USO DE BACULOVIRUS COMO ALTERNATIVA DE CONTROL BIOLOGICO DE *Spodoptera frugiperda* EN EL CULTIVO DEL MAIZ: UNA REVISIÓN CONCEPTUAL Y DE AVANCES EN SU APLICACIÓN

LUDY MARCELA QUINTER RUIZ

Cod. 52962238

UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y DEL MEDIO AMBIENTE

ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA AGRARIA

VILLAVICENCIO

2015

USO DE BACULOVIRUS COMO ALTERNATIVA DE CONTROL BIOLOGICO DE *Spodoptera frugiperda* EN EL CULTIVO DEL MAIZ: UNA REVISION CONCEPTUAL Y DE AVANCES EN SU APLICACIÓN

LUDY MARCELA QUINTER RUIZ

Cod. 52962238

Monografía

Asesor

Alberto Castellanos Riveros

MVZ.Esp.MSC Microbiología

UNIVERSIDAD ABIERTA Y A DISTANCIA

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y DEL MEDIO AMBIENTE
ESPECIALIZACION EN BIOTECNOLOGIA AGRICOLA
VILLAVICENCIO
2015

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE ILUSTRACIONES 4

1. INTRODUCCION 5

2. DEFINICION DEL PROBLEMA. 6

3. JUSTIFICACION. 8

4. OBJETIVOS 9

4.1 Objetivo general 9

4.2 Objetivos específicos 9

5. MARCO DE REFERENCIA 10

5.1 Nucleopoliedrovirus, contexto global 10

5.2 *Spodoptera frugiperda* 16

5.3 Clasificación de los Nucleopolihedrovirus 17

5.4 Estructura de los Nucleopoliedrovirus 18

5.5 Cuerpos de oclusión 20

5.6 Estructura de los viriones ocluidos 21

5.7 Estructura de los viriones brotantes 22

5.8 Estructura de la Nucleocapside 23

5.9 Ciclo de infección 25

5.9.1 Infección primaria 27

5.9.2. Infección secundaria. 28

5.10 Producción de Nucleopoliedrovirus 30

2.10.1 Producción de Nucleopoliedrovirus en insectos 30

5.10.2 Producción masiva de virus 30

5.10.3 Producción de nucleopoliedrovirus en cultivos celulares 31

5.11 Clases de formulaciones 37

5.11.1. Formulaciones con protección de luz ultra violeta 38

5.11.2 Determinación de la estabilidad en condiciones de almacenamiento 39

6 CONCLUSIONES 42

7 BIBLIOGRAFIA 43

TABLA DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Comparación entre las estructuras de los fenotipos virales NPV 19
Ilustración 2. Componentes proteicos de un virion ocluido. ODV-E: Proteinas de envoltura ODV. Factores de infección per os PIF/P74/Ac145/Ac150.....22
Ilustración 3. Esquema base de la morfología de los OBs de los Nucleopolihedrovirus. OBs con nucleocapside multiple y nucleocapside simple 24
Ilustración 4. Infección del Nucleopolihedrovirus sobre lepidopteros. Ingesta de los OBs y disolución de estos en el intestino medio. 26
Ilustración 5. Liberación de OBs al intestino 29
Ilustración 6.Diagarma del establecimiento de un cultivocelular primario de diferentes tejidos de insectos de lepidóptera.....32
Ilustración 7. Representación esquemática de la producción de OBs de Baculovirus en cultivos celulares de insectos.....35

1. INTRODUCCION

Una de las plagas de mayor importancia económica en el país es el gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Teniendo en cuenta que estas larvas o gusanos pueden alimentarse de 28 especies vegetales cultivadas, entre las cuales se destacan el maíz, sorgo, algodón, soya, higuerilla, tomate de huerta, caña de azúcar, ajonjolí, arroz, maní, melón y girasol. Prefiere para su alimentación a las gramíneas, cultivadas o no, causando pérdidas elevadas a los cultivos, ante todo, cuando sus poblaciones logran altos niveles durante las épocas de verano (Fernández, 2002).

Actualmente una de las formas más comunes de controlar plagas en los diferentes cultivos se realiza mediante la aplicación de agroquímicos; practica que ha permitido mantener poblaciones de plagas en niveles tolerables y reducir el daño que reducen el rendimiento del cultivo. Sin embargo el uso indiscriminado ha generado problemas de contaminación del suelo y fuentes hídricas. Además se eliminan los enemigos naturales de insectos y hongos secundarios que ante la ausencia de sus reguladores naturales pueden convertirse en plagas de importancia económica.

En Colombia, no existen estadísticas referentes a pérdidas confiables causadas por el insecto, pero en maíz tecnificado, se considera que un 5,6% a un 10% de los costos de producción corresponden al control químico de la plaga (URPA, citado por Polania *et al*. 2009).

Una de las alternativas frente al control de *Spodoptera frugiperda* es el uso de insecticidas biológicos como la bacteria *Bacillus thuringiensis* y los virus entomopatógenos como los Baculovirus.

La presente monografía recopila y destaca experiencias realizadas frente al uso de nucleopolihedrovirus como controlador biológico de *Spodoptera frigiperda,* teniendo en cuenta que los nucleopolihedrovirus son un grupo de virus entomopatógenos miembros de la familia Baculoviridae, los cuales se han aislado exclusivamente de artrópodos y principalmente de insectos. Los baculovirus se han utilizado de manera extensiva para el control biológico de diferentes plagas del orden lepidóptera a nivel mundial (Szewczyk *et al*., 2011), con excelentes resultados.

En América Latina, se han realizado diversos trabajos evaluando cepas de Nucleopolihedrovirus de *S. frugiperda* (Sf NPV) contra poblaciones del gusano cogollero *S. frugiperda,* se han evaluado cepas toxicas de Sf NPV aisladas en distintas regiones del Continente Americano, frente poblaciones españolas del gusano cogollero (Escribano et al., 1999). En Colombia, se ha evaluado la efectividad, a nivel de laboratorio y en algunos casos a nivel de campo, de aislamientos de Sf NPV nativos, con resultados alentadores, debido a que el gusano cogollero muestra elevada susceptibilidad a los diferentes aislamientos nativos(Gómez e*t al.,* 2010)

La realización del presente trabajo contó con la revisión bibliográfica de revistas indexadas durante un tiempo de aproximado de 4 meses, en su mayoría de años resientes y la revisión continúa por parte del asesor asignado.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA.

Para el manejo de *S. frugiperda* se debe monitorear su presencia en forma cuidadosa, teniendo en cuenta que el insecto se puede pasar de un cultivo a otro y que los pastos y las socas siempre albergan poblaciones peligrosas para el siguiente cultivo principalmente en las gramíneas, como maíz y sorgo, ya que la

presencia de esta plaga se considera endémica, es decir siempre existen poblaciones que causan daño en mayor o menor proporción al cultivo. En algunas ocasiones se hacen necesarios controles continuos y son poco exitosos por las altas poblaciones y tolerancia o resistencia del insecto a los productos químicos usados. (Zenner de Polanía *et al*, 2007).

Actualmente los productos orgánicos agrícolas han tenido gran acogida en el mercado nacional y extranjero, sugiriendo la transformación en la producción de cultivos, permitiendo la introducción de tratamientos biológicos dentro del manejo integrado de plagas.

El uso de hongos y bacterias entomopatógenos se ha implementado para un efectivo manejo en el control de plagas, sin embargo se hace necesario encontrar nuevas alternativas que permitan aumentar el uso de controles biológicos, que no atenten contra el medio ambiente, permitiendo la producción de alimentos orgánicos y mantener la rentabilidad de los cultivos.

La bacteria entomopatogena *Bacillus thuringiensis* ha sido reconocida ampliamente por su efectividad en el control de *S. frugiperda* y otros lepidópteros. Tal efectividad llevo a que grandes multinacionales desarrollaran de manera biotecnológica nuevas plantas capaces de contener dentro de su ADN el gen codificante de las proteínas Cry propia de la bacteria (proteína insecticida). Sin embargo hoy en día en Colombia se han reportado casos de cultivos de maíz y algodón transgénico siendo atacado por *S. frugiperda* (Zenner de Polanía *et al*. 2007). Aunque no es del todo claro la explicación a este suceso es necesario conocer y trabajar en nuevas tecnologías que permitan mantener un control efectivo sobre esta plaga.

Colombia ha venido desarrollando trabajos que permiten el desarrollo de productos a base de baculovirus que permiten también contribuir en el manejo de plagas.

Estos estudios han sido enfocados básicamente a lepidópteros en el cultivo de papa para *Tecia solanivora* y *Phtorimeae operculella* y en maíz para *Spodoptera frugiperda.*

Teniendo en cuenta lo anterior el propósito de esta monografía es recopilar información acerca de investigaciones previas de carácter nacional y extranjero frente al uso de los nucleopoliedrovirus, y su efectividad como controlador biológico del género lepidóptera, específicamente *S.furgiperda* en el cultivo del maíz. Esto con miras a contribuir con información específica, en la construcción de una alternativa efectiva y altamente amigable con el ambiente, como lo es el desarrollo y uso de productos que cuentan con ingredientes biológicos como principio activo, en este caso, como el baculovirus en el control de *S.frugiperda* en maíz.

3. JUSTIFICACION.

En los últimos años en Colombia se ha despertado un creciente interés por desarrollar métodos sostenibles y amigables con el ambiente para el control de plagas de interés económico como el caso de *S. frugiperda* en maíz. Dicho interés ha generado la necesidad de evaluar el potencial insecticida de distintas materias activas que puedan tener cabida en programas de manejo integrado.

Una de las alternativas más prometedoras frente al control químico, lo constituye el baculovirus, concretamente el nucleopoliedrovirus, que habitualmente causa epizootias o muerte en un número inusual de poblaciones larvarias de algunos insectos principalmente lepidópteros y hemípteros (Gómez *et al*., 2010). En el siguiente trabajo se pretende hacer una revisión bibliográfica del uso de Nucleopolihedrovirus como controlador de lepidópteros especialmente de

Spodoptera frugiperda en el cultivo del maíz y los avances recientes que han contribuido al desarrollo de este como bioinsecticida.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar una revisión bibliográfica de los Nucleopolihedrovirus (Virus entomopatógenos) como herramienta en el control de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo del maíz, identificando los mecanismos de acción en el insecto hospedero y formas de producción in vivo e invitro de los nucleopolihedrovirus.

4.2 Objetivos específicos

Comprender los mecanismos de infección del baculovirus, mediante los cuales se ejerce el control biológico en insectos principalmente en el género lepidóptera.

Conocer experiencias realizadas a nivel mundial en el uso de nucleopoliedrovirus, y su efectividad para el control de plagas como *S. frugiperda* en maíz.

Conocer algunos métodos de producción de baculovirus de manera in vitro e in vivo junto con algunos parámetros ambientales a tener en cuenta para iniciar un proceso de producción de baculovirus.

5. MARCO DE REFERENCIA

5.1 Nucleopoliedrovirus, contexto global

Los baculovirus son un grupo de diversos virus específicos que infecta solo invertebrados, particularmente insectos, aunque también se propagan en camarones. Poseen genomas circulares de DNA de doble cadena superenrrollado que varía en tamaño de 88 a 200 KPB, empacados en una cápside proteica en forma de bastón, la cual a su vez está envuelta en una unidad de membrana y su replicación ocurre principalmente en el núcleo (Levy et al. 1994; O'Reilly et al. 1994; citado en Ojeda, 2002).

Según la forma y estructura los cuerpos de inclusión (OBs por sus siglas en inglés) de los baculovirus, estos se clasifican en nucleopoliedrovirus (NPV) y granulovirus (GV) (Caballero et al, 2001 citado en Villamizar et al., 2012). Los cuerpos de oclusión (OBs) son estructuras cristalinas constituidas principalmente por poliedrina o granulina (según el género baculoviral), dentro de los cuales se encuentran los virus ocluidos (OVD) (Rios et al., 2012)

Los NPV se caracterizan por su forma poliedral y por formar múltiples viriones por cuerpo de oclusión (OBs), que a su vez pueden tener una o varias nucleocapsides, por los que se clasifican en simples (SNPV) o múltiples (MNPV). Estos virus se replican en el núcleo de las células de varios tipos de tejidos (poliorganotrópicos), incluida la epidermis de las larvas afectadas en donde se producen millones de partículas virales que son diseminadas al ambiente después de la muerte del insecto. Por su parte los granulovirus se caracterizan por su forma granular y por tener viriones de tipo simple, los cuales están incluidos individualmente en los OBs y su patología es muy similar a la ocasionada por los NPV de acuerdo con el tipo de aislamiento (Possee *et al.,* 2010 citado en Villamizar *et al*., 2012).

Cuando un huésped susceptible se alimenta de follaje contaminado con OBs, los viriones son liberados debido a que la proteína de los OBs se disuelve por el pH alcalino (8-11) que prevalece en el intestino del insecto. Los viriones derivados de los OBs infectan a las células epiteliales del intestino medio para iniciar el primer ciclo de replicación o infección primaria (Possee *et al.,* 2010 citado en Martínez *et al* 2012). Alternativamente, algunas nucleocápsides atraviesan el citoplasma y sin pasar por el núcleo, se dirigen a la zona basal. Las nucleocápsides atraviesan la membrana celular formando los viriones brotados (BVs) y pasan a la cavidad hemocélica a través de las traqueolas evitando la membrana basal (Caballero *et al*., 2009 citado en Martínez et al., 2012).

Las larvas de los lepidópteros que son infectadas por los Nucleopoliedrovirus muestran signos visibles de la infección en un período de dos a cinco días después de la ingestión del virus. Estos signos incluyen un cambio gradual de color, reducción del apetito y cese de la alimentación. Previo a la muerte, la larva de muchos lepidópteros se desplazan a la parte aérea de las plantas donde mueren colgadas de sus propatas anales. Finalmente, el integumento se degrada y se liberan millones de nuevos OBs para dar origen a un nuevo ciclo de infección (Fuxa, 2004 en Marttínez et al., 2012). Este ciclo de infección será expuesto con detalle más adelante.

Los Nucleopoliedrovirus se han utilizado de manera extensiva para el control biológico de diversas plagas de lepidópteros a nivel mundial, con resultados extraordinarios en el caso del control del gusano de la soya *Anticarsia gemmatalis* en Brasil, pues un Nucleopoliedrovirus (AgNPV) aislado de ese insecto se ha utilizado para el control de más de 2×10^6 Ha de ese cultivo (Szewczyk *et al* 2012, Moscardi, 1999 citado en Núñez *et al,* 2014). De igual manera, en dicho país se han evaluado aislamientos de NPV para el control tanto de *S. frugiperda* como de *S. exigua* obteniendo mortalidades de las dos especies del insecto, significativamente superiores que las obtenidas con los productos químicos

(Guimarães et al., 2003). Igualmente, se han adelantado trabajos en el desarrollo de formulaciones, como lo hizo Embrapa (Empresa Brasilera de Investigación Agropecuaria), que desarrolló un producto formulado como un polvo mojable a base de un aislamiento de este virus y estandarizó un sistema de producción a escala (Valicente y Da Costa, 1995 citado en Villamizar *et al.*, 2012).

En México se han desarrollado diversos trabajos sobre el uso de SfNPV mediante caracterización biológica y molecular de cepas exóticas, estableciendo la concentración letal 50 (CL50). En dichos trabajos se identificó que diferentes aislamientos pertenecen a cepas diferentes de virus aunque los patrones de proteínas son muy similares entre sí. A demás se determinó como una de las cepas más virulentas SfNPV- Ar, la cual es promisoria para para ser usada en este país como bioinsecticida contra el cogollero del maíz. (Rangel *et al*., 2014)

Núñez (*et al* 2014) apoyado en diferentes investigaciones menciona que en América Latina y EEUU se han realizado diferentes trabajos evaluando cepas de SfNPV contra poblaciones del gusano cogollero *S. frugiperda*, de tal manera que ya se han probado cepas exóticas de SfNPV aisladas en distintas regiones del Continente Americano, contra poblaciones españolas del gusano cogollero (Escribano et al., 1999). Países como Argentina (Berretta et al., 1998); Perú (Vásquez *et al*., 2002), Brasil (Arce Gómez *et al*., 1999) y Colombia (Gómez e*t al.,* 2010), ya han estudiado la efectividad, a nivel de laboratorio y en algunos casos a nivel de campo, de aislamientos de SfNPV nativos, con resultados muy variables, pero todos alentadores, debido a que el gusano cogollero muestra elevada susceptibilidad a dichos aislamientos.

Williams et al (1999), realizó ensayos para el control de *S. frugiperda* usando un bioinsecticida a base de Nucleopoliedrovirus, probado en los países de Hondura y México usando protocolos similares. Aunque los resultados de mortalidad no fueron altos (40%) en las parcelas experimentales, se pudo establecer factores importantes a tener en cuenta a la hora de la formulación, púes se encontró que la radiación Uv

era una limitante importante en el uso de baculovirus ya que afecta directamente la viabilidad del virus y las aplicaciones del virus fueron en un horario de alta intensidad solar.

Por esta misma época Escribano et al (1999) aisló cuatro cepas de nucleoplihedrovirus de *S. frugiperda* en Estados unidos, Nicaragua y Argentina estas fueron llevadas para una comparación estructural, genética y biológica, encontrando que todos los aislamientos presentaron OBs y la proteína poliedrina de 32 KDa, pero los viriones de cada aislamiento difirieron sustancialmente en el patrón y abundancia de ciertos polipéptidos estructurales. El análisis de del DNA viral por endonucleasa de restricción confirmo que estos aislamientos eran cepas de una sola especie de virus, pero mostraban que ellos no eran genéticamente homogéneos, cada aislamiento podía ser diferenciado del otro mediante enzimas de restricción. Los bioensayos realizados indicaron que las cepas de estos virus podían ser más efectivas en un instar especifico de la larva, pues se obtuvo altos niveles de infección para las cepas de Nicaragua y Estados Unidos en el segundo instar.

En el sur de España, otra de las plagas de importancia es *Spodoptera exigua* pariente cercana a *S.frugiperda* pero causante de daños en cultivo como la remolacha. Allí, también se probaron cepas de multinucleopoliedorovirus (SeMNPV) para el control de dicha plaga, (Lasa *et al*., 2007). Realizando dos aplicaciones con un intervalo de 7 días y una concentración de $5X10^8$ OBs/ Lt se obtuvo porcentajes de mortalidad de 70-89%. En este estudio se pudo demostrar que las larvas adquirían la infección en las primeras 48 h, de un 27 a un 60% después de la aspersión. Además se encontró que el proceso de infección es más lento durante la noche comparado con el periodo del día. Este trabajo concluyo que el aislamiento de esta cepa de SeMNPV podía ser registrada para ser un insecticida biológico en cultivos de invernadero en la región (lasa et al., 2007)

Barrera (2011) demostró la efectividad del Nucleopoliedrovirus como controlador de *S.frugioerda* en Colombia a partir del aislamiento nativos de plantas de pasto, maíz y sorgo de Nucleopolihedrovirus multiple de *S.frugiperda* (SfMNPV). Se realizó una

caracterización molecular, análisis de restricción de endonucleasa. El mapa físico de la cepa promisoria colombiana denominada SfCOL fue construido y el genoma fue estimado133.9 Kb, con pocas diferencias en términos de cantidad y posición de sitios de restricción entre los genomas de SfCOL y SfNIC (*S. frugiperda* Nicaragua). En cuanto a la caracterización biológica fue realizada con dos cepas diferentes, la cepa de Colombia SfCOL y una proveniente de México. Los OBs de SfCOL fueron tan potentes (en términos de concentración y mortalidad) como la SfNIC y México. Sin embargo el SfCOL resulto 12 veces más potente que los Obs de SfNIc y tres veces más potente frente a la cepa mexicana. La nueva cepa SfCOL es considerada como una cepa con características patogénicas muy buenas para producir un biopesticida en Colombia.

Trabajos alternos se han desarrollado en Argentina buscando la relación entre la morfología de los Nucleopoliedrovirus y su especificidad y virulencia (Yasem de Romero et al., 2006). Aislaron Nucleopolihedrovirus a partir de *S. frugiperda* en la región de Tucuman y realizaron su caracterización morfológica con miras a posteriores ensayo en cuanto a patogenicidad.

Sin embargo, en Argentina no solo han trabajado con Nucleopoliherivirus para el control de *S.frugiperda.* Se han realizado estudios con Nucleopolihedroviru para el control de *Rachiplusia nu* una plaga de interés económico en todo América latina. Para el control de esta plaga, se logró aislar y caracterizar una cepa de Nucleopolihedrovirus múltiple denominada RanuMNPV. Sin embargo aún se encuentra en estado de prueba y no se ha logrado establecer si es una cepa promisoria para el desarrollo de un bioinsecticida.

En México, Ríos (et al., 2011), promovió una investigación de usar aislamientos de de SfMNPV a partir de suelo de cultivos de maíz y no de larvas infectadas como comúnmente se hace. En este estudio se usaron larvas de *S. frugiperda* de tercer instar para determinar la respuesta biológica y determinar el aislamiento más agresivo. Se determinó la LC50 en el 5 instar. Demostrando que los aislamientos de suelo son SfMNPV altamente virulentos.

De igual manera Colombia, Perú y Ecuador han realizado trabajos de investigación con Baculovirus, principalmente granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV como un excelente controlador biológico de *Tecia solanivora* una de las plagas más limitantes en el cultivo de papa (Villamizar *et al.,* 2005). Además en Colombia, en el centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de CORPOICA ya se produce comercialmente un bioplaguicida a base de un granulovirus de *Phthorimaea operculella* para su uso como protector de la semilla de papa bajo condiciones de almacenamiento. También se han desarrollado estudios de NPV para el control de S*. frugiperda* con resultados promisorios, alcanzando mortalidades de larvas superiores al 90% bajo condiciones de laboratorio y campo (Villamizar *et al.,* 2012).

En el proceso de producir un biofungicida a base de Nucleopoliedrovirus se requiere de diversos estudios como el uso de fago estimulantes, sustancias que va a aumentar el deseo de alimentarse por parte de las larvas. Cisneros (*et al.,* 2002) usó ácido bórico como fagoestimulante para disminuir la cantidad de inoculo a utilizar ya que este factor hace que las aplicaciones no sean viables. Utilizando larvas de segundo instar y concentraciones de virus de 114 OBs y 51OBs/mm2 acompañado del 1% de ácido ascórbico se observó incremento en la mortalidad con respecto a los inóculos que no tenían ácido bórico. Se presentó un porcentaje de mortalidad de 39,4% en usencia de ácido bórico y un 77,5% en presencia de ácido bórico.

En Europa, Lasa (2009) usó nucleopolihedrovirus multiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) en productos formulados para el control de la misma en cultivos de invernadero. La formulación de los productos incluía el uso, germen de trigo y harina de soya como fagoestimulantes. Las larvas fueron puestas en lechuga, la mortalidad se determinó después de que las larvas consumieron lechuga contaminadas con SeMNPV. El germen de trigo y la harina de soya aumentaron significativamente la mortalidad comparado con el virus sin fagoestimulante. Sin embargo, las diferencias desaparecieron cuando las larvas fueron criadas con lechuga. Concluyendo que la actividad potencial del fagoestimulante depende de la experiencia primaria de alimentación de las larvas.

5.2 *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es conocido como el gusano cogollero del maíz y es la plaga más importante de este cultivo, pues ocasiona grandes pérdidas, considerando que se encuentra ampliamente distribuido y reduce los rendimientos hasta en un 35% (Villamizar *et al*., 2012). Los efectos nocivos de *S. frugiperda* se ha combatido mediante el uso de insecticidas químicos de amplio espectro, los cuales pueden ser altamente tóxicos como fosforados, piretroides y carbamatos, usando dosis por encima de las recomendadas por las casas comerciales causando un impacto ambiental negativo no considerado en el momento(Gracia y del Pozo 1999 en Villamizar et al ., 2012).

Spodoptera frugiperda presenta preferencia en su alimentación por hojas y brotes tiernos, especialmente de los cogollos convirtiéndose en un masticador del tejido vegetal, el cual ha venido causando pérdidas en la producción. Las numerosas pérdidas causadas por *S. frugiperda* en los cultivos se deben a su poder de aclimatación a diferentes condiciones lo cual ha permitido que su distribución geográfica sea amplia (Clavijo y Pérez 2000).

Inicia su reproducción cuando hembra oviposita un promedio de 1044 huevos a lo largo de su vida, los cuales se depositan en masas o grupos compactos que promedian de 100 a 150 huevos cada una (Clavijo y Pérez 2000). Los lugares en donde estos huevos son depositados no siempre corresponden a la planta que va a servir de alimento para las larvas, ya que cuando ocurren grandes explosiones poblacionales, pueden ser hallados en lugares tan diversos como postes de luz, paredes, alambrados, etc. Cuando se les encuentra en los cultivos como el maíz, independientemente de su estado fenológico, son colocados sobre las hojas, en la parte media de la planta, preferentemente en el envés y/o en la zona basal de las mismas (Clavijo y Pérez 2000).

El primer alimento de las mismas es el corion de los huevos, después de lo cual, si el hospedero no es el adecuado, migran a través de un hilo de seda en busca de alimento. Las más jóvenes comen durante el día mientras que en los últimos estadios son más activas de noche (Casmuz A. et al., 2010; Estrada, 2002).El período larval dura un promedio de 25 días, pasando generalmente por seis o siete instares larvales (Murúa y Virla, 2004; Murúa et al., 2009). Las larvas de insectos sufren las mudas durante su desarrollo en consecuencia de distintos cambios hormonales, lo cual causa variaciones en el tamaño, en su comportamiento y morfología, para completar su desarrollo, las larvas consumen un promedio total de 179.7 cm2 de superficie foliar de hojas de maíz y dejan de alimentarse justo antes de alcanzar el último estadio larval (Clavijo y Pérez 2000).

5.3 Clasificación de los Nucleopolihedrovirus

Teniendo en cuenta el conocimiento de las secuencias genómicas baculovirales y sus relaciones filogenéticas, Jehel (*et al* 2006) ha sugerido la división de esta familia en cuatro géneros:

El género *Alphabaculovirus* incluye a todos los Nucleopoliedrovirus (NPVs) específicos de lepidópteros. Los miembros de este género producen tanto viriones brotantes (BV del inglés Budded Virus) como viriones ocluidos (ODV del inglés Oclusion-Derived Virus), los cuales pueden presentar solo una nucleocapside (SNPV) o varias nucleocapsides (MNPV) por virión. Un ejemplo de esto es el nucleoplihedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV).

Por otra parte, entre los NPVs de lepidópteros se distinguen dos grupos. Los NPV que poseen la proteína GP64 pertenecen al grupo I, y al grupo II si carecen de un homólogo de GP64. En ese caso, la fusión de la membrana dependiente de bajo pH durante la entrada viral ocurre mediada por la proteína F. Mientras que la proteína GP64 es exclusiva del grupo I de NPV, existen homólogos de la proteína F de

envoltura, no sólo en los virus de insectos, sino también en algunos virus de vertebrados (Westenberg et al., 2008).

El género *Betabaculovirus* comprende los Granulovirus específicos para la infección solo de lepidópteros. En su ciclo replicativo producen tanto viriones brotantes como ocluidos. Como especie ejemplo de esto se propuso al granulovirus *Cydia pomonella* (CpGV) (Jehle *et al* 2006).

El género *Gammabaculovirus* incluye a los Nucleopoliedrovirus aislados de himenópteros. El fenotipo de virus brotante (VB) puede estar ausente. Un ejemplo de esto es el nucleopoliedrovirus hallado en N*eodiprion lecontei* Nucleopolyhedrovirus (NeleNPV) (Jehle et al 2006).

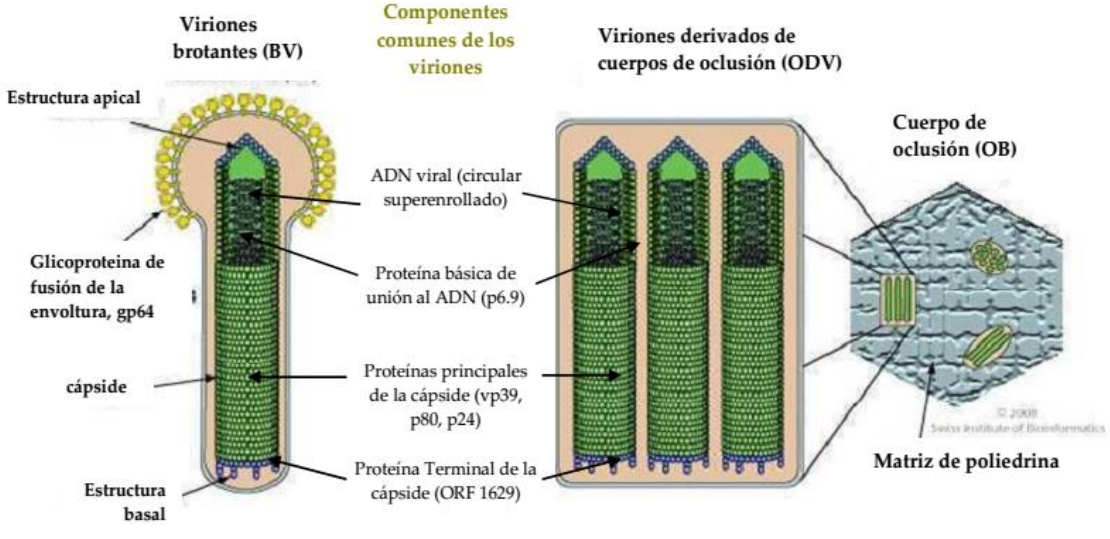
Por último, se encuentra el género *Deltabaculovirus* que incluye al nucleopolierovirus de *Culex nigripalpus* (CuniNPV) y otros baculovirus específicos de dípteros. La proteína constituyente del cuerpo de oclusión no es homóloga ni a la poliedrina ni a la granulina (Jehle *et al,* 2006).

5.4 Estructura de los Nucleopoliedrovirus

El genoma viral se encuentra empaquetado en nucleocápsides contenidas en viriones con forma de bastón, que miden aproximadamente 200 nm de largo por 30 nm de diámetro. Durante el ciclo de replicación viral, pueden presentar dos fenotipos virales con roles diferentes, los virus ocluidos (ODV) y virus brotantes (BV). Los ODV son embebidos por una matriz semi cristalina (constituida principalmente por poliedrina o granulina) y son responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad entre los individuos susceptibles de una población, así como de iniciar la infección primaria en las células epiteliales del mesenterón. Los BV son los responsables de la transmisión de la infección de una célula a la otra y de un tejido a otro dentro del insecto. (Theilmann *et al*., 2005 citado en Salvador, 2010).

La principal diferencia entre BV y ODV es el origen de sus envolturas. Las proteínas de las envolturas de los BVs derivan de la membrana plasmática de la célula huésped que ha sido modificado por las proteínas virales. En contraste, ODV obtienen su dotación de proteínas en el núcleo y pueden derivar de las membranas nucleares que se modifican con una serie de proteínas virales. Como consecuencia las envolturas de los BV puede limitarse a una o dos proteínas, mientras que la envoltura viral de los ODV son más complejas (Rohrmann, 2008).

Ilustración 1. Comparación entre las estructuras de los fenotipos virales NPV



Fuente: (López, 2010)

5.5 Cuerpos de oclusión

Los cuerpos de oclusión (OBs) son estructuras cristalinas constituidas principalmente por poliedrina o granulina (según el género baculoviral), dentro de estas estructuras se encuentran “paquetes” de OVD los cuales pueden coexistir en grupos. Los OB que son los que contiene los OVD son los responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad entre individuos susceptibles. Además, los OB resultan ser una forma de resistencia del virus, ya que constituyen una protección mecánica de los viriones a las agresiones ambientales, que les permite sobrevivir fuera de una célula hospedadora por períodos largos hasta ser ingeridos por un insecto susceptible (Rios *et al*., 2012)

Estas proteínas poliedrina y granulina son los componentes estructurales más importantes del OB y ambas contienen aproximadamente 250 aminoácidos (30 kDa). De acuerdo con Funk, (1997 citado en Salvador, 2010) se encuentran homólogos en todos los genomas baculovirales. Sin embargo Perera (*et al.*, 2006 citado en Salvador 2010) menciona una excepción, el nucleopoliedrovirus CuniNPV, en el que la secuencia aminoacídica de la proteína constituyente de los OBs parece no estar relacionada con la secuencia de la poliedrina de otros nucleopoliedrovirus.

Los OB poseen una envoltura, constituida por una estructura densa de electrones que forma una superficie lisa. La función de esta envoltura se relaciona con sellar la superficie de los poliedros y aumentar su estabilidad, la evidencia sugiere que pueden sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal de las aves, facilitando su dispersión (Rohrmann, 2008). Inicialmente se identificó que la envoltura estaba constituida por carbohidratos, pero luego encontraron que una proteína fosforilada identificada como PE (Ac131) también hacia parte de la envoltura. Los homólogos de esta proteína se encuentra en los genomas de todos los lepidopteros de NPV (Rohrmann, 2008). Entre los factores asociados a los OBs se puede citar además la proteína Ac68, que parece estar involucrada con la morfogénesis del poliedro. La

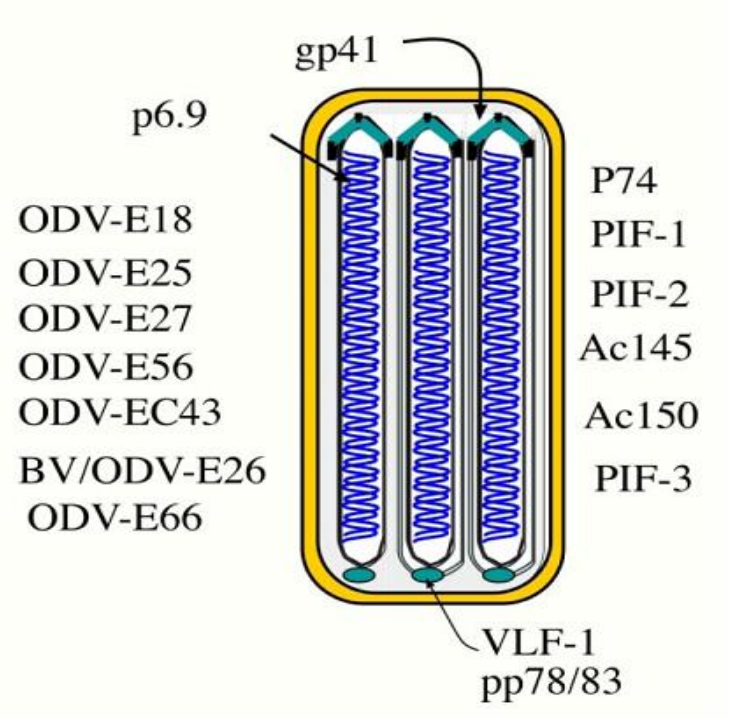
proteína P10 (Ac137) es requerida para la correcta formación de los poliedros (Slavador, 2010).

5.6 Estructura de los viriones ocluidos

Los viriones ocluidos dentro de la matriz proteica del OB poseen una envoltura constituida por diversas proteínas designadas como ODV-E. Un ejemplo es la ODV-E66 en AcMNPV (Ac46) codifica una enzima que es capaz de digerir el ácido hialurónico, que es un polisacárido importante de la matriz extracelular. Homólogos a esta proteína se encuentran en casi todos los baculovirus, excepto los aislados de himenópteros y dípteros (Van Oers & Vlak, 2007 citado en Salvador ,2010). De otro lado al suprimir proteínas como la ODV- E 25, (Ac94) se genera una reducción en la población de VB, a de más se sugiere que puede jugar un papel en el cambio de VB a ODV. La proteína ODV-E C43 resulta esencial en la nucleocapside y la formación de poliedro y su ausencia inhibe la formación de estos (Rohrmann, 2008).

Otro grupo de proteínas encontradas en la envoltura que rodea a los ODV se asocia a la infección de los insectos por vía oral, por lo cual fueron designadas con el nombre de *per os infectivity factors* (PIF). Se identificaron cuatro genes *pif* en AcMNPV denominados p74-pif (Ac138), Ac 22 (pif-2), Ac115 (pif-3), y Ac119 (pif-1). Homólogos de estos cuatro genes están presentes en los genomas de todos los baculovirus. Las proteínas PIF1, PIF2, y p74 actúan mediando de forma específica la unión de los ODV a las células del intestino medio, sugiriéndose que están directamente involucradas en la interacción virus-célula en las etapas iniciales de la infección (Okawa, *et al* 2005 en Salvador 2010).

Ilustración 2. Componentes proteicos de un virion ocluido. ODV-E: Proteínas de envoltura ODV. Factores de infección per os PIF/P74/Ac145/Ac150



(Fuente: Rohrmann, 2008)

5.7 Estructura de los viriones brotantes

El segundo fenotipo viral hallado en el ciclo infectivo de los Nucleopoliedrovirus corresponde a los viriones bortantes (BV). Como se mencionó anteriormente, si bien ambos BV y ODVs llevan la misma información genética, existen varias diferencias entre ellos en función y estructura (peng, et al 2010).

Este tipo de virion tiene una envoltura distinta de ODV que facilita la infección sistémica. Los BV difieren en su eficiencia para infectar los diferentes tejidos; mientras que los ODV infectan el intestino medio y las células epiteliales hasta 10.000 veces más eficiente de BV, mientras que BV son hasta 1.000 veces más eficiente en la infección de células en cultivo de tejidos (Rohrmann, 2013).

Estructuralmente los BVs poseen en su envoltura una proteína con actividad fusogénica bien caracterizada denominada GP64 (Ac128). Debido a su importancia en la infectividad del BV se pensó que estaría presente en todos los nucleopoliedrovirus. El análisis de diversos genomas demostró la ausencia de homólogos a este ORF, en los cuales la función de fusión era cumplida por una proteína denominada F (prot. F). Algunos nuclopoliedrovirus poseen ambos ORFs pero en esos casos, la proteína F es inactiva. Según estudios realizados en tal sentido, se postula que GP64 podría haberse adquirido en diferentes linajes baculovirales en los cuales la actividad de la proteína F fue desplazada (Rohrmann, 2008).

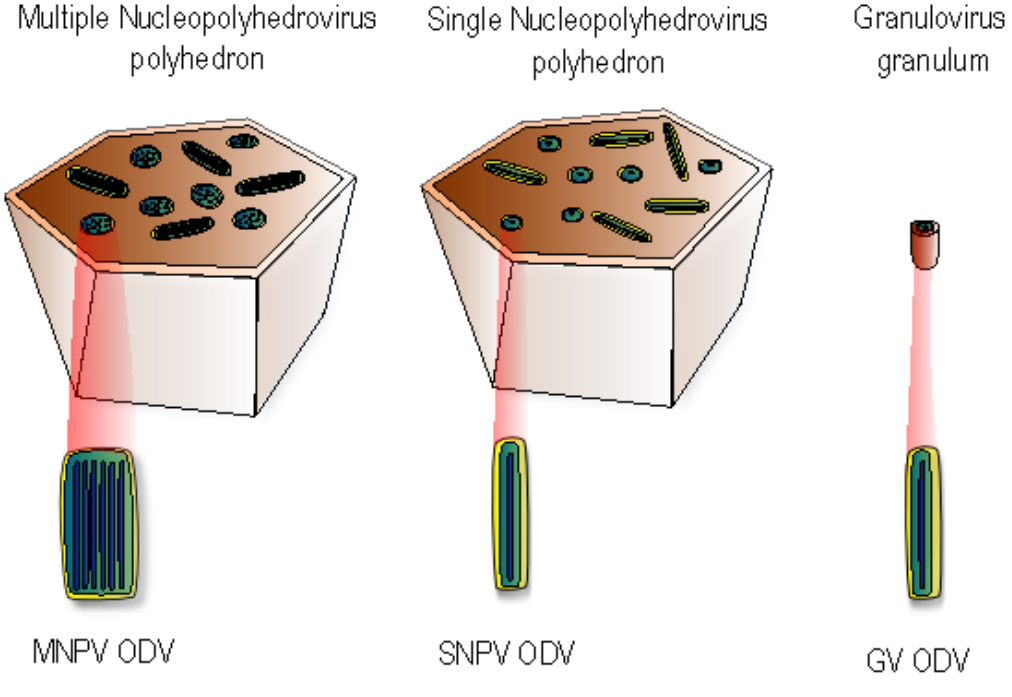
5.8 Estructura de la Nucleocapside

Una característica de las nucleocápsides dentro de poliedros es su organización, pues estas pueden ser individuales (SNPV) o presentarse en agregados múltiples (MNPV) dentro de la envoltura. Se ha sugerido que el fenotipo MNPV puede acelerar la capacidad del virus para establecer la infección, teniendo en cuenta que al ser múltiple, una nucleocápsides podrían entrar en el núcleo y empezar la replicación, mientras que otros podrían transitar dentro de la célula y propagar la infección en otra parte. Otro beneficio de los grupos de nucleocápsides de infectar la célula es la posibilidad de reparar el ADN dañado a través de recombinación (Rohrmann, 2013).

La estructura de las nucleocapsides de los ODV es común con la de los viriones brotantes (BV). La nucleocápside (NC) está conformada por DNA superenrollado íntimamente asociado a la proteína P6.9. Esta proteína con capacidad de unión a DNA participa en alto grado de la compactación que presenta el material genético viral. Por otra parte, la proteína VLF-1 (Ac77) (*very late factor*), está ubicada en la región terminal de la NC y tiene funciones estructurales tanto en los ODV como en los BV (Yang & Miller, 1998 citado en Salvador, 2010).

Todos los nucleopoliedrovirus presenta una etapa como SNPV, que posteriormente en la infección, cuando la replicación y la formación de virión se amplifica, inicia la formación de las nucleocapsides MNPV, las cuales se ensamblan y la proteína gp41 podría actuar como pegamento para unirlas de modo que cuando la envoltura comienza a formarse, estos son co-envueltos. Sin embargo la concentración de nucleocapside puede ser alterada por diversos factores como la replicación del ADN reducida, causada por una ADN polimerasa alterada o algún componente desconocido de la célula y cómo interactúan con los tipos de virus, pueden influir en si en el virus es predominantemente un SNPV o MNPV (Rohrmann, 2013)

Ilustración 3. Esquema base de la morfología de los OBs de los Nucleopolihedrovirus. OBs con nucleocapside multiple y nucleocapside simple



Fuente: Haase *et al*., 2013.

La cápside del virión está compuesta principalmente por la proteína VP39 (Ac89), que posee homólogos en todos los genomas baculovirales. Entre otras proteínas de importancia que están presentes en los viriones se pueden citar a GP41 (Ac80), que se encuentra localizada entre la envoltura del virión y la cápside, constituyendo una estructura denominada tegumento que es requerida para el regreso de la nucleocápside del núcleo (Olszewski & Miller, 1997 citado en Salvador, 2010).

5.9 Ciclo de infección

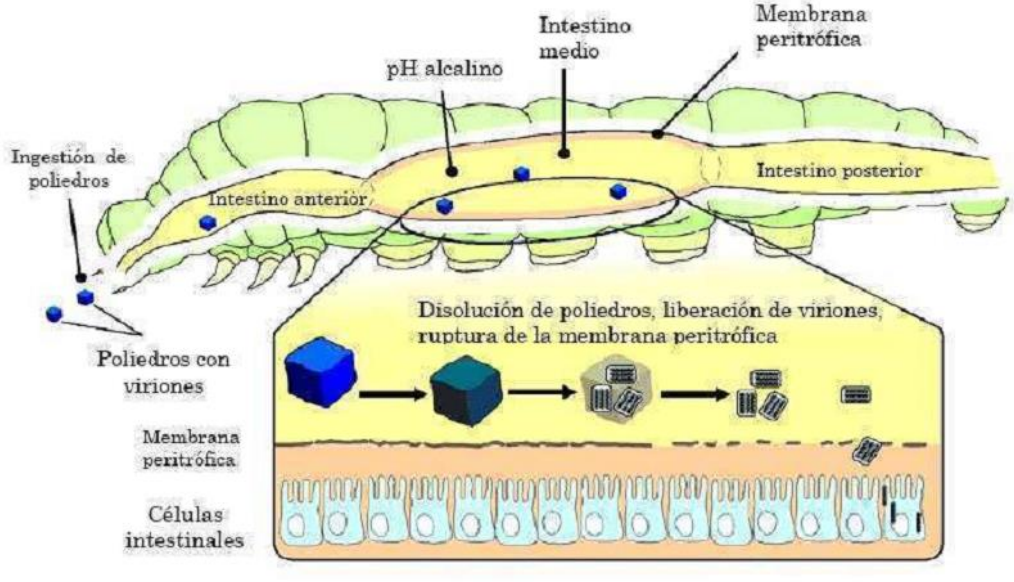
Después de la ingestión, los cuerpos de oclusión que contienen los virones se disuelven en condiciones alcalinas (pH > 7,5) del intestino medio y liberan los viriones. Los viriones infectan a las células epiteliales del intestino y posteriormente otros tejidos susceptibles del hospedero, donde el virus continúa su reproducción y multiplicación. Los tejidos del cuerpo graso, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda, también son afectados. Las larvas infectadas se tornan lentas en sus movimientos, dejan de alimentarse y se paralizan. Cuando la enfermedad viral muestra sus efectos se pueden observar las larvas en las partes superiores de las plantas pendiendo con la parte cefálica hacia abajo y adheridas de las pseudopatas anales, el integumento se vuelve blando y de color pardo o negro, y los tejidos internos se licuan, quedando la larva como una bolsa liquida (McCarthy & Theilmann, 2008).

Avanzada la infección se produce la lisis celular, adquiriendo la hemolinfa una característica coloración blanquecina debido a la acumulación de cuerpos de oclusión. En tal sentido, estudios realizados con AcMNPV, BmNPV y SeMNPV en células de insecto mostraron que este último proceso es dependiente de la presencia de P10, de la acción de una proteína quinasa y de catepsina codificadas por el virus. En infecciones *in vivo*, cuando la mayor parte de los tejidos susceptibles

se ven afectados, el insecto muere. El tegumento de la larva se rompe y se liberan los OBs en el ambiente, ayudado este proceso por la acción de una quitinasa codificada por el mismo virus. Los cuerpos de oclusión liberados estabilizan a los viriones en el exterior del huésped, permitiendo la transmisión horizontal de la infección cuando las larvas de insectos susceptibles ingieren alimento por ellos contaminados (Wang & Granados, 1997)

Para entender el ciclo de infección de los nucleopoliedrovirus, es necesario referirse al tracto gastrointestinal del insecto, ya que es en este sitio donde transcurren las primeras etapas del mismo. El intestino de este grupo de artrópodos se compone de tres secciones: intestino anterior, medio y posterior (Salvador, 2010).

Ilustración 4. Infección del Nucleopolihedrovirus sobre lepidopteros. Ingesta de los OBs y disolución de estos en el intestino medio.



Fuente: Kalmakoff y Ward, 2003

En lepidópteros, el intestino anterior cumple la función de facilitar la absorción, el almacenamiento y la transformación física de los alimentos. Está recubierto por una cutícula que contiene quitina y que forma parte del exoesqueleto del insecto. Una

válvula separa el intestino anterior del intestino medio. Este último es el sitio principal de la digestión de los alimentos y carece de cutícula, pero cuenta con una membrana matriz peritrófica (MP) (Rorhmann, 2013).

La MP es compuesta por quitina, mucopolisacáridos, y proteínas. Se cree que protege la superficie intestino de los daños causados por el material abrasivo de alimentos y limita el acceso de los microorganismos. También permite la transferencia de sustancias líquidas y digeridas a las células epiteliales intestino medio, pero impide el paso de partículas más grande. Se desgasta por el paso de alimentos pero se regenera a partir de las células epiteliales (Rohrmann, 2013).

Esta membrana no está presente en todos los grupos de insectos, faltando en grupos como ftirápteros (piojos) y tisanópteros (pescaditos de plata), entre otros. La presencia de la MP durante el ciclo vital de los insectos que la poseen, es variable y en algunos aparece solo en los estadios larvales mientras que en otros puede estar presente en todos los estados (Peters, 1992 citado en Salvador 2010).

El ciclo de infección de los nucleopoliedrovirus se divide en dos etapas: la infección primaria y la infección secundaria.

5.9.1 Infección primaria

Al parecer una combinación de factores están implicados en la iniciación de la infección del intestino medio, incluye factores que facilitan la unión a las células, estos son receptores de células a las que se une los viriones, además las proteínas del virion pueden tener actividad enzimática q permite el acceso viral a las células del intestino medio (Rohmann, 2013). Los ODV se unen luego a las microvellosidades del epitelio intestinal mediante la fusión de sus membranas, permitiendo que las nucleocápsides (NC) contenidas en su interior sean liberadas en el citosol. Es en esta etapa, cuando las proteínas presentes en la envoltura del ODV, como las P74 y PIFs, juegan un rol importante en la fusión a las células del intestino medio (Okawa et a*l.*, 2005 citado en Salvador 2010).

Las NC liberadas en el citosol son transportadas al núcleo y el DNA desnudo entra por el poro nuclear iniciando la expresión y replicación del DNA. La mayor parte de las proteínas necesarias para la replicación del DNA viral están incluidas en el ODV: DNA polimerasa, helicasas, IE1, LEF1 y LEF3 (Granados y Lawer, 1981 en Salvador, 2010). La incorporación al azar dentro del ODV no está descartada, aunque es probable que este proceso sea altamente específico. Una vez replicado el material genético e iniciada la cascada transcripcional de los genes virales que permite la formación de nuevas NC, estas salen del núcleo para propagar la infección; en el momento en que salen del núcleo obtienen la envoltura de la membrana nuclear, esta envoltura contiene al menos una proteína viral (GP16) (Gross et al., 1993 citado en Salvador, 2010, Rohrmann, 2013)

5.9.2. Infección secundaria.

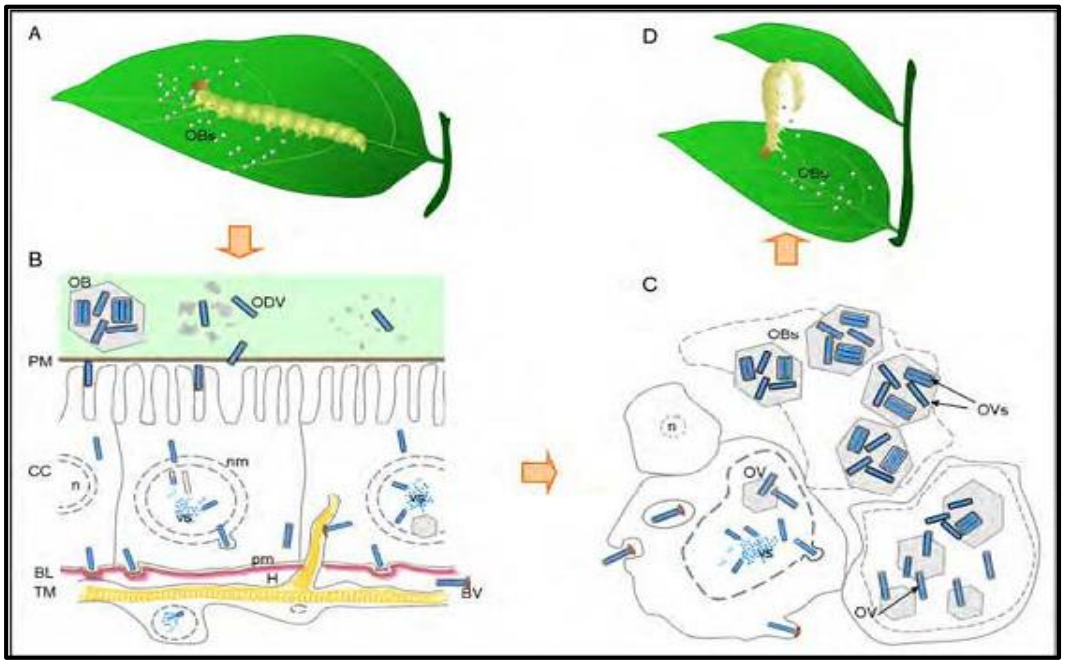
En la fase secundaria de la infección, las NC formadas son transportadas a la membrana celular, desde donde abandonan la célula por brotación o a través de la membrana basal. Las proteínas implicadas son la GP64 y F que además de requerirse en la salida de la célula, están involucradas en la infección a otras células.

Los BV una vez que abandonan la célula migran a células vecinas, adonde entran por endocitosis, con ayuda de las proteínas GP64 y F. Esto se da tras la unión de la proteína de fijación viral que estimula el citoplasma de la célula, generando una invaginación en el citoplasma celular llamado endosoma o vesicula endosomal, la cual se acidifica por causa de la proteína de fusión viral generando una fusión de la membrana endosomal y la envoltura viral permitiendo la entrada de la NC al citoplasma celular (Granados, 1981 citado en Rohrmann, 2013).

Durante la infección secundaria, en las infecciones producidas por NPV, los viriones que permanecen en el núcleo parecen obtener una membrana de microvesículas que tendría su origen en la membrana nuclear interna y que habría sido modificada por el agregado de proteínas virales especificas (Baunagel y Summers, 2007 citado

en Salvador 2010). En esta etapa ocurre la hiperexpresión de genes tardíos resultando en altos niveles de producción de proteínas como P10 y poliedrina. Esta última se acumula en el núcleo rodeando a los viriones y se sabe que al menos una proteína (Ac68) interviene en este proceso de oclusión de los viriones dentro de la matriz proteica del cuerpo de oclusión (Xu et al., 2008). La proteína P10 parece estar íntimamente involucrada en el ensamblado de la envoltura del poliedro sobre el cuerpo de oclusión (Rohrmann, 2008 citado en Salvador, 2010).

Ilustración 5*. Liberación de OBs al intestino*



A. Ingestión de la larva del alimento contaminado con OBs. **B**. Los OBs son disueltos en el medio alcalino del intestino, liberando los ODV, estos atraviesan la membrana periplasmica infectando las células epiteliales del intestino medio. Recien se forman las nucleocapsides salen de la membrana plasmática y se diseminan en todo el cuerpo de la larva a travez de las células traqueales o directamente por la hemolinfa. **C**. En la etapa tardia de la infección adquieren la nucleocapside sobre la membrana nuclear formando los OVS (flechas), que pueden contener una o varias nucleocapsides, y están ocluidos en una matriz de poliedrina

(OBs). **D**. Muerte de la larva llena de OBs. Aparece típicamente colgada en la parte superior de la planta.
Fuente: López *et al*., 2010

5.10 Producción de Nucleopoliedrovirus

2.10.1 Producción de Nucleopoliedrovirus en insectos

El primer paso para cualquier programa de control de plagas usando baculovirus es la evaluación de los aislamientos. Se hace con el fin de ensayar la eficiencia del virus como agente potencial de control. Este paso se realiza mediante bioensayos. Algunos de los parámetros medidos en un bioensayo son la concentración letal, la dosis letal y el tiempo letal. Existen varios factores que pueden afectar un bioensayo como el instar larval en el cual es adecuada la aplicación del nucleopolihedrovirus, la temperatura, la dieta del insecto y el peso de la larva (Ojeda, 2002)

5.10.2 Producción masiva de virus

La explotación comercial de un nucleopoliedrovirus requiere el desarrollo de una tecnología que haga posible la producción del virus a gran escala a un costo aceptable, como condición necesaria para la obtención de un producto de calidad y confiable (Caballero et al., 2009).

La producción *in vivo* sobre hospedero susceptible es la metodología actualmente utilizada para la producción de todos los bioinsecticidas basados en nucleopoliedrovirus disponibles en el mercado. Esta técnica consiste básicamente en alimentar larvas con dieta semisintética que es superficialmente contaminada con una suspensión del virus que se quiere multiplicar. Algunos de los aspectos esenciales de esta metodología, como por ejemplo las dietas para insectos o los métodos de cría masiva, deben ser específicamente desarrollados para cada sistema hospedero-baculovirus (Caballero., *et al* 2009).

Sin embargo, el desarrollo de este método requiere una gran cantidad de mano de obra. Por lo cual se han desarrollado métodos de producción masiva que permiten utilizar una alta densidad de larvas y automatizar el proceso en gran medida, reduciendo así los costos de producción.

De acuerdo al método presentado por Caballero (et al., 2009) la producción del Nucleopolihedrovirus de *Spodoptera exigua* (SeMNPV), consiste en infectar larvas del quinto estadío de *S. exigua*, en grupos de 100 larvas/caja, alimentándolas con dieta semisintética contaminada superficialmente por aspersión con $1,5\times10^8$ OBs. Estas larvas son criadas bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. Las larvas muertas por virus son recogidas y los cadáveres triturados y homogenizados. Obteniendo una producción entre $1,2\times10^9$ y $2,3\times10^9$ OBs/larva. Cada larva es adicionada en 100 µl y se observan en cámara de Neubauer para determinar la concentración de los OBs por µl. Es posible recuperar aproximadamente el 80% de las larvas infectadas, mientras que el 20% restante se pierde debido al canibalismo.

Para la multiplicación de nucleopoaculovirus ya sea de manera in vivo o invitro, hay que partir de la caracterización morfológica y genética de los posibles aislados que se hayan realizado de Baculovirus. La caracterización de los aislamientos puede realizarse mediante la comparación de perfiles y de la actividad biológica mediante enzimas de restricción (REN) (Ojeda., et al 2002).

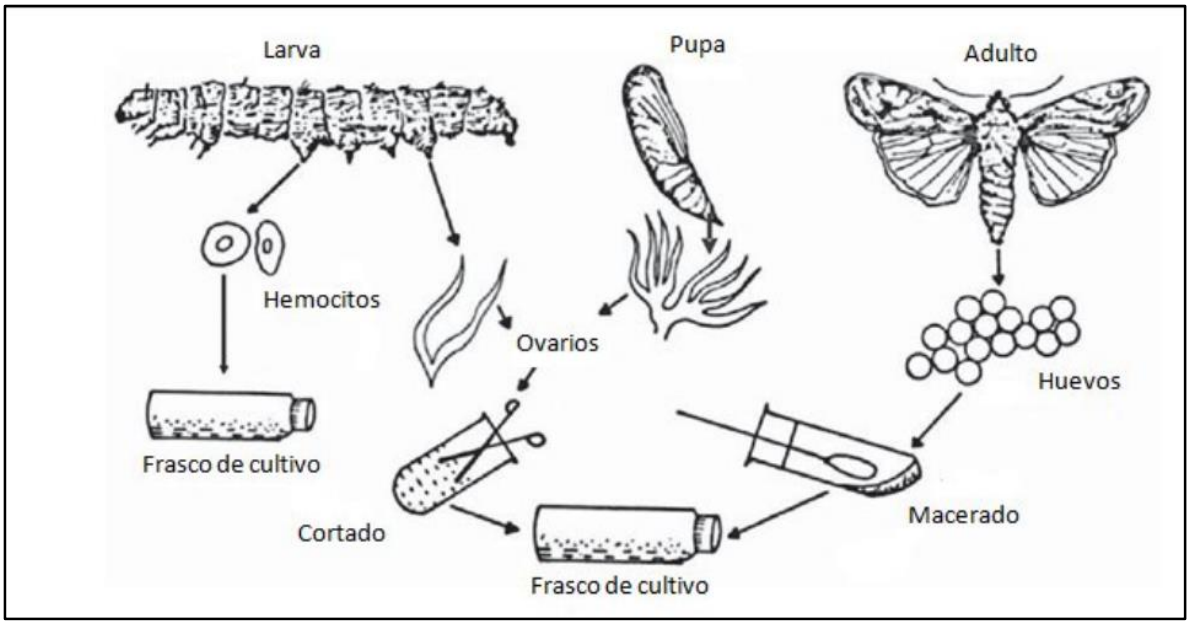
5.10.3 Producción de nucleopoliedrovirus en cultivos celulares

El fundamento de este proceso de producción se basa en que las células del cultivo constituyen el sustrato sobre el cual se lleva a cabo la multiplicación viral. Un primer requisito para el desarrollo del cultivo celular, es la selección de una línea celular susceptible a la infección viral, capaz de llevar a cabo eficientemente las etapas del ciclo de replicación viral y de producir elevados rendimientos volumétricos de OBs.

Además, el proceso de producción in vitro del nucleopoliedrovirus requiere de una línea celular que logre soportar el cultivo en suspensión agitada. Un ejemplo de esta líneas celulares son la Sf9 y Sf21 de *Spodoptera frugiperda (*Gioria *et al.,* 2006).

Los cultivos celulares pueden iniciar con células de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. Los cultivos celulares primarios son cultivos que se pueden obtener de cualquier tejido u órgano como embriones o animales adultos. Las células obtenidas a partir de embriones, son células que se dividen muy rápido, crecen fácilmente in vitro y se disgregan sin dificultad. Las células obtenidas a partir de animales adultos se disgregan con más dificultad y crecen de forma lenta en el cultivo. En invertebrados, los cultivos celulares primarios se obtienen a partir de embriones, hemocitos, ovarios, tejidos grasos y macerados de larvas, pupas o adultos (Ojeda, 2002).

Ilustración 6. Diagarma del establecimiento de un cultivocelular primario de diferentes tejidos de insectos de lepidóptera



Fuente: Farias *et al*., 2010

Los cultivos en suspensión favorecen el estudio de variables cinéticas de crecimiento celular y la producción de proteínas. La densidad celular se estima con frecuencia durante todo el período de cultivo, ya que la estimación de las tasas de crecimiento y de producción específicas depende de esta variable. Las líneas de células Sf9 y Sf21 se adaptan fácilmente al cultivo en suspensión. La línea celular utilizada puede comprometer la producción in vitro de la nucleopoliedrovirus, mostrando diferente permisividad de la replicación del virus. Por lo tanto, incluso las células permisivas para la replicación pueden dar lugar a diferentes niveles de producción de virus dependiendo de la línea celular utilizada (Farias *et al.,* 2010)

La producción de un nucleopoliedrovirus implica la infección de células permisivas al virus. El proceso de infección extracelular in vitro, se inicia con BV, que se obtiene a partir de la hemolinfa de insectos infectados o del sobrenadante de las células infectadas. Cuando se infecta, células del cultivo celular producen más BV, así como también OB. Es importante mencionar que los OB son la forma biopesticida del virus en campo. Además, la infección in vitro se puede iniciar con virus ocluidos extraídos de OB (Farias *et al.,* 2010).

- **Líneas celulares**

Las líneas celulares más comunes utilizados para aplicaciones BVs son: Sf9 de *Spodoptera frugiperda*, Sf21 de *Spodoptera frugiperda*, Tn 368 de *Trichoplusia ni*, Higth five BTI-TN-5B1-4. De estas, Sf9 se estableció originalmente de tejido ovárico del gusano cogollero del maíz. Aunque hay datos científicos significativos en las características de estas líneas celulares de lepidópteros, queda por confirmar si es la mejor línea para el virus o la producción de proteínas recombinantes. La investigación actual sugiere que las diferentes líneas celulares de insecto pueden soportar diferentes niveles de expresión y glicosilación diferencial con la misma proteína recombinante (Caballero et al., 2001).

- **Infección de nuclopoliedrovirus en cultivos celulares de lepidópteros**

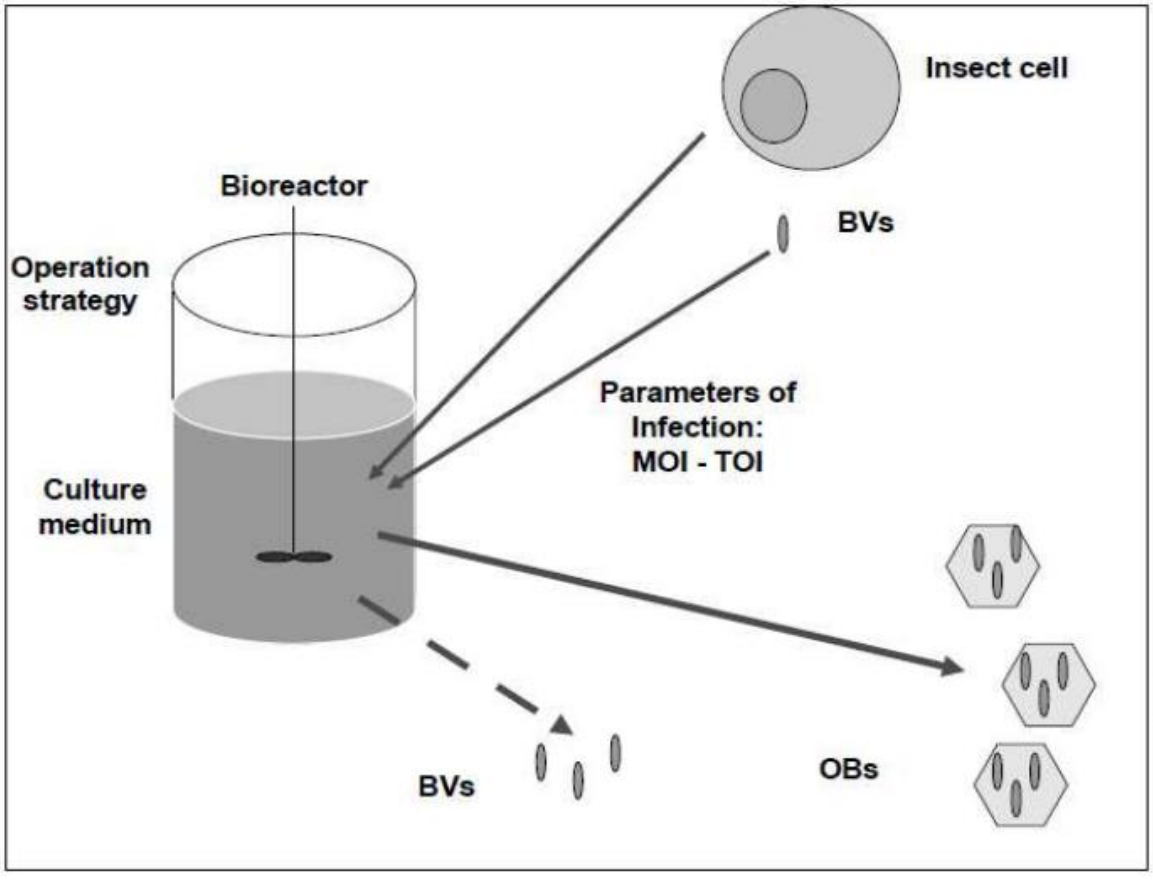
El inóculo de nucleopoliedrovirus está compuesto por BVs que se añaden al cultivo de células de insecto al momento de la infección. La calidad del inoculo es un factor crítico para determinar la calidad del producto final, los cuerpos de oclusión, así como la productividad del proceso. En primer lugar, la cepa seleccionada debe ser virulenta para el insecto a ser controlado. También debe ser capaz de replicarse en el cultivo celular, teniendo una alta productividad de OBs. Además, estos OBs deben tener una alta actividad biológica. Para cumplir estos requisitos, los inóculos virales deben estar libres de variantes genómicas capaces mantener la actividad biológica de OBs. Las principales variantes genómicas del nucleopoliedrovirus capaces de reducir el rendimiento de los OBs son el fenotipo con poca producción de poliedrina (FP) y la formación de partículas defectuosas interferentes (DIP) (Claus *et al*., 2012).

Las mutaciones responsables del fenotipo FP, se expresan a través de las siguientes características: pérdida en el rendimiento de los OB, reducción del contenido de VDO por cuerpo de oclusión, reducción de la actividad biológica de los OB y el aumento de rendimiento de BVs. La aparición del fenotipo FP es responsable de una disminución de los rendimientos finales de OBs, así como de su actividad biológica (Gioria *et al*., 2006). Una vez convertido, la población de mutantes FP tiende a enriquecer a través de pasos sucesivos en cultivos de células de insectos, debido a su mayor capacidad de producir BVs (Claus *et al*., 2012)

Los genomas DIP no pueden replicarse de manera autónoma, pero pueden hacerlo con la ayuda de genomas completos. La replicación de los DIPs compite e interfiere con la replicación de genomas completos, y conduce a un enriquecimiento progresivo de la población de virus defectuoso, a expensas de la población de virus de tipo salvaje (Morales *et al*, 2013). La generación de DIP en cultivos de células infectadas con nucleopoliedrovirus se ve favorecida por condiciones que aumentan la probabilidad de recombinación homóloga, como en las infecciones a alta

multiplicidad de infección. La proporción de DIP en una población viral, así como la proporción de mutantes de PF, aumenta con el número de pasajes en cultivos de células, una fenómeno conocido como "efecto de paso" (Gioria *et al*., 2006). Este efecto impide la amplificación de stocks de nucleopoliedrovirus necesarias para infectar cultivos a gran escala de células de insecto.

Ilustración 7. Representación esquemática de la producción de OBs de nucleopoliedrovirus en cultivos celulares de insectos



Fuente: Claus et al., 2012.

- **Factores ambientales**

Los cultivos de células de invertebrados son extremadamente sensibles a factores y condiciones ambientales. La naturaleza baja en proteínas de la mayoría de las formulaciones libres de suero a menudo aumenta la sensibilidad celular. Para reducir los problemas, el uso de materiales y equipos son designados solo para un cultivo celular, incluyendo incubadoras, campanas de flujo, autoclaves, áreas de preparación de medios, especialmente la de gases, y los bio-reactores (Williams *et al*., 1999, Morales *et al*., 2013)

Temperatura: El rango óptimo para el crecimiento y la infección de los cultivos de células de insectos más es de 25 ° C a 30 ° C. Los cultivos en monocapa suplementados con suero se pueden almacenar de 2 ° C a 8 ° C durante períodos de hasta 3 meses (Claus *et al*., 2012., Morales *et al*., 2013).

pH : El pH de un medio de crecimiento celular afecta tanto la proliferación celular como la producción de proteína viral o recombinante. Aunque muchos valores han sido reportados para las células de invertebrados, en la mayoría de las aplicaciones de un intervalo de pH de 6,0 a 6,4 trabaja bien para la mayoría de las líneas celulares de lepidópteros (Gioria *et al*., 2006).

Aireación: Los cultivos celulares de invertebrados requieren la transferencia suficiente de oxígeno disuelto por cualquiera de los métodos pasivos o activos para la proliferación celular óptima y la expresión de proteínas recombinantes. Los sistemas de biorreactores más grandes utilizan sistemas de oxigenación controlada requiriendo oxígeno disuelto en un 10 % a 50 % de saturación de aire (Farias *et al*., 2010).

Las fuerzas de corte: las técnicas de cultivo de suspensión generan fuerzas mecánicas de cizallamiento o corte. Los factores que contribuyen a experimentar estas fuerzas o tensiones de corte por las células en cultivo en suspensión incluyen

el tamaño y tipo de los impulsores dentro de recipientes de agitación, el tamaño y la velocidad de las burbujas en el proceso de aireación o esparcido en los bio-reactores, y la acción turbulenta resultante a la superficie de cultivo (Castro, 2006).

Durante el cultivo de células en suspensión, la mayoría de líneas celulares de insecto requieren protección de la fuerza de corte. Aunque las concentraciones de suero entre 5 % y 20 % en medio parecen proporcionar algún protección de las fuerzas de corte, se recomienda que todos los cultivos en suspensión, ya sea libre o suero suplementado con suero, se complementarán con un protector de la fuerza de corte (Castro, 2006).

5.11 Clases de formulaciones

La formulación es este tipo de productos biológicos es muy importante, teniendo en cuenta que las características fisicoquímicas, microbiológicas y la actividad insecticida de los formulados pueden afectarse negativamente durante el almacenamiento. Además la estabilidad de los productos puede verse influenciada por la temperatura y el tipo de formulación (Quiroga *et al*., 2011).

Es importante destacar que una buena formulación va a mantener la estabilidad del producto durante un mediano o largo periodo de tiempo (6 meses a dos años) evitando el mantenimiento de la cadena de frio tanto en el transporte como en la comercialización, lo cual implica disminución de costos en los productos (Quiroga *et al.,* 2011)

Se han realizado estudios con diferentes tipos de formulación, granulares, en polvo esparcible, en suspensión concentrada y microencapsulación. Cada una de esta confiere una serie de bondades, que permiten que el formulado tenga mayor acción y resistencia a su deterioro una vez es llevado a campo.

A nivel mundial existen productos comerciales a base de nucleopoliedrovirus de. como SPOD-X®, el cual contiene el virus de *Spodoptera exigua* y es recomendado para cultivos de hortalizas y flores, y Spodopterin® que contiene el NPV de *Spodoptera litoralis* y se utiliza para proteger cultivos de algodón, maíz y tomate, aunque ninguno es recomendado para el control de *S. frugiperda* (EPA, 2011). Adicionalmente, en Colombia no existen productos registrados comercialmente a base de nucleopoliedrovirus.

5.11.1. Formulaciones con protección de luz ultra violeta

Los nucleopoliedrovirus presentan inactivación por efecto de la radiación solar bajo condiciones de campo, este es el principal factor ambiental que limita el uso masivo como agentes de biocontrol (Ignoffo et al., 1997 citado en Villamizar *et al*., 2012). La luz solar afecta negativamente las partículas virales, especialmente la radiación entre 280 nm y 310 nm (Tamez et al., 2006). Son diversos los trabajos que se han desarrollado buscando protectores solares que eviten el deterioro de los nucleopolihedrovirus por causa de la luz mediante estrategias como el uso de derivados de la lignina, con los cuales se han alcanzado niveles de protección de 421 días bajo condiciones de campo (Hamed *et al*., 2004 en Villamizar *et al*., 2012). La microencapsulación es otra tecnología que permite estabilizar el producto, en esta se recubren pequeñas partículas sólidas con una capa delgada y uniforme de material de recubrimiento, formando pequeñas capsulas.

El-Husseini et al, 2012 probo algunos productos naturales como almidón, arcilla, extracto de té negro y glicerina para determinar su acción frente a los rayos solares en nucleopoliedrovirus para el control de *S.litoralis*, encontrando que tanto el extracto de té negro como la arcilla podían ser buenos aditivos para evitar el deterioro de las partículas virales por los rayos UV.

5.11.2 Determinación de la estabilidad en condiciones de almacenamiento

Uno de los factores limitantes para el uso y la aceptación de formulaciones a base de agentes de control biológico es su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento, ya que de esta depende la viabilidad y la actividad biocontroladora del principio activo durante la distribución y comercialización del producto. La estabilidad está directamente relacionada a los factores propios del proceso de producción del producto, como es el medio de cultivo usado, el proceso de secado y el proceso de formulación así como por factores externos, como la temperatura y la humedad relativa de almacenamiento, variables que pueden afectar significativamente el producto(Abadías et al., 2001).

En el caso de los nucleopoliedrovirus, la estabilidad en condiciones de almacenamiento es influenciada por el sistema de producción del agente viral, ya que esta normalmente se realiza en el hospedero, lo que genera contaminación microbiana en la suspensión viral, proveniente de la microflora normal de los cadáveres de los insectos (Lasa et al., 2009). Sin embargo la contaminación puede afectar la actividad insecticida, e incluso representar riesgos para el cultivo y para la salud humana dependiendo los patógenos que presente el producto.

El bajo porcentaje de humedad en los productos, puede disminuir los posibles cambios químicos en la formulación evitando interacciones que afecten el bioinsumo, trabajo realizado por Quiroga et al. (2011), para un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhoGV) determinaron que valores de humedad de bioplaguicidas en 0,52 ± 0,11% y 4,00 ± 0,11% a base de PhoGV respectivamente, favorecen la estabilidad de los productos. Tamez et al (2006) evaluaron dos prototipos de bioinsecticidas a base del nucleopolihedrovirus de *Anagrapha falcifera* observando que humedades superiores al 10% afectaron la estabilidad del ingrediente activo durante el almacenamiento. Comprobando que volúmenes de humedad altos en el producto favorecen el desarrollo de contaminantes que deterioran la calidad del mismo.

El pH es un factor importante en la formulación a base de nucleopoliedrovirus, teniendo en cuenta que los cuerpos de inclusión de los nucleopoliedrovirus se disuelven en valores de pH alcalinos (pH entre 9,5 y 11,5) (Szewczyk et al., 2006), se recomienda que las formulaciones a base de estos virus tengan un pH cercano a la neutralidad para asegurar la estabilidad de la estructura cristalina que protege al virión (Caballero et al., 2001). De igual manera, establecieron que para bioinsecticidas a base de nucleopoliedrovirus, un pH superior a 9,0 y menor a 4,0 puede afectar drásticamente la integridad de los cuerpos de onclusión virales y por consiguiente disminuir su eficacia y actividad biocontroladora, es decir, que valores de pH neutros son más recomendables que aquellos que se acercan a los límites de aceptación.

El tamaño de partícula de los formulados debe oscilar entre 5,0 -70,0 µm, encontrándose entre un 88% y un 90% de las partículas con un diámetro entre 10 y 40 µm. Teniendo en cuenta que la abertura bucal de una larva neonata de *S. frugiperda* es de aproximadamente 70 µm, el tamaño de partícula obtenido para el formulado es adecuado para permitir su consumo por el insecto y con base en este resultado se ha establecido como límite de aceptación para esta característica, que más del 80% de las partículas debe tener un tamaño entre 10 y 40 µm.(Caballero et al., 2001).

La concentración de contaminantes en un bioinsecticida es de gran importancia debido a que un alto contenido de microorganismos afecta la viabilidad o integridad del principio activo y su actividad biológica, además de representar un riesgo para la salud humana y para el medio ambiente (Quiroga et al., 2009).

En Estados Unidos el contenido de contaminantes permitido para productos a base de virus es hasta 10^{8} UFC/g (Lasa et al., 2009). Cabe resaltar que si se presentan altos niveles de contaminantes en el producto, estos pueden ser indicativos de una alta carga microbiana presente en el inóculo utilizado como principio activo (larvas

infectadas). Para esto se recomienda reducir el número de contaminantes mediante la utilización de insectos sanos y libres de microorganismos antes de ser infectados con el virus, trabajadores con una higiene adecuada y la recolección de larvas antes de la lisis celular para evitar la contaminación por microorganismos saprófitos (Villamizar *et a*l., 2005 citado en Villamizar *et al*., 2012).

Con respecto a la actividad insecticida, las formulaciones no deben afectar la actividad insecticida del virus. La disminución en la eficacia durante el almacenamiento puede deberse a la hidrólisis y autooxidación resultante de la exposición al oxígeno de los derivados lipídicos que están presentes en los cadáveres de los insectos y que no fueron removidos por la filtración de la suspensión viral (Lasa et al., 2009). Este fenómeno también fue observado por Ignoffo y García (1994), quienes determinaron que los superóxidos y radicales libres generados por la autooxidación fueron capaces de modificar la estructura de los ácidos nucleicos de los nucleopoliedrovirus y causar la pérdida de patogenicidad en almacenamiento. De igual manera Lasa et al., (2009) evidenciaron que la actividad insecticida de un bioplaguicida a base de NPV almacenado a 25 ºC se redujo significativamente después de 6 meses de almacenamiento y presentó una inactivación total a los 18 meses del estudio.

6 CONCLUSIONES

Mediante la recopilación de información en el presente trabajo se comprendió el mecanismo de infección por los cuales los nucleopolihedrovirus ejercen control biológico, generando muerte a los insectos principalmente del género lepidóptera.

De acuerdo a los estudios internacionales mencionados en la presente monografía se conocieron diversas experiencias en el uso de nucleopolihedrovirus y su efectividad para el control de *S. frugiperda* en maíz.

El uso de cepas nativas, propias de cada región, presentan mejores efectos de infección frente a la plaga que se quiere controlar, sin embargo es posible que cepas foráneas presente un control adecuado de la plaga.

La recopilación de información en el presente trabajo, muestran el efecto de los nucleopoliedrovirus como una herramienta útil en el control de plagas a nivel nacional e internacional. En Colombia la corporación Colombiana de investigación agropecuaria ha sido pionera en realización de diversos estudios que han permitido obtener cepas específicas para el control de *S.frugiperda* con éxito, sin embargo se hace necesario aumentar esfuerzos que permitan desarrollar un producto efectivo y al alcance de los agricultores.

Teniendo en cuenta que el uso de insumos biológicos en agricultura permite disminuir la aplicación de agroquímicos, podemos decir que el uso de nucleopolihedrovirus puede implementarse como una herramienta en el manejo integrado de plagas mitigando el impacto ambiental a los ecosistemas que genera la aplicación indiscriminada de insumos químicos.

7 BIBLIOGRAFIA

Abadías, M.; Teixidó, N.; Usall, J.; Benabarre, A.; Viñas, I. (2001). Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agente Candida sake using different protective and rehydration media. Journal of Food Protection. 64(6):856-861

Arce, G. S., Moscardi, F., Sosa, Gómez. (1999) Susceptibilidade de Spodoptera frugiperda a isolados geograficos de um virus de poliedrose nuclear. Pesq. Agropec. Bras. 34: 1539-1544.

Barrera, G., Simón, O., Villamizar, L., Williams, T. Caballero, P. (2011). Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. Biological Control 58: 113–120.

Berretta, M., Ríos, M., Sciocco De Cap. A. (1998). Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of Spodoptera frugiperdafrom Argentina. Journal of Invertebrate Pathology. 71: 280-282

Caballero, Primitivo., Murillo, R., Muñoz, D., Williams, Trevor. (2009) El nucleopoliedrovirus de Spodoptera Exigua (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances resientes en España. En: Revista Colombiana de Entomología. 35 (2): 105-115.

Caballero, Primitivo., Williams Trevor. (2008). Virus entomopatógenos. Control biológico de plagas agrícolas. Phytoma. Visto en http://www.trevorwilliams.info/caballero_williams_fasciculo_2008.pdf

Caballero, Primitivo., López, F., Williams, Trevor. (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. En: Phytoma. S. A., Valencia, España.

Casmuz, A. M., Juárez, M. L., Socías, G. M., Murúa, G., Prieto, S., Medina, S., Willink, E., Y Gastaminza, G. (2010). Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Rev. Soc. Entomol. Argent. 69 (3-4): 209-231.

Castro, B. M., Ribeiro, A. Z., Souza, L. M. (2006). Infectivity of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus to different insect cell lines: Morphology, viral production and protein synthesis. Biological control. 36: 299-304.

Cisneros,J., Peréz, J.A., Penagos, D., Ruiz,V. J., Goulson, Dave., Caballero, P., Williams, T. 2002. Formulation of a Nucleopolyhedrovirus whith Boric Acid for control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae) in miaze... Biological control. 23: 87-95

Claus, J. D., Gioria, V. V., Micheloud, Gabriela., Y Visnovsky, Gabriel. (2012) Production of Insecticidal Baculoviruses in Insect Cell Cultures: Potential and Limitations. En: http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/27802.pdf

Clavijo, S., Perez, G. G., 2000. Capítulo 6 protección y sanidad vegetal. Seccion 2. Insectos plagas del maíz. En http://www.bio-nica.info/biblioteca/Clavijo2000maiz.pdf.

Enviromental Protection Agency (EPA). (2011). Pesticides: Regulating pesticides. In: http://www.epa.gov/pesticies/biopesticides. (Consulta: septiembre 1 de 2014).

Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R., Chapman, J. W., Caballero, P. (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of Spodoptera frugiperda(Lepidoptera: Noctuidae): estructural, genetic and biological comparison of four isolates from the Americas. Journal of Economic Entomology. 92: 1079-1085.

Estrada A. J. Pastos y Forrajes para el trópico colombiano. Universidad De Caldas. Colombia. (2002). pág. 402.

Farias de Almeida, A., Ribeiro de Macedo, G., Chee Loong, C., Y Da Silva, P. M. (2010). Kinetic Analysis of in vitro Production of Wild-Type Spodoptera frugiperda Nucleopolyhedrovirus. Brazilian archives of Biology and technology. 53 (2): 285-291.

Fernandez J.L. 2002. Nota corta: Estimación de umbrales economicos para Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera:Noctuidae) en el cultivo del maiz. Laboratorio de control biologico. Facultad de ciencias Agricolas. Universidad de Granma. Consultado en http://www.inia.es/gcontrec/pub/fernandez_1161159402468.pdf

Funk, J., Braunagel, S. C. & Rohrmann, G.F. 1997. Baculovirus structure. pp. 7-32. En: The Baculoviruses. L. Miller (ed.). Plenum Press, New York

Fuxa, J. R., Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. (2004). En: Agriculture, Ecosystems and Environment. 103: 27-43

Gioria,V.V., Janger,V.,Claus,J.D., (2006). Growth, metabolism and baculovirus production in suspensión cultures of an *Anticarcia gemmatalis* cell line. Cytotechnology 52, 113-124.

Gómez, J.; Guevara, J.; Barrera, G.; Cotes, A.; Villamizar, L. (2010). Aislamiento, identificación y caracterización de nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. En: Revista Facultad Nacional Agronomía. Medellín 63(2): 5511-5520.

Granados, R. R. & Lawler, K. A. (1981). In vivopathway of Autographa californica baculovirus invasion and infection. Virology108, 297-308.

Gross, C. H., Russell, R. L. & Rohrmann, G. F. (1994). Orgyia pseudotsugata baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure. J Gen Virol75 (Pt 5), 1115-1123.

Haase, S., Ferrelli, L., Pidre, M.,y Romanowski V. 2013. Genetic engeneering of Baculovirus. En: http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/45876.pdf.

Ignoffo, C.; García, C. (1994). Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the Heliothisbaculovirus by simulated sunlight UV. Environmental Entomology, 23: 1025 - 1029.

Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. En: Archives of Virology. 151: 1257-1266.

Kalmakoff y Ward. 2003. Universidad de Otago. New Zeland. Visto en: http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/baculo.html

Lasa, R., Pagola, I., Ibañez,I., Belda, J.E., Williams, T. Y Caballero, P. (2007). Eficacy of Spodoptera exigua multiple nuclepolyhedrovirus as a biological insecticide for bett armyworm control in greenhouses of sutrern Spain. BIocontrol Science and Technology. 17 (3): 221-232.

Lasa, R., Williams, T., Caballero, P. 2009. The attractivesness of phagoestimulant formulations of a nucleopolyhedrovirus – based insecticides depends on prior insect diet. J. Pest Sci. 82: 247-250.

Lasa, R.; Williams, T.; Caballero, P. (2008). Insecticidal properties and microbial contaminants in a Spodoptera exiguamultiple nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. Journal of Economic Entomology 101: 42-49

López, M. (2010) Complementación de Baculovirus que no forman cuerpos de occlusion mediante líneas celulares establemente transformadas con el gen poliedrina. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Martínez, A. M., Pineda,S., Figueroa, I., Chavarrieta, J.M., Williams, T. 2012. Los baculovirus como bioinsecticidas: evaluacion de un nucleopoliedrovirus para el combate de *Spodoptera fruiperda* (Lepidoptera: Noctuidae en Mexico y Honduras). Ciencia Nicolaita 56. 35-47

Mccarthy. C., And Theilmann. D. (2008). AcMNPV ac 143 is essential for ating budded virus production and is 30th baculovirus core gene. En: J. Virology. 375 (1), 277-291.

Moscardi, F. (2007). A Nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian Soybeans. En Vincent, C., Goettel, M., Lazarovits, G. Biological control. A global perspective. 344 – 352 p.

Murúa, M.G., Juarez, M. L., Prieto, S., Gastaminza, G., Willinkl, E. 2009. Distribución temporal y espacial de poblaciones larvarias de Spodoptera frugiperda (Smith) (Lep.: Noctuidae) en diferentes hospederos en provincias del norte de la Argentina.Rev.Ind. y Agric. De Tucumán. 86 (1) 25-36.

Murúa, M.G., & Virla, E.G.,2004. Presencia invernal de Spodoptera frugiperda (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el área maicera de la provincia de Tucumán, Argentina. Rev facultad de agronomía, La Plata 105 (2).

Ojeda. Z., Multiplicación de Baculovirus para el control de *Euprosterna eleasa* en palma de aceite. (2002). Bogota. Trabajo de grado (Maestría en Biología). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas.

Ohkawa, T., Washburn, J. O., Sitapara, R., Sid, E. & Volkman, L. E. (2005). Specific binding of Autographa californicaM nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of Heliothis virescens larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115. J Virol79, 15258-15264.

Olszewski. J., Miller. L,K. (1997) Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation. J. Virol. Jul;71(7):5040-50.

Peng, Ke., Minzhi, W., Fei, D., Jingjiao, S., Chunsheng, D., Hualin, W., Zhihong, H.(2010). Identification of protein–protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus. En: J. General virology. 91:659-670

Peters, W. (1992). Peritrophic Membranes. Berlin. Springer. 1st ed.

Polania. I,Z., Arevalo. M, H., Mejia. C, R., Díaz. S, J. (2009). Spodoptera frugiperda: respuesta de distintas poblaciones a la toxina Cry 1Ab. Rev. Colomb. Entomol. 35: (1)

Possee, R.; Griffiths, C.; Hitchman, R.; Chambers, A.; Murguiameca, F.; Danquah, J.; Jeshtadi, A.; King, L.(2010). Baculoviruses: Biology, replication and exploitation. In: Insect virology. Caister Academic Press. Gran Bretaña. 35-57

Quiroga, I., Gomez, M., Villamizar, L. (2011). Estabilidad de las formulaciones a base de Granulovirus frente a *Tecia solanivora* en campo. En: Revista Colombiana de entomología. 37 (1): 27-35

Rangel N. J., Vásquez, R. Ma., Del Rincón, Castro. Ma. (2014) Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de Baculovirus SfNPV, con actividad bioinsecticida hacia una población Mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Interciencia. 39 (5), 320-326

Ríos, V. C., Gallegos, M. G., Berlanga, R. D., Cambero, C. J., And Romo, C. A. (2012). Mortality and Production of Occlusion Bodies in *Spodoptera frugiperda* Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) Treated with Nucleopolyhedrovirus. Florida Entomologist 95(3):752-757.

Rios, V. C., Gallegos,M.G., Del Rincon, C.C.,Cerna,C.E., Sanchez, P.S., Cepeda, S. M. 2012. Insecticidal activity of native aislates of Spodopters frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus from soil samples in Mexico. Florida Entomologist. 94 (3) 716.

Rohrmann, G.F. (2008). Baculovirus Molecular Biology. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fci?book=bacvir

Rohrmann, G. (2008). Introduction to the baculoviruses and their taxonomy. www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi?book=bacvir...pdf.

Rohrmann, G. 2013. Baculovirus molecular biology. 3ra edición. www.ncbi.nlm.nih.gov/Books/NBK49500/

Salvador, R. 2010. Caracterización biológica y molecular de genes involucrados en la virulencia de baculovirus de importancia agronómica. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata. Argentina.

Simon, O., Williams, T., Possee, R. D., Lopez, F. M. And Caballero, P. (2010). Stability of a Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus deletion recombinant during passage in insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (3), 803-809.

Szewczyk, B.; Hoyos, L.; Paluszek, M.; Skrzecz, I.; Lobo, M. (2006). Baculoviruses - re-emerging biopesticides. Biotechnology Advances. 24: 143– 160.

Tanada, Y. y H.K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press, San Diego, CA.
van Oers, M. M. 2011. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system. Journal of Invertebrate Pathology 107: 3-15.

Tamez, P.; Zamudio, V.; Martínez, J.; Rodríguez, C.; Tamez, R.; Gómez, R. (2006). Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. Ciencia UANL. 10(2). pp. 149-156.

Theilmann, D. A.,Blissard, G. W., Bonning, B., Jehle, J. A., O'reilly, D. R., Rohrmann, G. F., Thiem, S., Vlak, J. M. (2005). Baculoviridae, pp. 177-185. En: Fauquet, C. M.; Mayo, M. A.; Maniloff, J.; Desselberger, U.; Ball, L. A. (Eds.). Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, San Diego, California. 1259 p.

Valicente, F. y Da Costa. E. 1995. Controle da la lagarta do cartucho Spodoptera frugiperda (J.E. Smith), com o baculovirus Spodoptera aplicado via água de irrigação. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 24(1): 61-67.

Van Oers Mm, Vlak Jm. (2007). Baculovirus genomics. Curr Drug Targets. Oct;8 (10): 1051-68.

Villamizar, L., Zedda, J., Espinel, C., Cotes, A. M., (2005) Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base de granulaovirus de *Phthorimaea operculella* PhoGV. En: Rev. Colombiana de entomología. Vol 31: 2

Villamizar, L., Guevara, J., Espinel, C., Gómez, M., Gómez, J., Cuartas, Paola., Barrera, G., Cruz, M., Santos, A., Uribe,L., Ruiz, C., Castro, O., López-Ferber, M., Valicente, F., Caballero, P., Simón, O., López Ávila, A., Marínez, F., Cotes, A. M. (2012). Desarrollo de un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera Frugiperda*. Bogotá: Corpoica.

Wang, P., Granados, R. (1997). An intestinal mucin is the target substrate for a Baculovirus enhancin. En: http://www.pnas.org/content/94/13/6977.full.pdf Revisado 03- 2014

Yang, S., And L. K. Miller. (1999). Activation of baculovirus very late promoters by interaction with very late factor 1. J. Virol. 73**:**3404-3409.

Zenner De Polania, Ingeborg., Arevalo, Helver., Mejia, Rodolfo. (2007). El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. Revista colombiana en ciencias hortícolas. 1 (1): 103 -111