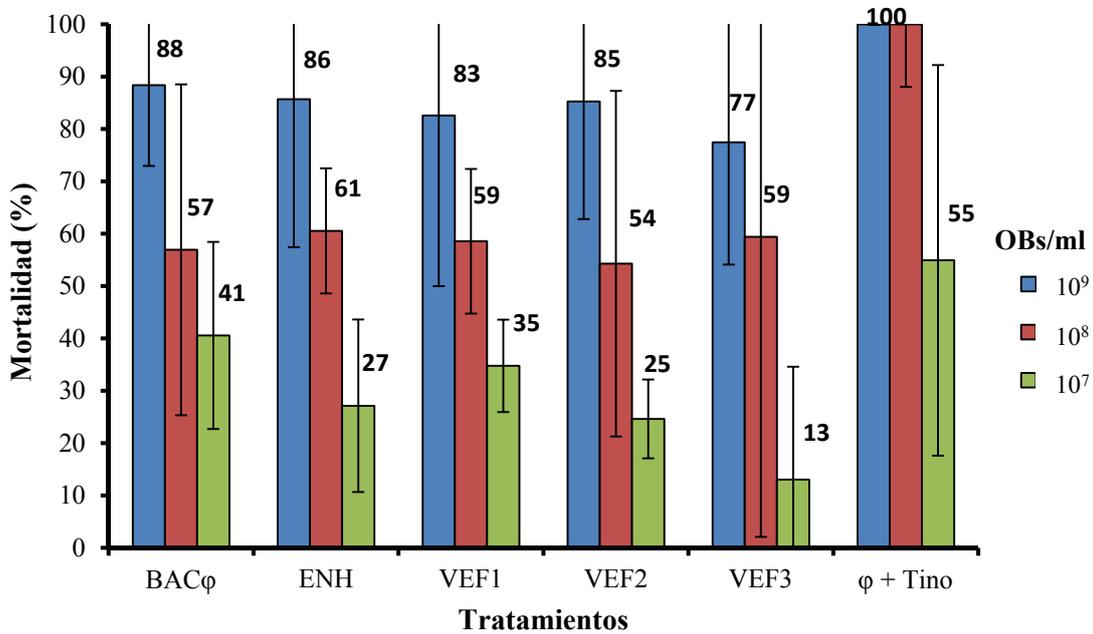
Entre todas las poblaciones disponibles en el insectario sólo se pudieron realizar los ensayos con las especies *S. frugiperda*, *M. brassicae* y *C. chalcites*. Al igual que en L₂, no se obtuvieron resultados en *C. chalcites* ya que el ensayo se contaminó de nuevo con hongos.

En *S. frugiperda* se ensayaron tres concentraciones diferentes, 1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 OBs/ml, que producen un rango de mortalidad entre el 20% y el 80% (Martínez *et al.*, 2003). En general se observa un incremento de la mortalidad conforme incrementa la concentración de los distintos tratamientos ($F_{3,36}=88,25$; $P<0,001$), excepto en el tratamiento con Tinopal UNPA-GX donde las últimas dos concentraciones producen el 100% de mortalidad. No se observa interacción entre los tratamientos y las concentraciones ($F_{9,36}=1,181$; $P=0,336$), de forma que no hay un efecto concentración y todos los tratamientos tienen el mismo efecto en las distintas concentraciones. Cuando se comparan los distintos tratamientos en cada una de las dosis se observa diferencias significativas entre tratamientos ($F_{5,36}=12,60$; $P<0,001$), ya que el tratamiento que incluye el Tinopal UNPA-GX produce mortalidades significativamente superiores (t-student, $P<0,001$). Sin embargo, cuando quitamos este tratamiento del análisis se observa que los distintos tratamientos producen la misma mortalidad para las distintas concentraciones ($F_{4,30}=2,309$, $P=0,081$). Por tanto, al igual que lo observado en el estadio L₂ no se observa un efecto claro de las enhancinas, lo que confirma lo que se ha venido diciendo hasta ahora.

Finalmente, en *M. brassicae* al no tener una referencia clara de las concentraciones a utilizar, ya que no se realizaron ensayos en el estadio L₂ y tampoco se ha encontrado nada en la bibliografía, se utilizaron las mismas concentraciones que para *S. frugiperda*. En este caso se observa mayor variabilidad entre los datos, habiendo una interacción entre la concentración y el tratamiento ($F_{9,36}=3,081$; $P=0,008$). Por tanto, hay un efecto claro de las concentraciones sobre los distintos tratamientos, de forma que los distintos tratamientos no presentan el mismo patrón de mortalidad en las distintas concentraciones. Aunque parece que haya mayor mortalidad conforme aumenta la concentración, no parece que haya una correlación tan clara como en *S. frugiperda*. De nuevo, el Tinopal UNPA-GX produce mortalidades del orden 100% en todas las concentraciones observándose un incremento significativo de la mortalidad respecto al virus control (t-student, $P<0,05$). Por tanto, hay un efecto claro del abrillantador óptico, efecto que por el contrario no se observa en los virus que contienen las *enhancinas*. Así, cuando eliminamos del análisis el tratamiento que incluye el Tinopal UNPA-GX, no se observa interacción entre tratamientos y concentración ($F_{3,30}=1,202$; $P=0,332$) y los recombinantes que incluyen a las *enhancinas* no presentan diferencias significativas con el tratamiento control Bac ∞ (t-student, $P>0,05$). En conclusión, al igual que lo observado en *S. frugiperda* no se

observa un efecto potenciador de las distintas enhancinas como pueda observarse en el tratamiento que incluye el abrillantador óptico.

A)



B)

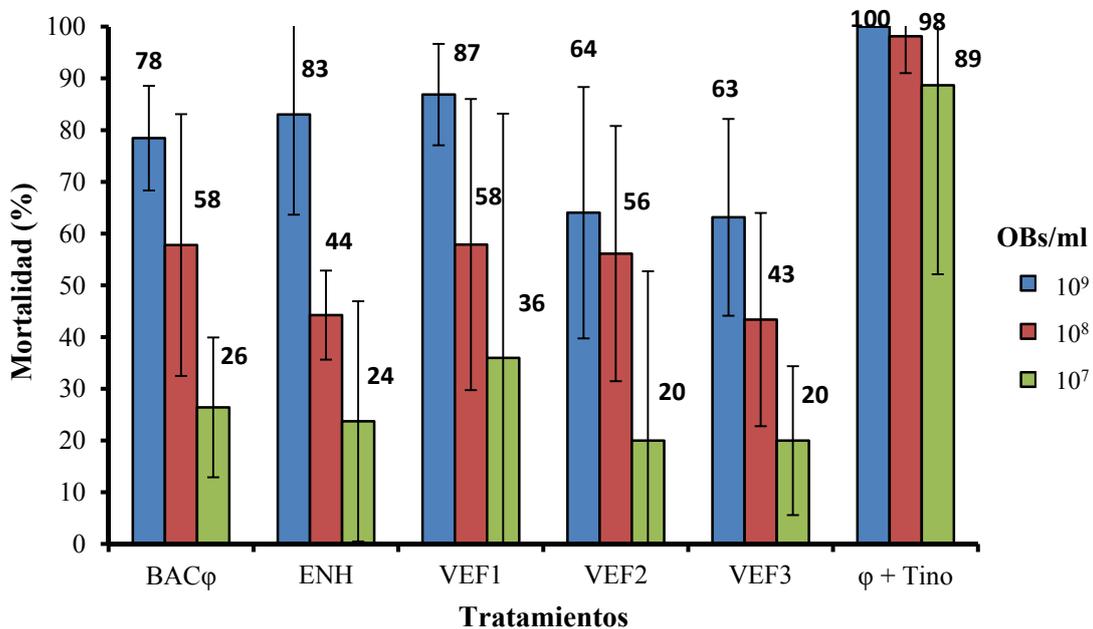


Figura 14. Representación gráfica de los porcentajes de mortalidad en A) *S. frugiperda* y B) *M. brassicae* agrupados según el tratamiento: BAC ϕ , ENH (BacENHAgseGV), VEF1 (BacVEF1AgseNPV), VEF2 (BacVEF2AgseNPV), VEF3 (BacVEF3AgseNPV) y ϕ + Tino (Bac ϕ con Tinopal). A simple vista no encontramos diferencias entre tratamientos, tan sólo el tratamiento que incluye el Tinopal muestra mayor porcentaje de mortalidad que el control (en nuestro caso el virus vacío, BAC ϕ).

A la vista de los resultados obtenidos en L₄, el Tinopal UNPA-GX incrementa la actividad biológica del virus control del orden un 15-60% tanto en *S. frugiperda* como *M. brassicae*. Incrementos similares se han observado en otros sistemas huésped-patógeno (Bernal *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2003; Murillo *et al.*, 2003). Sin embargo, este incremento no se observa en los virus recombinantes que incluyen en su genoma las *enhancinas*, siendo su actividad similar a la del control.

En resumen, el hecho de que no se ha detectado expresión de la *enhancina* de AgseGV ni proteína en los OBs y que no se haya observado un efecto potenciador, fortalece la hipótesis de que las *enhancinas* no se expresan bajo promotores heterólogos como se ha descrito en trabajos anteriores (Hayakawa *et al.*, 2000; Lepore *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2003). Sin embargo, para corroborar esta hipótesis se deberían realizar ensayos de transcripción incluyendo como controles positivos genes que se expresan con seguridad como son la *ADN-polimerasa* y la *poliedrina* (Romanowski y Ghiringhelli, 2001), y comprobar además que las *enhancinas* purificadas mediante filtración cromatográfica en gel a partir de los OBs son potenciadores de la actividad, como ya se ha podido demostrar con las *enhancinas* de otros GVs y NPVs (Granados *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2007). Este último ensayo también podría ayudar a determinar si la mutación que sufren en el dominio HEXXH de unión a zinc, necesario para su función proteolítica, las *enhancinas* de AgseGV y la VEF3 de AgseNPV hace que éstas no sean funcionales, y por tanto no tengan actividad potenciadora.

La idea original de este trabajo fue el de seleccionar de entre las distintas *enhancinas* descritas en los baculovirus de *A. segetum* aquella con mayor capacidad potenciadora mediante la construcción de recombinantes, con el fin de producir esta proteína a gran escala e incluirla en formulados (Williams y Cisneros, 2001), dado que a nivel social hay aversión hacia la liberación de organismos modificados genéticamente y hacia su uso como agentes de control biológico (Inceoglu *et al.*, 2001). Pero el producir proteínas en *E. coli* es muy caro, debido a la necesidad de inducir la producción proteica mediante IPTG. Una posible solución sería producir la proteína en *Bacillus megaterium*, que ha demostrado ser un huésped excelente para la expresión de ADN no homólogo (Biedendieck *et al.*, 2007; Malten *et al.*, 2006; Rygus y Hillen, 1991), además de tener un sistema de inducción mucho más barato que *E. coli*. Siguiendo este sistema Liu *et al.* (2000) pudieron producir una *enhancina* de HearGV en *E. coli* BL21 y utilizarla como potenciador de la actividad HearNPV contra *H. armigera*.

El uso de *enhancinas* tiene claras implicaciones en el desarrollo de nuevos formulados basados en baculovirus y consecuentemente en su desarrollo como bioinsecticidas.

CONCLUSIONES

1. La *enhancina* del aislado de Badajoz de AgseGV presenta un 99% de identidad a nivel de nucleótido (y proteína) con la del aislado chino ya secuenciado, esta identidad baja al 24-28% cuando se compara con las *enhancinas* de AgseNPV, incluso descendiendo al 20% con el resto de *enhancinas*.
2. Las *enhancinas* del aislado de Badajoz y de China del AgseGV y la VEF3 de AgseNPV tienen un motivo de unión a zinc HVMGH y HAISF, respectivamente, en vez de la secuencia consenso HEXXH, lo que hace que pueda que no sean funcionales. Aunque con los resultados obtenidos en el presente trabajo no se ha podido llegar a comprobar su funcionalidad.
3. Se construyeron con éxito dos recombinantes utilizando el sistema Bac-to-Bac, uno de ellos incluía en su genoma bajo el promotor p10 el gen de la *enhancina* de AgseGV de Badajoz, BacENHAgseGV, y el segundo de ellos, Bac \emptyset se utilizó como control ya que bajo el promotor p10 no se insertó ningún gen.
4. No se pudo detectar transcripción del gen de la *enhancina* en cultivos celulares infectados con BacENHAgseGV, aunque al no incluir un control positivo de la RT no se sabe si ha habido un problema con la extracción de ARN y transcripción reversa, o realmente no hay transcripción.
5. El análisis de la composición de proteínas en los OBs mediante SDS-PAGE reveló la ausencia de bandas proteicas correspondientes al tamaño de las *enhancinas* en los OBs de los distintos recombinantes, lo que corrobora la ausencia transcripción.
6. Finalmente, los baculovirus recombinantes que incluyen en sus genomas el gen de la *enhancina* no presentaron una actividad insecticida superior a la del control contra distintas especies susceptibles, lo cual sugiere que no hubo efecto de dichos genes.
7. A la vista de estos resultados, podemos concluir que los baculovirus recombinantes contruidos en este trabajo probablemente no expresan las correspondientes *enhancinas*. Por tanto, teniendo en cuenta lo recogido en la literatura sobre éstas, de cara a futuros trabajos se sugiere abordar la construcción de nuevos recombinantes que contemplen la inclusión de los promotores nativos de los genes de las *enhancinas* que se quieran expresar.

REFERENCIAS

- Bernal A, Simón O, Williams T, Caballero P.** 2014. Stage-specific insecticidal characteristics of a nucleopolyhedrovirus isolate from *Chrysodeixis chalcites* enhanced by optical brighteners. *Pest Manag. Sci.* **70**:798-804.
- Bernal A, Williams T, Hernández-Suárez E, Carnero A, Caballero P, Simón O.** 2013. A native variant of *Chrysodeixis chalcites* nucleopolyhedrovirus: The basis for a promising bioinsecticide for control of *C. chalcites* on Canary Islands' banana crops. *Biol. Control* **67**:101-110.
- Beperet I.** 2014. Regulation of multiple infection in *alphabaculoviruses*: critical factors that determine success. Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Biedendieck R, Gamer M, Jaensch L, Meyer S, Rohde M, Deckwer WD, Jahn D.** 2007. A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. *J. Biotechnol.* **132**:426-430.
- Bischoff DS, Slavicek, JM.** 1997. Molecular analysis of an *enhancin* gene in the *Lymantria dispar* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Virol.* **71**:8133-8140.
- CABI.** 2014. <http://www.cabi.org/>
- Caballero P, López-Ferber M, Williams T.** 2001. Los baculovirus como Bioinsecticidas en el control biológico de plagas, 1ª ed. Phytoma y UPNA, Valencia, España.
- Chang JH, Choi JY, Jin BR, Roh JY, Olszewski JA, Seo SJ, O'Reilly DR, Jea YH.** 2003. An improved baculovirus insecticide producing occlusion bodies that contain *Bacillus thuringiensis* insect toxin. *J. Invertebr. Pathol.* **84**:30-37.
- Chejanovsky N, Gershburg E.** 1995. The wild-type *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus induces apoptosis of *Spodoptera littoralis* cells. *Virology* **209**:519-525.
- Ciccarone VC, Polayes D, Luckow VA.** 1997. Generation of recombinant baculovirus DNA in *E. coli* using baculovirus shuttle vector. *Methods Mol. Med.* **13**: 213-235.
- Crawley M.** 1993. GLIM for ecologists. Oxford: Blackwell scientific publications.
- Després L, David JP, Gallet C.** 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Ecol. Evol.* **22**:6.
- Devine GJ, Furlong MJ.** 2007. Insecticide use: context and ecological consequences. *Agric. Human Values* **24**: 281-306.
- Edgar RC.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**:1792-1797.

- Escriche B, Ferrandis MD, Hernández CS, Herrero S, Martínez C, Porcar M.** 2001. Técnicas básicas en el trabajo con *Bacillus thuringiensis*, p. 297-315, *En*: Caballero P, Ferré J (ed), Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas, 1ª ed. Phytoma y UPNA, Valencia, España.
- FAO.** 2014. <http://www.fao.org>
- Funk CJ, Braunagel SC, Rohrmann GF.** 1997. Baculovirus structure, p. 7-32. *En*: Miller LK (ed), The baculoviruses, Plenum, New York.
- Gallo LG, Corsaro BG, Hughes PR, Granados RR.** 1991. *In vivo* enhancement of baculovirus infections by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **58**:203-210.
- Gijzen M, Roelvink P, Granados RR.** 1995. Characterization of viral enhancing activity from *Trichoplusia ni* granulosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* **65**:289-294.
- Granados RR, Fu Y, Corsaro B, Hughes PR.** 2001. Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the *enhancin* from *Trichoplusia ni* granulovirus. *Biol. Control* **20**:153-159.
- Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA.** 1976. Velvetbean Caterpillar: a rearing procedure and artificial médium. *J. Econ. Entomol.* **69**: 487-488
- Goto C.** 1990. 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.
- Guo HF, Fang JC, Wang JP, Zhong WF, Liu S.** 2007. Interaction of *Xestia c-nigrum* granulovirus with peritrophic matrix and *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura*. *J. Econ. Entomol.* **100**:20-25.
- Hammock BD, Bonning BC, Possee RD, Hanzlik TN, Maeda S.** 1990. Expression and effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector. *Nature* **344**:458-461.
- Hara S, Tanada Y, Omi EM.** 1976. Isolation and characterization of a synergistic enzyme from capsule of a granulosis virus of armyworm, *Pseudaletia-unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol.* **27**:115-124.
- Häse CC, Finkelstein RA.** (1993). Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* **57**:823–837

- Hayakawa R, Shimojo E, Mori M, Kaido M, Furusawa I, Miyata S, Sano Y, Matsumoto T, Hashimoto Y, Granados RR.** 2000. Enhancement of baculovirus infection in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus or *Nicotiana tabacum* engineered with a granulovirus *enhancin* gene. *Appl. Entomol. Zool.* **35**:163–170.
- Hughes PR, Wood HA.** 1981. A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.* **37**:154-159
- Ibarra JE, Del Rincón Castro MC.** 2001. Capacidad insecticida de los baculovirus, p 204-220. *En*: Caballero P, López-Ferber M, Williams T (ed), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas, 1ª ed. Phytoma y UPNA, Valencia, España.
- Inceoglu AB, Kamita SG, Hinton AC, Huang Q, Severson TF, Kang KD, Hammock BD.** 2001. Recombinant baculoviruses for insect control. *Pest. Manag. Sci.* **57**:981-987.
- Jakubowska AK, Peters SA, Ziemnicka J, Vlak JM, Van Oers MM.** 2006. Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV. *J. Gen. Virol.* **87**:537-551.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM.** 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revisión. *Arch. Virol.* **151**:1257-1266.
- Jiang W, Bond JS.** 1992. Families of metalloendopeptidases and their relationships. *FEBS Lett.* **312**:110–114.
- Jongeneel CV, Bouvier J, Bairoch A.** 1989. A unique signature identifies a family of zinc-dependent metallopeptidases. *FEBS Lett.* **242**:211–214.
- Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL.** 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnol.* **23**: 567-575.
- LeOra software.** 1987. POLO-PC a user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, CA.
- Lepore LS, Roelvink PR, Granados RR.** 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.** 2003. Characterization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancin and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* MNPV recombinant. *J. Gen. Virol.* **84**:123–132.

- Liu X, Yang G, Qiu B, Tian P.** 2000. Molecular cloning of enhancin gene from *Helicoverpa armigera* granulosis virus and its expression in *E. coli*. *Acta Microbiol. Sin.* **40**:379-383.
- Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO.** 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67**:4566-4579.
- Malten M, Biedendieck R, Gamer M, Drews AC, Stammen S, Buchholz K.** 2006. A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**:1677-1679.
- Maranga L, Cruz PE, Aunins JG, Carrondo MJ.** 2002. Production of core and virus-like particles with baculovirus infected insect cells. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **74**: 183-206.
- Martínez AM, Simón O, Willaims T, Caballero P.** 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *Entomol. Exp. Appl.* **109**:139-146.
- Miao Y, Zhang Y, Nakagaki K, Zhao T, Zhao A, Meng Y, Nakagaki M, Park EY, Maenaka K.** 2006. Expression of spider flagelliform silk protein in *Bombyx mori* cell line by a novel Bac-to-Bac/BmNPV baculovirus expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**:192-199.
- Murillo R, Muñoz D, Caballero P.** 2003. Host range and biological activity of three *Spodoptera* nucleopolyhedrovirus genotypic variants and the effect of Tinopal LPW on the most active variant. *Int. J. Pest Manag.* **49**:147-153.
- Murphy GJP, Murphy G, Reynolds JJ.** (1991). The origin of matrix metalloproteinases and their familial relationships. *FEBS Lett.* **289**:4-7.
- Peng J, Zhong J, Granados RR.** 1999. A baculovirus *enhancin* alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *J. Insect Physiol.* **45**:159-166.
- Popham HJR, Bischoff DS, Slavicek JM.** 2001. Both *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *enhancin* genes contribute to viral potency. *J. Virol.* **75**:8639-8648.
- Roelvink PW, Bartholomew GC, Granados RR.** Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus *enhancin* genes. *J. Gen. Virol.* **76**: 2693-2705.

- Romanowski V, Ghiringhelli PD.** 2001. Biología molecular de baculovirus: Replicación y regulación de la expresión génica. *En: Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas.* M.L.-F.y.T.W. P. Caballero, editor, Phytoma-Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España. 119-142.
- Rohrmann GF.** 2008. Baculovirus molecular biology. National center for biotechnology information. Bethesda, MD.
- Rygas T, Hillen W.** 1991. Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**:594-599.
- Sciocco de Cap, A.** 2001. Biología y patogénesis de los baculovirus, p. 47-72. *En: Caballero P, Williams T, López-Ferber M (ed), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas, 1ª ed.* Phytoma y UPNA, Valencia, España.
- Simón O, Williams T, López-Ferber M, Taulemesse JM, Caballero P.** 2008. Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control* **44**:321-330
- Simón O, Williams T, López-Ferber M, Caballero P.** 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5579-5588.
- Shapiro M.** 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entom.* **85**:1682-1686.
- Slavicek JM.** 2012. Baculovirus enhancins and their role in viral pathogenicity, p147-168. *En: Moses A (ed), Molecular virology, Chap. 9, InTech, Rijeka, Croatia.*
- Slavicek JM, Popham HJR.** 2005. The *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *enhancins* are components of occlusion-derived virus. *J. Virol.* **79**, 10578–10588.
- Stewart LMD, Hirst M, López-Ferber M, Merryweather AT, Cayley PJ, Possee.** 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* **352**:85-88.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S.** 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.
- Takemoto Y, Mitsuhashi W, Murakami R, Konishi H, Miyamoto K.** 2008. The N-terminal region of an entomopoxvirus fusolin is essential for the enhancement of peroral infection, whereas the C-terminal region is eliminated in digestive juice. *J. Virol.* **82**:12406-12415.

- Tanada Y.** 1959. Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Insect. Pathol.* **1**:215-231.
- Tanada Y, Himeno M, Omi EM.** 1973. Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear-polyhedrosis virus of the armyworm. *J. Invertebr. Pathol.* **21**:31-40.
- Theilmann DA, Blissard GW, Bonning B, Jehle JA, O'Reilly DR, Rohrmann GF, Thiem S, Vlak JM.** 2005. Baculoviridae, p. 177–185. *En*: Fauquet CX, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger (ed), *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. 8th Report of the international committee on the taxonomy of viruses*, Elsevier, Amsterdam.
- Toprak U, Harris S, Baldwin D, Theilmann D, Gillott C, Hegedus DD, Erlandson MA.** 2012. Role of *enhancin* in *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus virulence: selective degradation of host peritrophic matrix proteins. *J. Gen. Virol.* **93**:744-753.
- Uchima K., Harvey JP, Omi EM, Tanada, Y.** 1988. Binding sites on the midgut cell membrane for the synergistic factor of a granulosis virus of the armyworm (*Pseudaletia unipuncta*). *Insect Biochem.* **18**:645-650.
- Van Beek NAM, Hughes PR.** 1998. The response time of insect larvae infected with recombinant baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.* **72**:338-347.
- Wang P, Hammer DA, Granados RR.** 1994. Interaction of *Trichoplusia ni* granulosis virus-encoded *enhancin* with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects. *J. Gen. Virol.* **75**:1961-1967.
- Wang P, Granados, RR.** 1998. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *J. Invertebr. Pathol.* **72**:57–62.
- Wang P, Granados RR.** 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem.* **30**:135-143.
- Williams T, Cisneros J.** 2001. Formulación y aplicación de los baculovirus Bioinsecticidas, p 313-372. *En*: Caballero P, López-Ferber M, Williams T (ed), *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*, 1ª ed. Phytoma y UPNA, Valencia, España.
- Yamamoto T, Tanada Y.** 1978. Biochemical properties of viral envelopes of insect baculoviruses and their role in infectivity. *J. Invertebr. Pathol.* **32**:202-211.

Zhang XX, Liang ZP, Chen XH, Song XF, Wang LW, Shao XF. 2012. Expression and synergistic function of *enhancin*-like gene of *Agrotis Segetum* granulovirus. J. Chinese Virol. **28**:258-264.