

Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus

DELIA MUÑOZ, ANA MABEL MARTÍNEZ, ROSA MURILLO, ÍÑIGO RUIZ DE ESCUDERO, LLÜISA VILAPLANA

1. Técnicas de identificación	481
1.1. Recogida de larvas en campo	482
1.2. Sintomatología	482
1.3. Microscopía	483
2. Multiplicación de virus	485
2.1. <i>In vivo</i>	485
2.1.1. Cría artificial de poblaciones de insecto	486
2.1.2. Dieta artificial	488
2.2. <i>In vitro</i>	488
3. Técnicas de purificación	490
3.1. Purificación de OBs	490
3.1.1. A partir de cadáveres de insectos	491
3.1.2. A partir de cultivos celulares	492
3.2. Purificación de viriones	492
3.2.1. Viriones derivados de los cuerpos de inclusión	492
3.2.2. Viriones brotantes	493
3.3. Purificación de ADN viral	493
4. Titulación	496
4.1. Titulación de cuerpos de inclusión	496
4.2. Titulación de viriones brotantes	498
5. Separación de variantes genotípicas	499
5.1. <i>In vitro</i>	500

5.1.1. Por purificación en placa	500
5.1.2. Por dilución limitante de viriones brotantes	501
5.2. <i>In vivo</i>	502
5.2.1. Por dilución limitante de cuerpos de inclusión	502
5.2.2. Por ingestión de viriones brotantes	504
6. Caracterización bioquímica	505
6.1. Análisis de proteínas estructurales	505
6.2. Análisis de ADN con endonucleasas de restricción	508
7. Caracterización biológica	509
7.1. Métodos de inoculación	509
7.1.1. Inoculación de Hughes y Wood	509
7.1.2. Inoculación en superficie	511
7.1.3. Inoculación por incorporación en dieta	513
7.1.4. Inoculación en sustrato vegetal	514
7.2. Determinación del espectro de huéspedes	515
7.3. Determinación de la productividad y peso de las larvas	515
8. Bibliografía	516

Este capítulo recoge, en forma de protocolos, las técnicas más empleadas en la caracterización bioquímica (Apartado 6) y biológica (Apartado 7) de los baculovirus, así como los pasos previos que preceden a estos análisis. En un primer punto se explica brevemente cómo se realiza la recolección del material viral en campo y se describen los síntomas característicos de los insectos infectados por un baculovirus y la forma de observarlos al microscopio óptico, los dos primeros indicios que nos señalan si estamos ante una infección por baculovirus. El segundo apartado trata los distintos métodos que existen para la multiplicación de los virus: *in vivo* utilizando insectos, que es la forma en la que se producen hoy en día los baculovirus que se emplean con fines bioinsecticidas, e *in vitro*, utilizando cultivos de células de insectos y que está en estos momentos en desarrollo para la producción masiva de virus, especialmente los recombinantes obtenidos mediante biotecnología. La purificación de cuerpos de inclusión (OBs), de viriones derivados de OBs (ODVs), de viriones brotantes (BVs) o de ADN genómico viral, en el tercer apartado, son pasos esenciales previos a la caracterización bioquímica o a la titulación de la muestra viral, entre otras cosas. En el cuarto apartado se detallan los distintos métodos que se siguen para titular una suspensión de OBs o de BVs, de especial importancia para llevar a cabo la separación de variantes genotípicas formando parte de un aislado y que se describe en el siguiente apartado, o para los bioensayos de actividad biológica. Las técnicas que se detallan para la caracterización bioquímica, en el apartado sexto, incluyen por un lado el análisis de proteínas estructurales, tanto de la matriz cristalina formada por poliedrina o granulina, como de las que forman parte de los viriones; y por otro, el del ADN genómico, digerido con endonucleasas de restricción. Por último, en el apartado de caracterización biológica, se describen los distintos métodos de inoculación de insectos que se utilizan para realizar los bioensayos de actividad biológica y se muestran los protocolos para determinar el espectro de huéspedes de un baculovirus, la cantidad de progenie viral que es capaz de generar en una especie huésped determinada y el peso que alcanzan las larvas infectadas con un baculovirus concreto. Los métodos para determinar la dosis y concentración letal media, así como el tiempo medio que tardan las larvas infectadas en morir ya se han descrito en el Capítulo 7 de este libro.

1. Técnicas de identificación

El material viral por caracterizar se puede obtener tanto de huéspedes recolectados en campo como de laboratorios comerciales y de investigación. Básicamente, la recolección de baculovirus silvestres se centra en la búsqueda de los hábitats naturales de los huéspedes de interés y se realiza de forma manual (LACEY Y BROOKS, 1997). Una vez el material recolectado en campo llega al laboratorio, todos los huéspedes vivos se someten a cuarentena y el posible material infectado debe ser aislado y conservado a -20 ó -40°C hasta su futuro análisis.

El laboratorio se está convirtiendo en otra fuente de material viral, dado que a partir de virus silvestres puede obtenerse una gran variedad de genotipos nuevos

por recombinación mediante trasfección de cultivos celulares (O'REILLY *et al.*, 1992) o *in vivo* (KOOIJMAN, 1997). Además, en el laboratorio también se pueden separar y clonar las variantes genotípicas que constituyen un aislado silvestre (SMITH Y CROOK, 1988).

1.1. Recogida de larvas en campo

Como normas de seguridad para evitar contaminación cruzada entre el material recolectado, todos los instrumentos que tengan contacto directo con los huéspedes deben ser estériles y remplazados en cada zona de recolección (HUNTER, *et al.*, 1998). Por otro lado, un adecuado medio de transporte de los huéspedes puede garantizar su óptimo mantenimiento hasta el lugar donde vayan a ser analizados, por ejemplo el uso de contenedores protegidos de la luz solar, provisión del material vegetal donde fueron recolectados, una adecuada temperatura, etc.

Material

- Pinzas estériles.
- Contenedores (ejemplo: viales de plástico, vasos desechables etc.).
- Nevera.
- Bolsas de autoclave.
- Marcadores indelebles, etiquetas, libro de notas, etc.

Método

1. Identificar las plantas donde se realiza la recolección.
2. Recoger las larvas en los contenedores.
3. Colocar el material utilizado en bolsas de autoclave.
4. Transportar el material en nevera cuando la temperatura ambiental es elevada.
5. Separar el material por zona de recolección.

1.2. Sintomatología

Los síntomas de infección por baculovirus se suelen manifestar en cambios morfológicos y de comportamiento de los insectos. La sintomatología puede variar de acuerdo con la especie y el huésped, pero en general, una infección provocada por NPVs en lepidópteros se identifica por cambios en la movilidad de las larvas y en la coloración del tegumento. También se observa un cese en la alimentación y un comportamiento característico de desplazamiento hacia la parte superior de las plantas en el periodo final de la infección. Es entonces cuando, característicamente, las larvas se sostienen del sustrato vegetal con sus falsas patas y poco después mueren en esta posición, flácidas y con el tegumento a punto de romperse para la liberación de billones de OBs (EVANS, 1986).

Los GV's sólo se han aislado de larvas de lepidópteros. Los síntomas se inician con pérdida del apetito y cambios en la coloración del tegumento, la región ventral

se vuelve blanca o amarillenta. Cuando la infección está avanzada, los tejidos se desintegran y la hemolinfa presenta un aspecto lechoso debido al alto número de OBs que son liberados (ASAYAMA, 1986).

1.3. Microscopía

Debido a que la sintomatología provocada por entomopatógenos puede ser común en algunos grupos de insectos, es recomendable realizar un diagnóstico de mayor fiabilidad basado en la observación al microscopio (EVANS Y SHAPIRO, 1997). El uso del microscopio óptico a 400x en contraste de fases permite la adecuada observación de los OBs de los NPVs debido a su tamaño y características de refractibilidad. Sin embargo, los GVs de un tamaño inferior, se encuentran en el límite de resolución del microscopio óptico y deben observarse a 1000x en campo oscuro.

Los efectos citopatológicos debidos a una infección de NPV pueden reconocerse 8 horas después de la infección (KING Y POSSE, 1992). Los OBs se pueden observar en un gran número de tejidos, incluyendo hemocitos. Benz (1963) describe una secuencia de infección en *Malacosoma alpicola* en el siguiente orden: tejido graso, hipodermis, matriz traqueal, tejido muscular, nervios, ganglios y células pericárdicas. A nivel celular, el núcleo se detecta hipertrofiado con presencia de poliedros, la cromatina dispersa y, en infecciones más avanzadas, se pueden observar células en lisis liberando los poliedros (Figura 1). (VOLKMAN *et al.*, 1976). En infecciones por GVs, la infección tisular es más limitada comparada con infecciones con NPVs, debido a que solamente se han observado síntomas de infección en tejido graso, epidermis y matriz traqueal, de los cuales el tejido graso es el principalmente afectado (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986).

Para un diagnóstico más detallado de la infección celular, las técnicas más utilizadas son la tinción de Giemsa para la observación de los NPVs y Negro de Neptaleno 12B para los GVs (WIGLEY, 1980).

Tinción de Giemsa

Giemsa es un colorante negativo que permite identificar a los OBs como partículas claras y redondeadas; el citoplasma y núcleo celular presentan una coloración azul y roja, respectivamente.

Material

- Microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x/ 1,25 oil Ph 3).
- Portaobjetos.
- Colorante Giemsa.
- Fijador Giemsa: 94% etanol absoluto; 5% formalina; 1% ácido acético.

Método

1. Colocar sobre portaobjetos una fina muestra del tejido del insecto infectado.

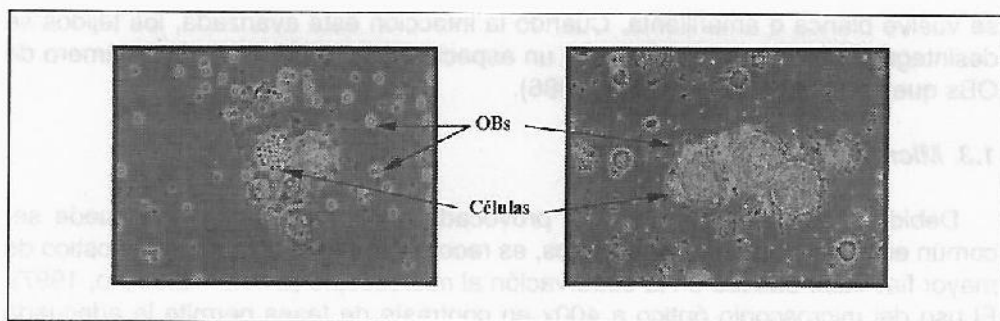


Figura 1. Células del cuerpo graso de un lepidóptero poco antes de que se produzca la lisis celular para liberar los poliedros que contiene.

2. Secar al aire.
3. Cubrir la muestra con fijador Giemsa durante 2 min.
4. Lavar el portaobjetos por escurrimiento de agua durante 10 seg.
5. Secar al aire y cubrir la muestra con colorante Giemsa durante 30 min.
6. Lavar el exceso de colorante y secar al aire.
7. Examinar la muestra bajo el objetivo de inmersión.

Negro de Neptaleno 12 B

Negro de Neptaleno 12 B es un colorante positivo que permite distinguir los gránulos como formas negro-brillantes sobre un fondo rojo.

Material

- Microscopio óptico con objetivo de inmersión con filtro rojo (100x/1,25 oil Ph 3).
- Portaobjetos.
- 50% albúmina de huevo (p/v) en dH_2O .
- Fijador Buoin.
- 2,5% sulfato de amonio férrico (p/v) en dH_2O .
- 0,4% eosina Y (p/v) y 45% etanol, en dH_2O .
- 95% etanol.
- Solución colorante: 1,5% negro de neptaleno 12B; 40% ácido acético glacial.

Método

1. Homogenizar las larvas infectadas.
2. Diluir en agua y mezclar 500 μl de la muestra con 500 μl de 50% albúmina de huevo.
3. Colocar sobre el portaobjetos una alícuota de 5 μl de la preparación anterior.
4. Secar al aire y colocar en fijador Bouin durante 24 h.
5. Lavar por escurrimiento de agua.

6. Colocar sobre la muestra 2,5% sulfato de amonio férrico durante 2 h.
7. Lavar por escurrimiento de agua durante 30 seg.
8. Colocar sobre la muestra solución de Eosina Y durante 3 min.
9. Lavar por escurrimiento de 95% etanol durante 1 min.
10. Colocar Negro de Neptaleno 12B en 35% ácido acético glacial a 40°C durante 5 min.
11. Lavar, secar al aire y observar la muestra un filtro rojo con el objetivo de inmersión en contraste de fases.

2. Multiplicación de virus

2.1. In vivo

Actualmente, la multiplicación de los baculovirus empleados en el control de plagas se realiza *in vivo*, empleando insectos como biofábricas. Mediante este sistema se logra obtener una gran producción del virus por unidad de volumen y un producto de alta calidad (CORY Y BISHOP, 1997). Además, con el desarrollo de dietas semisintéticas para la cría masiva del huésped (MOORE, 1985) se ha logrado obtener una mayor producción a un menor costo. No obstante, para la optimización de este sistema es necesario considerar varios aspectos importantes, tales como: condiciones del huésped y su estado de desarrollo, condiciones ambientales y métodos de inoculación.

El óptimo aprovechamiento de los recursos del huésped es uno de los aspectos básicos del sistema *in vivo* (SHAPIRO *et al.*, 1981). Varios estudios han señalado que existe una relación positiva entre la producción del virus y el tamaño del huésped. Por ejemplo, la producción promedio del NPV de *S. frugiperda* puede incrementarse de $1,22 \times 10^8$ OBs/larva del tercer estadio (L_3) a $15,10 \times 10^8$ OBs/larva del quinto estadio (L_5) (ESCRIBANO *et al.*, 1999). Sin embargo, esta relación puede variar de acuerdo con la especie del virus y el huésped; en *L. dispar* se observó un incremento de la producción de LdMNPV de $1,45 \times 10^6$ a $3,20 \times 10^6$ OBs en larva del primer y cuarto estadio, respectivamente; pero la producción de virus se redujo en un 20% en larvas del quinto estadio (SHAPIRO *et al.*, 1986).

Entre las condiciones ambientales, el rango de temperatura y el tiempo de incubación son las que más influyen en la multiplicación y la calidad de los baculovirus. Un intervalo entre 20 y 26°C se considera óptimo, pero debido a la variabilidad de las especies estas condiciones pueden cambiar (CORY Y BISHOP, 1997). En *M. brassicae* se logra obtener una producción óptima entre un intervalo de 20 a 30°C, un incremento de la temperatura podría tener influencia negativa en la producción del virus por larva (KELLY Y ENTWISTLE, 1988).

Las técnicas más comunes de inoculación para la multiplicación de los baculovirus son la inoculación de superficie y la incorporación del inóculo en dieta (Apartados 7.1.2 y 7.1.3). La primera ha sido la más ampliamente utilizada debido a su facilidad de uso y al bajo requerimiento del virus por volumen de dieta para

provocar altos niveles de mortalidad (90-100%). En ambas técnicas es recomendable mantener a los insectos infectados en contenedores individuales que permitan llevar un adecuado registro de desarrollo y que además disminuyan el riesgo de contaminación de la dieta. Cuando los insectos mueren, se recolectan para evitar contaminación por organismos oportunistas y se conservan a -20°C .

2.1.1. Cría artificial de poblaciones de insectos

La cría de insectos es el mantenimiento o cultivo de insectos en cautiverio durante un número variable de generaciones enteras, o bien durante uno o más de sus estados de desarrollo. En el actual concepto de la lucha contra las plagas, la producción de insectos es necesaria tanto para alcanzar objetivos de investigación como para plantear soluciones de tipo práctico dentro del campo de Protección de los Cultivos.

El diseño del laboratorio de cría es de crucial importancia para conseguir un uso eficiente de los recursos. Entre otras cosas debe tener en cuenta necesidades futuras y unas estrictas condiciones de higiene. Por ejemplo, una buena circulación de aire en los espacios habilitados para la cría es vital para el buen estado de los insectos y el buen mantenimiento de las dietas. Deben permitir además, el control de las condiciones ambientales de cría, como son la temperatura, el fotoperiodo, la intensidad luminosa y la humedad relativa. Actualmente existen cámaras informatizadas donde estos parámetros se pueden variar fácilmente desde un ordenador.

Disponer de una habitación dedicada al lavado de los materiales de cría es otra medida deseable en un insectario que debe contar con lavabos, encimeras de secado, contenedores de lejía, autoclave y horno para la esterilización de las dietas y de los utensilios metálicos, respectivamente, etc. También es muy conveniente disponer de una habitación para la preparación y el mantenimiento de las dietas y sus componentes. Su principal mobiliario debe estar formado por lavabos, frigorífico para conservar las dietas y los distintos componentes de la dieta, un dispensador de agua desionizada, cajones y estanterías que eviten la presencia de polvo en los ingredientes de la dieta, y todos los utensilios necesarios para preparar ésta como por ejemplo un microondas y una balanza de precisión (Figura 2). Una campana de extracción de gases evita la inhalación de gases tóxicos que se emplean en el insectario, como es el formaldehído para la esterilización superficial de huevos.

El manejo y la cría de insectos requiere la utilización de un material que debe estar adaptado a las necesidades de cada uno de los estados del desarrollo del ciclo biológico. Utensilios como pinzas entomológicas, pinceles, espátulas, bisturíes y tubos de ensayo se utilizan a diario durante el manejo de las poblaciones. Los contenedores de los insectos se diseñan específicamente para cada tipo de insecto y cada estado de acuerdo a sus características biológicas y a su comportamiento. Cuando es posible, es conveniente utilizar contenedores de material translúcido para que entre la luz así como para poder observar los insectos desde fuera. Las dimensiones de los ponederos deben estar adecuadas a las necesidades de

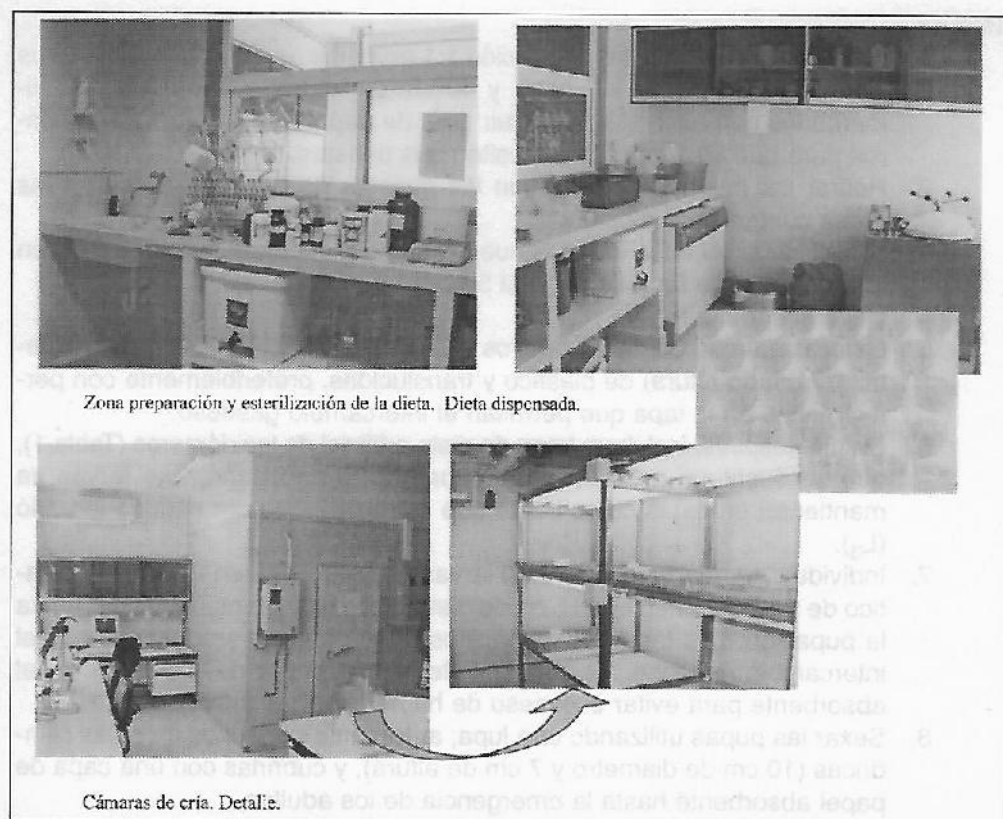


Figura 2. Vistas de las distintas zonas de un insectario moderno equipado con todo lo necesario para la cría artificial de insectos.

los adultos (apareamiento, vuelo, etc.). Los individuos recién traídos se suelen mantener individualmente en contenedores de plástico, cristal, o cartón para reducir la contaminación y eliminar la competencia. La forma de criar las distintas especies varía enormemente de acuerdo a los diferentes requerimientos biológicos, de comportamiento, etc. A continuación exponemos, a modo de ejemplo, la cría artificial que se sigue para las especies de *Spodoptera*, un género comprendido dentro de la familia Noctuidae del orden Lepidoptera.

Material

- Cajas de cría múltiple.
- Vasos de plástico con tapa, de 25 ml.
- Urnas de puesta.
- Dieta artificial.
- Miel.
- Papel de filtro.
- Pinzas y pinceles entomológicos.

Método

1. Mantener los adultos en proporción 1:1 (machos:hembras) en ponaderos cilíndricos (25 cm de diámetro y 40 cm de altura) y translúcidos y alimentarlos con miel diluida. Incluir tiras de papel de filtro en los ponaderos para que las hembras depositen sus puestas.
2. Retirar los papeles de filtro con las puestas de huevos, y recortar las áreas conteniendo plastrones.
3. Esterilizar la superficie de los huevos sumergiéndolos durante 5 min. en una solución de formaldehído al 5%.
4. Dejar secar al aire.
5. Colocar no más de 1.000 huevos en cajas cilíndricas (10 cm de diámetro y 7 cm de altura) de plástico y translúcidas, preferiblemente con perforaciones en la tapa que permitan el intercambio gaseoso.
6. Un día después, incluir un trozo de dieta artificial de lepidópteros (Tabla 1), que se sustituye por otro fresco cuando es necesario. Las larvas se mantienen en estas cajas hasta que alcanzan el tercer estadio larvario (L₃).
7. Individualizar diariamente 15-30 larvas en estadio L₃ en vasitos de plástico de 25 ml, conteniendo 5 ml de dieta artificial, y mantenerlas así hasta la pupación. Las tapas de los vasitos deben perforarse para permitir el intercambio gaseoso. Es conveniente incluir un par de capas de papel absorbente para evitar el exceso de humedad en el interior del vaso.
8. Sexar las pupas utilizando una lupa, agruparlas por sexos en cajas cilíndricas (10 cm de diámetro y 7 cm de altura), y cubrirlas con una capa de papel absorbente hasta la emergencia de los adultos.
9. Transferir 8-12 parejas de adultos a los ponaderos.

2.1.2. Dieta artificial

La cría en laboratorio de una especie depende de la disponibilidad de un método de alimentación natural o artificial. En el caso de insectos que se alimentan de una única especie huésped, o de aquellos para los que no se conoce una dieta apropiada, se hace necesario cultivar el substrato alimenticio natural, que puede ser una especie vegetal en el caso de los fitófagos, u otra especie de insecto si se trata de un depredador. La utilización de un huésped natural puede parecer más deseable, pero trae muchos problemas asociados de disponibilidad, contaminación, etc. La alimentación con dieta artificial es mucho más conveniente desde un punto de vista económico y práctico, no está sujeta a circunstancias ambientales y puede hacerse disponible en grandes cantidades siempre que sea necesario.

En la Tabla 1 se detallan los ingredientes de una dieta adaptada para lepidópteros.

2.2. In vitro

El método para la obtención de BVs se basa en infectar cultivos celulares y recoger 4-5 días después el fluido extracelular. Para obtener grandes cantidades,

Tabla 1. Dieta artificial adaptada a lepidópteros.

Ingrediente	gr/litro	Ingrediente	gr/litro
Germen de trigo	72	Nipagina	0,94
Caseína	33	Aceite de lino	1,9 ml
Levadura de cerveza	14,25	Agar	18,75
Mezcla de sales Wesson	9,4	Agua destilada	862,5 ml
Ácido sórbico	1,5	Vitaminas y antibióticos	5,6
Colesterol	0,94	Cloruro de colina	0,94

normalmente es necesario realizar dos rondas de amplificación. Para que la amplificación sea correcta se deben tener en cuenta dos factores: primeramente es conveniente evitar la amplificación en serie de los inóculos obtenidos en cada paso ya que ello puede comportar la aparición de virus mutantes, que podrían llegar a convertirse en la variante predominante. Un ejemplo observado en AcMNPV son los mutantes con pocos OBs (mutantes FP), que pueden llegar a ser más abundantes que el virus silvestre. En segundo lugar, también hay que evitar la acumulación de partículas virales defectivas. Éstas contienen múltiples mutaciones en su genoma y necesitan para su replicación que la célula se coinfecte con el virus salvaje. Ambos problemas se pueden evitar tomando precauciones muy simples tales como partir de un inóculo bien purificado, mantener el número de pasos de amplificación lo más bajo posible e infectar con baja multiplicidad de infección (moi), disminuyendo así la posibilidad de adquirir partículas defectivas. El protocolo que se explica a continuación describe dos rondas de amplificación de las que se obtienen 40 ml de virus.

Material

- Medio de cultivo tisular completo.
- Línea celular.
- Placas de cultivo tisular de 35 y 100 mm.
- Inóculo de BVs purificado.
- Incubadora de 27°C.

Método

1. Sembrar placas de cultivo de 35 mm (una para cada virus que se desee amplificar) con 1×10^6 células en un volumen final de 2 ml de medio tisular completo.
2. Incubar las placas a 27°C durante 30 min-1 h, para permitir que las células se adhieran a la base y formen una monocapa.

3. Aspirar el medio de cultivo e infectar con 1×10^5 unidades formadoras de calvas (Apartado 4.2). La determinación del título del inóculo se realiza con anterioridad para asegurar así que la infección se está realizando a una baja *moi*, correspondiente a 0,1 pfus/célula.
4. Ajustar el volumen total de la placa a 500 μ l con medio de cultivo.
5. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente agitando suavemente.
6. Añadir 1,5 ml de medio tisular a cada placa (no es necesario retirar el inóculo viral).
7. Incubar a 27°C durante 4-5 días.
8. Recoger el fluido extracelular y centrifugarlo a 1.000 g durante 5 min para eliminar los restos celulares. Guardar el sobrenadante a 4°C en oscuridad.
9. Determinar el título del inóculo (Apartado 4.2).
10. Sembrar 4 placas de cultivo de 100 mm con 5×10^6 células en un volumen final de 10 ml de medio tisular completo para cada uno de los sobrenadantes obtenidos.
11. Incubar las placas a 27°C durante 30-60 min.
12. Aspirar el medio de cultivo y añadir el inóculo viral amplificado previamente a un *moi* de 0,1 pfu/célula. Ajustar el volumen total de la placa a 1 ml con medio tisular completo.
13. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente agitando suavemente.
14. Añadir a cada placa 9 ml de medio de cultivo.
15. Incubar a 27°C durante 4-5 días.
16. Recoger el fluido extracelular y centrifugarlo a 1.000 g durante 5 min. El sobrenadante es el inóculo viral amplificado. Guardarlo a 4°C en oscuridad.
17. Antes de usar el virus amplificado, titularlo por el método de purificación por placa.
18. Congelar varias alícuotas de 1 ml a -80°C para conservar durante mucho tiempo.

3. Técnicas de purificación

3.1. Purificación de OBs

Existen distintos protocolos que permiten la extracción de los OBs de los baculovirus con mayor o menor grado de pureza a partir de los restos del huésped y a partir de un cultivo celular. La mayoría de las veces no es conveniente purificar los OBs de forma exhaustiva. Durante el proceso de purificación se pierde una gran cantidad de OBs, por lo que si los OBs se van a emplear como inóculo para la multiplicación de virus en larvas o para ciertos análisis (ejemplo: digestión del ADN con endonucleasas), es recomendable evitar algunos pasos que son innecesarios. Otras veces, en cambio, una buena purificación de OBs es un requisito indispensable, como cuando se quiere emplear el inóculo para titular, o para continuar con la extracción de ADN con el fin de transfectar insectos o células.

3.1.1. A partir de cadáveres de insectos

En esta sección se detallan dos protocolos para la preparación de pequeñas cantidades de OBs a partir de cadáveres de insectos. Ambos se aplican a la extracción de los OBs contenidos en un insecto infectado. Un protocolo de purificación exhaustiva y masiva de OBs ha sido descrito por Caballero *et al.* (1992).

En la purificación de los OBs, los restos del huésped son tratados con un detergente aniónico (SDS) para facilitar la ruptura de los tejidos celulares que aún permanecen intactos y la liberación de los OBs del interior de las células que no han sido lisadas. Estos restos celulares se sedimentan mediante una centrifugación muy suave y se eliminan, mientras que el sobrenadante se somete a una nueva centrifugación a gran velocidad para sedimentar los OBs, que se resuspenden en un pequeño volumen de agua y se filtran a través de una capa de sacarosa que permite separar las partículas contaminantes más pequeñas. Varios lavados con H₂O eliminan los restos de sacarosa. Debido a que los OBs son generalmente muy estables en condiciones de laboratorio, pueden mantenerse en agua bidestilada o PBS a temperatura ambiente, 4°, -20°, -80°C, o bien, en nitrógeno líquido.

Purificación

Material

- 0,1% SDS (p/v) en dH₂O.
- Homogenizador de cristal.
- 40% sacarosa (p/v) en dH₂O.

Método

1. Homogenizar una muestra de las larvas en 1 ml de 0,1 % SDS.
2. Centrifugar a 1.600 *g* durante 5 min y guardar el sobrenadante.
3. Resuspender el precipitado en 500 µl de 0,1% SDS.
4. Centrifugar a 1.600 *g* durante 5 min y guardar el sobrenadante.
5. Mezclar los sobrenadantes de los pasos 2 y 4.
6. Centrifugar a 5.000 *g* durante 5 min.
7. Eliminar el sobrenadante y resuspender la suspensión de virus en 300 µl de 0,1% SDS.
8. Cargar 500 µl de 40% sacarosa y por encima la suspensión de virus del paso anterior.
9. Centrifugar a 23.000 *g* durante 30 min.
10. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 1.000 µl de 0,1% SDS.
11. Centrifugar a 4.000 *g* durante 5 min y desechar el sobrenadante.
12. Resuspender el sedimento en 500 µl de dH₂O.

Semipurificación

Material

- Agua bidestilada.
- Homogenizador de cristal.
- Muselina.

Método

1. Añadir 1 vol. de dH_2O al cadáver del insecto.
2. Homogeneizar vigorosamente empleando, por ejemplo, puntas de pipetas.
3. Filtrar la muestra a través de la muselina y desechar los residuos no filtrados.
4. Centrifugar a 800 g durante 5 min.
5. Transferir el sobrenadante a un nuevo vial.

3.1.2. A partir de cultivos celulares

Preferentemente, los OBs se purifican a partir de cadáveres de insectos, pero puede haber casos en los que se necesite obtenerlos de un cultivo celular, como es el caso de baculovirus recombinantes tóxicos para las larvas. El protocolo para purificar OBs a partir de cultivos celulares es muy similar al del Apartado 3.1.1.

Material

- 0,5% SDS (p/v).

Método

1. Recolectar las células infectadas por centrifugación a 1.000 g durante 5 min.
2. Desechar el sobrenadante y resuspender en 0,5% SDS.
3. Continuar el mismo protocolo que la purificación a partir de cadáveres a partir del punto número 8.

3.2. Purificación de viriones

3.2.1. Viriones derivados de los cuerpos de inclusión

Los viriones derivados de los cuerpos de inclusión (ODVs) se encuentran embebidos en la matriz proteica que forma la poliedrina, en los NPVs, o la granulina, en los GVs y son liberados en el mesenterón de los insectos gracias al pH alcalino que ahí se encuentra (ver Capítulo 2). En el laboratorio, los ODVs se obtienen mediante disolución alcalina de los OBs y se purifican mediante un filtrado a través de un gradiente continuo de sacarosa. La obtención de viriones a partir de OBs es un paso previo para la caracterización de la composición de proteínas estructurales de los viriones.

Material

- Solución tampón TE: 10 mM Tris- HCl, pH 7,2; 1 mM EDTA.
- Solución 3x DAS: 0,3 M Na_2CO_3 ; 0,5 M NaCl; 0,03 M DTA; pH 10,5.
- Gradiente continuo de sacarosa entre el 38% y el 62% (p/p) en dH_2O .
- Jeringuilla de 25 ml y aguja doblada en ángulo de 90°.

Método

1. Tomar 1 ml de una suspensión de OBs puros (Apartado 3.1) de aproximadamente una concentración 10^8 OBs/ml.
2. Añadir 1 ml de agua bidestilada y 1 ml de solución 3x DAS en cada uno de los tubos e incubar a 37°C de 5 a 10 min hasta que la muestra se

torne translúcida por la disolución alcalina de la poliedrina o granulina que produce la liberación de los viriones.

3. Añadir 3 ml de agua bidestilada a cada tubo y agitar hasta que la muestra sea homogénea.
4. Centrifugar las muestras durante 3 min a 1.500 *g* para eliminar los OBs no digeridos o parcialmente digeridos (si el precipitado contiene gran cantidad de OBs sin disolver, resuspender el precipitado en 1 ml de agua y repetir los pasos del 1 al 4).
5. Recuperar el sobrenadante de cada tubo y depositarlo sobre tubos preparados con un gradiente continuo de sacarosa del 38-62%. Precaución: los tubos deben ser calibrados dos a dos antes de colocarlos en el rotor.
6. Centrifugar las muestras a 40.000 *g* y 4°C de temperatura durante 60 min. Al final de la carrera se apreciarán a simple vista en los tubos un número variable de bandas blanquecinas correspondientes a viriones de distinto peso de los MNPVs (con distinto número de nucleocapsidas) o una única banda en el caso de NPVs simples o GVs.
7. Recolectar las bandas con una jeringuilla provista de una aguja doblada en ángulo de 90°C (Figura 3). Para apreciar las bandas mejor se puede proyectar una fuente de luz verticalmente sobre el tubo. Precaución: Las bandas se difunden fácilmente en la sacarosa, por lo que conviene hacer la recogida de viriones inmediatamente después de la carrera.
8. Eliminar los restos de sacarosa añadiendo un volumen 20 (l de dH₂O y centrifugando de nuevo las muestras a 40.000 *g* durante 60 min.
9. Desechar el sobrenadante y resuspender los viriones precipitados en el fondo de los tubos en 50-100 µl de TE.
10. Almacenar los viriones a 4°C hasta su utilización.

3.2.2. Viriones brotantes

Los BVs resultantes de una infección o una transección en cultivo celular se obtienen aspirando el medio de cultivo que baña las células. Los BVs son muy estables en este medio y pueden guardarse en él a 4°C durante largos periodos de tiempo. La mayoría de las veces no es necesario purificar excesivamente los viriones brotados que se obtienen de un cultivo celular pues, inevitablemente, siempre hay una pérdida de virus. Sin embargo, algunas veces, cuando se utilizan como inóculos para volver a infectar células, se hace necesaria y entonces se puede seguir el mismo protocolo que el que se describe en el apartado 3.2.1 empezando desde el punto número 5. Los BVs no se encuentran ocluidos como los ODVs, y no necesitan ser liberados, como éstos, de la matriz proteica, por lo que los 4 primeros puntos de la citada sección se hacen innecesarios.

3.3. Purificación de ADN viral

La extracción del ADN genómico a partir de cuerpos de inclusión es un paso previo a su posterior análisis con endonucleasas de restricción. Si se necesitan

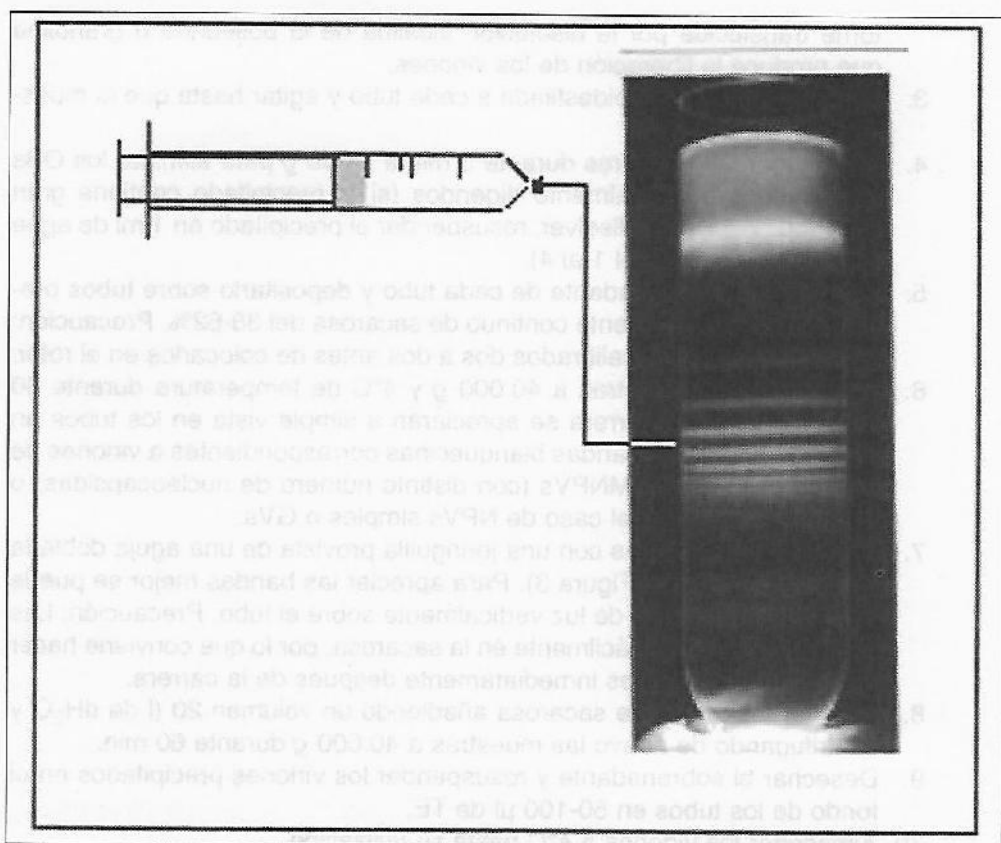


Figura 3. Tubo de una ultracentrífuga con un gradiente continuo de sacarosa en el que se han separado los viriones que contienen distinto número de nucleocápsidas. Estas bandas pueden ser recogidas selectivamente con una jeringuilla tal y como se muestra en la figura.

grandes cantidades de ADN, se deben utilizar suspensiones con al menos 10^9 - 10^{10} OBs y seguir los protocolos detallados en O'Reilly *et al.* (1992) o King y Possee (1992). Cuando no se necesitan grandes cantidades de ADN, se puede partir de muestras con un mínimo de 10^7 OBs y conseguir entre 1 y 10 μ g de ADN, suficiente para 2-20 digestiones con endonucleasas de restricción. En estas mini preparaciones, el ADN se libera de los OBs mediante disolución alcalina de la matriz proteica, y mediante la ruptura de las membranas de los viriones con proteinasa K, y a continuación se extrae por fenolización. Durante la extracción con fenol, la mayoría de las proteínas resultan atrapadas en la fase orgánica o desnaturalizadas, mientras el ADN se queda en la fase acuosa. Por último, el ADN se precipita para concentrarlo o se somete a diálisis.

Material

- Suspensión purificada de OBs. A partir de suspensiones de NPVs de 0,1 ml, con 10^8 OBs/ml, se pueden conseguir entre 1 y 10 μ g de ADN.

- Solución 3x DAS: 0,3 M Na₂CO₃; 0,5 M NaCl; 0,03 M EDTA; pH 10,5.
- Proteinasa K (500 µg/ml).
- 10% SDS (p/v).
- Fenol equilibrado.
- Fenol:Cloroformo:Isoamilalcohol (25:24:1).
- 96% etanol frío.
- 3 M NaAc, pH 5,2.
- 70% etanol frío.
- 10 mM Tris, pH 8,0.
- Tubos de celulosa para diálisis (SIGMA D-9277). Antes de utilizarlos deben hervirse en bicarbonato sódico al 2% durante 10 min, y a continuación en agua destilada durante otros 10 min. Se dejan enfriar y se guardan en dH₂O a 4°C.
- Pinzas de diálisis.
- TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA.

Método

1. Tomar 100 µl de una suspensión purificada de OBs con una concentración aproximada de 10⁸ OBs/ml.
2. Añadir 1 vol. de agua y otro de la solución alcalina 3 x DAS, e incubar durante 5 min. a 37°C para disolver la matriz proteica de los OBs. Los ODVs de algunas especies de baculovirus, como SIMNPV, son muy sensibles al tratamiento alcalino y una incubación prolongada los destruye, por lo que esta incubación se reduce a no más de 30 seg.
3. Centrifugar la suspensión a 6.000 g durante 1 min para sedimentar los restos de matriz.
4. Desechar el sedimento y transferir el sobrenadante, conteniendo los ODVs liberados en suspensión a un nuevo vial.
5. Romper las envolturas de los viriones y nucleocápsidas incubando con 500 µg/µl de proteinasa K durante 2,5 h a 45°C.
6. Añadir 1/10 vol de 10% SDS e incubar 30 min a la misma temperatura.
7. Añadir 500 µl de fenol, mezclar suavemente durante 5 min y centrifugar a 12.000 g durante otros 5 min. Precaución: el genoma de los baculovirus es relativamente grande y se rompe fácilmente por lo que, al mezclar las fases, nunca se utiliza el vortex, además se recomienda utilizar puntas de pipeta con el extremo cortado.
8. Transferir la fase acuosa a un nuevo vial y repetir dos veces más la extracción empleando la mezcla de fenol-cloroformo-isoamilalcohol en lugar de fenol. Precaución: el fenol es un potente neurotóxico por lo que se recomienda utilizar guantes de latex durante toda esta fase.
9. Precipitar el ADN de la fase acuosa añadiendo 1/10 vol. de 3 M NaAc pH 5,2 y 2 vol. de etanol frío puro al 96%. Centrifugar a 12.000 g durante 15 min., desechar el sobrenadante, lavar con 70% etanol y centrifugar a 12.000 g durante 5 min.

10. Los residuos de disolventes orgánicos no son eliminados en la precipitación, por lo que conviene no apurar mucho al separar la fase acuosa de la orgánica antes de proceder a la precipitación. Sin embargo, estos restos sí pueden eliminarse mediante diálisis durante 48 h en 0,1 x TE utilizando tubos con poros de un tamaño que retenga el ADN. Para concentrar el ADN dializado, se colocan los tubos de diálisis sobre una capa de sacarosa pura y se deja que el dH_2O salga por ósmosis. Cuando el volumen de la solución de ADN ha disminuido convenientemente, se reduce la distancia entre los extremos del tubo acercando las pinzas de diálisis y se vuelve a dializar en solución fresca de TE para lavar la sacarosa.
11. Desechar el sobrenadante poniendo el vial boca abajo, mantenerlo en la misma posición hasta desechar todas las gotas de etanol, colocarlo boca arriba y dejar secar durante 1 min a temperatura ambiente.
12. Añadir un volumen apropiado de dH_2O o de 10 mM Tris pH 8,0, e incubar durante 15 min a temperatura ambiente o a 65°C para conseguir la completa disolución del ADN. Precaución: puede haber restos de ADN en las paredes del vial por lo que es aconsejable lavar paredes con el disolvente.
13. Guardar el ADN a 4°C ó -20°C .

4. Titulación

4.1. Titulación de cuerpos de inclusión

El título de una suspensión viral es la concentración de OBs presentes por unidad de volumen. En preparaciones acuosas puras o semipuras, el método más común para la cuantificación de los baculovirus es mediante el uso de cámaras de conteo (Neubauer, Thoma) por observación de los OBs al microscopio óptico, en contraste de fases a 400x (NPVs) o en campo oscuro a 1.000x (GVs). En ambos casos es muy importante que en la suspensión de virus no haya agregados y, en tal caso, la suspensión deber ser tratada con un sonicador, o bien, realizar varios lavados con detergentes aniónicos (ejemplo: 0,1% de SDS o Tween 20).

Por otro lado, la preparación de diluciones seriadas y la repetición de los conteos de OBs incrementan la fiabilidad en el cálculo de la concentración de los OBs. Las diluciones seriadas facilitan la selección de la dilución con una adecuada concentración del virus (un número adecuado de OBs por cuadrícula es entre 20 y 40). Una vez que se haya depositado la alícuota dentro de la cámara, se recomienda que ésta se deje en reposo durante 10 min para facilitar el depósito de los OBs.

Material

- Cámara de conteo de volumen conocido, por ejemplo Neubauer de 10^{-4} cm^3 .

- Microscopio óptico con contraste de fases o campo oscuro.
- Suspensiones purificadas de OBs (Apartado 3.1).

Método

1. Preparar varias diluciones seriadas de la suspensión del virus (ejemplo: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}).
2. Tomar una alícuota (10 μ l) de la dilución más baja (mínimo tres diluciones) e introducirla por capilaridad entre la cámara y el cubreobjetos.
3. Esperar 10 min para que los OBs se sedimenten.
4. Observar a 400x en contraste de fases para el conteo de poliedros o a 1.000x en campo oscuro para el conteo de gránulos.
5. Contar el número de OBs en al menos cinco cuadrantes de la cuadrícula completa, tal y como se muestra en la Figura 4.
6. Realizar al menos tres repeticiones por muestra.

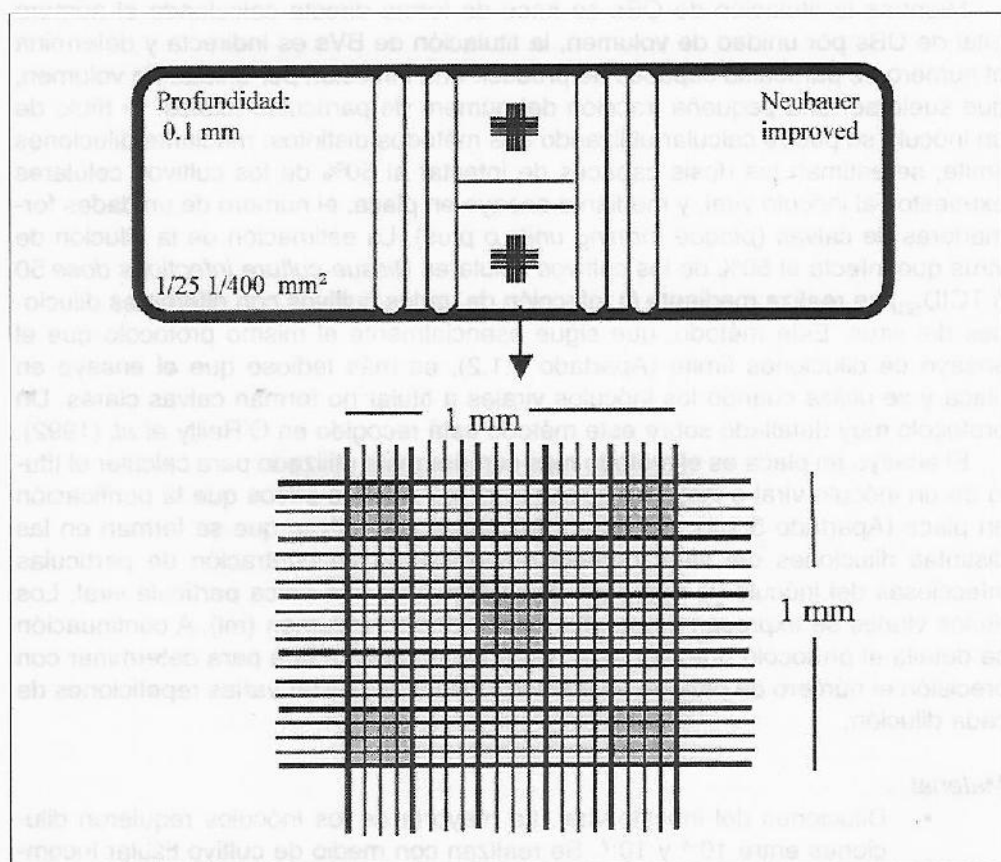


Figura 4. Hematócmetro o cámara de conteo que permite titular las suspensiones de cuerpos de inclusión (OB; occlusion body) de los baculovirus.

7. Calcular la concentración para cada repetición de acuerdo a la fórmula siguiente:

$$OBs/ml = \frac{n \cdot D \cdot 5}{V}$$

donde: **n** es el nº de poliedros contados.

D es la dilución empleada.

V es el volumen de la cámara en ml.

8. Calcular una media de las tres repeticiones para obtener el número de OBs/ml de la muestra.

4.2. Titulación de viriones brotantes

Mientras la titulación de OBs se hace de forma directa calculando el número total de OBs por unidad de volumen, la titulación de BVs es indirecta y determina el número de partículas capaces de producir una infección por unidad de volumen, que suele ser una pequeña fracción del número de partículas totales. El título de un inóculo se puede calcular utilizando dos métodos distintos: mediante diluciones límite, se estiman las dosis capaces de infectar al 50% de los cultivos celulares expuestos al inóculo viral, y mediante ensayo en placa, el número de unidades formadoras de calvas (*plaque forming units* o pfus). La estimación de la dilución de virus que infecta al 50% de los cultivos celulares (*tissue culture infectious dose 50* ó TCID₅₀) se realiza mediante la infección de varios cultivos con diferentes diluciones del virus. Este método, que sigue esencialmente el mismo protocolo que el ensayo de diluciones límite (Apartado 5.1.2), es más tedioso que el ensayo en placa y se utiliza cuando los inóculos virales a titular no forman calvas claras. Un protocolo muy detallado sobre este método está recogido en O'Reilly *et al.* (1992).

El ensayo en placa es el método más comúnmente utilizado para calcular el título de un inóculo viral e incluye básicamente los mismos pasos que la purificación en placa (Apartado 5.1.1). El conteo del número de calvas que se forman en las distintas diluciones del virus permite determinar la concentración de partículas infecciosas del inóculo ya que cada calva deriva de una única partícula viral. Los títulos virales se expresan como pfus por unidad de volumen (ml). A continuación se detalla el protocolo que se utiliza, teniendo en cuenta que para determinar con precisión el número de pfus de un inóculo, conviene realizar varias repeticiones de cada dilución.

Material

- Diluciones del inóculo viral. La mayoría de los inóculos requieren diluciones entre 10⁻⁴ y 10⁻⁷. Se realizan con medio de cultivo tisular incompleto.
- Línea celular.

- Medio de cultivo tisular completo.
- Medio de cultivo tisular incompleto.
- 5% agarosa (p/v) en ddH₂O.
- Placas de cultivo tisular de 60 mm.
- Incubadora de 27°C.

Método

1. Sembrar las placas de cultivo con 2×10^6 células en un total de 4 ml de medio de cultivo incompleto (permite una adhesión más rápida de las células que el medio completo).
2. Dejar que las células se adhieran al fondo durante 30 min ó 1 hora. Para que la distribución de las células sea homogénea, se dejan en agitación muy suave durante este tiempo.
3. Aspirar el medio de cultivo e infectar con 0,5 ml de las diluciones virales. Incubar a temperatura ambiente durante 1,5-2 h en agitación suave.
4. Aspirar el inóculo viral y lavar las células con 2 ml de medio de cultivo incompleto.
5. Añadir 4 ml de 0,5% agarosa en medio de cultivo. El 5% de agarosa en ddH₂O se diluye 1/10 previamente en medio de cultivo completo calentado a 60°C para evitar la solidificación de la agarosa. Antes de añadir a las células, esta mezcla se deja enfriar hasta 40-42°C.
6. Dejar las placas a temperatura ambiental hasta que la agarosa solidifique y a continuación incubarlos a 27°C.
7. Observar la aparición de calvas a partir de las 48 horas después de la infección. Las calvas se pueden distinguir en lupas de 2 a 6 aumentos como condensaciones de células de un color blanquecino. Las calvas también pueden distinguirse por fenotipo en el microscopio. Por ejemplo, si los virus tienen el gen de la poliedrina, se observarán OBs en las células de las calvas.
8. Seleccionar las placas de las diluciones que contienen entre 10 y 100 calvas y realizar el conteo del número total de calvas en cada placa (se hace la media del número de calvas en las placas de la misma dilución). El título del inóculo se calcula multiplicando el número de calvas por el factor de dilución y por 2, puesto que se utilizaron 0,5 ml del inóculo viral para realizar las infecciones.

5. Separación de variantes genotípicas

La heterogeneidad genética dentro de una población es una característica frecuente en aislados de campo de baculovirus. La presencia de bandas submolares en los perfiles de restricción del ADN viral de los aislados de campo, denota que diversos genotipos en distintas proporciones se encuentran formando una mezcla (SMITH Y CROOK, 1988; MUÑOZ *et al.*, 1999). Sin embargo, tanto a nivel molecular

como a nivel de campo, muchas veces es deseable trabajar con una población genéticamente homogénea del virus. Para ello se selecciona la progenie resultante de infecciones realizadas a partir de una o unas pocas partículas virales en sucesivos pases a través de líneas celulares o insectos vivos.

5.1. In vitro

Desde que Lee y Miller (1978) purificaron por vez primera las variantes genotípicas que formaban parte de un aislado de AcMNPV, la generación de inóculos virales puros se ha venido realizando mayoritariamente en líneas celulares de insectos. La purificación en placa y la dilución limitante que se detallan a continuación, son los dos procedimientos que se utilizan actualmente para producir un inóculo viral puro.

5.1.1. Por purificación en placa

La formación de calvas por un baculovirus fue descrita inicialmente por Hink y Vail (1973) y se basa en la infección de un cultivo celular con títulos muy bajos de partículas virales, de forma que únicamente son unas pocas células aisladas las que resultan infectadas. El cultivo se cubre con una capa de medio sólido que limita la expansión de las partículas virales, de manera que cuando las células que son inicialmente infectadas liberan las partículas virales hijas, sólo las células vecinas resultan infectadas. De esta forma, después de varios ciclos de infección, se forma un acúmulo de células infectadas, llamado calva, cuyas partículas virales provienen todas de un único BV y constituyen, por tanto, una población clónica. Para asegurar una buena purificación, es importante recoger las calvas de aquellas placas que no contengan más de 10 calvas, por lo que es necesario realizar las infecciones con diluciones apropiadas del inóculo viral. Para la obtención de buenas calvas es crucial que las células, que deben estar sanas y creciendo activamente, formen una monocapa distribuida homogéneamente por toda la placa. El protocolo que se detalla a continuación es una modificación del descrito por O'Reilly *et al.* (1992).

Material

- Diluciones del inóculo viral. En el primer pase se emplean diluciones de BVs de entre 10^{-5} y 10^{-6} . Para los siguientes pases, a partir de los BVs recogidos de las calvas, se utilizan diluciones entre 10^{-1} y 10^{-3} . Para diluir se emplea medio de cultivo tisular incompleto.
- Línea celular.
- Medio de cultivo tisular completo.
- Medio de cultivo tisular incompleto.
- 5% agarosa (p/v) en ddH₂O.
- Placas de cultivo tisular de 60mm.
- Incubadora de 27°C.

Método

1. Sembrar las placas de cultivo con 2×10^6 células en un total de 4 ml de medio de cultivo incompleto (permite una adhesión más rápida de las células que el medio completo).
2. Dejar que las células se adhieran al fondo durante 30 min ó 1 hora. Para que la distribución de las células sea homogénea, se dejan en agitación muy suave durante este tiempo.
3. Aspirar el medio de cultivo e infectar con 0,5 ml de las diluciones virales. Incubar a temperatura ambiente durante 1,5-2 h en agitación suave.
4. Aspirar el inóculo viral y lavar las células con 2 ml de medio de cultivo incompleto.
5. Añadir 4 ml de 0,5% agarosa en medio de cultivo. El 5% de agarosa en ddH_2O se diluye 1/10 previamente en medio de cultivo completo calentado a 60°C para evitar la solidificación de la agarosa. Antes de añadir a las células, esta mezcla se deja enfriar hasta $40-42^\circ\text{C}$.
6. Dejar las placas a temperatura ambiental hasta que la agarosa solidifique y a continuación incubarlos a 27°C .
7. Observar la aparición de calvas a partir de las 48 horas después de la infección. Las calvas se pueden distinguir en lupas de 2 a 6x como condensaciones de células de un color blanquecino. Las calvas también pueden distinguirse por fenotipo en el microscopio. Por ejemplo, si los virus tienen el gen de la poliedrina, se observarán OBs en las células de las calvas. Otra posibilidad para distinguir las calvas a simple vista es mediante tinción con el colorante neutral red (O'REILLY *et al.*, 1992).
8. Seleccionar las placas conteniendo 10 ó menos calvas y marcar la posición de las mismas con un círculo en la parte externa de la placa.
9. Aspirar el contenido de una calva con la punta de una pipeta, verterlo sobre 1 ml de medio tisular completo, agitar vigorosamente para liberar los BVs de la agarosa y guardar a 4°C en oscuridad.

5.1.2. Por dilución limitante de viriones brotantes

La idea de generar un inóculo viral puro por dilución límite se basa en realizar diluciones del virus hasta tal punto que, del número de cultivos que se exponen a éstas, los que resultan infectados son los que han recibido únicamente una partícula viral. Para que esto sea posible, se emplean diluciones del virus hasta que el 10% o menos de los cultivos que se exponen a él, terminan infectados. Este método se utiliza con menor frecuencia que el de purificación en placa por ser más complicado, pero resulta muy útil cuando nos encontramos con virus de lento crecimiento que no forman calvas bien definidas.

Material

- Diluciones seriadas de factor 10 del inóculo viral. Las diluciones entre 10^{-6} y 10^{-8} suelen ser las más apropiadas para la mayoría de los inóculos. Se realizan con medio de cultivo tisular incompleto.

- Línea celular.
- Medio de cultivo tisular completo.
- Medio de cultivo tisular incompleto.
- Placas de cultivo de 96 pocillos.
- Incubadora de 27°C.

Método

1. Diluir las células a una concentración de 1×10^5 células/ml con medio completo.
2. Mezclar 10 µl de cada dilución viral con 100 µl de la suspensión celular y sembrar en los pocillos de las placas de cultivo. Conviene utilizar 4 filas de pocillos por cada dilución.
3. Incubar las placas a 27°C durante 4-7 días en ambiente húmedo para evitar la desecación de los pocillos.
4. Observar cada pocillo al microscopio y registrar los infectados.
5. Recolectar el medio de los pocillos infectados de las diluciones que originan 10% o menos cantidad de pocillos infectados.

5.2. In vivo

Aunque la utilización de cultivos celulares es probablemente el método más sencillo de manejar, está restringido a un número limitado de especies para las que en la actualidad se dispone de líneas celulares y además existe el riesgo de que se produzcan alteraciones en el ADN viral (KRELL, 1996).

A continuación se exponen dos métodos distintos para la separación *in vivo* de genotipos (Figura 5). La utilización de uno u otro se determinará atendiendo a las características del aislado.

5.2.1. Por dilución limitante de cuerpos de inclusión

Este método, que fue descrito originariamente por Smith y Crook (1988), se basa en la utilización de dosis de OBs muy bajas para la infección de las larvas, de las que se espera una mortalidad de entre 5-20%. La inoculación con estas dosis provoca que la infección de cada larva se origine a partir de una o unas pocas partículas virales, facilitándose la separación de genotipos. Este método es el más sencillo y da buenos resultados para aislados salvajes de SNPVs y GVs, en los que las partículas virales contienen una única nucleocapsida.

Material

- Larvas del huésped natural del virus en estadio avanzado (L₄)
- Suspensión purificada y titulada de OBs (Apartados 3.1 y 4.1, respectivamente)
- Agua bidestilada estéril.
- Dieta artificial (Apartado 2.1.1)
- Cajas de cría individuales.

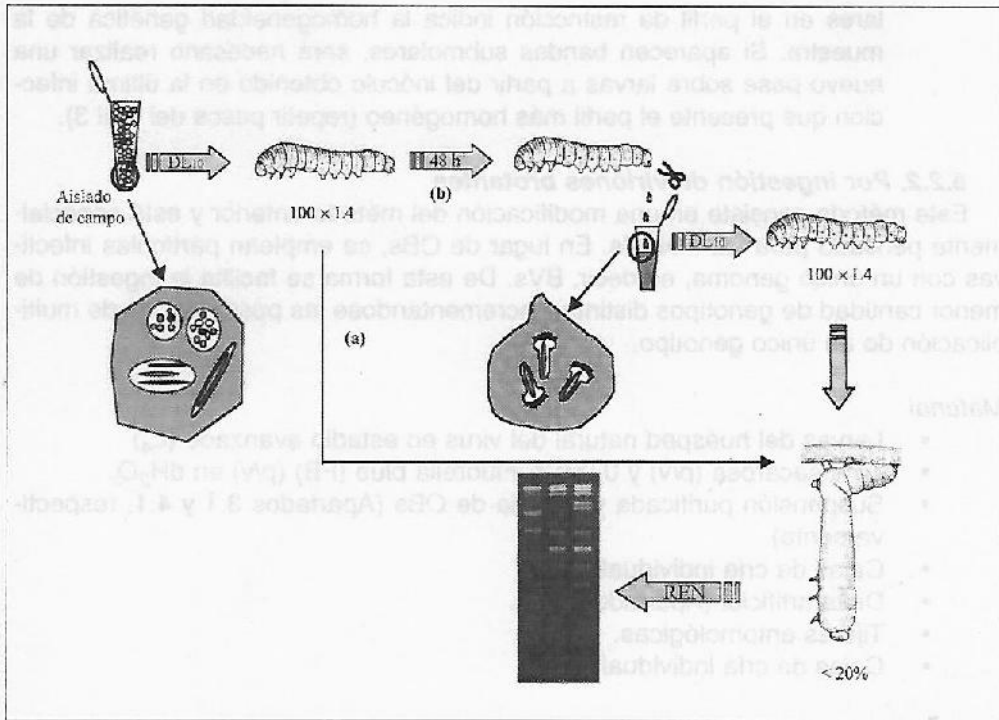


Figura 5. Esquema de un método de clonación *in vivo* de los genotipos presentes en el aislado silvestre de un baculovirus.

Método

1. Infectar un grupo de 100 larvas del huésped en estadio L₄. Este tamaño nos permite obtener posteriormente una cantidad suficiente de ADN viral (3-15 µg) para su análisis con enzimas de restricción. La infección se realiza con una cantidad de inóculo de partida que produzca una mortalidad larvaria de entre el 5 y el 20% sobre trozos de dieta artificial de un tamaño suficientemente pequeño para que sean consumidos en 24 horas aproximadamente.
2. Si la mortalidad larvaria excede del 20% se repite la inoculación. Para determinar la dosis que produce entre un 5 y un 20 % de mortalidad se realiza un ensayo preliminar.
3. Transferir las larvas que consumen toda la dieta infectada después de 24 horas a cajas individuales.
4. Recolectar individualmente en viales los cadáveres de las larvas muertas por la infección para la posterior purificación de los OBs (Apartado 3.1.1). Una parte de los OBs obtenidos (10%) se separan como inóculo para nuevas infecciones. El resto se destina al análisis del ADN viral con enzimas de restricción (Apartados 3.3 y 6.2). La ausencia de bandas submo-

lares en el perfil de restricción indica la homogeneidad genética de la muestra. Si aparecen bandas submolares, será necesario realizar una nuevo pase sobre larvas a partir del inóculo obtenido en la última infección que presente el perfil más homogéneo (repetir pasos del 1 al 3).

5.2.2. Por ingestión de viriones brotantes

Este método consiste en una modificación del método anterior y está especialmente pensado para los MNPVs. En lugar de OBs, se emplean partículas infectivas con un único genoma, es decir, BVs. De esta forma se facilita la ingestión de menor cantidad de genotipos distintos incrementándose las posibilidades de multiplicación de un único genotipo.

Material

- Larvas del huésped natural del virus en estadio avanzado (L_4)
- 10% sacarosa (p/v) y 0,001% Fluorella blue (FB) (p/v) en dH_2O .
- Suspensión purificada y titulada de OBs (Apartados 3.1 y 4.1, respectivamente).
- Cajas de cría individual.
- Dieta artificial (Apartado 2.1.1).
- Tijeras entomológicas.
- Cajas de cría individual.

Método

1. Tomar un pequeño número de larvas (10-20) en estadio L_4 y mantenerlas durante unas 8-12 horas en ayunas. Suministrar por ingestión una dosis alta (DL_{90}) de OBs suspendidos en solución de sacarosa teñida con el colorante fluorella blue (FB).
2. Disponer las larvas que han ingerido el virus en cajas individuales de cría con dieta artificial y mantenerlas en condiciones normales de cría durante 48-72 horas.
3. Extraer hemolinfa de varias larvas seccionándoles una de las falsas patas del último segmento abdominal. Después de 48 a 72 horas de la infección, la hemolinfa contiene grandes cantidades de BVs.
4. Mezclar la hemolinfa rápidamente, para evitar su oxidación, con la solución de sacarosa y FB en la dilución adecuada para producir una mortalidad del 5-10%. Esta dilución será determinada en un ensayo previo realizado con varias diluciones en las mismas condiciones. Si la mortalidad larvaria excede del 20% se repite la inoculación.
5. Infectar un nuevo grupo de 100-200 larvas L_4 utilizando la mezcla de sacarosa y FB siguiendo el mismo procedimiento.
6. Recolectar individualmente los cadáveres de las larvas muertas por la infección y purificar los OBs (Apartado 3.1.1). Una parte de los OBs obtenidos (10%) se guarda como inóculo para nuevas infecciones. El resto se destina al análisis del ADN viral con enzimas de restricción (Apartados 3.3 y 6.2).

La ausencia de bandas submolares en el perfil de restricción, indica la homogeneidad genética de la muestra (Figura 3, Capítulo 4). Si aparecen bandas submolares será necesario realizar una nuevo pase sobre larvas a partir de un inóculo obtenido en la última infección que presente el perfil más homogéneo.

6. Caracterización bioquímica

Los baculovirus se han aislado de cientos de especies de insectos, pero desde que se empezó a determinar su actividad biológica y a observarlos bajo el microscopio electrónico se sabe que no son idénticos. La aparición de técnicas de análisis bioquímico ha permitido definir las diferencias entre los distintos baculovirus a nivel molecular. Estas técnicas se están utilizando ampliamente para la identificación de los distintos aislados (CABALLERO *et al.*, 1992; ESCRIBANO *et al.*, 1999) (ver Capítulo 1), para conocer la composición genotípica de una población (SMITH Y CROOK, 1988; MUÑOZ *et al.*, 1998), etc. Se pueden realizar a nivel de las proteínas estructurales de los virus (CABALLERO *et al.*, 1992; KONDO *et al.*, 1994; ESCRIBANO *et al.*, 1999) y/o a nivel genómico (LEE Y MILLER, 1978), pero debido a la capacidad discriminadora y facilidad de aplicación de las técnicas de análisis del ADN viral, son éstas las más utilizadas en la actualidad, y cada vez hay más voces que apoyan su utilización para la clasificación taxonómica de los baculovirus (FEDERICI Y HICE, 1997).

6.1. Análisis de proteínas estructurales

La electroforesis desnaturante en geles de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) es una herramienta muy útil para el análisis de las proteínas estructurales de los virus. Consiste en la separación por tamaños de los polipéptidos de una muestra al paso de una corriente eléctrica. Las muestras de proteínas (correspondientes a OBs o viriones), previamente desnaturadas por calor en presencia de un agente reductor, adquieren una carga negativa proporcional a su tamaño que les confiere un fuerte detergente aniónico (SDS). Dicha carga permite la separación de los polipéptidos en función de su peso sobre geles discontinuos de poli(acrilamida) (LAEMMELI, 1970). El análisis de muestras de OBs purificadas, da lugar a una banda mayoritaria en el gel cuyo peso molecular de alrededor de 30 kDa, varía ligeramente entre las distintas especies de virus y se corresponde a la poliedrina o granulina (Figura 6). Sin embargo, cuando el análisis se realiza a partir de viriones aparecen entre 15 y 25 bandas de polipéptidos de intensidad variable y pesos comprendidos entre 12 y 100 kDa (HUNTER *et al.*, 1998).

Material

- Equipo de electroforesis (ejemplo: Mini Protean II de Biorad).
- Solución de acrilamida-bisacrilamida: 29% acrilamida (p/v); 1% bisacrilamida.

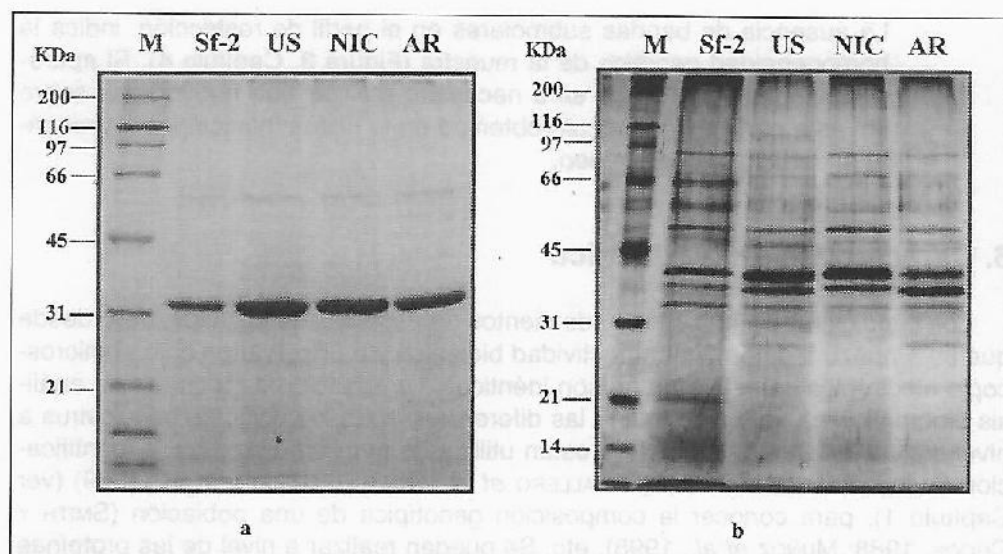


Figura 6. Separación de las proteínas estructurales de un baculovirus mediante un gel SDS-PAGE.

mida (p/v). Precaución: la acrilamida es un potente neurotóxico, es necesario el uso de guantes y mascarilla para su manipulación.

- 3,0 M Tris-HCl, pH 8,8.
- 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8.
- 10% lauryl sulfato sódico (SDS) (p/v).
- Marcadores moleculares (preparado comercial).
- 10% persulfato amónico (APS) (p/v).
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina)
- Tampón de carga: 125 mM-Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS (p/v), 10% glicerol (v/v), 0,001 % azul de bromofenol (p/v) y 5 % 2-mercaptoetanol (v/v).
- Tampón de carrera (10x): 250 mM Tris, 1,92 M Glicina; pH 8,3, 1% SDS (p/v).
- Solución colorante: 0,1% azul brillante de Commassie R (p/v), 10% ácido acético (v/v) y 50% etanol (v/v).
- Solución decolorante: 9,45% etanol y 6,75% ácido acético.
- Gel de apilamiento: 2,5% acrilamida-bisacrilamida; 125mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1 % TEMED y 0,12% APS.
- Gel de separación (Tabla 2).
- Muestra de OBs (Apartado 3.1.) o viriones purificados (Apartado 3.2).
- Papel celofán.

Método

1. Antes de comenzar el montaje de la estructura de soporte de los geles,

Tabla 2. Composición de los geles de resolución según el porcentaje de acrilamida. Las cantidades se muestran en ml.

Reactivo	Tipo de gel	
	12,5%	10%
Acrilamida-bisacrilamida	4,2	3,3
3,0 M Tris-HCl pH 8,8	1,25	1,25
SDS 10%	0,1	0,1
Agua bidestilada	4,6	5,5
APS	0,4	0,4
TEMED	0,06	0,09

limpiar los cristales con etanol para eliminar cualquier impureza. Montar los cristales sobre los soportes de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tener especial cuidado en igualar ambos cristales para evitar posibles fugas de la acrilamida líquida por las esquinas y en la zona de unión con el soporte.

- Preparar la solución de acrilamida para el gel de separación mezclando los reactivos en las cantidades indicadas en la siguiente tabla para las distintas concentraciones de acrilamida y un volumen final de 10 ml.
- Verter la mezcla con ayuda de una pipeta lentamente por el interior de los cristales evitando la formación de burbujas, hasta aproximadamente 1 cm del extremo inferior del peine.

Precauciones: La reacción de polimerización de la acrilamida comienza al añadir el reactivo TEMED, por tanto debe añadirse cuando esté todo preparado para verter la mezcla.

La concentración de poli(acrilamida) que se utilice dependerá del intervalo de tamaño de los polipéptidos que se quieren separar. Se aconseja para un intervalo de entre 16-68 kD geles del 10%, mientras que polipéptidos de tamaños inferiores se resolverán en geles más concentrados (12,5%) (SAMBROOK *et al.*, 1989).

- Cubrir el extremo superior de acrilamida con agua y mantener el gel en posición vertical a T ambiente. La polimerización tiene lugar en 20 ó 30 min. El gel se puede conservar a T ambiente durante varias horas o durante semanas a 4°C.
- Preparar el volumen indicado (ejemplo: 10 ml) de gel de apilamiento.
- Retirar el agua introduciendo pequeños trozos de papel secante entre los cristales hasta llegar a la altura del gel y colocar el peine en su posición.
- Verter la mezcla de acrilamida líquida correspondiente al gel de apilamiento sobre la fase anterior del gel ya polimerizado con ayuda de una pipeta.

Precauciones: evitar la acumulación de burbujas agitando con cuidado el peine.

- Cuando el gel de apilamiento ha polimerizado, montar los geles sobre el

soporte de electroforesis y añadir el tampón de carrera llenando toda el tanque de forma que los pocillos de los geles queden bien cubiertos.

9. Retirar el peine con cuidado y lavar los pocillos varias veces con el tampón de carrera, antes de cargar las muestras de proteínas.
10. Mezclar 2/3 de la muestra de proteínas, bien sean OBs o viriones purificados, con 1/3 de tampón de carga en un vial de 0,5 ml y hervir durante 3 min.
11. Centrifugar las muestras durante 10-20 seg para recuperar el agua condensada en la parte superior de los tubos.
12. Cargar las muestras de proteínas en los pocillos del gel.
13. Cerrar el tanque y conectar de forma conveniente los bornes a la fuente de voltaje. La carrera se realizará a intensidad constante de 40 mA durante aproximadamente 45-60 min. Una vez que el frente llegue al fondo del gel desconectar la fuente de voltaje y desmontar los soportes para recuperar los geles.
14. Introducir los geles durante 10-30 min en un recipiente con solución colorante y mantenerlos en agitación durante este tiempo para asegurar una tinción homogénea.
15. Introducir los geles en un recipiente con solución decolorante y mantenerlos en agitación durante 40-45 min.
16. Colocar el gel entre papel de celofán para su secado. Para asegurarse de que no se deja nada de aire entre el papel y el gel, conviene humedecer el papel antes de la colocación del gel y estirarlo convenientemente con ayuda de un marco de plástico y unas pinzas de enmarcar.

6.2. Análisis de ADN con endonucleasas de restricción

El análisis del genoma viral con endonucleasas de restricción (análisis REN) ha demostrado ser una técnica muy útil y fiable, no sólo para definir las distintas especies de baculovirus (FIGEIREDO *et al.*, 1999) sino también para distinguir entre las distintas cepas (CABALLERO *et al.*, 1992) y genotipos (LEE Y MILLER, 1978) de una misma especie. Las endonucleasas de restricción nos permiten obtener patrones de bandas característicos de cada cepa o genotipo, que posteriormente pueden ser comparados entre sí. El análisis REN nos sirve también para el elaborar los mapas de restricción de los genomas de los baculovirus.

Material

- Endonucleasas de restricción y tampones suministrados por el proveedor. Para digestiones con múltiples endonucleasas, se puede emplear el tampón universal 10 x TA (1M Tris-HCl, pH 7,8; 5 M acetato potásico; 1 M acetato magnésico; 0,1 M espermidina; 0,1 M DTT).
- Equipo de electroforesis.
- Agarosa.
- TAE: 40 mM Tris-acetato, pH 8,0; 1 mM EDTA.

- Tampón de carga 6 x [0,25% azul de bromofenol; 40% sacarosa (p/v)].
- 1 mg/ml bromuro de etidio.

Método

1. Mezclar 0,5-2 µg ADN con 5 unidades de una determinada endonucleasa de restricción, y 1/10 vol. del tampón. Llevar el volumen total de la digestión hasta 20 µl con dH₂O e incubar durante 4-24 h a la temperatura adecuada (normalmente 37°C).
2. Preparar un gel de agarosa de entre 0,6-0,8% en TAE y añadir 25 µg/ml de bromuro de etidio, dejar solidificar e introducirlo en una cubeta de electroforesis con TAE.
3. Detener la reacción de digestión del ADN añadiendo 1/6 vol. de tampón de carga.
4. Cargar las muestras en los pocillos del gel de agarosa, y aplicar el voltaje adecuado. Para obtener buenos perfiles de ADN genómico viral se aplica un voltaje de entre 20 y 60 voltios (dependiendo del tamaño de la cubeta de electroforesis) durante una noche.

7. Caracterización biológica

Mediante la realización de bioensayos es posible cuantificar la actividad biológica de los baculovirus como una respuesta del huésped en términos de mortalidad, fecundidad, desarrollo, etc. en donde se involucran la dosificación del patógeno, administración de la dosis y el registro de la respuesta negativa o positiva en un tiempo determinado (ROBERTSON Y PRESILIER, 1992; HUGHES Y WOOD, 1987).

7.1. Métodos de inoculación

La actividad biológica de una cepa de virus se puede determinar utilizando distintos métodos de inoculación. La forma en que se realiza la infección depende de los hábitos de la especie de insecto sobre la que se experimenta y la disponibilidad del material requerido. Se determina previamente el huésped y el tamaño más adecuado según los parámetros a evaluar. Aunque hay baculovirus con un espectro de huéspedes muy restringido, existen otros que pueden infectar a un número de especies más o menos amplio, por lo que el huésped sobre el que se decida determinar la actividad biológica del virus puede ser bien su huésped natural o alguna de las especies susceptibles al mismo. Es habitual utilizar larvas de los primeros estadios, por ser en la práctica el tamaño más adecuado para la aplicación de un bioinsecticida. Las concentraciones del producto viral se preparan por dilución de la obtenida en la titulación.

7.1.1. Inoculación de Hughes y Wood

Este método, originariamente descrito por Hughes y Wood (1981), se basa en

la infección *per os* de larvas que se han mantenido en ayunas durante un breve periodo de tiempo. La gran ventaja que ofrece este método es que la dosis se ingiere en un breve espacio de tiempo, lo cual es de especial importancia a la hora de calcular parámetros de tiempo. Además, mediante la utilización de un colorante alimenticio, se comprueba que las larvas han ingerido la dosis. Los resultados de mortalidad obtenidos nos permiten calcular la CL_{50} , DL_{50} y el tiempo medio para morir. El volumen ingerido por las larvas debe conocerse para el cálculo de la DL_{50} . Este volumen puede estimarse utilizando una suspensión marcada con ^{32}P (HUGHES & WOOD, 1981).

Material

- Larvas del huésped en el mismo estadio.
- El inóculo viral titulado (Apartado 5.1).
- Solución mezcla: colorante alimenticio 0,001% FB (p/v) y 10% sacarosa (p/v).

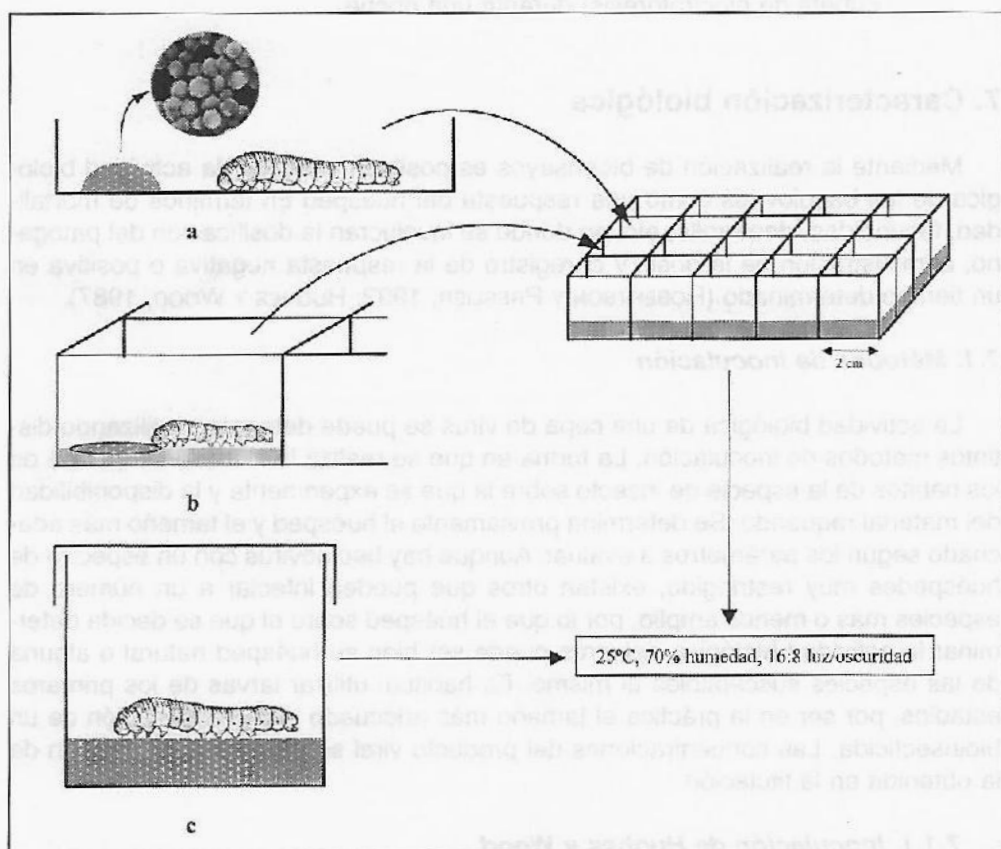


Figura 7. Esquema de los métodos de bioensayo propuestos.

Tabla 3. Dosis y concentraciones suministradas a larvas de segundo estadio de *S. exigua*, que ingieren 0,3 µl según el cálculo de Smits (1987).

Concentración (OBs/ml)	Dosis (OBs/larva)
10^4	3
$3 \cdot 10^4$	9
$9 \cdot 10^4$	27
$27 \cdot 10^4$	81
$81 \cdot 10^4$	243

- Cajas de Petri.
- Cajas de Petri cuadradas de 25 compartimentos individuales.
- Pinceles y pinzas entomológicas.

Método

1. Seleccionar un lote de larvas del huésped en la premuda de L₁ a L₂, y mantenerlas en ayunas de 6 a 8 horas antes de la infección.
2. Infectar las larvas colocándolas en grupos de 25 a 30 en placas circulares de Petri donde se dispone el inóculo en pequeñas gotas, preparando tantas cajas de este tipo como dosis a evaluar para cada inóculo (Figura 7). Las distintas dosis del inóculo viral se preparan por dilución acuosa del inóculo de partida al que se añade un 10% de la mezcla de sacarosa con el colorante. Para el cálculo de las dosis ingeridas (OBs/larva) debemos tener en cuenta el volumen de ingestión de cada especie y cada estadio larvario (Tabla 3).
3. Disponer las larvas infectadas en cajas de plástico transparente con compartimentos individuales que contienen dieta artificial para su alimentación durante los días de observación. Una vez que las larvas han ingerido el inóculo adquieren un color azulado que nos permite desechar las no infectadas.
4. Las larvas se mantienen a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y los datos de mortalidad se registran cada ocho horas, si se quiere determinar el tiempo medio para morir, o cada 12 ó 24 para determinar la CL₅₀ ó DL₅₀.

7.1.2. Inoculación en superficie

Este método puede ser empleado para estimar la DL₅₀ y la CL₅₀. En el primer caso, la dosis es proporcionada en una cantidad de dieta que es ingerida en su totalidad (caso A); en el segundo, la concentración es aplicada sobre una superficie determinada de la dieta que no es consumida en su totalidad (caso B).

Material

- Larvas del huésped del estadio seleccionado.

- Dieta semisintética adaptada a la especie.
- Contenedores (ejemplo: vasos pequeños, placas Petri con 25 compartimentos).
- Pinceles y pinzas entomológicas.
- Agua bidestilada.
- Suspensiones purificadas y tituladas de OBs (Apartados 3.1 y 4.1, respectivamente). Las concentraciones del producto viral se prepararán por dilución de la obtenida en la titulación.

Caso A

Debido a que el presente método tiene como fundamento determinar la concentración ingerida por el huésped, sólo podrán ser consideradas dentro del bioensayo las larvas que hayan consumido la totalidad del inóculo viral en un periodo de 24 h.

Método

1. Colocar en cada compartimiento una pastilla de dieta que pueda soportar una gota de suspensión viral (ejemplo: 1 μ l para larvas L₂) y que pueda ser ingerida en un periodo de 24 h.
2. Inocular la pastilla de dieta.
3. Colocar una larva por celda.
4. Incubar a $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ durante 24 h. Las larvas que no hayan ingerido la totalidad de la dieta deben ser eliminadas del bioensayo.
5. Cambiar las larvas en contenedores provistos con dieta nueva y en donde las larvas mueran o puedan completar su desarrollo.
6. Mantener las larvas a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; los datos de mortalidad deben ser registrados cada 8 horas, si se quiere determinar el TL₅₀, o cada 12 ó 24 para determinar la CL₅₀ ó DL₅₀, hasta el cese de la mortalidad por virus.

Caso B

1. Verter una cantidad conocida de dieta en cada celda de los contenedores, o bien, sobre una placa individual (ejemplo: cajas Petri).
2. Inocular homogéneamente la concentración del virus sobre toda la superficie de la dieta (este paso puede ser auxiliado con el uso de asas de platino o de vidrio).
3. Secar al aire hasta que la concentración aplicada se haya absorbido totalmente.
4. Colocar una larva por compartimento.
5. Mantener las larvas a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; los datos de mortalidad deben ser registrada cada 8 horas, si se quiere determinar el TL₅₀, o cada 12 ó 24 para determinar la CL₅₀ ó DL₅₀, hasta el cese de la mortalidad por virus.

7.1.3. Inoculación por incorporación en dieta

La inoculación de virus en dieta es una técnica comúnmente utilizada para la multiplicación de virus. Sin embargo, en algunas especies que penetran en la dieta para alimentarse se emplea rutinariamente para la determinación de la DL_{50} y la CL_{50} .

Material

- Larvas del huésped del estadio seleccionado.
- Ingredientes para la elaboración de la dieta semisintética (véase Apartado 2.1.1).
- Contenedores (ejemplo: vasos pequeños, placas Petri con 25 compartimentos).
- Pinceles y pinzas entomológicas.
- Agua bidestilada.
- Suspensiones purificadas de OBs (Apartado 2). Las concentraciones del producto viral se prepararán por dilución de la obtenida en la titulación.

Método

1. Incorporar los ingredientes de la dieta de acuerdo al protocolo especificado.
2. Mezclar la dieta y enfriar a una temperatura de 45°C .
3. Incorporar el inóculo viral y mezclar homogéneamente.
4. Verter rápidamente la dieta a los compartimentos donde serán confinadas las larvas. Precaución: enfriar la dieta preferentemente varias horas antes de colocar las larvas.

DL_{50}

1. Cortar un volumen determinado de la dieta inoculada y transferirla a un contenedor limpio.
2. Colocar la larva y dejarla que se alimente por un periodo determinado de tiempo (según la especie y el estadio utilizado).
3. Cambiar la larva a un contenedor con dieta limpia hasta el cese de la mortalidad por virus.
4. Mantener las larvas a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y registrar los datos de mortalidad (cada 8 horas, para determinar el tiempo medio para morir).

CL_{50}

1. Verter un volumen conocido de la dieta inoculada por compartimento.
2. Colocar una larva y mantenerla en el mismo contenedor hasta el cese de la mortalidad por virus.
3. Mantener las larvas a una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y registrar los datos de mortalidad (cada 8 horas, para determinar el tiempo medio para morir).

7.1.4. Inoculación en sustrato vegetal

Este método de bioensayo se basa en la utilización de discos de hoja de planta impregnados en una solución de OBs y se basa en el publicado por Iriarte *et al.* (1998). El insecto ingiere el virus mezclado con la dieta artificial. Los resultados de mortalidad obtenidos se utilizarán para estimar la CL_{50} .

Material

- Material vegetal (ejemplo: hojas de lechuga).
- Sacabocados.
- Recipiente con hielo.
- Servilletas de papel absorbente.
- Mojanete agrícola tipo B (Ert Fitos).
- Pinzas y pinceles entomológicos.
- Larvas recién mudadas, mantenidas en ayunas durante unas 8 horas.
- Pinceles.
- Cajas Petri cuadradas de 25 celdillas.
- 3% agar (p/v).
- Suspensión acuosa titulada de OBs.
- Solución acuosa sin virus que servirá como testigo negativo.

Método

1. Fundir el agar y dispensarlo mediante un embudo en las cajitas Petri, poniendo en cada celdilla una capa de unos 3 mm de espesor, que servirá como fuente de humedad. Dejar enfriar.
2. Preparar las correspondientes diluciones seriadas de OBs con razón constante, de tal forma que suministremos a cada bloque de larvas la dosis requerida.
3. Añadir el mojanete agrícola al 0,005% (v/v), con el fin de disminuir la tensión superficial y permitir la total impregnación de los discos. Agitar bien.
4. Deshojar la lechuga y lavar las hojas en un vaso de precipitados grande. Dejar a remojo una media hora con dos o tres gotas de lejía. Aclarar bien con agua corriente y una vez con agua destilada. Sobre unas servilletas de papel cortar los discos de lechuga con el sacabocados. Para evitar que se marchiten durante la realización del bioensayo, es conveniente conservar los discos húmedos y sobre una bandeja con hielo.
5. Sumergir con unas pinzas de punta fina los discos de lechuga en las suspensiones virales, escurrirlos y colocarlos individualmente en los pocillos sobre la superficie de agar. Dejar secar.
6. Introducir una larva en cada una de las celdillas de las cajas de 25 compartimentos, con ayuda de un pincel.
7. Cerrar las cajitas con dos servilletas absorbentes dobladas y la correspondiente tapa, y fijar con cinta adhesiva.
8. Incubar durante el tiempo necesario en condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo y humedad relativa y registrar la mortalidad a intervalos de tiempo regulares.

7.2. Determinación del espectro de huéspedes

La determinación del espectro de huésped se realiza mediante bioensayo inoculando las especies que se sospecha pueden ser susceptibles a un baculovirus concreto. Generalmente se utilizan especies próximas, del mismo género o familia, a la especie de la que se aisló originariamente el baculovirus, pero también pueden utilizar especies que convivan en el mismo hábitat y que tengan algún interés agro-nómico, bien por ser plagas o sus enemigos naturales. El método de inoculación a utilizar puede ser cualquiera de los descritos en el Apartado 7.1. Puesto que el grado de susceptibilidad de las distintas especies a un mismo baculovirus puede variar considerablemente (BLACK *et al.*, 1997), se recomienda utilizar dosis muy altas de virus, que permitan detectar el desarrollo de una infección en especies con baja susceptibilidad a un determinado baculovirus. También es recomendable hacer ensayos en distintos estadios larvarios, ya que la susceptibilidad suele ser mucho mayor en los estadios más jóvenes (ESCRIBANO *et al.*, 1999).

Material

- Larvas de las distintas especies en diferentes estadios.
- Suspensión de OBs.
- Cajitas de bioensayo.
- Pinceles, pinzas y servilletas de papel.

Método

1. Suministrar la suspensión viral a las larvas según el método de bioensayo elegido (Apartado 7.1).
2. Realizar el control de la mortalidad hasta que todas las larvas hayan muerto o pupado.

7.3. Determinación de la productividad y peso de las larvas

La productividad o cantidad de progenie viral que es capaz de generar un baculovirus, expresada en OBs/larva, y la incidencia del proceso infeccioso en el peso del insecto son parámetros que también pueden medirse mediante bioensayo. La determinación de la productividad de una cepa de baculovirus está en relación directa con su capacidad para originar una epizootia en campo, y es una característica muy importante a la hora de diseñar el proceso industrial de producción de un insecticida a base de baculovirus.

Material

- Balanza de precisión de 4 dígitos decimales (Sartorius BP61S).
- Pinzas entomológicas.
- Larvas en el mismo estadio larvario.
- Suspensión de OBs.
- Cámara de conteo (Apartado 4.1).

- Cajitas cilíndricas individuales de 3 cm de diámetro.
- Dieta semisintética.

Método

1. Registrar el peso de las larvas a ensayar. Calcular la media y seleccionar aquellas cuyo peso quede comprendido entre $\bar{X} \pm 2 \sigma$.
2. Suministrar a cada grupo de 50 larvas, según el método más conveniente (Apartado 7.1), la dosis elegida. Como testigo se toma un grupo de larvas que se inocula con una suspensión sin virus.
3. Registrar el peso de las larvas cada 24 horas.
4. Tomar al azar 20 cadáveres larvarios de cada grupo y resuspender, cada uno de ellos, en 300 μ l de dH_2O .
5. Purificar los OBs (Apartado 3.1.1) y titular la suspensión realizando, al menos, tres repeticiones.

8. Bibliografía

- ASAYAMA, T. 1986. *Pathology and morphology of granulosis virus of the diamond-back moth*, p. 205. En: Talekar (ed.), *Diamondback Moth Management, Proceedings of the First International Workshop Tainan, Taiwan, 11-15 March 1985*.
- BENZ, G.A. 1963. *Nuclear polyhedrosis of Malacosoma alpicola (Staudinger)*. J. Insect. Pathol. **5**:215-222.
- BLACK, B.C., L.A. BRENNAN, P.M. DIERKS Y I.E. GARD. 1997. *Commercialization of baculoviral insecticides*, p. 341-387. En: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses*. Plenum Press, Nueva York, Estados Unidos.
- CABALLERO, P., D. ZUIDEMA, C. SANTIAGO-ÁLVAREZ Y J.M. VLAK. 1992. *Biochemical and biological characterization of four isolates of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*. Biocontrol Sci. Technol. **2**:145-157.
- CORY, J.S. Y D.H.L. BISHOP. 1997. *Use of Baculoviruses as biological insecticides*. Molecular Biotechnology. **7**:303-313.
- ESCRIBANO A., T. WILLIAMS, D. GOULSON, R.D. CAVE, J.W. CHAPMAN Y P. CABALLERO. 1999. *Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas*. J. Econ. Entomol. **92** (5):1080-1085.
- EVANS, H.F. 1986. *Ecology and epizootiology of baculoviruses*, p. 89-132. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses*, Vol II. CRC Press. Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- EVANS, H. Y M. SHAPIRO. 1997. *Viruses*, p. 17-53. En: L.A. Lacey (ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press San Diego, California, Estados Unidos.
- FARRAR, R.R. Y R.L. RIDGWAY. 1998. *Quantifying time-mortality relationships for nuclear polyhedrosis viruses when survivors are present*. Environ. Entomol. **27**(6):1289-1296.

- FEDERICI B.A. Y R.H. HICE. 1997. *Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of the Anagrapha falcifera multinucleocapsid NPV*. Arch. Virol. **142**:333-348.
- FIGUEIREDO, E., D. MUÑOZ, A. ESCRIBANO, A. MEXIA, J.M. VLAK Y P. CABALLERO. 1999. *Biochemical identification and comparative insecticidal activity of nucleopolyhedrovirus isolates pathogenic for Heliothis armigera (Lep., Noctuidae) larvae*. J. Appl. Ent. **123**:165-169.
- FINNEY, J.D. 1971. *Probit Analysis*. London: Cambridge University Press, Reino Unido.
- GRANADOS, R.R. Y K.A. WILLIAMS. 1986. *In vivo infection and replication of baculoviruses 2:89-208*. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses*, CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- HINK, W.F. Y P.V. VAIL. 1973. *A plaque assay for titration of alfalfa looper nuclear polyhedrosis virus in a cabbage looper TN-368 cell line*. J. Invertebr. Pathol. **22**:168-174.
- HUGHES, P.R. Y H.A. WOOD. 1981. *A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses*. J. Invertebr. Pathol. **37**:154-159.
- HUGHES, P.R. Y H.A. WOOD. 1987. *In vivo and in vitro bioassay methods for Baculoviruses*, p. 1-30. En: R. R Granados y B. A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses*, Vol II. CRC Press. Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- HUNTER, F., F.P. ENTWISTLE, H.F. EVANS Y N.E. CROOK. 1998. *Insect viruses and Pest Management*. John Wiley & Sons. Nueva York, 620 p. Estados Unidos.
- IRIARTE, J., Y. BEL, M.D. FERRANDIS, R. ANDREW, J. MURILLO, J. FERRÉ Y P. CABALLERO. 1998. *Environmental distribution and diversity of Bacillus thuringiensis in Spain*. System Appl. Microbiol. **21**:97-106.
- KELLY, P.M. Y P.F. ENTWISTLE. 1988. *In vivo mass production in the cabbage moth (Mamestra brassicae) of a heterologous (Pannolis) and a homologous (Mamestra) nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. Methods. **19**:249-256.
- KING, L.A. Y R.D. POSSEE. 1992. *The baculovirus expression system: A laboratory guide*. Chapman & Hall, Londres, Reino Unido.
- KOOIJMAN, M. 1997. *Functional analysis of AcMNPV ORF119 and construction of a SeMNPV insertional mutant in the ORF119 locus using fluorescent protein as a marker*. M. Sc. thesis, Wageningen Países Bajos.
- KONDO, A., M. YAMAMOTO, S. TAKASHI Y S. MAEDA. 1994. *Isolation and characterization of nuclear polyhedrosis viruses from the beet armyworm Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) found in Shiga, Japan*. App. Entomol. Zool. **29(1)**:105-111.
- KRELL, P.J. 1996. *Passage effect of virus infection in insect cells*, p. 125-137. En: J.M. Vlak, C.D. de Gooijer, J. Tramper y H.G. Miltenburger (ed.), *Insect cell cultures: fundamental and applied aspects*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos.
- LACEY, L.A. Y W.M. BROOKS. 1997. *Initial handling and diagnosis of diseased insects*, p. 1-10. En: L.A. Lacey (ed.), *Manual of techniques in insect pathology*. Academic Press, San Diego, California, Estados Unidos.

- LAEMMELI, U.K. 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4*. Nature **227**:680-785.
- LEE, H.H. Y L.K. MILLER. 1978. *Isolation of genotypic variants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **27**:754-767.
- MOORE, R. F. 1985. Artificial diets: *Development and improvement*. En: P. Singh y R. F. Moore (eds.), Handbook of insect rearing. Elsevier, Amsterdam, Países Bajos.
- MUÑOZ, D., J.I. CASTILLEJO Y P. CABALLERO. 1998. *Two naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a Spodoptera exigua Nucleopolyhedrovirus strain*. Appl Environ. Microbiol. **64**:4372-4377.
- MUÑOZ, D., R. MURILLO, P. KRELL, J.M. VLAK Y P. CABALLERO. 1999. *Four in vivo cloned genotypic variants of a Spodoptera exigua Nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region*. Vir. Res. **59**:61-79.
- O'REILLY, D.R., L.K. MILLER Y V.A. LUCKOW. 1992. *Baculovirus expression vectors*. A laboratory manual. Oxford University Press, London, Reino Unido.
- ROBERTSON, J.L. Y H.K. PRESLIER. 1991. *Pesticide bioassays with arthropods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, Estados Unidos.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH Y T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, Estados Unidos.
- SHAPIRO, M., R.A. BELL Y C.D. OWENS. 1981. *In vivo mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus*, p. 633-655. En: C.C. Done y M.L. McManus (ed.), The gypsy moth: research toward integrated pest management, USDA Technical Bulletin, Washington, DC. Estados Unidos.
- SHAPIRO, M., J.L. ROBERTSON Y R.T. BELL. 1986. *Quantitative and qualitative differences in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) nucleopolyhedrosis virus produced in different-aged larvae*. J. Econ. Entomol. **79**:1174-1177.
- SMITH, I.R.L. Y N.E. CROOK. 1988. *In vivo isolation of baculovirus genotypes*. Virology **166**:240-244.
- SMITS, P.H. 1987. *Nuclear polyhedrosis virus as biological control agent of Spodoptera exigua*. Tesis doctoral. Wageningen Agricultural University. Wageningen, Países Bajos.
- VOLKMAN, L.E., M.D. SUMMERS Y C.M. HSIEH. 1976. *Occluded and nonoccluded nuclear polyhedrosis virus grown in Trichoplusia ni: Comparative neutralization, comparative infectivity, and in vitro growth studies*. J. Virol. **19**:820-829.
- WIGLEY, P.J. 1980. *Practical: Counting microorganisms*, p. 29. En: J. Kalmakoff y J.F. Longworth (ed.), Microbial control of insect pest, New Zealand Department of Science and Industrial Research Bulletin 228. Wellington, Nueva Zelanda.