

CEPA RECOMBINANTE DE GRANULOVIRUS CON MAYOR VIRULENCIA HACIA EL GUSANO FALSO MEDIDOR DE LA COL, DESARROLLADA POR CO-TRANSFECCIÓN MEDIANTE BIOBALÍSTICA

PROYECTO 157791

REPORTE FINAL

INTRODUCCIÓN

Los baculovirus son una alternativa al uso de insecticidas químicos en el control de insectos plaga. Estos virus se han aislado sólo de lepidópteros, himenópteros y dípteros, y muestran una alta especificidad sobre su hospedero en comparación con otros microorganismos entomopatógenos. Ejemplos de uso de estos virus se ha reportado desde el siglo XIX para el control de plagas agrícolas y forestales. La infección por baculovirus frecuentemente causa la muerte de su hospedero y en muchas veces origina epizootias naturales en sus poblaciones. Por otro lado, la principal limitante es el modo de acción lento en comparación con los insecticidas químicos. Para aumentar la virulencia de las cepas silvestres de baculovirus se ha recurrido a la manipulación genética que consiste en la inserción genes heterólogos al genoma viral y la interrupción o delación de genes virales importantes para el virus. Los genes heterólogos probados son neurotoxinas, proteínas de regulación fisiológica, enzimas de degradación celular y recientemente la expresión de RNAs de interferencia (iRNAs) con fines de modulación post-traduccional; todas dirigidas hacia el insecto huésped. Por otro entre los genes virales interrumpidos o deletados se encuentran los considerados accesorios como son los reguladores hormonales como EGT y los reguladores del ciclo celular como las familias de proteínas IAP y P35. Dichas modificaciones se han visto reflejadas en la rapidez para matar al insecto plaga en comparación con su homólogo silvestre, pero también se reduce el daño ocasionado a la planta por los insectos plaga

Hasta el momento, los baculovirus recombinantes obtenidos sólo pertenecen al género *Alfabaculovirus* y principalmente a su especie tipo AcNPV. Esto se debe a que tienen como prerrequisito contar con una línea de células de insecto permisible a la replicación y co-transfección viral *in vitro*, situación que limita a la mayoría de la especies de esta familia de virus. Sin embargo, trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que es posible obtener tanto *Alfabaculovirus* como *Betabaculovirus* recombinantes por la

técnica de biobalística. Este hecho abrió la posibilidad aumentar la virulencia de cualquier tipo de baculovirus silvestre sobre su hospedero natural.

El granulovirus de *Trichoplusia ni* (TnGV) es un virus perteneciente al género *Betabaculovirus*, específico del lepidóptero noctuido *T. ni*, que es una plaga polífaga de gran relevancia mundial, de ahí la importancia para ser utilizado como agente de control biológico. A pesar de su potencial selectivo para infectar a su hospedero, el TnGV no es utilizado con este fin, ya que tiene un modo de acción extremadamente lento, aunado su baja estabilidad en el medio ambiente, el reducido espectro de hospederos y altos costos de producción en comparación con los insecticidas convencionales. Pero la capacidad inherente de los baculovirus para producir proteínas heterólogas en gran cantidad, como podrían ser las toxinas, la hacen atractiva para usarla como organismos de control biológico dirigida al aumento de la virulencia. Por otro lado, la existencia de herramientas como la microdissección por láser, contribuyen a la purificación de granulovirus recombinantes a partir de la recuperación de adipocitos que expresen marcadores como la proteína GFP.

ANTECEDENTES

De acuerdo a los datos recabados por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera en el 2015, el brócoli y el repollo son los principales productos hortícolas exportados a América del Norte y Europa desde México. Entre los principales estados de país que las producen se encuentran Guanajuato seguido por Michoacán y Puebla (1). Pero estos productos pierden su valor por presencia de plagas en los materiales de exportación. Aunque se sabe que estas plagas no afectan su rendimiento, sí se considera importante por el daño cosmético ocasionado al contaminar con excretas u organismos en las partes comestibles, produciendo frecuentemente pérdidas económicas por rechazo del producto por presentar mala calidad (2).

El gusano falso medidor de la col, *Trichoplusia ni*, es una plaga polífaga que puede atacar a 60 especies de plantas de interés agrícola, y es una de las principales especies que de forma recurrente se encuentran en cultivos de crucíferas, aunque también otros organismos son encontrados en productos destinados exportación. Esta plaga pertenece a la clase Insecta, orden Lepidoptera, familia Noctuidae y género *Trichoplusia*. Tiene un ciclo biológico de 35 días, con metamorfosis completa que consiste en huevo, 5 estadios larvales, pupa e imago (adulto). La hembra oviposita hasta 300 huevecillos en el envés de las hojas y es capaz de producir hasta 5 generaciones al año en el Bajío mexicano,

debido a niveles de temperatura y humedad óptimas, situación que hace difícil su control como plaga.

En general, para el control de insectos plaga se han utilizado insecticidas sintéticos de forma indiscriminada que, aunque tienen un efecto rápido de acción, disminuyen significativamente la fauna benéfica que rodea a este agroecosistema, causando daños irreversibles y generando organismos más resistentes, sin dejar de lado los residuos químicos nocivos al ser consumidos por el hombre. Por esta razón se buscan nuevas estrategias identificando enemigos naturales para el control de insectos plaga, donde se incluyen a los que se les denomina “Bioinsecticidas”. Dentro de éstos se encuentran microorganismos como nemátodos, bacterias, hongos protozoarios y virus (3).

Respecto a este último grupo, hasta el momento el Comité Internacional para la Taxonomía de virus (ICVT) ha descrito 13 familias diferentes de virus con capacidad de infectar a la clase Insecta entre las que se incluye muy distintivamente a la familia Baculoviridae. Esta familia ha sido ampliamente estudiada y documentada desde el siglo XIX por su capacidad para controlar plagas agrícolas y forestales, así como también por el uso como herramienta de síntesis y expresión de proteínas heterólogas en las áreas de farmacéutica y de investigación (4).

Los baculovirus se caracterizan por tener cuerpos de oclusión (COs) de forma poliédrica (nucleopoliedrovirus o NPV) o granular (granulovirus o GV) que protegen de las condiciones ambientales a las unidades infectivas que son los viriones, con la matriz de los COs formada primordialmente por poliedrina o granulina y con tamaño que varía en longitud de 12 a 5 μm en los NPVs o de 0.5 a 0.2 μm en los GVs. Los COs ocluyen a muchos viriones denominados derivados de oclusión (ODV) para el caso de los NPVs, y sólo un ODV para los GVs. Su función es servir de medio de protección y transporte hasta la ingestión por el hospedero. Los ODVs a su vez pueden contener una o varias nucleocapsides en forma de bastón (de donde proviene el nombre de la familia) y contienen el material hereditario: el DNA. La estructura de la nucleocápside es de naturaleza lipoproteica, que en todos los baculovirus es la misma y su función es la de transportar la información genética del virus en una forma altamente compactada, hasta el núcleo de la célula huésped. El DNA es circular de doble cadena que varía en longitud de 80 a 180 kb y que puede codificar de 100 a 200 proteínas (5).

Los baculovirus tienen cierta plasticidad genética tanto para la adquisición como para la pérdida de fragmentos de DNA, lo que se ve reflejado en su evolución. Los genes únicos así como genes en ciertos linajes, y la relación co-evolutiva con su organismo

huésped han ayudado a dividirlos en cuatro géneros: los *Alfabaculovirus* y *Betabaculovirus* con forma poliédrica y granular, respectivamente, y que parasitan sólo a lepidópteros; los *Gammabaculovirus* y *Deltabaculovirus*, ambos de forma poliédrica y que parasitan a himenópteros y dípteros, respectivamente (6).

El ICTV sólo ha registrado 46 aislados que pertenecen al género *Betabaculovirus* (granulovirus), a pesar de que los reportes de estos patógenos es mucho mayor. Hasta el momento sólo se ha secuenciado el genoma completo de 13 de los cuales 6 son granulovirus que atacan a larvas de la familia Noctuidae, y entre ellos se encuentra TnGV (7). Este virus tiene un cuerpo de oclusión que mide aproximadamente 0.5 µm de largo por 0.2 µm de ancho. El genoma fue recientemente descrito, conteniendo un total de 175,360 pb, el cual codifica para 178 marcos de lectura abierto, y está muy emparentado con los granulovirus de *Xestia c-nigrum*, *Helicoverpa armígera* y *Pseudaletia unipuncta*. Con este último presenta una alta colinearidad genética y un porcentaje de similitud del 98.5% (Bivián-Hernández *et al*, 2016).

RESULTADOS DEL PROYECTO

Desde el primer año de trabajo del proyecto se lograron obtener un poco más de los resultados esperados. En resumen, se obtuvieron las tres construcciones que contienen dos genes que expresan dos tipos de toxinas, estas construcciones se usaron para co-transfectar con los genomas de AcNPV y TnGV, se bombardearon las larvas de *T. ni* y se detectaron los virus recombinantes de las construcciones respectivas. Las toxinas que se seleccionaron para realizar las construcciones fueron la toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* y el veneno Cn10 del alacrán *Centruroides noxius*. Sus correspondientes genes fueron clonados en el vector pAcUW31, tanto individualmente como en conjunto, utilizando en las tres construcciones el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como reportero. La co-transfección con los genomas del nucleopoliedrovirus AcNPV y del granulovirus TnGV se logró por bombardeo de larvas de *T. ni* y se detectaron por microscopía de fluorescencia los cuerpos de inclusión correspondientes. A continuación se detallan los resultados.

Replicación de los virus

Las cepas AcNPV L1 de nucleopoliedrosis y TnGV de granulovirus, ésta registrada en el cepario del laboratorio de Bioinsecticidas como LBIV-12 fueron

proporcionadas por B. A. Federici (Universidad de California, Riverside). Para obtener suficiente muestra de trabajo, ambas fueron replicadas, utilizando una concentración de 10^6 COs/ μ l para la infección inicial *per os* en larvas de *T. ni* de tercer instar. Las larvas infectadas se colectaron de 8 a 10 días post-inoculación para la recuperación de COs. Para su extracción y purificación, 30 larvas infectadas se colectaron y molieron en mortero. La suspensión se filtró en doble tela de organza y se centrifugó en tubos de 35 ml a baja velocidad para retirar excesos. La pastilla resultante se resuspendió en agua desionizada repitiendo las mismas condiciones de centrifugado hasta tener una pastilla blanca. Finalmente esta pastilla resuspendió y se fraccionó en volúmenes pequeños para luego almacenarse a -20°C hasta su uso.

Purificación de virus

La purificación de gránulos y poliedros (COs) se realizó por gradientes continuos de sacarosa de 60 al 36% en tubos de polialómero de 35 ml con ayuda del formador de gradientes GA 3060 BRL (Bethesda Research Laboratories). El gradiente se centrifugó a 24,000 rpm por 1 hora en una ultracentrífuga Beckman XL-90, utilizando el rotor de columpio SW-28. Posteriormente se colectó la banda correspondiente a los COs en tubos de polipropileno. Se adicionó agua destilada hasta 35 ml para resuspender y eliminar el exceso de sacarosa por centrifugación a 15,000 rpm por 10 min a 4°C en la centrifuga Biofuga-Stratos. Este paso se repitió dos veces y finalmente los COs purificados fueron resuspendidos en agua desionizada estéril y se almacenados a 4°C .

Obtención y purificación de DNA viral

El DNA genómico de los virus, a los cuales se les integrarían las construcciones con los genes de las toxinas, se obtuvieron a partir de los viriones de cada cepa silvestre. Primeramente, para disolver los cuerpos de oclusión previamente purificados, se inició con la resuspensión de 2 ml de COs puros en 1 volumen de solución de alcalina, con agitación suave por 1 hora a 28°C . Al final se le agregó TE para detener la reacción. Ya que no se necesitaban viriones puros, a la solución obtenida se le agregó 1 vol de proteinasa K para disolver las cápsides de los viriones y liberar el DNA. El DNA fue purificado por lavados con fenol-cloroformo. Se utilizó RNasa para eliminar RNA y el DNA se precipitó con ayuda de isopropanol y 0.1 vol de acetato de sodio (3M, pH 5.2). La pastilla resultante se resuspendió en TE, se cuantificó y se almacenó a -20°C hasta su

uso. Las condiciones y pureza de DNA viral fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La concentración se determinó en un Nanodrop 2000c (Thermoscientific).

Construcción Cn10-GFP

La primera construcción incluye al gen que expresa la toxina Cn-10 y el gen reportero de la GFP. Esta construcción utilizó como base otra que nuestro laboratorio ya había desarrollado en años previos, la cual incluye el vector pAcUW31, que integra genes heterólogos en el genoma del nucleopoliedrovirus AcNPV por recombinación homóloga, y el gen de la toxina Cn10, éste bajo el control del promotor de la poliedrina. La construcción Cn10-GFP se logró obtener con la integración del gen de la GFP bajo el control del promotor de la p10 (Fig. 1). Para ello se amplificó el gen de la GFP con los iniciadores F- 5'ATCGATATGGCTAGCAAAGGAGAA3' y R- 5'ATCGATTTATTTGTAGAGCTCATC3' (Fig. 2) para luego clonar el amplicón en el vector TOPO para productos de PCR (Fig. 3). Posteriormente se digirieron con EcoRI tanto la construcción TOPO-GFP como la construcción pAcUW31-Cn10, para luego ligar el amplicón con el gen de la GFP en el sitio único EcoRI de la construcción pAcUW31-Cn10. El DNA de las diferentes clonas obtenidas se digirieron primero con EcoRI para identificar aquellos que contenían el inserto esperado (Fig. 4), y luego con NdeI y XbaI para seleccionar al que contenía al inserto en la dirección adecuada (Fig. 5). Con esta estrategia se obtuvo una clona con el inserto esperado y en la dirección adecuada. A esta construcción se le llamó pAcUW31-Cn10-GFP (Fig. 1).

Construcción Cyt1-GFP

Esta construcción incluye los genes que expresan la toxina Cyt1Aa de *B. thuringiensis* sv. *israelensis* y la GFP. Esta construcción también utilizó como base al vector pAcUW31. Primeramente, se amplificaron los genes de la Cyt1Aa y de la GFP con iniciadores que contenían sitios específicos de subclonación. Los de la toxina Cyt1Aa fueron: F, 5'GAATTCATGGAAAATTTAAATCATTG3', con un sitio EcoRI en su origen; y R, 5'GGTACCGAGGGTTCCATTAATAGC3', con un sitio KpnI en su origen. Los de la GFP fueron: F, 5'GGTACCATGGCTAGCAAAGGAGAAG3', con un sitio KpnI en su origen; y R, 5'GGTACCTTATTTGTAGAGCTCATCC3', con un sitio KpnI en su origen. Una vez obtenidos los amplicones (Fig. 6), éstos fueron clonados en el vector TOPO y la corroboración del inserto apropiado se obtuvo con una

digestión con EcoRI (Fig. 7). Posteriormente, el inserto de la Cyt1Aa se ligó al sitio único EcoRI del vector pAcUW31 y se corroboró la inserción apropiada con una digestión con la misma enzima (Fig. 8). Además, la dirección apropiada del inserto se corroboró con una digestión con BamHI. Se obtuvo una clona con el inserto esperado y la dirección adecuada (Fig. 8). Esta construcción pAcUW31-Cyt1 (Fig. 9) sólo contenía el gen de la Cyt1Aa y hacía falta incorporar el gen de la GFP. Para ello, este último gen fue obtenido de la construcción descrita anteriormente y extraído con los nuevos sitios KpnI adicionados a los iniciadores, el cual fue ligado al sitio único KpnI de la construcción pAcUW31-Cyt1, al final de la secuencia del gen de la Cyt1Aa, y con los codones en fase entre los dos genes. Los clones obtenidos se digirieron con EcoRI para determinar la presencia del inserto adecuado (Fig. 10) y la dirección adecuada del inserto se corroboró con una digestión simple con BamHI y una doble con XbaI y NdeI (Fig. 11). De esta forma se obtuvo la construcción pAcUW31-Cyt1-GFP (Fig. 12).

Construcción Cn10-Cyt1-GFP

La tercera construcción incluyó a los tres genes seleccionados que expresan a las toxinas Cn10 y Cyt1Aa, y a la proteína GFP. Esto se logró de una manera relativamente sencilla, al utilizar la construcción pAcUW31-Cn10, descrita anteriormente, a la que se le ligó el inserto Cyt1-GFP de la construcción pAcUW31-Cyt1-GFP, obtenido con una digestión EcoRI. Las clonas obtenidas fueron sujetos a dos dobles digestiones, primero con XbaI y NdeI, y luego con XbaI y NcoI. Con ello se corroboró que se obtuvieron tres clones con el inserto esperado y la dirección adecuada (Fig. 13). La nueva construcción se denominó pAcUW31-Cn10-Cyt1-GFP (Fig. 14).

Cría de *T. ni* en condiciones de insectario

Una colonia de larvas de *T. ni* es mantenida en el insectario del CINVESTAV-Irapuato de acuerdo a las condiciones previamente descritas (8). Se usaron larvas neonatas para realizar bioensayos, larvas de 48 hrs de eclosión para la co-transfección por bombardeo y de tercer instar para amplificar los nucleopoliedrovirus y los granulovirus silvestres y recombinantes. En todos los casos las larvas estuvieron en dieta artificial y en cámara de crecimiento a una temperatura de $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, con un fotoperiodo de 14:10 h y una humedad relativa de 60-70% en iguales condiciones de insectario (9).

Bombardeo de larvas de *Trichoplusia ni*

Una vez obtenidas las construcciones que contienen los genes de las toxinas Cn10 y Cyt1Aa, y a la proteína GFP como reportero, se continuó con la obtención de los virus recombinantes. Debido a que se utilizó un vector diseñado para la integración de genes heterólogos en el genoma del nucleopoliedrovirus AcNPV, primero se realizaron bombardeos de larvas del falso medidor utilizando las construcciones antes descritas y el genoma del AcNPV. Para ello se purificó el DNA genómico del virus mediante la purificación de poliedros y viriones, por centrifugación diferencial en gradientes de sacarosa, y luego se obtuvo el DNA genómico por disolución de las cápsides. Posteriormente se purificó DNA genómico del granulovirus TnGV, de la misma forma. Las mezclas de los DNA genómicos de los virus con las diferentes construcciones se adhirieron a las micropartículas de oro y se procedió a bombardear larvas del falso medidor de primer instar, bajo las condiciones que se optimizaron en experimentos anteriores (partículas de 1.6 μm , presión de disparo de 900 psi, vacío a 400 Torr, 7 cm de distancia de disparo, sobre 20 larvas en un contenedor de 16 mm de diámetro), usando un sistema de bombardeo BioRad. Las larvas bombardeadas fueron regresadas a su dieta artificial para su recuperación y subsiguiente crecimiento, las cuales fueron mantenidas bajo condiciones de insectario ($28\pm 2^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ HR, 14:10 hs luz-oscuridad). Éstas fueron monitoreadas diariamente para identificar cualquier síntoma de infección viral.

Detección de virus recombinantes

Cuando las larvas bombardeadas mostraron síntomas de infección viral, éstas eran separadas y monitoreadas bajo el microscopio estereoscópico de fluorescencia. Algunas larvas mostraron el desarrollo de la infección además de zonas de fluorescencia bajo la luz UV. En ocasiones, aunque poco frecuentemente, se pudo detectar algunas larvas con evidente fluorescencia verde en todo su cuerpo (Fig. 15). La observación de células individuales al microscopio compuesto de fluorescencia corroboró la presencia de poliedros que contenían la GFP, debido a que los promotores usados en las tres construcciones regula la expresión de dos de las proteínas del poliedro: la poliedrina y la p10. En las figuras 16 y 17 se observan núcleos agrandados de adipocitos infectados con AcNPV recombinantes con las construcciones pAcUW31-Cn10-GFP y pAcUW31-Cyt1-GFP, respectivamente. Los poliedros fluorescentes que llenan los núcleos se observan claramente, contrastando con otros núcleos infectados por virus no

recombinantes (no fluorescentes) en el fondo de la foto. Los primeros, producto de la co-transfección con la mezcla del DNA genómico y la construcción respectiva; y los segundos, producto sólo de la transfección con el DNA genómico del AcNPV.

Por otro lado, las mismas construcciones se mezclaron con el DNA genómico del granulovirus TnGV. Las larvas bombardeadas con estas mezclas no mostraron áreas fluorescentes tan evidentes como las observadas cuando se utilizó el genoma del nucleopoliedrovirus AcNPV. Sin embargo, una observación minuciosa de los tejidos de las larvas que mostraron infección viral mostró algunos signos de fluorescencia, sobre todo en los adipocitos, que es el tejido que infectan los granulovirus. Las figuras 18, 19 y 20 muestran evidente fluorescencia verde en algunas de sus células, en larvas que fueron bombardeadas con las construcciones pAcUW31-Cn10-GFP, pAcUW31-Cyt1-GFP y pAcUW31-Cn10-Cyt1-GFP. Es importante hacer notar que, a diferencia de los nucleopoliedrovirus, los granulovirus forman un cuerpo de oclusión mucho más pequeño, ya que sólo contienen a un virión por cuerpo de oclusión, y por lo mismo su detección como partícula individual es mucho más difícil de observar. Sin embargo, algunas microfotografías muestran pequeñas partículas fluorescentes, o bien citoplasmas fluorescentes debido a que, a diferencia de los nucleopoliedrovirus que crecen en el núcleo, los granulovirus crecen en el citoplasma de la célula infectada. Otra observación que hay que hacer notar es que el vector utilizado para la clonación de las toxinas está diseñado para realizar recombinación homóloga con sitios específicos del genoma de AcNPV y no de TnGV, por lo que se esperaría que la recombinación se llevara a cabo más eficientemente en el genoma del primero.

Estrategia planteada originalmente

Una vez que se obtuvieron las construcciones genéticas que incluían las toxinas de *Bacillus thuringiensis* y del alacrán en el vector pacUW31 y que se realizaron los primeros bombardeos en larvas de *T. ni*, se continuaron con los bombardeos y el aislamiento de las cepas recombinantes a partir las larvas que contenían las mezclas de cepas silvestres y recombinantes. Asimismo, se logró identificar un fragmento del gen *etg* del granulovirus de *T. ni* (TnGV) el cual se pudo amplificar mediante el diseño de iniciadores degenerados (ver más adelante). Este fragmento se clonó y posteriormente se utilizó para diseñar un vector específico para el TnGV, con secuencias flanqueantes a los genes clonados, que permitirían la recombinación homóloga en el genoma del virus. En este vector se logró clonar las tres construcciones que ya se habían obtenido con el vector

para el AcNPV (pacUW31). Con estas construcciones se realizarían las transformaciones directamente en el genoma del TnGV.

Generación de los baculovirus AcNPV recombinantes.

Debido a que la cepa de granulovirus TnGV (o de cualquier granulovirus, para este caso) nunca antes se había manipulado por la ausencia de líneas celulares permisibles, este trabajo se inició con la cepa más utilizada y establecida en protocolos de baculovirus recombinantes: la AcNPV. Es por ello que se generaron las construcciones donde se clonaron dos diferentes genes heterólogos: el primero fue el gen *cn10* de *Centruroides noxius* que codifica para una toxina que inhibe los canales de sodio alterando el sistema nervioso volviéndose tóxico para los insectos, pero no para los humanos; y el segundo gen fue el *cyt1A* de *Bacillus thuringiensis* que codifica para una toxina citolítica que es tóxica a diversos insectos. Como ya se mencionó, los genes se clonaron en el vector pacUW31 y así obtuvimos las siguientes construcciones que se resumen en la figura 21.

Con estas construcciones y siguiendo el protocolo desarrollado por Obregón-Barboza *et al.* (2007), generamos 3 nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcNPV) expresando los diferentes genes heterólogos: AcNPV-paccn10-GFP, AcNPV-paccyt1A-GFP y AcNPV-paccn10-cyt1A-GFP, que fueron utilizados para los bombardeos de las larvas. En la figura 22 se muestran larvas de *T. ni* con altos niveles de fluorescencia, debido a la expresión de la proteína GFP de la construcción AcNPV-paccn10-cyt1A-GFP.

La funcionalidad del gen reportero de los virus recombinantes (GFP) se corroboró por microscopia de fluorescencia donde detectamos tejido de larvas con células infectadas por NPVs que expresaron la proteína verde fluorescente. En este análisis se observaron poliedros fluorescentes en muchas células, además de células infectadas con poliedros no fluorescentes (silvestres). En la figura 23 se muestran los poliedros de los virus recombinantes con la construcción AcNPV-paccn10-cyt1A-GFP, detectables por microscopía de fluorescencia. Este resultado indica, como se esperaba, que en estas larvas teníamos una mezcla de poliedros tanto de virus silvestres como recombinantes, por lo que había que purificar los virus recombinantes.

Purificación de los virus AcNPV recombinantes.

Una de las principales tareas fue la purificación de los virus recombinantes de AcNPV. Ésta la realizamos mediante infecciones sucesivas de larvas con la mezcla de virus recombinantes y silvestres, donde las larvas con síntomas de infecciones se colocaron en una solución isotónica y se disectaron con ayuda de un estereoscopio para seleccionar los puntos de fluorescencia en los tejidos internos (Fig. 24). Este tejido se observó posteriormente en un microscopio de fluorescencia para detectar cúmulos de células fluorescentes con virus recombinantes. Estos fragmentos de tejidos fluorescentes se colectaron y se usaron para infectar otras larvas. Este proceso, muy laborioso y tardado, se concluyó cuando en los tejidos de las larvas infectadas se observó casi un 100% de poliedros recombinantes (expresando la GFP) (Fig. 25) y así obtuvimos en un alto grado de pureza a los tres poliedrovirus recombinantes de AcNPV (AcNPV-paccn10-GFP, AcNPV-paccyt1A-GFP y AcNPV-paccno10-cyt1A-GFP). Sin embargo, cabe hacer la aclaración que en ningún caso se logró obtener un 100% de pureza en el aislamiento de ninguno de los virus recombinantes. Esto se debió, principalmente, a que pequeñas proporciones de virus silvestre en la larva competían exitosamente con el recombinante, por alguna razón aún no determinada.

GENERACIÓN DE LOS BACULOVIRUS TnGV RECOMBINANTES.

Por otro lado, el objetivo específico del proyecto fue la generación de cepas recombinantes del granulovirus TnGV y para cubrir este objetivo, inicialmente utilizamos las mismas construcciones que las usadas para generar AcNPV recombinante. Con estos plásmidos co-transfectamos larvas de *T. ni*, mezclado con DNA genómico de TnGV, teniendo en cuenta que estas construcciones no tienen sitios específicos de recombinación para TnGV, ni tampoco tiene promotores y terminadores para TnGV. En este sentido quisimos evaluar si por eventos de recombinación al azar sucedía una recombinación inespecífica y así poder generar las cepas recombinantes de TnGV. En los primeros intentos que se realizaron, si bien se observaron algunos resultados alentadores, fue hasta este segundo año que pudimos detectar resultados más concretos y reproducibles.

Interesantemente, en estos experimentos encontramos que la co-transfección con TnGV-cyt1A-GFP fue exitosa, ya que las células presentaron una fluorescencia muy clara (Fig. 26), lo que indicó que hubo recombinación y que se había generado un TnGV recombinante. Para las co-transfecciones con TnGV-cn10-GFP y TnGV-cn10-cyt1A-GFP, observamos que los tejidos presentaron células fluorescentes pero ésta fue muy

débil. Posiblemente esto se debió a una baja expresión por el lugar donde se insertó la construcción y por esa razón los transgenes no se expresaron tan eficientemente. Sin embargo, estos resultados son muy interesante ya que indican que los genes heterólogos se están expresando y traduciendo, y por ende, los promotores y terminadores de AcNPV también pueden ser leídos por TnGV.

Generación de un vector específico para TnGV.

Para resolver el problema del sitio de recombinación para TnGV, decidimos buscar secuencias potenciales en el DNA de TnGV para poder usarlo como sitio de recombinación e inserción de los genes heterólogos. Durante el proceso de selección del gene más adecuado para este propósito, encontramos que el genoma de AcNPV contiene el gen *egt* (ecdysteroid UDP-glucosyl transferasa) el cual, cuando es eliminado en este virus, la virulencia del poliedrovirus recombinante aumenta significativamente (O'Reilly y Miller, 1991). Con este antecedente decidimos usar el gen *egt* de TnGV como sitio de recombinación y con esto lograríamos obtener un granulovirus que mostraría el efecto de los genes heterólogos más el efecto de la desactivación del gen *egt* de TnGV. Desafortunadamente, el genoma de TnGV aún no había sido secuenciado ni tampoco el gen *egt* de este virus en particular había sido descrito, por lo que buscamos los genomas de otros granulovirus secuenciados. Hasta la fecha se han secuenciados 13 genomas y únicamente 9 de ellos han revelado la presencia de *egt*.

Aun así realizamos diversos alineamientos con los genes *egt* de los genomas de granulovirus reportados para buscar aquellos que fueran más similares y a partir de ellos diseñar iniciadores degenerados para amplificar el *egt* del genoma de TnGV. A través de múltiples análisis decidimos utilizar los granulovirus que atacan a larvas de lepidópteros noctuidos, tratando de optimizar una mejor región a partir de la cual se pudiera diseñar los iniciadores. Los genes *egt* usados fueron las de los granulovirus de *Agrotis segutum* y *Lacanobia oleracea*. Con este alineamiento diseñamos los siguientes iniciadores degenerados: Egt TnGV (directo) AGTCACCAATCWGKTTTKCGG; Egt TnGV (reverso 1) AACTGATCKCCCATYATRGG; y Egt TnGV (reverso 2) ATCCAACCYTYTYTTCCA.

Con estos iniciadores, y después de varios ajustes en la reacción de PCR, logramos amplificar dos bandas con el iniciador reverso 1 (~1200 pb y ~1700 pb), y una (~1200 pb) con el iniciador reverso 2. Los productos amplificados fueron clonados en el vector Topo pcr4 y secuenciados. La secuencia de la banda de ~1200 pb amplificada con el iniciador

reverso 1 fue alineada con los genomas de granulovirus, pero no se observó similitud con ningún *egt* reportado; sin embargo, esta secuencia se alineó con el genoma del GV de *Pseudaletia unipuncta*. Aunque a este virus no se le ha identificado el gen *egt*, nuestra secuencia alineó con una región de este genoma donde debería estar ubicado el *egt*, si lo tuviera, de acuerdo a la estructura de los genomas reportados de GVs, por lo que en función de este resultado decidimos trabajar con esta secuencia. En el Anexo 1 se presenta la secuencia obtenida a partir del amplicón que resultó ser de 1,130 pb.

Construcciones con sitios de recombinación *egt* para TnGV.

Debido a que el plásmido vector para TnGV debería contar con secuencias homólogas al gene *egt* (putativo) de TnGV y que esas secuencias deberían estar flanqueando los genes de interés, se requirió clonar por separado las mitades de la secuencia completa. Para esto se diseñaron iniciadores para amplificar las regiones de recombinación 5' y 3' del gen *egt* de TnGV a partir de la secuencia obtenida anteriormente. Estas regiones se amplificaron a partir de DNA de TnGV. Asimismo, se diseñaron iniciadores para amplificar las construcciones: cn10-GFP, *cyt1A*-GFP y cn10-*cyt1A*-GFP. Estas construcciones fueron amplificadas a partir de los plásmidos usados para AcNPV, pero excluyendo el sitio de recombinación de AcNPV, para luego fusionarlo con las regiones 5' y 3' del *egt* de TnGV.

Una vez amplificadas las tres regiones a fusionar (la región 5' del *egt*, genes heterólogos y región 3' de *egt*), se fusionaron siguiendo la técnica de “double joint-PCR” (Yu *et al.*, 2004). Así obtuvimos la construcción *egt*-cn10-GFP, la cual fue verificada por análisis de restricción y se secuenció. Esta construcción se utilizó para co-tranfectar larvas y así generar el granulovirus con sitio de recombinación para *egt*. Por otro lado, también se generaron las otras dos construcciones: *egt*-*cyt1A*-GFP y *egt*-cn10-*cyt1A*-GFP (Fig. 27). Adicionalmente, Se seleccionaron más genes propios del TnGV, como el *p35* y el *IAP*, que inhiben la apoptosis, para crear nuevos vectores que aumenten la probabilidad de incrementar la virulencia de los granulovirus.

Diseño de otros vectores específicos para el genoma del TnGV

Se realizó una búsqueda bioinformática de regiones ortólogas a los genes *egt*, y *p49* de en los genomas *Betabaculovirus* (granulovirus) publicados en NCBI. De acuerdo a la literatura se sabe que estos genes virales al ser mutados o interrumpidos aumentan la virulencia del organismo. Se diseñó un juego de iniciadores para cada caso.

Se tomó en cuenta el contenido de GC (50% aproximado), la longitud (entre 21 y 22 pb), exclusión de concatámeros y que tuviera una temperatura de alineamiento cercana a los 60°C. Estos se enlistaron en la Tabla 1.

TABLA 1. Iniciadores diseñados a partir de los genes *egt* (putativo) y *p49* de TnGV.

Amplicón	Nombre	Secuencia	TM °C	Longitud
<i>egt</i>	Egt5'-F	TGCGGACTGTAAAATTCACCAC	64	22
	Egt5'-R	CGGCCGCATCAACTGGAAGAT	60	22
<i>p49</i>	P49-F	CCTACGCTACCGTCAGGTCCTC	60	22
	P49-R	ATGGTTCTAGACGAGGACAGC	55	21

Amplificación y clonación de fragmentos

Las dos regiones fueron amplificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se utilizaron las condiciones descritas en la hoja técnica (Cat.10966-020) para la enzima *Taq* Platinum Polimerasa (INVITROGEN). Los fragmentos amplificados fueron insertados en el plásmido pCR4-TOPO y clonados en *E. coli* DH5 α por choque térmico. El paquete celular transformado se plaqueó en cajas Petri con medio LB y antibiótico. Al día siguiente las colonias de bacterias resistentes al antibiótico se sembraron para realizar “minipreps” en medio LB líquido para el posterior escrutinio. El DNA plasmídico se recuperó por lisis alcalina. Las muestras que presentaron aumento del tamaño de plásmido fueron digeridas con la endonucleasas EcoRI y corroborar la liberación del fragmento insertado. Para verificar el tamaño de los productos de PCR y los plásmidos se utilizó electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Secuenciación y análisis de fragmentos amplificados

Dos muestras de cada fragmento clonado fueron secuenciadas y la secuencia consenso resultante se comparó con los genomas de los *Betabaculovirus* publicados en el Genbank y, debido a que recientemente se logró la secuenciación del genoma del TnGV, también se comparó con éste, para conocer la posición y posible función. Se utilizaron 14 secuencias sintéticas a los genes *egt* de *Betabaculovirus* y una secuencia de AcNPV para realizar el cladograma con el primer fragmento. Para el cladograma del segundo fragmento (*p49*) se utilizaron 17 secuencia de *Betabaculovirus* y 3 *Alfabaculovirus* (nucleopoliedrovirus).

Construcción de otros vectores específicos para TnGV

Se utilizaron los iniciadores p10-f y pol-R (Tabla 2) para amplificar las regiones que contienen las toxinas Cn10 y Cyt1Aa clonadas en el plásmido pAcUW31 bajo los promotores de la poliedrina y p10 (Fig. 21). Por otro lado se diseñó un juego de iniciadores para amplificar el gen *p49* en dos fragmentos de 700 pb cada uno. Dichos iniciadores cuentan como distancia mínima de 50 pb entre ellas más la secuencia complementaria al iniciador p10-F para el caso del fragmento 5' de cada gen y pol-R para el caso del fragmento 3' (Tabla 2).

TABLA 2. Iniciadores diseñados para amplificar las construcciones realizadas previamente en el plásmido pAcUW31 e interrumpir al gen *p49* por Double-joint.

Nombre	Secuencia	TM °C	Long.
P10-F	CGGCATAGTACGCAGCTTCTTC	64.2	22
Pol-R	TCGGCCTAATAAAGCTAACACG	60.1	22
P49-pAc-F	CGTTATCACAACAAAGGATCTGC CGGCATAGTACGCAGCTTCTTC	61	45
P49-pAc-R	CTTGACCAACTCATTGCGG TCGGCCTAATAAAGCTAACACG	60	44

Se utilizó la estrategia de PCR Double-joint y las condiciones estandarizadas por Bryksin para fusionar los fragmentos por PCR, por lo que se utilizó la enzima Phusion *taq* polimerasa (F-530-L) siguiendo las especificaciones del proveedor se amplificaron los fragmentos correspondientes a cada construcción. Los productos resultantes de la fusión fueron verificados por electroforesis en geles de agarosa y utilizados para realizar un PCR anidado con la enzima Taq-Platimun Polimerasa (Invitrogen) utilizando los iniciadores P49-F y P49-R, y posterior clonación en el vector pCR4-Topo. El correcto ensamble de secuencias clonadas en los vectores fue verificado por perfiles de restricción con las enzimas *Bam* HI, *Eco* RI y Hind III.

Preparación para el bombardeo con DNA

El DNA genómico y de los vectores con las construcciones descritas anteriormente que se utilizó para el bombardeo fue extraído una semana previa a cada ensayo. Se verificó la calidad y la concentración en el Nanodrop 2000c (Thermo scientific). El procedimiento para recubrir las partículas con DNA se realizó de acuerdo

a las condiciones descritas previamente (10), y las cantidades de DNA y del vector de transferencia se utilizarán de acuerdo a lo descrito previamente (9).

Se utilizó el sistema de bombardeo de micropartículas de alta presión PDS-1000/He Biolistic® (Bio-Rad Laboratorios, Inc. Hércules, CA), que consistió en 7 cm de distancia de disparo, 23 psi de vacío y 900 psi de presión de disparo.

Bombardeo de larvas

Se utilizaron larvas neonatas de *T. ni* de 48 horas en dieta artificial previo al bombardeo. Lotes de 20 larvas se usaron en cada disparo, las cuales fueron transferidas a contenedores de 1.5 cm de diámetro y colocadas en hielo hasta su uso. Después de realizado el disparo, las larvas se transfirieron a cajas con dieta artificial y se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante el tiempo que duró el experimento.

Expresión de virus recombinantes en larva

Las larvas bombardeadas fueron diagnosticadas de acuerdo a la sintomatología típica de la patología gruesa ocasionada por los granulovirus, que consistió en cuerpos larvales blanquecinos a transparentes, aumento de la talla en larvas infectadas y comparación con las testigo. De las larvas que presentaron estas características fueron verificadas por observación en estereoscópico y bajo lámpara de luz azul (470 nm). Aquellos organismos que presentaron motes fluorescentes, se disectaron y se les retiró el intestino para dejar expuesto el tejido adiposo (tejido donde crece el granulovirus). Se tomó una muestra de tejido se observó al microscopio de contraste de fases con el objetivo 100x para corroborar las estructuras granulares y el movimiento browniano típico.

Purificación de virus recombinante

En un microscopio de epifluorescencia y con los objetivos 4 y 10X se recuperó tejido adiposo fluorescente. Éste se utilizó para infectar otras larvas *per os* pero ahora de tercer estadio, con el objetivo de amplificar los granulovirus recombinantes. A las larvas que presentaron infección se repitió el mismo procedimiento. Con el objeto de aislar los gránulos recombinantes, se utilizó el sistema PALM de Carl Zeiss (PALM-System), para lo cual el tejido recuperado fue disgregado de forma mecánica y resuspendido en glicerol al 50%. Se utilizaron portaobjetos con membrana (1.0-PEN Zeiss) para realizar frotis de tejido adiposo disgregado. Se usaron las indicaciones del proveedor para un microscopio

con láser Carl Zeiss para disectar y recuperar sólo tejido fluorescente con los objetivos 20 y 40 X.

Con las muestras de tejido recuperadas se infectaron nuevamente 20 larvas de 3er estadio y se calculó el porcentaje aproximado de virus recombinante a partir del tejido adiposo fluorescente. A partir del tejido infectado puro obtenido de esta infección se infectó un lote de 40 larvas para recuperar cantidad suficiente de virus recombinante para realizar los bioensayos y para extraer DNA viral recombinante.

Cuantificación de partículas virales

Los gránulos silvestres y recombinantes purificados por gradientes de sacarosa fueron trasvasados en tubos de microfuga previamente pesados en balanza analítica. Se volvió a pesar y se restó el peso del tubo. Se agregó 1 ml de agua destilada estéril por cada 100 mg de gránulos. De este “stock” se realizaron diluciones seriada hasta llegar 1:1000 en glicerol al 50% con el objetivo de reducir el movimiento “browniano” de los virus. Se utilizó la cámara Petroff-Hausser Catalogo No. 3900 para cuantificar el número de partículas virales en un milímetro cúbico. Para observar las partículas se utilizó el objetivo 100X del microscopio de contraste de fase Axioplan 2 Imaging. Este procedimiento se repitió 5 veces por cada muestra, comenzando con realizar la dilución seriada correspondiente desde el stock. Por último se determinó el coeficiente de variación de las repeticiones para que no excediera el 20% para ser tomado como válido.

Concentración letal media (CL₅₀)

Para el cálculo de la CL₅₀ se utilizaron cajas petri de 6 cm de diámetro con dieta artificial. Se utilizaron 6 concentraciones diferentes y un testigo con tres repeticiones cada uno. Cada caja contenía 20 larvas de primer estadio de *T. ni*. A las cajas del primer tratamiento se les dispersó 9×10^6 gránulos/cm². A partir de esta concentración se realizaron 5 diluciones seriadas con un factor de 0.5 que fueron dispersadas en los tratamientos subsecuentes. Para el testigo, sólo se usó agua destilada (Fig. 28). Todos los tratamientos fueron puestos en las mismas condiciones del insectario antes mencionadas. Se registró el número de muertos a los 7 días pos-infección y los datos obtenidos fueron procesados por análisis Probit y análisis de varianza.

Tiempo letal medio (TL₅₀)

Para el cálculo de la TL₅₀ se usó como punto de partida la CL₅₀ obtenida previamente, y se utilizó el mismo número de tratamientos, y sus repeticiones. Se registró la mortalidad de las larvas cada 8 horas y se realizó una Regresión Complementaria Log-Log de Robertson y Preisler (CLL) y se excluyen los tiempos que tengan 0 y 100% de mortalidad para que el logaritmo negativo no cause problemas para realizar la regresión lineal. Todos los cálculos se realizaron en el programa SAS.

Corroboración microscópica

En la figura 29 se observan gránulos del TnGV en tinción negativa bajo microscopía electrónica de transferencia que fueron purificados por gradiente continuo de sacarosa y corresponden con las características en tamaño y forma de género *Betabaculovirus*. También se observa claramente una nucleocápside dentro de un cuerpo de oclusión (gránulo). De este lote de granulovirus se extrajo y purificó el DNA genómico tanto para amplificar los genes a interrumpir, como el DNA que se usó en la co-transfección (Fig. 30A).

Evidencia de la construcción de los vectores específicos para TnGV

Utilizando los iniciadores de la tabla 1, se amplificaron por PCR dos fragmentos únicos con tamaños aproximados de 1100 y 1400 pares de bases respectivamente y corroborados por electroforesis en geles de agarosa (Fig. 30B). Estos fragmentos fueron insertados en el vector pCR4-TOPO. Después de la transformación de células competentes se analizó el DNA plasmídico de 20 colonias por medio de “minipreps”. Al verificar el aumento de tamaño del DNA plasmídico y liberación del fragmento insertado por digestión con la endonucleasa *Eco*-RI (Fig. 30C) se mandaron a secuenciar a la empresa MACROGEN por la técnica Sanger. Las secuencias consenso clonadas y secuenciadas en fueron de 1130 pb (Anexo II) y de 1395 pb (Anexo III)

Las secuencias clonadas en el vector se alinearon al genoma total de TnGV (ver mapa del genoma recientemente secuenciado del TnGV, Fig. 31). El primer fragmento corresponde a los orfs 174 y 175 que codifican para una proteína putativa y al factor de crecimientos fibroblástico de baculovirus (FGF). El segundo corresponde al orf 12. Para este caso se tiene un marco de lectura abierto de la proteína P49 (Anexo IV).

Después de realizar el alineamiento de la secuencia del orf 174 con secuencias ortólogas así como las codificantes para la proteína EGT de *Betabaculovirus*, se obtuvo un cladograma (Fig. 32A) en donde se observa claramente que las secuencias provenientes de granulovirus que infectan noctuidos no tienen homología con el resto que son anotadas como verdaderas EGTs. Caso contrario sucedió con el orf 12 (Fig. 31) en donde en todas las secuencias alineadas se mantienen los dominios característicos de las proteínas supresoras de la apoptosis (P49) y además todas son anotadas con el mismo nombre (Fig. 32B).

El fragmento de *p49* fue interrumpido por inserción de un fragmento de 2520 pb provenientes del vector *pAc-cn0-gfp* (Fig. 21) utilizando la técnica Double-joint. Posteriormente se clonó en el vector pCR4-TOPO (Fig. 33A) y se obtuvo el plásmido etiquetado como pTnGV4 mismo que se verificó el tamaño de las bandas obtenidas por electroforesis en gel de agarosa al 1%, después de amplificar los fragmentos por PCR con los iniciadores universales F y R, los iniciadores que amplifican el gen *p49* y los que amplifican el fragmento proveniente del vector donante. También se obtuvo el tamaño esperado de los fragmentos al digerir este plásmido con las enzimas Bam HI, Eco RI y Hind III como se muestra en las figuras 33B y 33C. De igual forma se construyó el plásmido etiquetado como pTnGV5, en donde se interrumpió el fragmento de *p49* con 3060 pb provenientes del vector *pac-cyt-gfp* (Fig. 21), utilizando como vector de clonación pCR4-TOPO (Fig. 34A). Se utilizaron los mismos iniciadores y enzimas para verificar la orientación y los tamaños del plásmido construido como se muestra en las figuras 34B y 34C. Los DNAs plasmídicos correspondientes a pTnGV4 y pTnGV5 fueron cuantificados en 1 y 1.2 mg/ml respectivamente.

Obtención de TnGV recombinantes por biobalística

Después de 10 días de la co-transfección con el DNA viral y los dos vectores de transferencia respectivos, se obtuvieron 8 y 12 larvas con infección visible por granulovirus en donde se pudo observar tejido adiposo blanquecino (Fig. 35A). Se revisaron las larvas en el microscopio de epifluorescencia y se detectaron los motes fluorescentes que corresponden a la expresión de GFP en el tejido adiposo de larvas *in vivo* (Fig. 35B y C). Luego de este escrutinio se obtuvieron sólo 5 larvas con el primer recombinante y 3 con el segundo. Estas larvas fueron disectadas y se les retiró el intestino (Fig. 35D). De igual manera se observaron y rescataron fragmentos de tejido adiposo a

luz visible y luz fluorescente de ambos virus recombinantes a los que se les etiquetó como TnGVr4 y TnGVr5 (Fig. 35 E-H) que fueron colocados en tubos de microfuga con PBS.

Se realizaron frotis de los tejidos de cada muestra preservados en los tubos y disgregado de forma mecánica. Se observaron los adipocitos íntegros en luz visible y con expresión de GFP en luz azul utilizando los objetivos 20 y 40X del sistema PALM. Se pudieron recuperar de forma eficiente sólo adipocitos fluorescentes como se muestra en figura 36A-D antes y después de la disección por láser.

A partir del DNA viral recuperado de los TnGVr4 se pudo amplificar los genes heterólogos insertados en el genoma. Se obtuvo una banda de 700 pb que corresponde al fragmento amplificado de gen *gfp* y una banda de 350 pb que corresponde a la toxina *cn10* utilizando sus iniciadores respectivos. Por el otro lado, también se amplificó el gen de *gfp* y el de la toxina *cyt* que corresponden a las bandas de 700 y 720 pb, respectivamente, amplificados del DNA viral de TnGVr5 (Fig. 37).

Bioensayos de los nuevos recombinantes sobre larvas de *T. ni*

Posterior al aislamiento y amplificación de los virus recombinantes, se obtuvo una concentración de 7×10^9 , 7.5×10^9 y 7.2×10^9 COs/ml de granulovirus silvestre, TnGVr4 y TnGVr5, respectivamente, después de ser purificados por gradiente de sacarosa (Fig. 38).

Una vez realizados los bioensayos de acuerdo a la metodología antes descrita, la mortalidad registrada fue procesada mediante análisis Probit. Los datos estimaron CL_{50} s de 746 y 621 COs/ mm² de los granulovirus recombinantes TnGVr4 y TnGVr5, respectivamente, para matar a la mitad de la población en 7 días, presentando diferencia significativa con el granulovirus silvestre cuya CL_{50} se estimó en 1269 COs/mm² para causar el mismo efecto (Tabla 4). Por otro lado, al calcular el tiempo medio que tarda para matar 460 COs/mm² se estimó en 8.6 día con el recombinante TnGVr4, y 6.3 días con TnGVr5, mientras que el silvestre tarda 10 días (Tabla 4).

Tabla 4. Cálculo de la CL₅₀ y TL₅₀ del bioensayo de los granulovirus silvestres y recombinantes.

Tratamiento	CL ₅₀	Limite fiducial		pendiente	χ^2
		inferior	superior		
TnGV wt	1269	954	1688	0.41	3.08
TnGV-R4	746	511	1090	1.69	2.13
TnGV-R5	621	432	894	1.65	1.01

Tratamiento	TL ₅₀	Limite fiducial		R ²
		inferior	superior	
TnGV wt	9.72	9.52	99.43	0.91
TnGV-R4	8.64	8.42	9.20	0.95
TnGV-R5	6.32	5.51	8.38	0.75

Por otro lado, al comparar las características del desarrollo larval al ser infectadas con las cepas recombinante, se puede observar claramente los efectos de la infección por granulovirus (Fig. 39). Mientras las larvas sin infectar a los 15 días habían seguido su desarrollo normal y ya habían llegado a estado de pupa, las larvas infectadas con granulovirus silvestres habían muerto con cuerpos blanquecinos y talla mayor a las larvas de quinto instar. Por otro lado, las larvas infectadas con TnGVr4 presentaban desarrollo primordialmente de tercer instar y estructura flácida, y por último las larvas tratadas con TnGVr5 mostraron un desarrollo primordialmente de primer o segundo instar y flácidas.

DISCUSIÓN

En el presente proyecto se obtuvieron dos cepas recombinantes del granulovirus TnGV del falso medidor de la col, *T. ni*, los cuales mostraron una mayor virulencia, al compararlos con la cepa silvestre. A estos virus recombinantes se les integraron dos genes que codifican para toxinas, una la Cn10 del alacrán *C. noxius*, y la otra la Cyt1Aa de *B. thuringiensis*. Además, estos genes fueron integrados dentro del marco de lectura abierto del gene *p49* del genoma del TnGV, el cual está involucrado en la inhibición de la apoptosis, lo cual debe aumentar la virulencia, sólo por el hecho de interrumpirlo. Aún así, y a pesar de que las diferencias en CL50s y TL50s fueron estadísticamente diferentes, los niveles de aumento de virulencia de las cepas recombinantes no fueron los esperados.

Es importante hacer notar que las características morfológicas de la cepa LBIV-12 (TnGV) silvestre de baculovirus concuerda con las observadas en los recombinantes. Por lo que no se muestra diferencia morfológica alguna entre las cepas modificadas y la silvestre. Después de amplificar por PCR los fragmentos de los genes *egt* (putativo) y *p49*, las secuencias presentaron identidad de 98.5% con los genomas de granulovirus de insectos de la familia Noctuidae. Estos resultados fueron corroborados al alinear el genoma completo de TnGV con los pertenecientes al género *Betabaculovirus* (Bivian-Hernández *et al*, 2016). Hasta el momento en estos genomas no se ha encontrado una región codificante para *egt* verdadero por esta razón se interrumpió el gen *p49* con las construcciones.

Cabe hacer mención que los experimentos iniciaron con la cepa estándar AcNPV, con el objeto de estandarizar los procedimientos que posteriormente se utilizarían con el granulovirus TnGV, incluyendo la construcciones génicas de las toxinas y el gen reportero, de donde se obtuvieron las construcciones que posteriormente se utilizaron en los vectores específicos para la TnGV. Estos estudios preliminares mostraron excelentes niveles de expresión del gen reportero, lo cual fue definitivo para proseguir con la purificación de los recombinantes.

Una vez establecidos los protocolos y las construcciones génicas, se seleccionaron genes propios del granulovirus para desarrollar vectores específicos para esta cepa. En principio, se trató de obtener secuencias del gen *egt* presente de varios granulovirus y que están involucrados en el aumento de virulencia, cuando éstos son interrumpidos; sin embargo, a pesar de haber encontrado secuencias similares en TnGV, éstas no correspondían a dicho gen y, aun cuando se desarrollaron los vectores con estas secuencias flanqueantes en el vector de transferencia, se decidió no utilizarlo por la falta del gen *egt*, una vez que se conoció el genoma completo del TnGV. Es por ello que los bioensayos se enfocaron sólo a los TnGVs recombinantes con el vector contruido con el gen *p49*, el cual está involucrado en la inhibición de la apoptosis y teóricamente aumentaría más la virulencia del recombinante.

Finalmente se detectó un incremento en la virulencia de los virus recombinantes, comparativamente con el silvestre, pero no a los niveles esperados. Cabe mencionar que el proyecto se continúa (a pesar de que los recursos específicos otorgados por CONACYT ya han sido utilizados) con el objeto de completar el trabajo con la publicación de dos artículos: el correspondiente a los AcNPVs recombinantes, y el de los TnGVs recombinantes. Además, a más tardar, en agosto de 2017, el MC Juventino

López Tlacomulco obtendrá su título de Doctor en Biotecnología de Plantas, con la tesis proveniente de este proyecto. Los experimentos faltantes incluyen la prueba de otro vector de TnGV, y continuar con los bioensayos contra larvas de *T. ni* con el objeto de establecer parámetros de virulencia más precisos.

CONCLUSIONES

1. Se demostró la eficiencia de las construcciones génicas con los genes *cn10* y *cyt1Aa* por medio de la expresión del gen reportero *gfp*, en la cepa de AcNPV, donde el gen reportero se detectó claramente en los poliedros de las células infectadas
2. Se demostró que tanto las secuencias flanqueantes del vector pAcUW31 además de los promotores del gen *p10* y de la poliedrina de AcNPV, son capaces de integrarse al genoma del TnGV, y que los promotores son funcionales también en el granulovirus.
3. A pesar de que se construyó un vector específico para TnGV en base a secuencias conservadas del gen *etg*, posteriormente se detectó que tal gen no existe en el genoma del TnGV, por lo que se eliminó para porteriores pruebas.
4. El vector que se probó con los genes de las toxinas Cn10 y Cyt1Aa, integrados en el genoma del TnGV se basó en regiones recombinantes del gen *p49*, y logró expresar al gen reportero, lo que ayudó a la purificación de los recombinantes.
5. A pesar de utilizar tres técnicas para el aislamiento y purificación de los virus recombinantes (microdissección de tejidos, sistema PALM y Cell-Sorter), no se logró obtener una muestra con el 100% de pureza en ningún caso. Esto fue crucial, ya que los recombinantes siempre mostraron una competitividad más baja que la cepa silvestre, y en las infecciones posteriores, la cepa silvestre se replicaba más rápido que las recombinantes.
6. A pesar de la falta de pureza total de las cepas recombinantes, fue posible obtener niveles de pureza que pudieran indicar algún incremento en la virulencia de las recombinantes, con respecto al silvestre. De esta forma fue posible estimar CL₅₀s y TL₅₀s menores a los de la cepa silvestre, indicando un aumento de virulencia en las recombinantes.
7. Es necesario continuar con la evaluación de otras cepas recombinantes y seguir intentando obtener cepas puras.

REFERENCIAS

1. SAGARPA (2015) *Atlas Agroalimentario* (México), (Pesquera SdIAy).
2. Williams T, Arredondo-Bernal HC, & Rodríguez-del-Bosque LA (2013) Biological Pest Control in Mexico. *Annual Review of Entomology* 58(1):119-140.
3. Ibarra JE, *et al.* (2006) Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev. Latinoamericana de Microb* 48(2):113-120.
4. Harrison RL, *et al.* (2012) Eight new species in the genus Alphabaculovirus. ed ICTV.
5. Federici B (1997) Baculovirus Pathogenesis. *The Baculoviruses*, The Viruses, ed Miller L (Springer US), pp 33-59.
6. Ikeda M, Yamada H, Hamajima R, & Kobayashi M (2013) Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. *Virology* 435(1):1-13.
7. Zhang X, Liang Z, Yin X, Wang J, & Shao X (2014) Complete genome sequence of *Agrotis segetum* granulovirus Shanghai strain. *Archives of virology*:1-4.
8. Chaudhury MFB (1986) Handbook of Insect Rearing, Vol. I and II. Edited by SinghPritam and MooreR. F.. Vol. I, viii + 488 pp., US\$77.75, ISBN 0444-424665-2; Vol. II, viii + 514 pp., US\$77.75, ISBN 0444-424665-0. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1985. *Insect Science and Its Application* 7(4):575-576.
9. Obregon-Barboza V, Del Rincón-Castro MC, Cabrera-Ponce JL, & Ibarra JE (2007) Infection, transfection, and co-transfection of baculoviruses by microprojectile bombardment of larvae. *Journal of virological methods* 140(1):124-131.
10. Cabrera-Ponce, J. L., López, L., Assad-Garcia, N., Medina-Arevalo, C., Bailey, A. M., & Herrera-Estrella, L. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*, 16(5), 255-260.

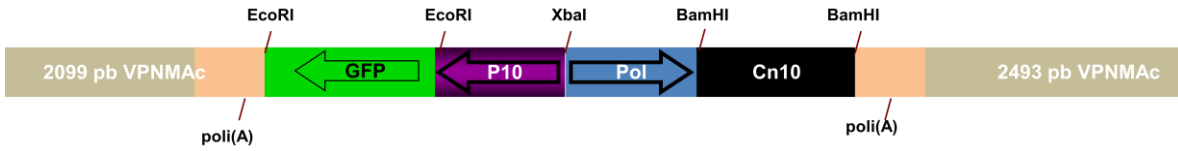


Figura 1. Mapa de la construcción pAcUW331-Cn10-GFP



Figura 2. Producto de la amplificación del gen que codifica la GFP

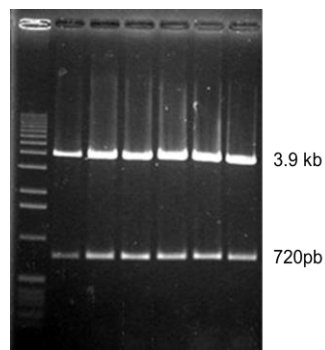


Figura 3. Digestión de la construcción TOPO-GFP con EcoRI, que libera el amplicón clonado que contiene al gen de la GFP.

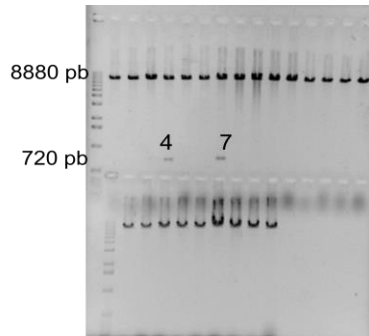


Figura 4. Digestión de la construcción pAcUW31-Cn10-GFP con EcoRI, que libera el inserto que contiene al gen de la GFP. Las clonas 4 y 7 revelan el inserto.

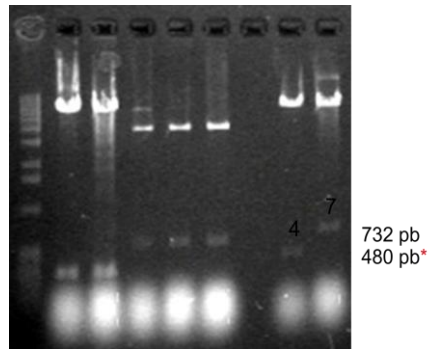


Figura 5. Doble digestión de la construcción pAcUW31-Cn10-GFP con XbaI y NdeI, que permite identificar la dirección correcta del inserto. La clona 4 revela la dirección adecuada.

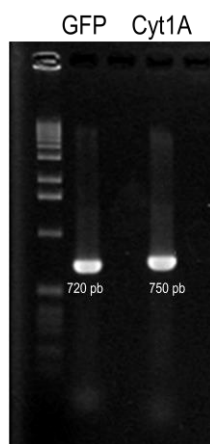


Figura 6. Amplificación de los genes que codifican la toxina Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis* y la GFP, con los sitios de restricción añadidos (ver texto).

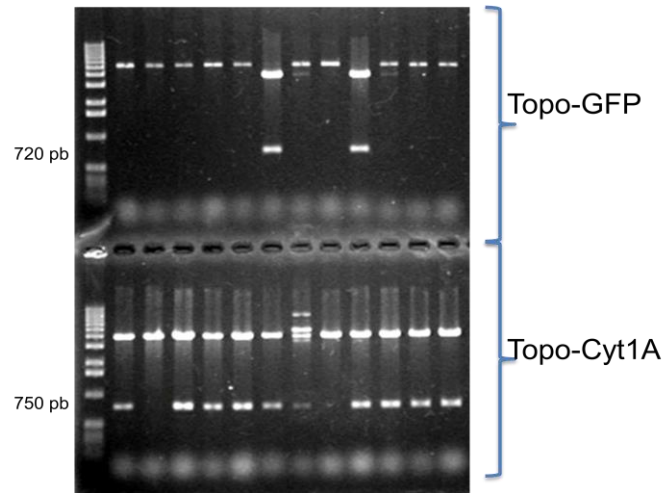


Figura 7. Corroboración de los insertos clonados con los genes que codifican a la toxina Cyt1Aa y la GFP, una vez clonados en el vector TOPO, por digestión con EcoRI.

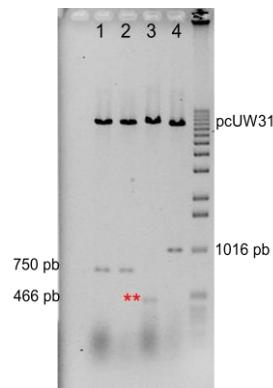


Figura 8. Corroboración de la inserción del gen que codifica la toxina Cyt1Aa en el vector pAcUW31 por medio de digestión con EcoRI (carriles 1 y 2), y de la dirección adecuada del inserto por digestión con BamHI (carriles 3 y 4). La clona 1 (carriles 1 y 3) mostró el tamaño esperado.

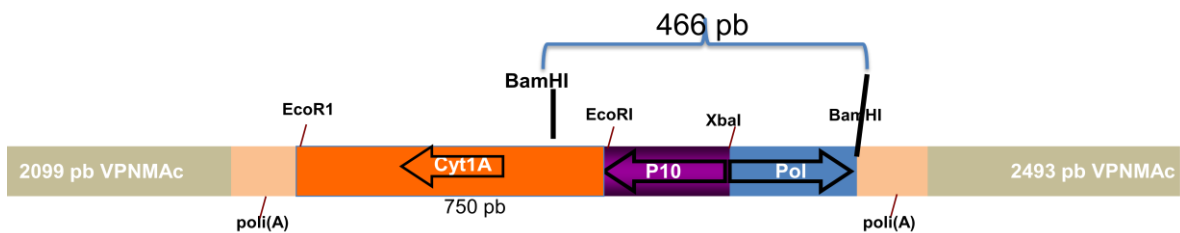


Figura 9. Mapa de la construcción pAcUW31-Cyt1.

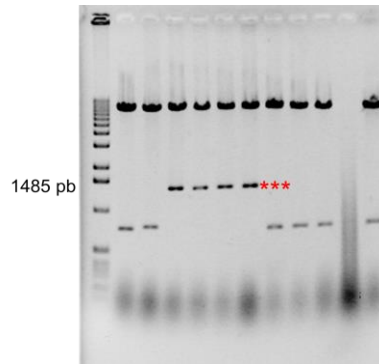


Figura 10. Corroboración del inserto esperado Cyt-GFP en la construcción pAcUW31-Cyt1-GFP, por medio de su digestión con EcoRI. Cuatro clonas mostraron el inserto esperado (*).

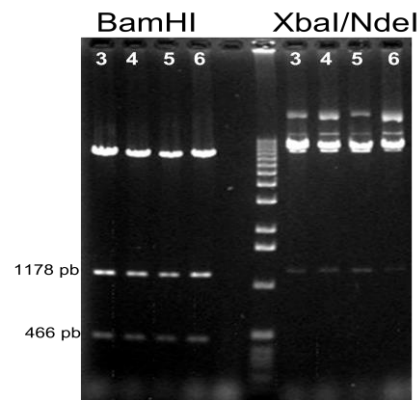


Figura 11. Corroboración de la dirección adecuada del inserto Cyt-GFP en la construcción pAcUW31-Cyt1-GFP, por medio de su digestión simple con BamHI y doble con XbaI y NdeI. Las cuatro clonas probadas mostraron los tamaños de los insertos esperados.

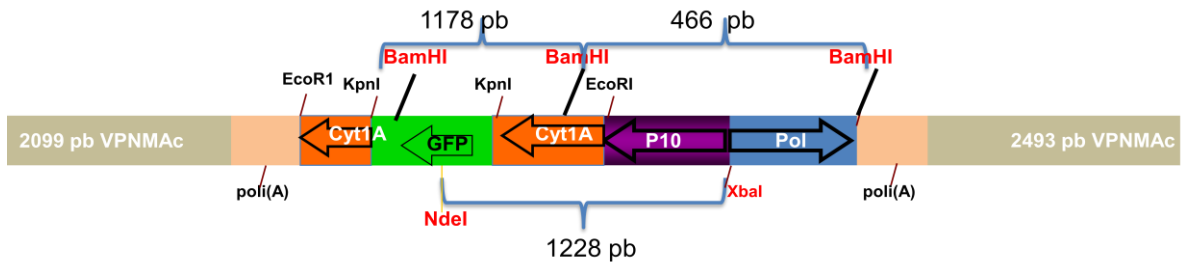


Figura 12. Mapa de la construcción pAcUW31-Cyt1-GFP.

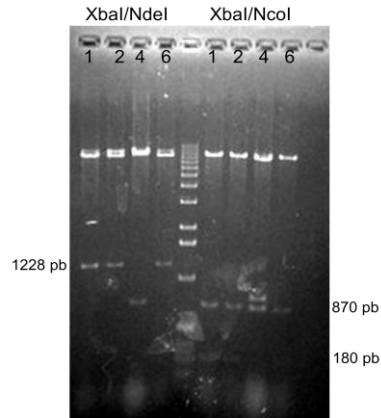


Figura 13. Corroboración del tamaño y la dirección esperados del inserto Cyt-GFP al clonarlo en la construcción pAcUW31-Cn10, por medio de las digestiones dobles con XbaI/NdeI y XbaI/NcoI. Las clonas 1, 2 y 6 mostraron las bandas esperadas para el tamaño y dirección adecuados del inserto. La construcción nueva fue la pAcUW31-Cn10-Cyt1-GFP.

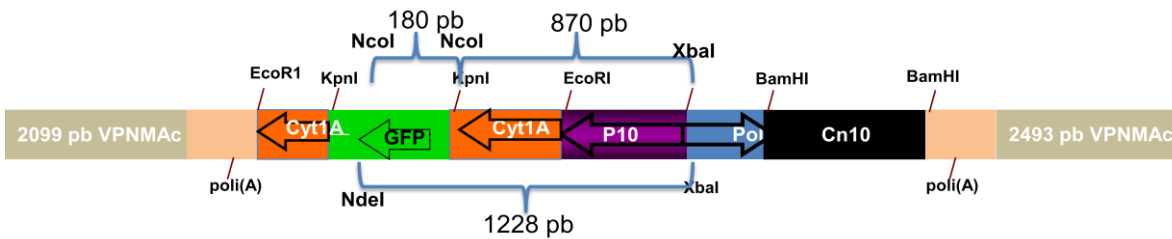


Figura 14. Mapa de la construcción pAcUW31-Cn10-Cyt1-GFP.

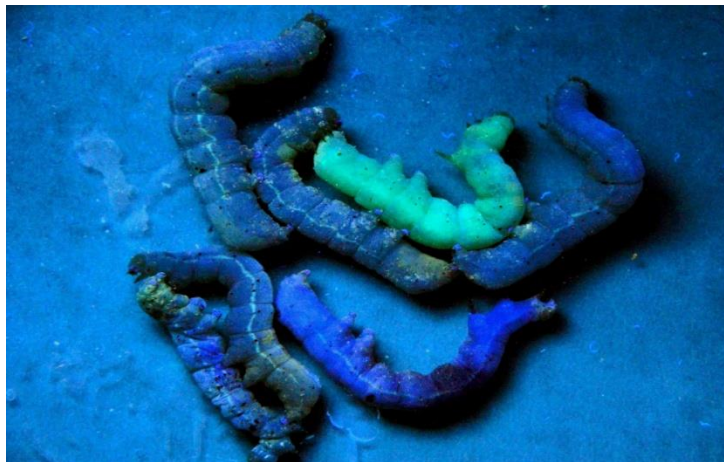


Figura 15. Larvas de *T. ni* bombardeadas con las construcciones mencionadas en el texto. Una de ellas muestra una alta fluorescencia producto de la elevada expresión de la GFP.

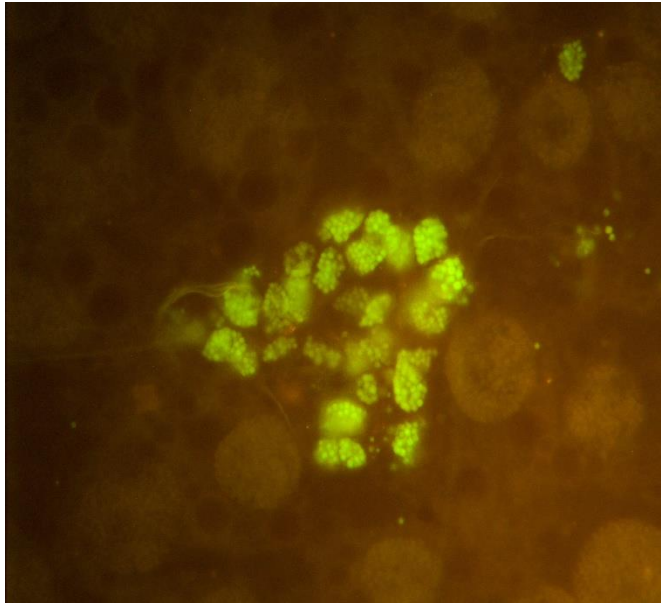


Figura 16. Núcleos agrandados y llenos de poliedros de AcNPV recombinantes que expresan la GFP, a partir de la recombinación con la construcción pAcUW31-Cn10-GFP.

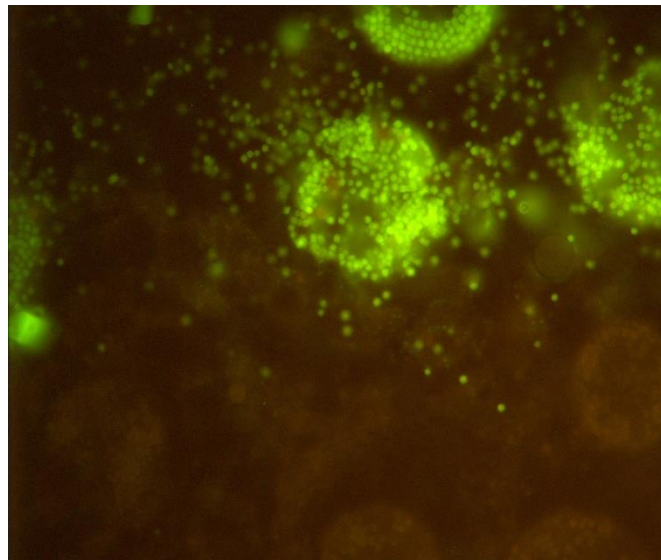


Figura 17. Núcleos agrandados y llenos de poliedros de AcNPV recombinantes que expresan la GFP, a partir de la recombinación con la construcción pAcUW31-Cyt1-GFP.

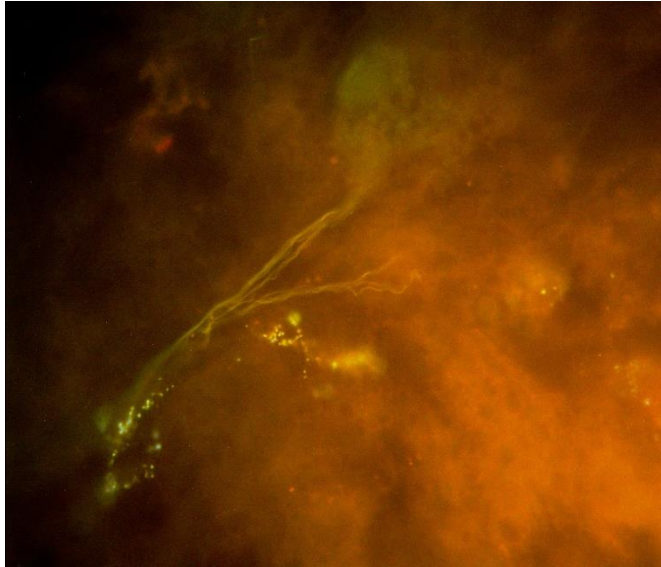


Figura 18. Células asociadas a las tráqueas que muestran fluorescencia verde. Debido a su tamaño, los gránulos no se pueden observar, pero esto indica la presencia de gránulos de TnGV recombinantes que expresan la GFP, a partir de la recombinación con la construcción pAcUW31-Cn10-GFP.

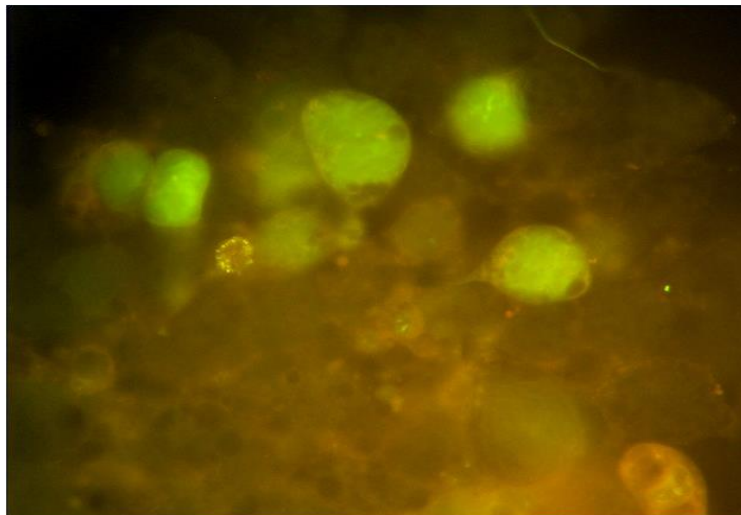


Figura 19. Adipocitos que muestran fluorescencia verde. Debido a su tamaño, los gránulos no se pueden observar, pero esto indica la presencia de gránulos de TnGV recombinantes que expresan la GFP, a partir de la recombinación con la construcción pAcUW31-Cyt1-GFP.

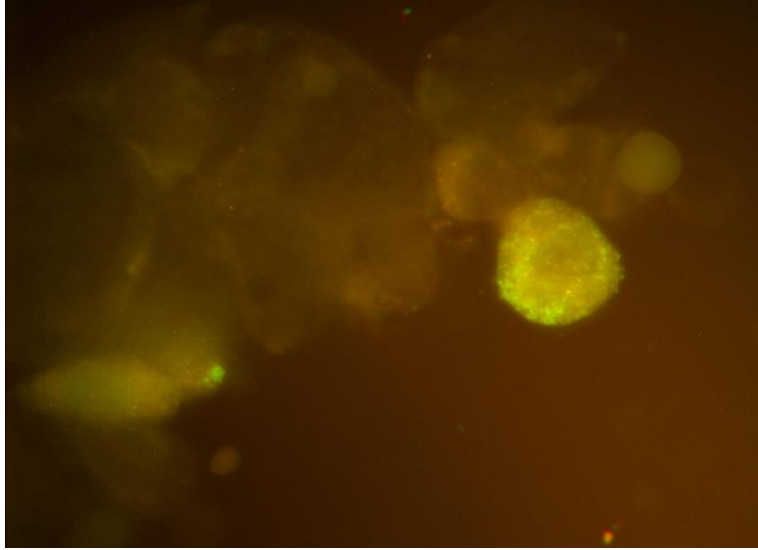
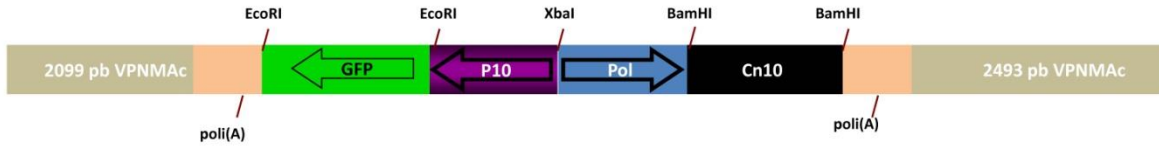
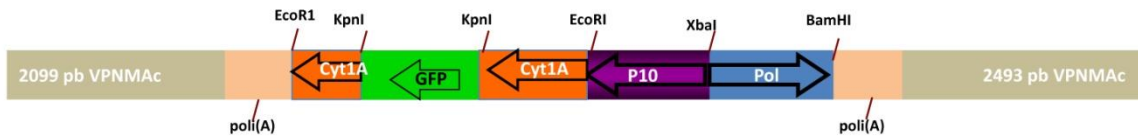


Figura 20. Adipocitos que muestran fluorescencia verde. Debido a su tamaño, los gránulos no se pueden observar claramente, pero esto indica la presencia de gránulos de TnGV recombinantes que expresan la GFP, a partir de la recombinación con la construcción pAcUW31-Cn10-Cyt1-GFP.

1.- Cn10-GFP



2.- Cyt1A-GFP



3.-Cn10-Cyt1A-GFP

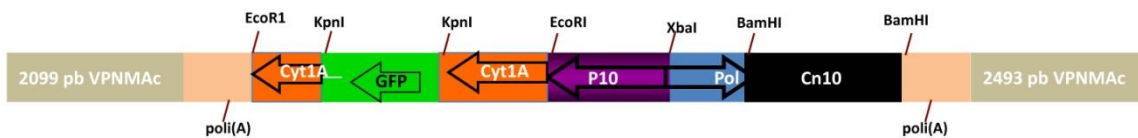


Figura 21. Construcciones genéticas en el vector de pacUW31 con los genes *cn10* y *cyt1A*, clonados individualmente y en combinación. El tamaño mostrado en las gráficas no es proporcional.

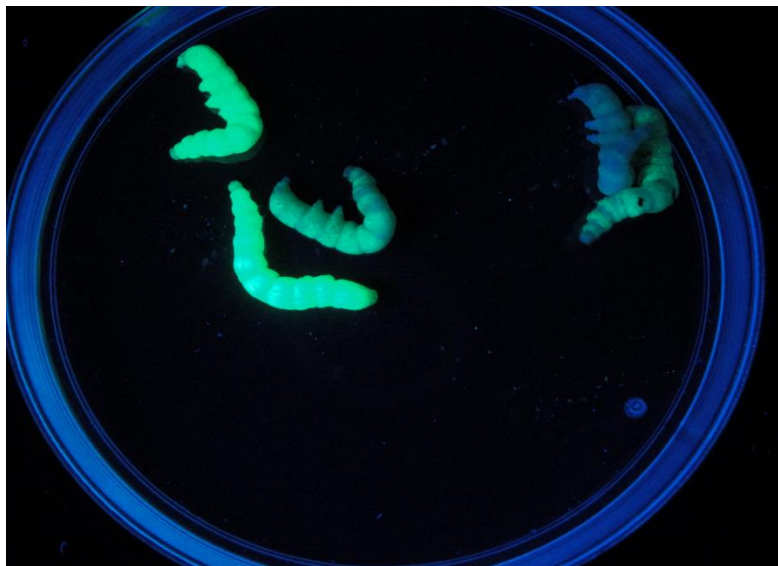


Figura 22. Larvas de *T. ni* bombardeadas con la construcción AcNPV -pacn10-cyt1A-GFP mostrando una alta fluorescencia con luz UV, producto de la expresión de la proteína GFP del virus recombinante.

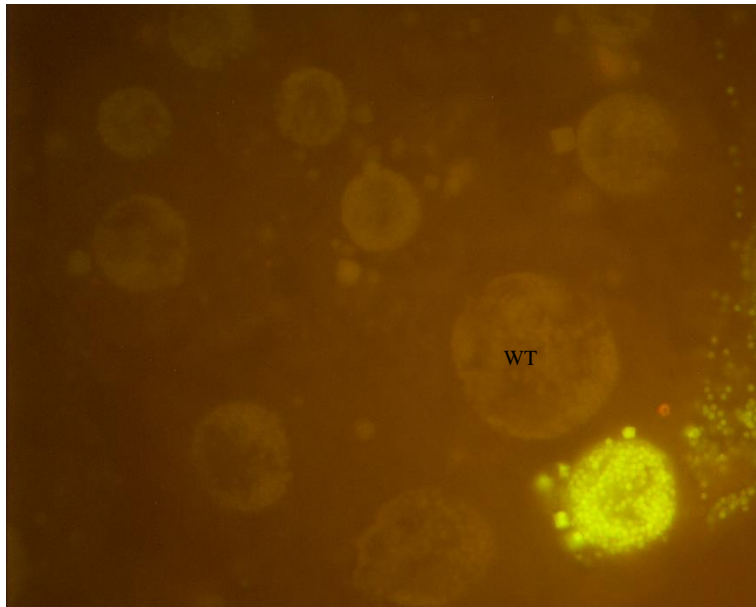


Figura 23. Detección de núcleos infectados con el virus recombinante AcNPV-paccn10-cyt1A-GFP por microscopía de fluorescencia en tejido graso de larvas bombardeadas de *T. ni*. Se puede observar el contraste del núcleo infectado con el virus recombinante (fluorescente) con aquellos infectados con virus silvestres (WT).

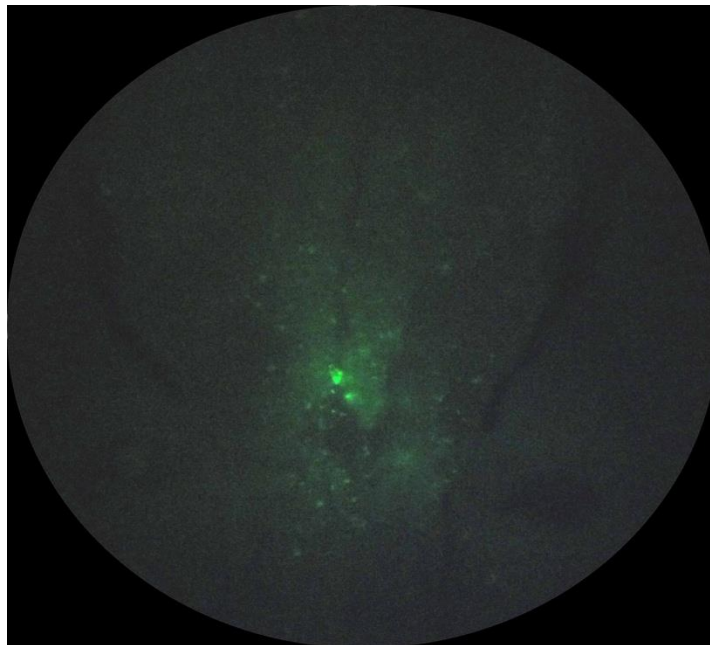


Figura 24. Detección de puntos específicos de infección con virus recombinantes en tejido graso de larvas de *T. ni* bombardeadas, mediante disecciones en microscopio estereoscópico de fluorescencia. Estos puntos específicos de infección fueron utilizados para infectar nuevas larvas y proseguir el proceso de purificación de los virus recombinantes.

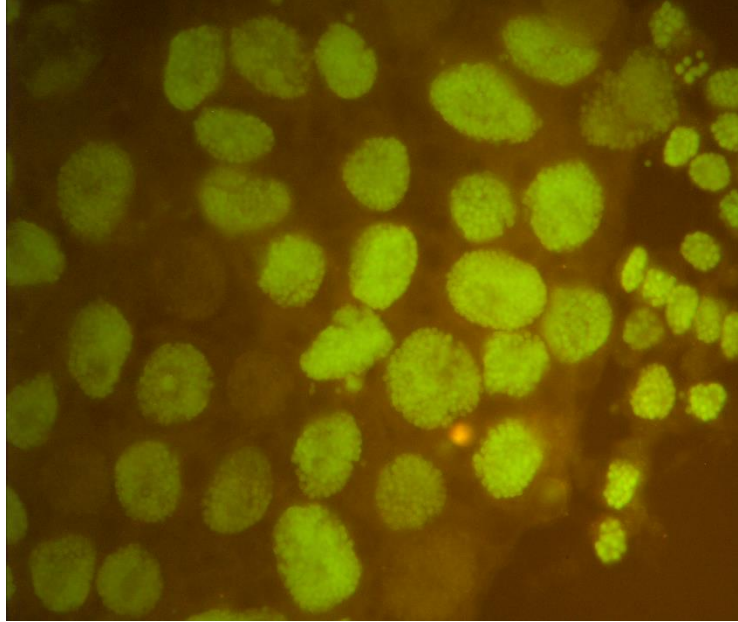


Figura 25. Núcleos celulares de tejido adiposo infectados mayoritariamente con AcNPV recombinante (GFP fluorescente) detectados con microscopía de fluorescencia. Esta larva de *T. ni* se utilizó en el proceso de purificación del virus recombinante.

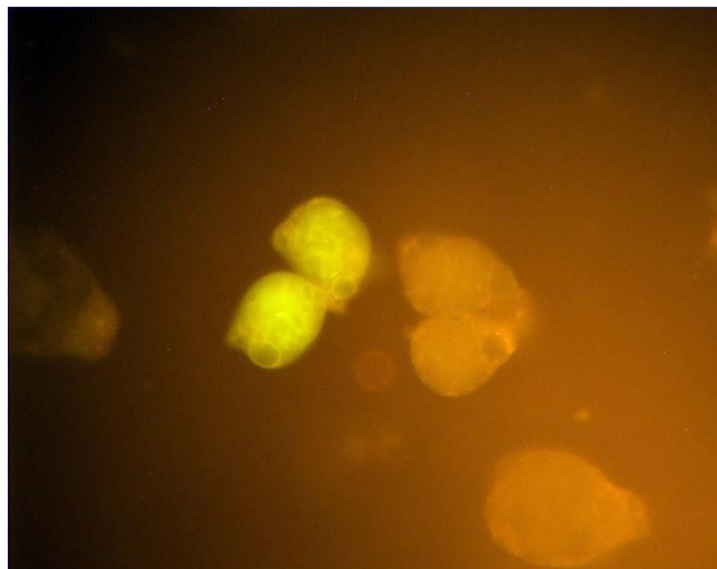


Figura 26. Células adiposas individuales tomadas con microscopía de fluorescencia a partir de larvas de *T. ni* bombardeadas con la construcción TnGV-cyt1A-GFP. Esta fluorescencia podría indicar la infección con el TnGV recombinante. Comparar con las células aledañas.

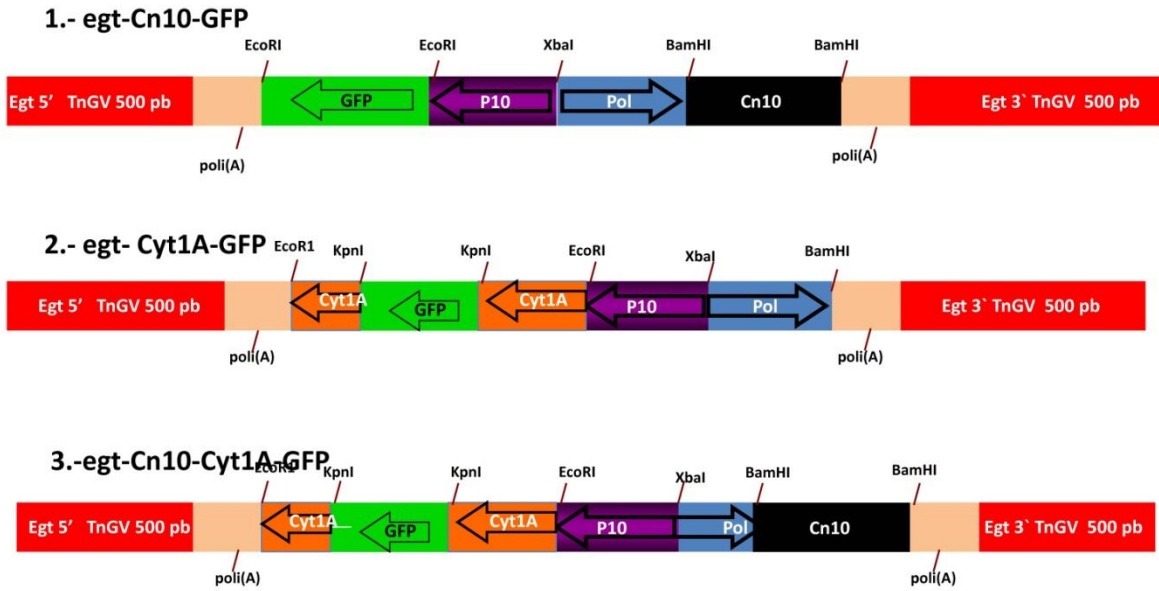


Figura 27. Construcciones genéticas en el vector diseñado con las secuencias flanqueantes del den *egt* de TnGV con los genes *cn10* y *cyt1A*, clonados individualmente y en combinación. El tamaño mostrado en las gráficas no es proporcional.



Fig. 28. Imagen de cajas Petri de 6 cm con dieta artificial utilizadas para realizar los bioensayos con 20 larvas de *T. ni* de primer instar. A las que se les dispersó 200 μ l de suspensión de COs de las 6 concentraciones

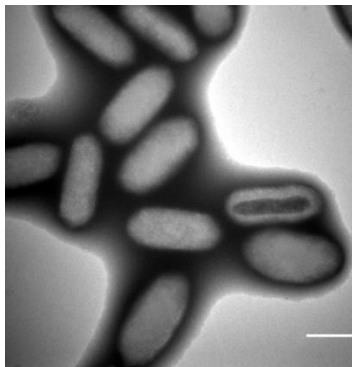


Fig. 29. Imagen de Microscopia electrónica de transmisión del granulovirus de *Trichoplusia ni*. Cuerpos de oclusión de 0.5 x 0.2 μ m. Barra 0.2 μ m.

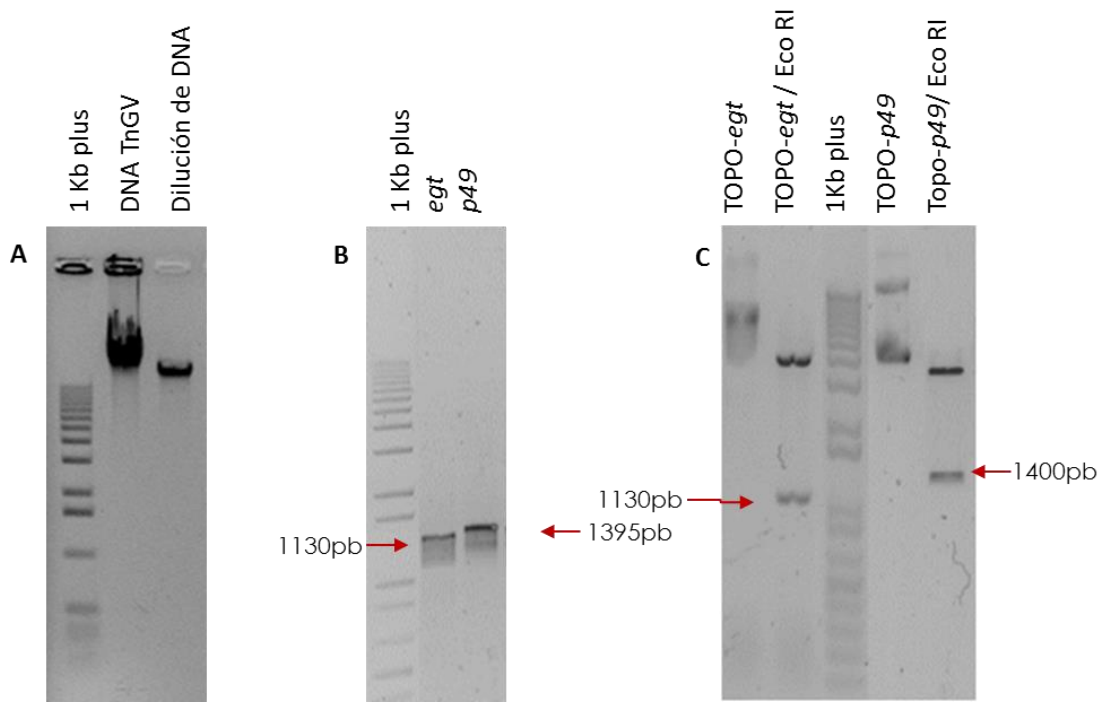


Fig. 30. Geles de agarosa al 1% que muestran fragmentos amplificados por PCR y clonados en pCR4-TOPO. A) DNA molde de TnGV, B) Frangmentos amplificados por PCR y C) Fragmentos clonados.

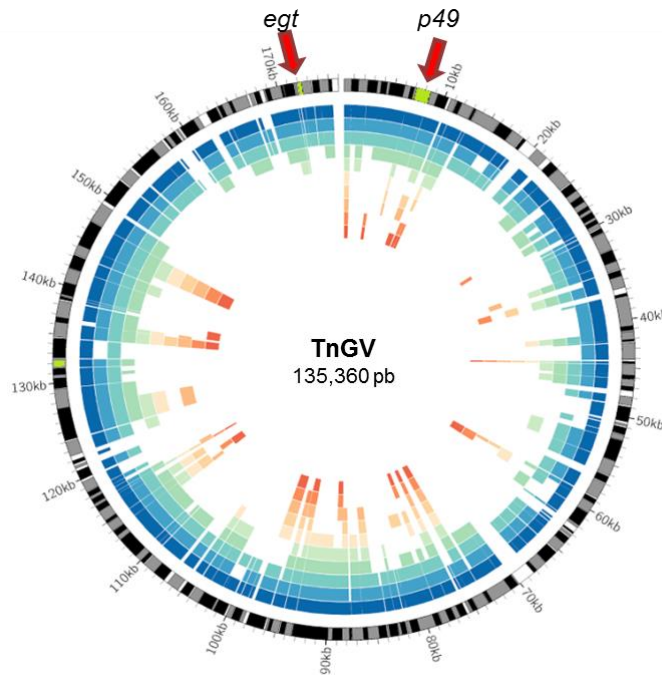


Fig. 31. Mapa circular del granulovirus de *Trichoplusia ni* en donde se muestra la posición de los genes *egt* y *p49* amplificados.

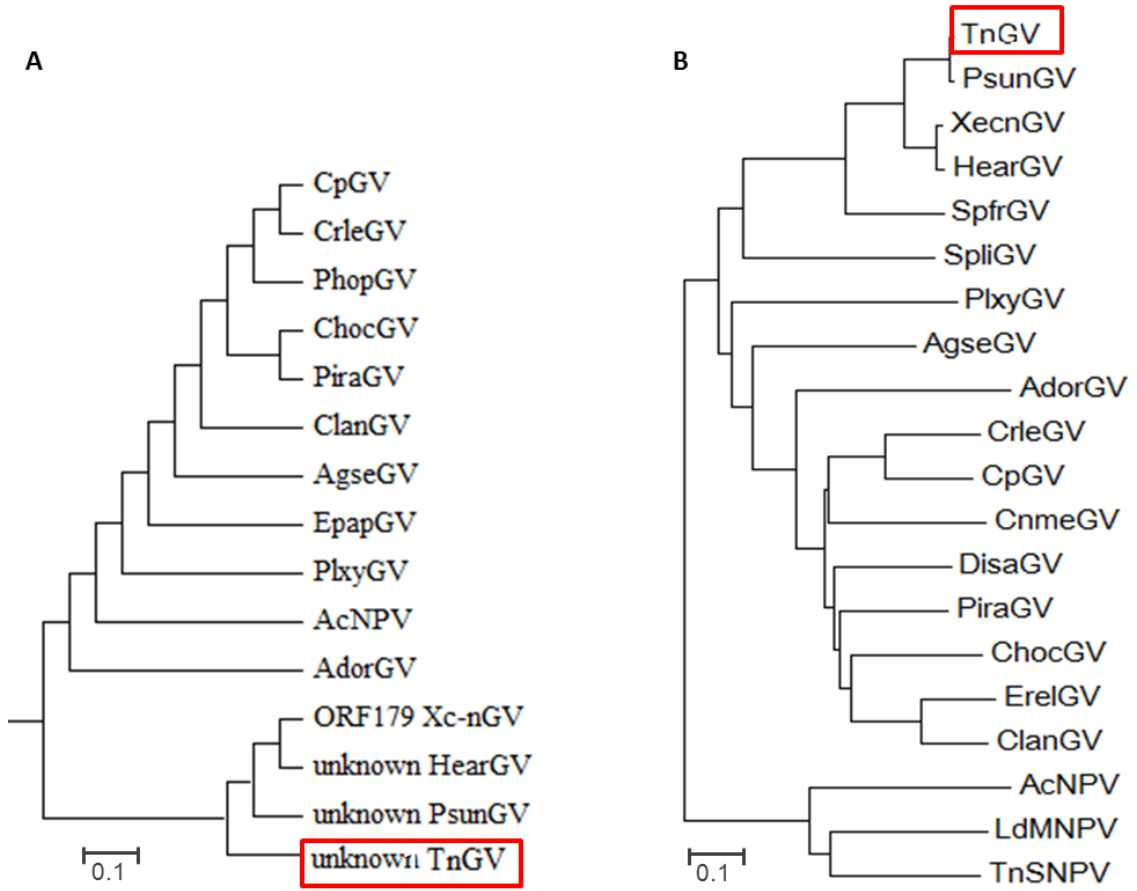


Fig. 32. Cladogramas de la comparación de los genes *egt* y *p49* en *Betabaculovirus*, usando los fragmentos amplificados a partir del DNA de TnGV (Caja roja) .

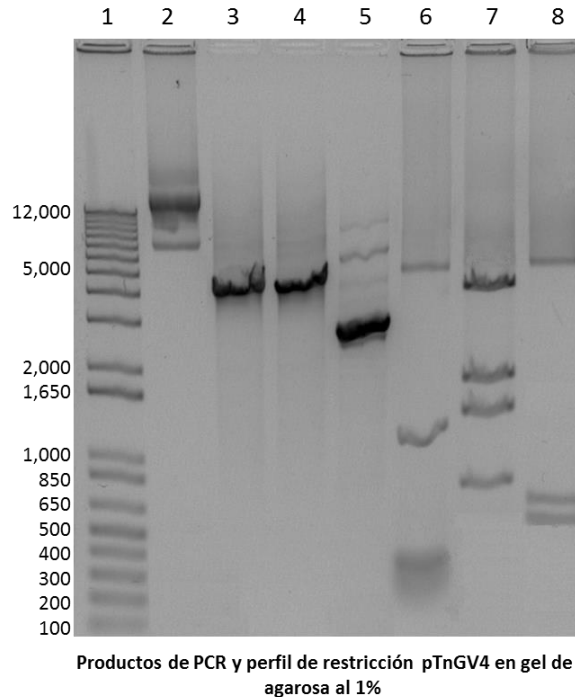
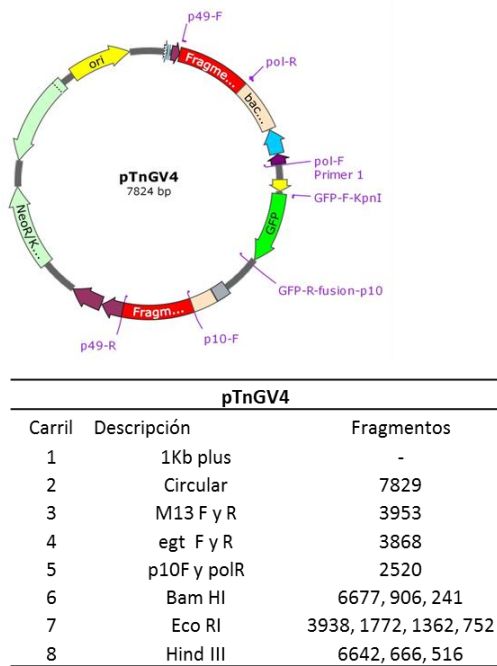


Fig. 33. Mapa circular y perfil de amplificación y restricción del plásmido de recombinación homóloga pTnGV4 para granulovirus. Cassete rojo interrumpido por *pac-cn10-GFP*. Carriles del 2 al 5 fragmento amplificados por PCR, carriles 6,7 y 8 digestión con endonucleasas.

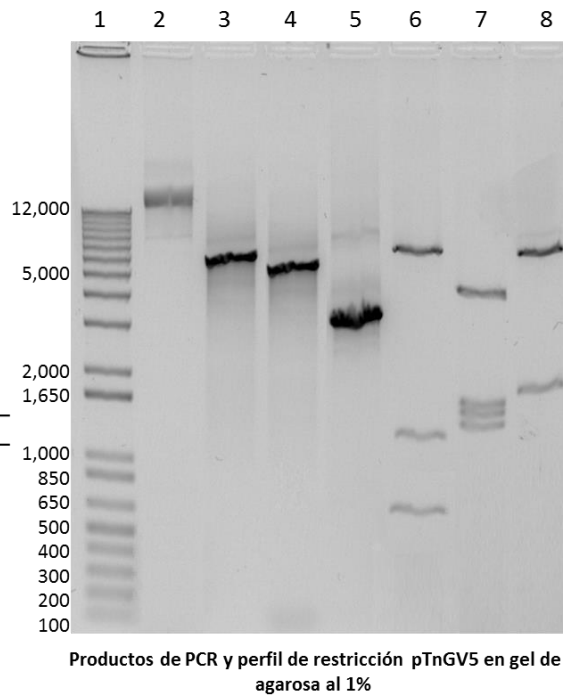
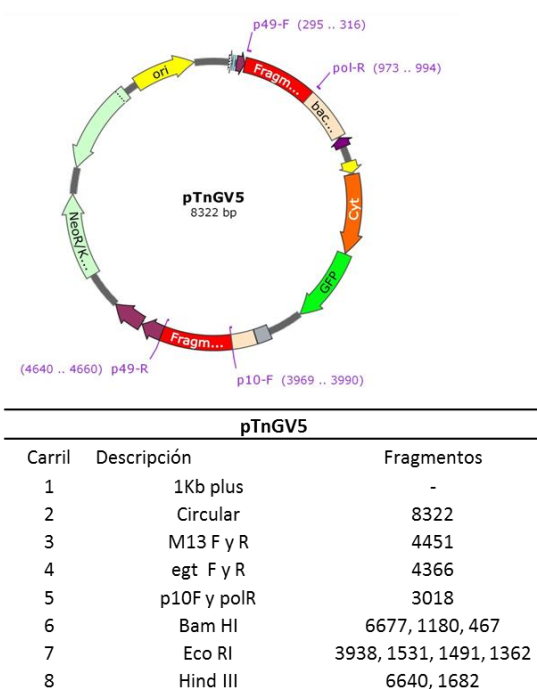


Fig. 34. Mapa circular y perfil de amplificación y restricción del plásmido de recombinación homóloga pTnGV5 para granulovirus. Cassete rojo interrumpido por *pac-cyt-GFP*. Carriles del 2 al 5 fragmento amplificados por PCR, carriles 6,7 y 8 digestión con endonucleasas.

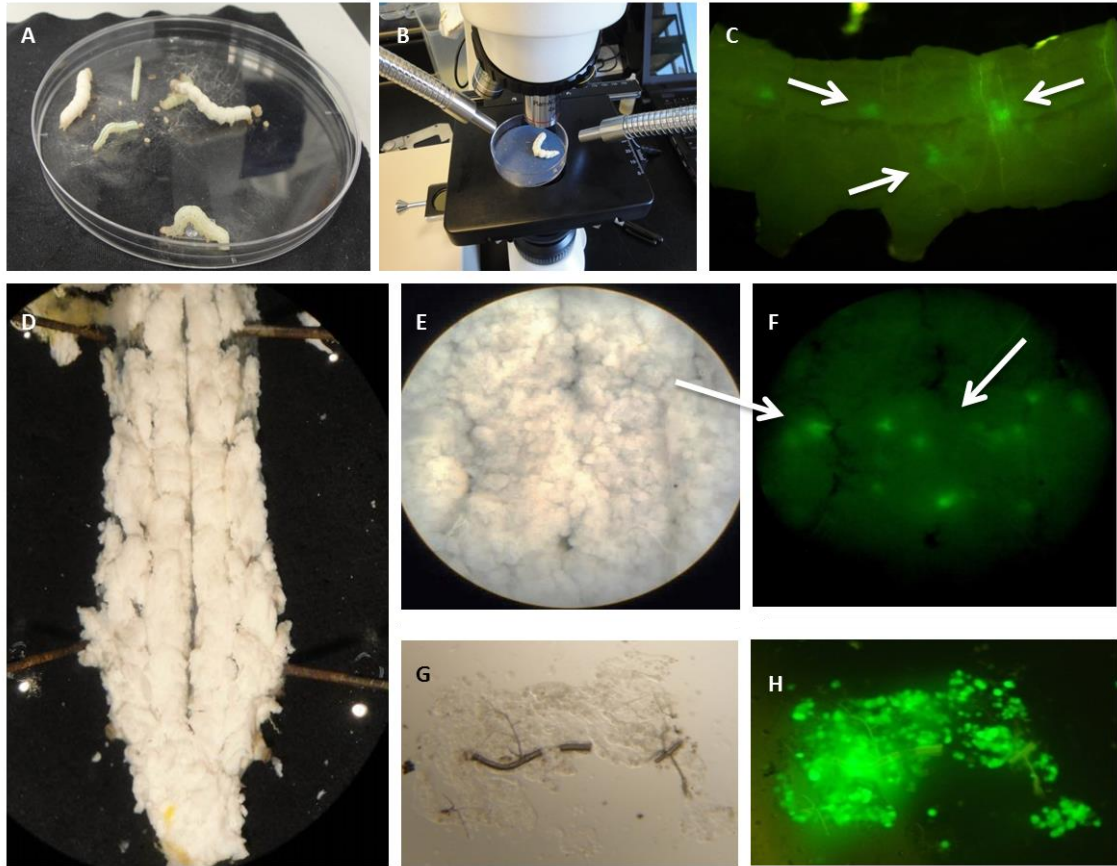


Fig. 35. Imágenes de microdissección de larvas. A) Larvas de *T. ni* con tejido adiposo blanquecino por infección con granulovirus. B y C) Microscopio con epifluorescencia de 480 nm para detectar tejido adiposo fluorescente en larvas *in vivo*. D) Larva disectada con exposición completa del tejido adiposo. E y F) Tejido adiposo con luz visible y a 480 nm para detecta tejido adiposo con expresión de granulovirus recombinantes. G y F) Fragmentos recuperados por microdissección de tejido con granulovirus recombinantes.

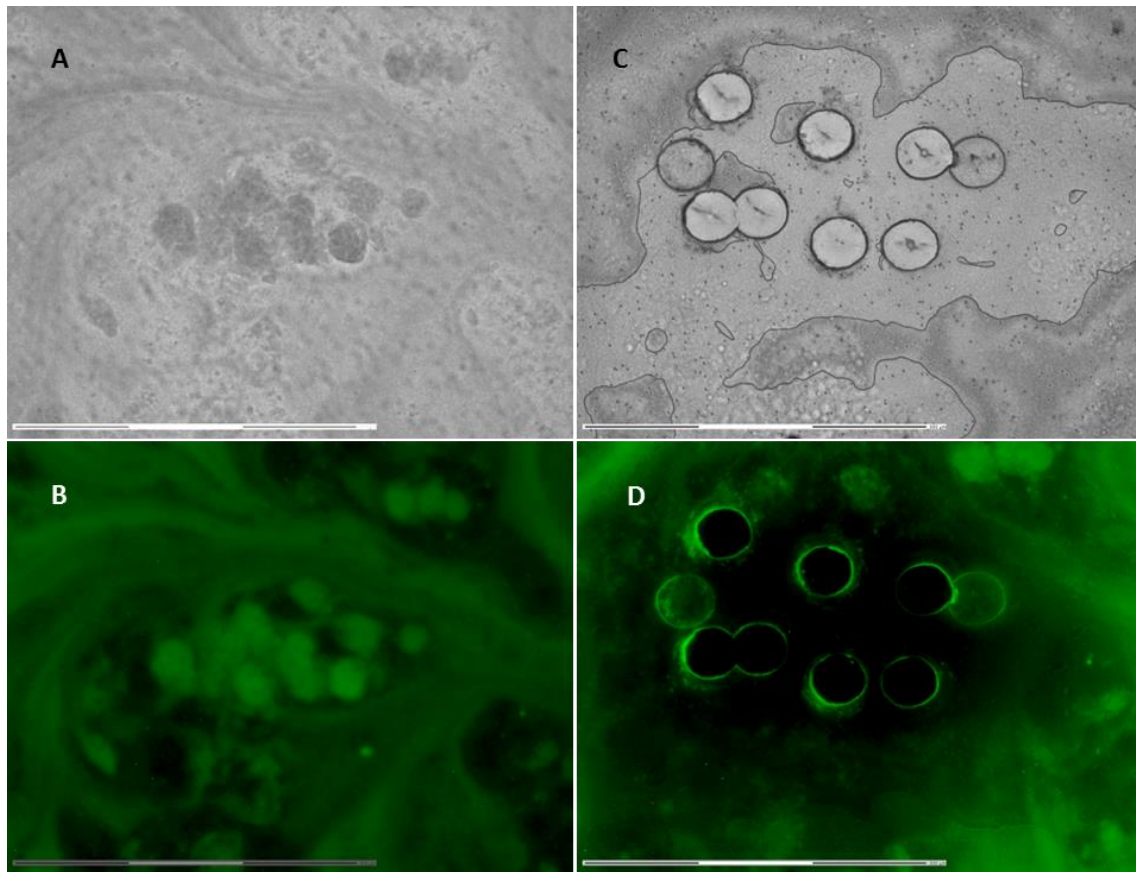


Fig. 36. Imágenes de adipocitos fluorescentes observados en el sistema PALM antes y después de la disección y catapultados por láser.

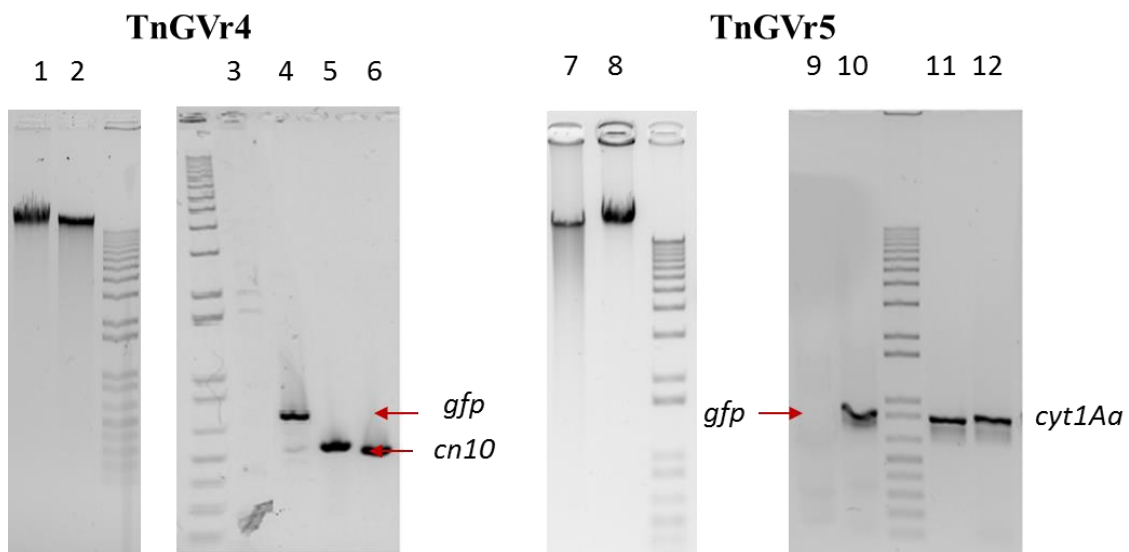


Fig. 37. Amplificación por PCR de los genes heterólogos *gfp*, *cn10* y *cyt1Aa* presentes en los granulovirus recombinantes TnGVr4 y TnGVr5.

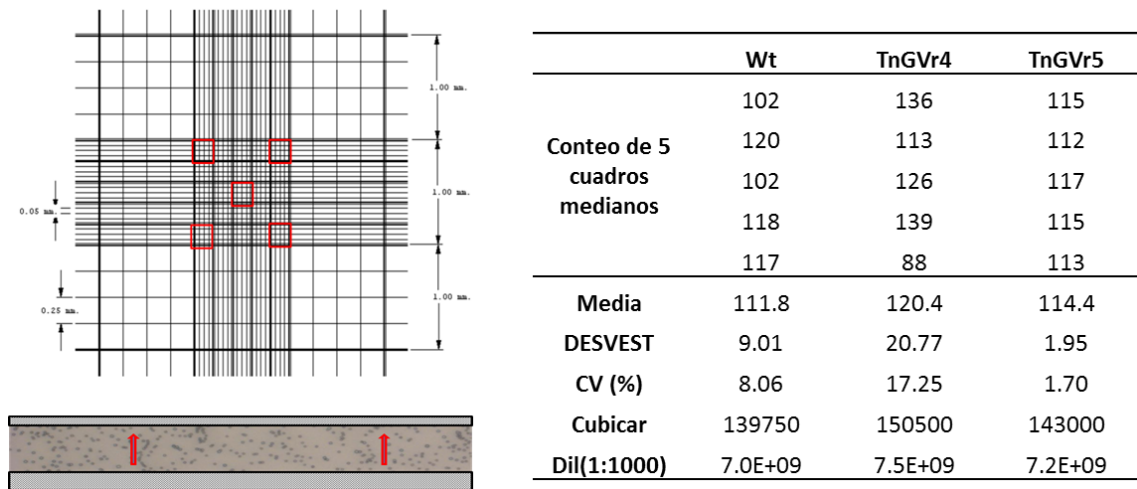


Fig. 38. Conteo de gránulos de cinco cuadros medianos de la cámara *Petrof Hausser* comenzando desde el fondo para calcular el número de COs/ ml.

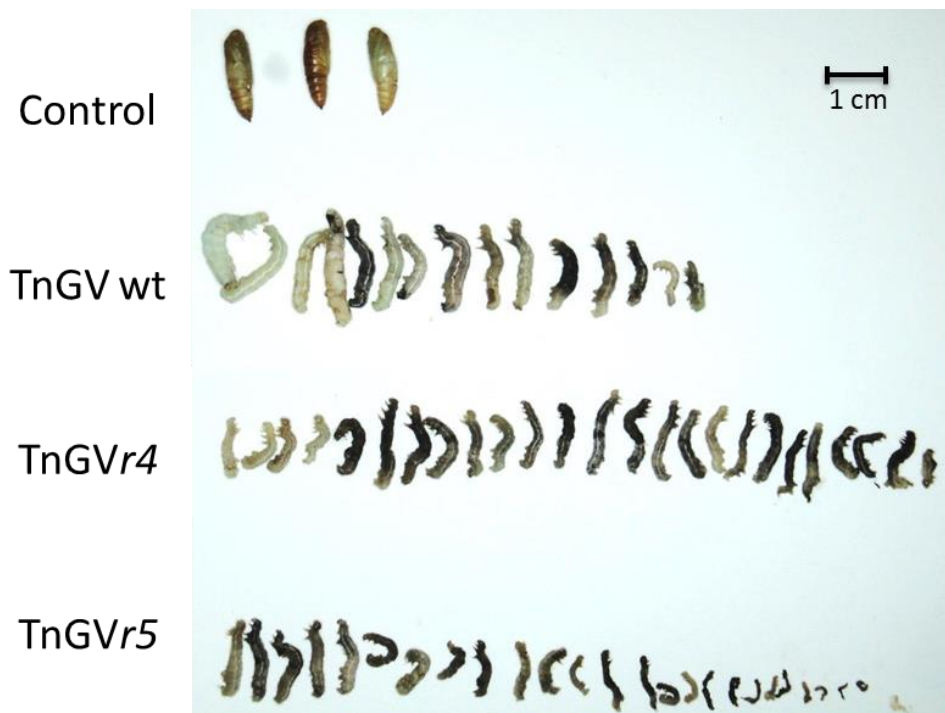


Fig. 39. Imagen representativa del efecto que causa la infección por granulovirus silvestres y recombinantes en el primer bioensayo

ANEXO I

Secuencia obtenida a partir del amplicón de 1,130 pb que resultó del PCR con los iniciadores Egt TnGV (directo) y Egt TnGV (reverso 2).

AGTCACCAATCAGTGTTTGC GGACTGTAAAATTCACCACAGTGGTTTAGGCAA
ACATACTTTAACGAAGACTCAAAACGCAACACCACAAAAGCGTCATTTTTGTC
AGAATCATTTTGATCGTAGTCTTTTAATTCGTATTTTAGTAAATTTGTTCCCTGAC
GAACTTACGCTGGTGCTGTGTGCCACATGTAATCCTAGCTTGT CATCAAAACCA
GACTGAAGATAGTGGTAAAAATGATTAATAACTTTATAAATTTTTACCAAACCA
TTTGTATTTTTCGGTGGACTTGGTACCGTGTCTGTTATGTTTTTAATATTGGCA
AATTTTCTATTGGTTCCGTTGGTGGTGGTGGTGGTAGAGTTGTTGTTGTTGTTGT
TGTTGTAGTTGTTTTCGTTAGTGGCGGAGGAGTTGGTGGTGGTTCTAACGCAAT
CGTGCACCACGCAAAAAACATTA AAAATTATTGCAGTTAGCTTTACCATGGTTGT
GTTTACTCGTTTGATTGTT CAGTACGTCAAACACAATTTAAATTTTTATACTGCT
TCTGTAACCCACGTAAGAATAATACGCAATCAATCCCAAAAATAAAAACACTAC
ACGTCACCAACAAAGCGTAGTTAAAATTGTACAAACTGT CGAATTGCAACGT
TCCGTTTGTTCCCTGTT CATCTACGTACAGCGGGATTTCCGATGGTTTACCTTTTT
TATACAAAACATAATCTTTAATTTTTGTGACAAATGGTTTAGAGAATACCAGTG
TGGGTTTTGTTTGAGAAGGTATCTCAAATTTTAATGACTTTTTTGGTTTATCTTC
ACCAAGGTTGTTGTTGTAGGGAATAGTTGTTTCGTTGTACACCGACATTGCGAG
TGAATGTGTGCGCACCACCACACCTTTTATATGTGCTCTTTATCTTGGATTCACA
AAATCACGTCAAAAAAAACAAATTTACATACGTTTTAATCAATTTTATTTTCTA
TTCGTTCATAACGCTGTACTTTAGACTGAAGTATATTCCTATTTACTAAAAAATCT
TCGTTTACATTATAGACCACCGCCAGCATTGCAAACACAACCACCAGCACCATT
ATAATAATCTTCCAGTTGATGCGGCCGAAAAACAGATTGGTGACT

ANEXO II

Secuencia de nucleótidos del gen putativo *egt*

AGTCACCAATCTGTTTTTTCGGCCGCATCAACTGGAAGATTATTATAATGGTGCT
TGGTGGTTGTGTTTGCATGCTGGCGGTGGTCTATAATGTAAACGAAGATTTTT
TAGTAAATAGGAATATACTTCAGTCTAAAGTACAGCGTATGAACGAATAGAAA
ATAAAATTGATTAACGTATGTAAATTTGTTTTTTTTGACGTGATTTTGTGAAT
CCAAGATAAAGAGCACATATAAAAGGTGTGGTGGTGCGCACACATTCACTCGC
AATGTTCGGTGTACAACGAAACAACCTATTCCCTACAACAACAACCTTGGTGAAG
ATAAACCAAAAAAGTCATTAATAATTTGAGATACCTTCTCAAACAAAACCCACA
CTGGTATTCTCTAAACCATTTGTCACAAAAATTAAGATTATGTTTTGTATAAA
AAAGGTAAACCATCGGAAATCCCGCTGTACGTAGATGAACAGGAACAAACGG
AACGTTGCAATTCGACAGTTTGTACAATTTTAACTACGCTTTGTTGGTGACGT
GTAGTGTTTTATTTTTGGGATTGATTGCGTATTATTCTTACGTGGGTTACAGAAG
CAGTATAAAAATTTAAATTGTGTTTGACGTACTGAACAATCAAACGAGTAAAC
ACAACCATGGTAAAGCTAACTGCAATAATTTAATGTTTTTTGCGTGGTGCACG
ATTGCGTTAGAACCACCACCAACTCCTCCGCCACTAACGAAAACAACACTACAAC
ACAACAACAACAACAACACTCTACCACCACCACCACCAACGGAACCAATAGAA
AATTTGCCAATATTAACAAAACATAACAGACACGGTACCAAGTCCACCGAAAAA
TACAAATGGTTTGGTAAAAATTTATAAAGTTATTAATCATTTTTTACCACTATCTT
CAGTCTGGTTTTGATGACAAGCTAGGATTACATGTGGCACACAGCACCAGCGT
AAGTTCGTCAGGAACAAATTTACTAAAATACGAATTAAGACTACGATCAAA
ATGATTCTGACAAAAATGACGCTTTTGTGGTGTTCGTTTTGAGTCTTCGTAA
AGTATGTTTGCCTAAACCACTGTGGTGAATTTTACAGTCCGCAAACACTGATTG
GTGACT

ANEXO III

Secuencia de nucleótidos del gen putativo *p49*

ATGGTTCTAGACGAGGACAGCTTAAAGTTTGTATTTATTGCCACATATTTTGAC
CCAAGTACGGATGTGCTTAACAATTTACCTGACAACGTTAAAGAACATTTAGCC
TCGCCACAGACCAGGACCTATTGCGTTACATGGAATACCTGAGCGGTATGGG
TATACATGGCTTGATTGGAGACACCAATTCAGTGAACCTATTCAAATATGTTAA
ACCTCAATTTTCATTTTGAGTGTGTGCGCGACCAAGATTTAGACATTGTCAGACA
CGATAACGAGGTGTATCTACGCAGACACACGTCTATTTATGCCACTAATTTATT
TGTGCGCGACCCAAACAAGCAAAAGTGGCTCTTGAAAATCATGGTGGACGTGA
TGAGAAACCAGCAGCGAGCGCTAGTAGTTGGCAATAATTATATGGTGTACGAC
GGATGTGTGGGCTACGTATTTGCCGGACCCTACCTAGATTGGTGTGGCGTTAGA
GTCTGCGCCTCAGACGCAGAAGGTACAAACACTACCATGTTGAGATTATATTTG
ATTGGACACGAACTTTTGAAAGTATTCACCGACCGAAACATAGAGCCCCCTCC
GGATGGCCAATTAATAAATTACCATAAAGGAACACCACTCATACCAACCATA
ATTACGTTATCACAACAAAGGATCTGCACACTAACAACATGAACAAAGTGTTTC
GAGTTTATACAACAAGAATTAACGGCAAAAATGAGTTGGTCAAGTATATTCA
GAGAGATTACATTTTTGACGCCGAACATTTTCCTTTGGATCTTCTAAACGAGCT
GCAGGATCACTATGTTTCCACCACGGCACTTTACAAAATTATCCATCGTTTTCA
TAGAGCGGAACCTGGCGAAAGAGCACACGACGTGGTTGTCGATAGATATGCAG
CGGACCGGTATCGTAAGTGTTTGGTGTTCGCCAGCGAGAACAACGTGTATCCA
GCGTTAGCGCATGCGCTATACATATTCATTCCAGACGATTACTACCAAATAAGA
CATACACTTAACGCGGCCTATGCGCCTAGGTTTGGTATGGTTGTACTCGCTACT
CATGTGTTTTTCGGTGCCACCAAAGTCATTAATTTTGACCCACAAAAGACCTC
GAATCGTTTGTCAAGACCAAATATGAGGTGGGATCACACGTGTACTACAGAAT
AGGGGGTAATTATTATTTAGAAGAGTCGCAGATGGACGAAAACGGTGTGCCGG
TATACTTTGTGGTGCGTCTCGACAAAATTTATTAGTAAGAGATAATTTAAGTT
CTCACACATTAGAGGATTTGAACAATAACTGGGTGAAAATACTATTGCAAAT
TTATTCGTACACCCTCTATAAAAATGGACACATTTTCGAGGACCTGACGGTAGC
GTA

ANEXO IV

Secuencia de aminoácidos de la proteína P49

MVLDEDSLKVFVFIATYFDPSTDVLNNLPDNLVKEHLASPTDQDLLRYMEYLSGMGI
HGLIGDTNSVNLFKYVKPQHFECVRDQDLDIRHDNEVYLRRHTSIYATNLFVRD
PNKQKWLLKIMVDVMRNQQRALVVGNNYMVYDGCVGYVFAGPYLDWCGVRV
CASDAEGTNTTMLRLYLIGHELLKVFTDRNIEPPPDGQLKNYHKGTPLITNHNYVIT
TKDLHTNNMKNVFEFIQQELNGKNELVKYIQRDYIFDAEHFPLDLLNELQDHYVST
TALYKIIHRFHRAEPGERAHDVVVDRYAADRYRKCLVFASENNVYPALAHALYIFI
PDDYYQIRHTLNAAYAPRFGMVVLATHVFFGATKVINFDPTKDLESFVKTKYEVG
SHVYYRIGGNYYLEESQMDENGVPVYFVVRLDKNLLVRDNLSSHTLEDLNNNWV
KNTIANLHVHPL