



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE AGRONOMÍA



ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACULOVIRUS PROCEDENTES DE REGIONES  
HORTÍCOLAS DE MÉXICO SOBRE LARVAS DE *spodoptera exigua* (J. E. SMITH)  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Por:

Fidencio Álvarez Antúnez

Tesis profesional presentada como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero  
Agrónomo Fitotecnista



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
FACULTAD DE AGRONOMÍA



ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BACULOVIRUS PROCEDENTES DE REGIONES  
HORTÍCOLAS DE MÉXICO SOBRE LARVAS DE *spodoptera exigua* (J. E. SMITH)  
(LEPIDÓPTERA: NOCTUIDAE)

Por:

Fidencio Álvarez Antúnez

Tesis profesional presentada como requisito parcial para obtener el título de  
Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

Asesor Dr. Ovidio Díaz Gómez

Revisores Dr. Ramón Jarquin Gálvez

Dr. José Marín Sánchez

Asesor externo Dra. Ana Mabel Martínez Castillo

El trabajo titulado “Actividad biológica de baculovirus procedentes de regiones hortícolas de México sobre larvas de *Spodoptera exigua* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)” fue realizado por Fidencio Álvarez Antúnez como requisito parcial para obtener el título de “Ingeniero Agrónomo Fitotecnista” y fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

Dr. Ovidio Díaz Gómez \_\_\_\_\_

Asesor

Dr. Ramón Jarquín Gálvez \_\_\_\_\_

Revisor

Dr. José Marín Sánchez \_\_\_\_\_

Revisor

Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a los 18 días del mes de noviembre de 2011.

## **DEDICATORIAS**

A MIS HERMANOS.

A Isabel, Crescencio y Miguel por darme el apoyo económico, confianza para alcanzar la meta.

A MIS PADRES.

Luís Aurelio y Ernestina Adela por darme una educación.

A MIS PADRINOS

Juan, Camila, Josefina, y Medardo los que me apoyaron a lo largo de mi vida y mi carrera.

A MI SOBRINA

Edith por sus ánimos, sus buenos consejos en las buenas y malas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de San Luís Potosí

A la Facultad de Agronomía

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### A MIS ASESORES

Dr. Ovidio Díaz Gómez.

Por la gran ayuda brindada, por ser un gran profesor que admiro mucho por su gran dedicación al trabajo de investigación y por contactarme en un excelente institución para lograr concluir mi trabajo de tesis.

Dra. Ana Mabel Martínez Castillo.

Del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto Actividad biológica de dos aislados de baculovirus procedentes de dos regiones hortícolas de México y un insecticida viral (SpoD-X®) en larvas de segundo estadio de *Spodoptera exigua* (J.E.SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), por su paciencia y por responder siempre mis dudas.

A los Doctores: Ramón Jarquin Gálvez y José Marín Sánchez.

Por su revisión y valiosa orientación para la culminación de mi trabajo.

### A MIS PROFESORES

Ing. Jesús Huerta, Ing. Cuellar, Ing. Soria, L. A. A. Vaglienty y al Ing. Gaytán, gracias

## CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Los Baculovirus.....	4
Morfología.....	4
Taxonomía.....	5
Ciclo de Infección .....	6
El Gusano Soldado, <i>Spodoptera exigua</i> .....	9
Origen, Importancia y Plantas Hospederas .....	9
Ciclo de Vida y Morfología.....	10
Enemigos Naturales.....	11
Métodos de Control.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS .....	12
Cría del Insecto.....	12
Replicación de los Virus.....	12
Bioensayo .....	13
Análisis Estadístico .....	14
RESULTADOS.....	15
Estimación de las CL <sub>50</sub> s .....	15
Estimación del Tiempo Medio Para Morir (TMM).....	15

Mortalidad Acumulada.....	17
DISCUSIÓN... ..	19
CONCLUSIONES .....	23
LITERATURA CITADA.....	24
Anexo 1 .....	30

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Valores de las CL <sub>50</sub> s de cinco aislamientos de baculovirus en larvas de segundo estadio de <i>S. exigua</i> .....	15
2	Tiempo medio para morir (TMM) de cinco aislamientos de baculovirus en larvas de segundo estadio de <i>S. exigua</i> .....	16

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	a) Microfotografía de cuerpos de inclusión (OBs) b) Representación esquemática de los viriones brotados y virus derivados de los cuerpos de inclusión (adaptado de Miller, 1988).....	6
2	Representación esquemática del proceso infeccioso de los baculovirus (tomado de Caballero <i>et al.</i> , 2009).....	8
3	Daños causados por <i>S. exigua</i> en plantas de tomate (fotografía de A. Martínez) .....	9
4	Sintomatología de una larva de <i>S. exigua</i> previa a la muerte (A) y muerta (B) por la acción de su nucleopoliedrovirus ocho días posteriores a la inoculación (fotografía de Álvarez, A. F.) .....	16
5	Mortalidad acumulada de larvas de segundo estadio de <i>S. exigua</i> tratadas con cinco aislados de baculovirus. Las concentraciones de los aislados fueron calculadas para provocar $\approx 90\%$ de mortalidad.....	17
6	Mortalidad acumulada de larvas de segundo estadio de <i>S. exigua</i> tratadas con cuatro aislamientos de baculovirus (A-D) en comparación con el producto comercial SpoD-X® a una concentración de $1 \times 10^6$ OBs/ml (prueba t-student, $P = 0.05$ para comparaciones en cada tiempo, ver texto) .....	18

## RESUMEN

Los nucleopoliedrovirus (NPVs) (Baculoviridae) son virus entomopatógenos que tienen un alto potencial para ser desarrollados como bioinsecticidas en programas de control de plagas. En la presente investigación se estimó la actividad biológica, a través de la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) y el Tiempo Medio de Mortalidad (TMM), de cuatro aislamientos de NPVs obtenidos de larvas de *S. exigua* colectadas en dos zonas productoras de hortalizas de los estados de Sinaloa y San Luis Potosí, México. Debido a que las colectas se realizaron en dos años diferentes, los aislamientos se catalogaron como SLP-2006, SLP-2008, SIN-2006 y SIN-2008. Los bioensayos se realizaron en laboratorio con larvas de segundo estadio de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), las cuales se inocularon mediante la técnica de ingestión de la gota con los aislamientos antes mencionados y un producto comercial del nucleopoliedrovirus de *S. exigua* (SeMNPV) (Spod-X<sup>®</sup>). Para determinar las  $CL_{50}$ s, se prepararon seis concentraciones de los virus en un rango de  $3.09 \times 10^2$  a  $9.6 \times 10^5$  cuerpos de inclusión (OBs, por sus siglas en inglés)/ml. Para determinar el TMM, se aplicó una sola concentración con la cual se esperó obtener ~ 90% de mortalidad larvaria para cada aislamiento. También se realizaron bioensayos para observar la mortalidad larvaria acumulada cuando se aplicó una sola concentración para todos los aislamientos ( $1 \times 10^6$  OBs/ml). Los valores de las  $CL_{50}$ s para los aislamientos SLP-2006 ( $1.07 \times 10^6$  OBs/ml) y SLP-2008 ( $3.92 \times 10^6$  OBs/ml), fueron significativamente mayores que el valor calculado para Spod-X<sup>®</sup> ( $3.82 \times 10^4$  OBs/ml) de acuerdo a sus límites de confianza al 95%. El valor de la  $CL_{50}$  para el aislamiento SIN-2006 ( $9.75 \times 10^4$  OBs/ml) no fue estadísticamente diferente a Spod-X<sup>®</sup>. Sin embargo, el calculado para el aislamiento SIN-2008 ( $4.11 \times 10^3$  OBs/ml) fue significativamente menor comparado con éste último. Los valores del TMM para las larvas de *S. exigua* tratadas no difirieron significativamente entre los aislamientos probados. Lo anterior también se reflejó en la mortalidad acumulada cuando se aplicó una sola concentración, ya que todos los aislamientos tuvieron la misma tendencia de mortalidad en un periodo de 96 a 184 h posteriores a la inoculación. Se concluye el aislamiento más activo fue SIN-2008 y que

existe cierta variabilidad en la patogenicidad entre los aislamientos evaluados. Sin embargo, en términos de virulencia la respuesta fue homogénea.

## SUMMARY

The nucleopolyhedrovirus (NPVs) (Baculoviridae) are entomopathogenic viruses that have a high potential to be developed as bio-insecticides in pest control programs. In the present study, the biological activity was estimated through the median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) and the mean time to death (MTD), four isolates of NPVs obtained from larvae of *S. exigua* collected in two vegetable producing areas in the states of Sinaloa and San Luis Potosi, Mexico. Since collections were made in two different years; the isolates were classified as SLP-2006, SLP-2008, SIN-2006 and SIN-2008. Bioassays were conducted in laboratory with second instar *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), which were inoculated by a standard droplet-feeding method with the isolates mentioned above and the commercial product of nucleopolyhedrovirus of *S. exigua* (SeMNPV) (Spod-X<sup>®</sup>). To determine CL<sub>50</sub>s were prepared six concentrations of the viruses ranging from 3.09 x 10<sup>2</sup> to 9.6 x 10<sup>5</sup> occlusion bodies (OBs)/ml. To determine the MTD, a single concentration with which the expected ~ 90% of larval mortality for each isolate was applied. Bioassays were also conducted to observe the cumulative larval mortality when a single concentration for all isolates (1 x 10<sup>6</sup> OBs/ml) was applied. The CL<sub>50</sub>s values for the isolates SLP-2006 (1.07 x 10<sup>6</sup> OBs/ml) and SLP-2008 (3.92 x 10<sup>6</sup> OBs/ml), were significantly higher than the value calculated for Spod-X<sup>®</sup> (3.82 x 10<sup>4</sup> OBs/ml) according to the confidence limits at 95%. The CL<sub>50</sub> value for SIN-2006 (9.75 x 10<sup>4</sup> OBs/ml) was not statistically different to Spod-X<sup>®</sup>. However, CL<sub>50</sub> value for SIN-2008 (4.11 x 10<sup>3</sup> OBs/ml) was significantly lower compared with the latter. MTD values for the larvae of *S. exigua* treated did not differ significantly among the isolates tested. This was also reflected in cumulative mortality when applied a single concentration, since all isolates had the same mortality trend in a period of 96 to 184 h post-inoculation. In conclusion, we observed that the more active isolate was SIN-2008 and that there is some variability in pathogenicity among the isolates tested. However, in terms of virulence response was homogeneous.

## INTRODUCCIÓN

En México, el sector agrícola forma parte fundamental de la economía nacional; sin embargo, uno de los principales problemas a los que se enfrentan los agricultores es la continua presencia de los insectos plaga. El gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidóptera: Noctuidae) es una especie mundialmente distribuida, más comúnmente, en regiones tropicales y subtropicales (CAB International, 2000). Es una plaga económicamente importante en diferentes cultivos de invernadero y de campo, que además, ha adquirido altos niveles de resistencia a la mayoría de los insecticidas químicos (Brewer y Trumble, 1994). Gastélum *et al.* (1999) señalan que dicho insecto puede ocasionar daños mayores a 20% en el cultivo de tomate en el estado de Sinaloa, México.

Para el control de *S. exigua* se llevan a cabo hasta 15 aplicaciones de insecticidas químicos por ciclo de cultivo. Los problemas asociados al empleo masivo de los insecticidas convencionales incluyen la intoxicación de los agricultores, resurgimiento de plagas, desarrollo de resistencia y daños en el ambiente (Boller *et al.*, 1998). Aunado a ello, los insecticidas químicos eliminan las poblaciones de la fauna benéfica presentes en los cultivos, provocando la necesidad de aplicaciones aún más frecuentes (Whalon *et al.* 2004), Dicha problemática ha generado un gran interés por utilizar métodos de control eficaces, ambientalmente seguros y que sean factibles de ser utilizados por los agricultores. Entre los métodos alternativos de control de insectos que han recibido mayor atención se encuentran los virus entomopatógenos (Caballero *et al.* 2009).

La familia Baculoviridae incluye a virus de ADN específicos de artrópodos que desempeñan un papel importante en la regulación de las poblaciones naturales de los individuos huésped (Tanada y Kaya, 1993). Además de su especificidad, los baculovirus son compatibles con la acción de otros enemigos naturales, tales como parasitoides y depredadores (Williams *et al.*, 1999). Todo lo anterior ha contribuido a que actualmente los baculovirus sean utilizados como bioinsecticidas tanto en sistemas agrícolas como forestales (Moscardi, 1999).

Específicamente, un aislado del nucleopoliedrovirus de *S. exigua* (SeMNPV) originario de Florida, Estados Unidos de América, se ha desarrollado como un producto comercial registrado bajo el nombre de Spod-X<sup>®</sup> en Holanda, Estados Unidos y Tailandia (Smits y Vlak, 1994). El producto se utiliza en los invernaderos de los Países Bajos en cultivos de plantas ornamentales y actualmente el virus es comercializado por la empresa Certis USA (Certis, 2011).

El SeMNPV también se ha aislado en otras regiones del mundo como Tailandia, Países Bajos, Taiwán, India, Egipto, Japón y España, donde ha surgido el interés por caracterizar la actividad biológica de virus autóctonos que puedan tener potencial para ser utilizados como insecticidas biológicos (Lasa, 2007). En México, también se tiene interés por la exploración de baculovirus que infectan a *S. exigua*, debido a ello en el presente estudio se compara la actividad biológica de cuatro aislamientos de baculovirus procedentes de dos regiones hortícolas de México con el insecticida Spod-X<sup>®</sup> en larvas de segundo estadio de *S. exigua*.

## **Objetivos**

### **General**

Evaluar la actividad biológica de aislamientos de baculovirus procedentes de dos regiones hortícolas de México y del insecticida viral SpoD-X<sup>®</sup> sobre larvas de segundo estadio de *S. exigua*.

### **Específicos**

1. Determinar las concentraciones letales medias (CL<sub>50</sub>) de cuatro aislamientos de baculovirus y el insecticida viral SpoD-X<sup>®</sup> en larvas de segundo estadio de *S. exigua*.
2. Estimar el tiempo medio de mortalidad (TMM) de cuatro aislamientos de baculovirus y el insecticida viral SpoD-X<sup>®</sup> en larvas de segundo estadio de *S. exigua*.

### **Hipótesis**

El SeMNPV es patógeno a larvas de *S. exigua* en condiciones de laboratorio, y puede ser desarrollado como bioplaguicida para regular su densidad de población.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Los Baculovirus

Existen 14 familias de virus asociadas a invertebrados (Toledo e Infante, 2008). La familia Baculoviridae es la más numerosa de todos los grupos de virus patógenos de insectos (Hunter–Fujita *et al.*, 1998). Esta familia incluye a virus altamente específicos hacia los insectos. Aunque algunos han sido aislados de crustáceos (Decapoda) y arácnidos (Acari). A la fecha, los baculovirus han sido aislados de más de 600 huéspedes, los cuales mayoritariamente son lepidópteros, dípteros e himenópteros. La clasificación a nivel género se basa en la morfología de la partícula viral y hospedero, mientras que las identificaciones específicas se basan en características bioquímicas, genéticas, serológicas y biológicas (Caballero *et al.*, 2001).

Los insecticidas microbianos poseen un gran potencial para utilizarse como agentes de control de plagas insectiles. Los primeros casos de control de insectos plaga con baculovirus se reportaron en 1892 y 1913, para controlar *Lymantria monacha* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) en Alemania y *Lymantria dispar* L. en Estados Unidos, respectivamente (Szewczyk *et al.*, 2006). En 1975 (Moscardi *et al.*, 2002). Se comercializó el primer insecticida viral, con el nombre de Elcar TM (Sandoz Inc.) para el control de *Helicoverpa zea* Boddie (Lepidoptera: Noctuidae). Actualmente, existen más de 30 insecticidas basados en baculovirus para el control de plagas agrícolas y forestales (Moscardi, 1999; Caballero *et al.*, 2001).

### Morfología

La familia Baculoviridae es la más numerosa y ampliamente estudiada de todos los grupos de virus patógenos de insectos. Son un grupo de virus que deben su nombre a la forma de varilla o de bastón (baculum = bastón) de sus viriones (Caballero *et al.*, 2009) (Figura 1). Agrupa a virus de DNA de doble cadena que contienen aproximadamente 90-200 kilobases en el cual se encuentran entre 100 y 200 genes (Szewczyk *et al.*, 2006). La nucleocápsida, es una estructura en forma de vaina o cápsida cilíndrica, tapada por ambos extremos (base y tapa) y, que en su interior, contiene el ADN genómico enrollado y altamente condensado. El genoma es condensado dentro de la nucleocápsida por la

proteína p6.9. La nucleocápsida tiene una longitud de 200-450 nm; 30-100 nm en diámetro y presenta simetría helicoidal. La función principal de la nucleocápsida es la de transportar la información genética del virus hasta la célula huésped (Federici, 1986). Los viriones son las entidades infecciosas de los baculovirus y son los responsables de su dispersión en los órganos y tejidos. En determinado momento de la morfogénesis, algunos viriones quedan dentro de los cuerpos de inclusión (OBs, por sus siglas en inglés), y es dentro de éstos, donde el virus puede ser diseminado en el ambiente (Caballero *et al.*, 2001) (Figura 1).

### **Taxonomía**

La taxonomía de los baculovirus ha sido objeto de varios cambios. Actualmente, la familia se divide en cuatro grupos: *Alphabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus, específicos para lepidópteros. El tamaño de los cuerpos de inclusión (OBs) es de 0.4 a 3 µm y el tamaño de su genoma varía de 100 a 80 kpb. El género *Betabaculovirus* está integrado por el *Granulovirus* específico de lepidópteros, los cuales producen tanto viriones brotados (BV, por sus siglas en inglés) y viriones derivados de la inclusión (ODV, por sus siglas en inglés). El tamaño de los cuerpos de inclusión (OBs) es de 300-500 × 130-250 nm y del genoma de 100-180 kbp. *Gammabaculovirus*, este grupo tienen cuerpos de inclusión (OBs) de 0.4-1.1 µm de tamaño con nucleocápsides simples envolviendo a sus viriones. Los genomas son de más o menos 82-86 kbp y parecen ser más pequeños en promedio que los de VPN específicos de lepidópteros. *Deltabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus específicos para dípteros. Los nucleopoliedrovirus tienen de 0.15-15 µm en tamaño, los viriones se encuentran solos (de tipo simples, SNPVs) o en grupos (de tipo múltiple, MNPV) envueltos en una membrana (Jehle *et al.*, 2006; Caballero *et al.*, 2009).

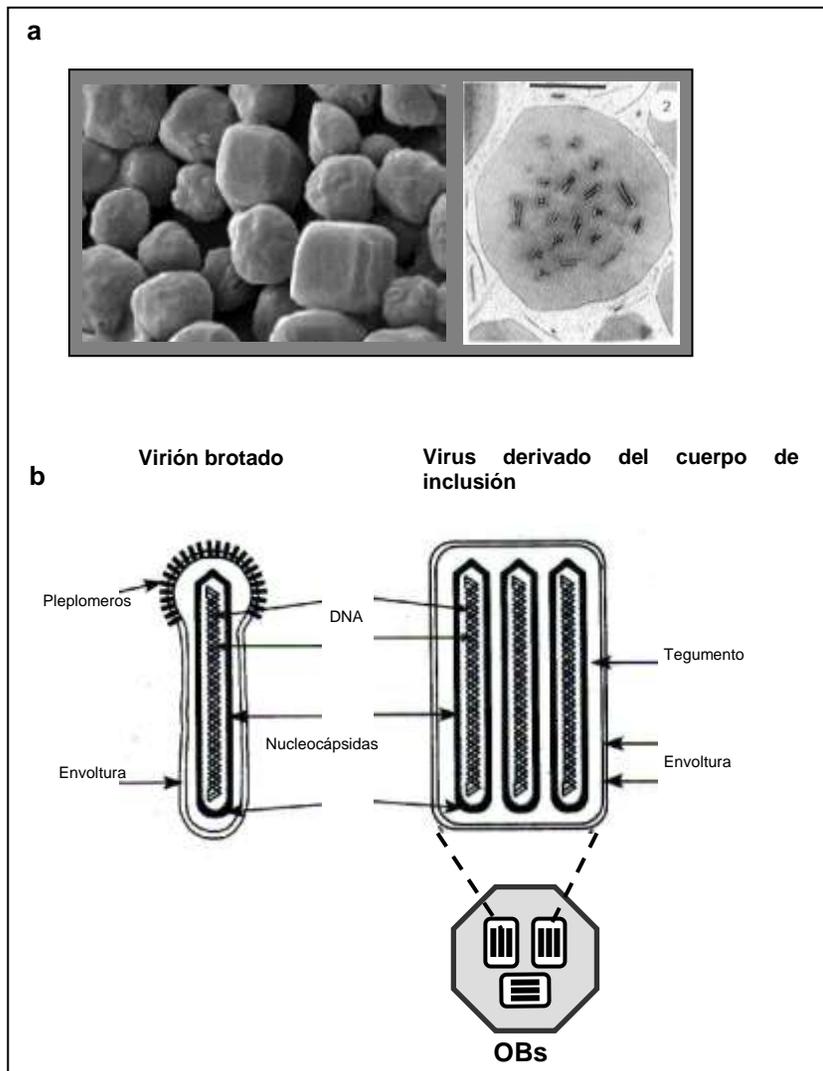


Figura 1. a) Microfotografía de los cuerpos de inclusión (OBs), b) Representación esquemática de los viriones brotados y virus derivados de los cuerpos de inclusión (adaptado de Miller, 1988).

### Ciclo de Infección

Los baculovirus son altamente patogénicos e inducen infecciones letales en sus hospederos y el estado más susceptible es la larva. Estos virus, al igual que la mayoría de otros patógenos, deben ser ingeridos para poder replicarse. Sin embargo, pueden ingresar al insecto por otras vías, entre ellas: transovarial (por contaminación superficial de los huevos), transóvulo (por contaminación interna de los huevos) (Tanada y Kaya, 1993), o a través de los espiráculos (Kirkpatrick *et al.*, 1994; Gallegos *et al.*, 2004).

Según el grupo, los baculovirus afectan diferentes sitios específicos dentro del insecto destruyendo las células, algunos se multiplican en el mesodermo, ectodermo y endodermo, mientras otros afectan el tejido adiposo y la epidermis (Tanada y Kaya, 1993). Toledo e Infante (2008) señalan que las larvas infectadas con baculovirus no presentan síntomas durante los primeros días de la infección. Después de pasar tres o cuatro días se observan cambios en el comportamiento del insecto, las larvas exhiben pérdida de apetito, se tornan blanquecinas debido a la infección de tejido adiposo y son menos activas. La muerte se presenta de cinco a 12 días; sin embargo, las cepas más virulentas puede matar las larvas de primeros instares de dos a cuatro días.

Posterior a la ingestión del alimento contaminado con los OBs, la matriz proteica es rápidamente disuelta por las condiciones alcalinas (pH entre 8-11) que prevalecen en el intestino medio de la larva (Horton y Burand, 1993) (Figura 2). Los viriones que son liberados de los OBs pasan a través de la membrana peritrófica, la cual protege a las células epiteliales del intestino medio de la abrasión física y de agentes microbiales durante la ingestión alimenticia (Tellam, 1996; Wang y Granados, 1998). En las células del intestino medio ocurre la fusión de la envoltura del virión con las microvelocidades de la membrana celular (Tanada y Kaya, 1993). La nucleocápsida entra en el citoplasma y viaja al núcleo, aparentemente a través de los microtúbulos. El ADN del virus es liberado en el núcleo para iniciar el primer ciclo de replicación (Granados y Lawler, 1981; Tanada *et al.*, 1984).

Durante la infección se producen dos tipos del virus: los viriones derivados de los cuerpos de inclusión (ODVs) y los viriones brotados (BVs) (ambas abreviaciones por sus siglas en inglés) (Caballero *et al.*, 2001) (Figura 2). Los BVs son nucleocápsidas que brotan a través de la lámina basal y son los responsables de la infección secundaria en el hemocele, entrando a las células de tejidos secundarios por endocitosis. Los ODVs aparecen más tarde en el ciclo infeccioso como viriones envueltos y embebidos dentro de un cuerpo de inclusión (Evans y Entwistle, 1987). En lepidópteros, se observa que las larvas se alejan de su fuente de alimentación, migrando hacia las partes superiores de la planta, donde mueren sostenidas de sus propatas. Tras la muerte de la larva, sus tejidos se desintegran, se produce la ruptura del tegumento larval y la liberación en masa de los OBs (Granados y Federici, 1986; Miller, 1988).

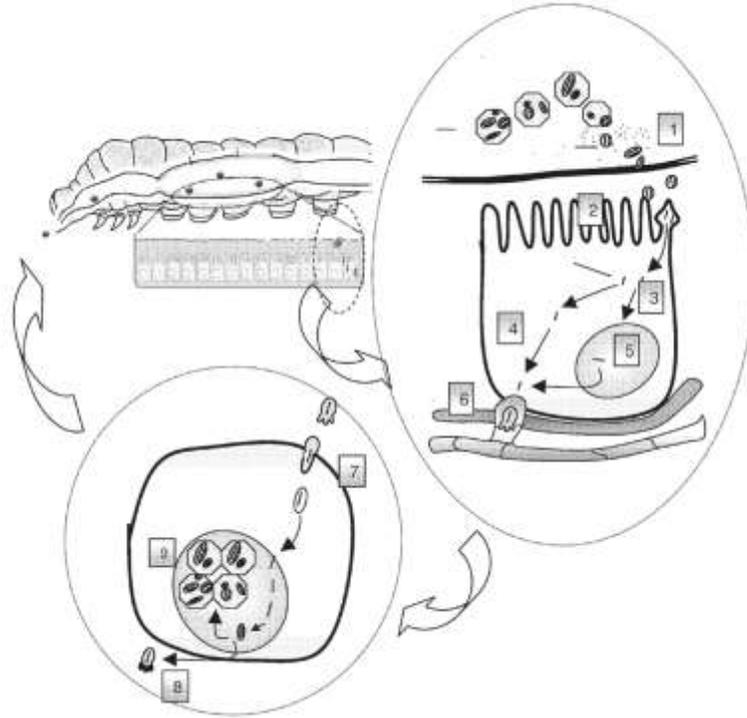


Figura 2. Representación esquemática del proceso infeccioso de los baculovirus (tomado de Caballero *et al.*, 2009). Nota del autor: Los cuerpos de inclusión (OBs) ingeridos se solubilizan en el mesenterón de la larva liberando los viriones derivados de la inclusión (ODVs) (1) y atraviesan la membrana peritrófica (MP) a través de sus poros naturales. La membrana del virión se fusiona con la membrana de la célula epitelial (2) y las nucleocápsidas (NC) desnudas atraviesan el citoplasma (3) y se dirigen al núcleo donde se produce una primera replicación del ADN viral (5). Alternativamente algunas nucleocápsidas atraviesan el citoplasma (4) y, sin pasar por el núcleo, se dirigen a la zona basal. Las nucleocápsidas atraviesan la membrana celular formando los viriones brotados (BVs) (6) y pasan a la cavidad hemocélica a través de las traqueolas (T) evitando la membrana basal (MB). En el hemocele, los BVs llevan a cabo la segunda fase del proceso infeccioso infectando las células de los órganos y tejidos por endocitosis (7). Las nucleocápsidas forman nuevamente BVs favoreciendo la dispersión de la infección (8). Alternativamente forman viriones y OBs completos (9), en una fase más avanzada del proceso infeccioso, que se acumulan en la célula y finalmente producen su lisis liberando los OBs al medio.

## **El Gusano Soldado, *Spodoptera exigua***

Origen, importancia y plantas hospederas

*Spodoptera exigua* es originaria del sur de Asia, pero en la actualidad se distribuye por África, Sur de Europa, India y Sur de Asia, Japón, Australia, Centro América, Estados Unidos y Canadá (Nuez *et al.*, 1996). Es especialmente abundante en Centroamérica, África, Australia, Sur de Asia y Europa. El gusano soldado es una plaga que ha cobrado gran importancia en los últimos años, debido a su gran proliferación en muchos cultivos. En México, se le cataloga como plaga en alrededor de 100 especies cultivadas, de las cuales casi una tercera parte son hortalizas (Mena, 2005) (Figura 3).



Figura 3. Daños causados por *S. exigua* en plantas de tomate (fotografía de A. Martínez).

Las plantas hospederas principales son el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), pimiento morrón (*Capsicum annuum* var. *Annuum*) y chile (*Capsicum annuum* L.) (Capinera, 2004). También se puede alimentar de los siguientes cultivos: lechuga (*Cichorium endivia* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), calabaza (*Cucurbita pepo* L.), chícharo (*Pisum sativum* L.), garbanzo (*Cicer arietinum* L.), arroz (*Oryza sativa* sp.), cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), maíz (*Zea mays* L.), ajonjolí (*Sesamun indicum* L.), linaza (*Linum usitatissimum* L.), soya (*Glycine max* L.), trigo (*Triticum spp* L.) sorgo (*Sorghum vulgare* L.) (Anaya y Romero, 2007).

*Spodoptera exigua* se desarrolla en poblaciones muy numerosas, se comporta como gusano trozador en pequeñas plantaciones y como gusano soldado cuando escasea el alimento. Esta plaga se alimenta durante la noche y durante el día se oculta entre los tallos, raíces de las plantas o en el suelo. La actividad biológica de *S. exigua* varía según el clima; en zonas cálidas se pueden encontrar todas las etapas de desarrollo en el transcurso del año, aunque las poblaciones disminuyen durante los meses de invierno (Pacheco, 1994).

### **Ciclo de Vida y Morfología**

La duración del ciclo biológico del gusano soldado es de aproximadamente 25 a 30 días, o bien 490 unidades calor arriba de 12.2 °C (Capinera, 2004). Los adultos del gusano soldado son palomillas de hábitos nocturnos, de color gris oscuro con pequeñas manchas claras o anaranjadas en las alas anteriores (Pacheco, 1994). Tiene una extensión alar de 30 mm (Anaya y Romero, 2007). Zalom *et al.* (2005) Marín y Bujanos, (2001) señalan que la hembra deposita los huevecillos en masas o grupos de 50 a 150, cubriéndolos con escamas del abdomen y de las alas durante la oviposición, normalmente la producción de huevos es de 300 a 600 por hembra. Al emerger las larvas, se alimentan inicialmente en grupos junto al sitio de emergencia, esclerotizando las hojas e hilando una pequeña telaraña alrededor del sitio en donde se alimentan; posteriormente, el tercer estadio se dispersa y hace perforaciones irregulares en las hojas a medida que se desarrollan (Capinera, 2004).

Las larvas son de color verde pálido o amarillo durante el primero y segundo instar, pero presentan líneas pálidas durante el tercer instar. En el cuarto instar, las larvas son más oscuras dorsalmente y poseen una línea lateral oscura. Durante el quinto instar son de apariencia variable, tienden a ser verdes dorsalmente y de color rosa o amarillo ventralmente y con una línea blanca lateralmente (Pacheco, 1994). Algunas veces las larvas varían de verde claro a negro con tonos verde, pero en todos los casos la larva presenta una mancha negra en el área. Los espiráculos son blancos con un borde negro estrecho. El cuerpo está prácticamente desprovisto de pelos y espinas. Las pupas se encuentran en el suelo. Después de un periodo de uno a dos días, las larvas construyen una cámara con arena y partículas de suelo unidas con una secreción oral que

se endurece cuando se seca. La pupa es de color café brillante y mide aproximadamente 15 a 20 mm de longitud. La duración del estado pupal es de seis a siete días bajo condiciones cálidas (Nuez *et al.*, 1996).

### **Enemigos naturales**

Se pueden citar como enemigos naturales a los parasitoides: *Trichogramma* sp. (*Trichogrammatidae*), *Rogas* sp. (*Braconidae*), *Chelonus* sp. (*Braconidae*) y *Apanteles* sp. (*Braconidae*). Dentro de los depredadores que atacan a los primeros instares de *S. exigua* destacan: *Chysoperla* spp. (*Chrysopidae*), *Orius* spp. (*Anthocoridae*), *Geocoris* spp. (*Lygaeidae*), *Nabis* spp. (*Nabidae*), *Zelus* spp. (*Reduviidae*), *Polistes* spp. (*Vespidae*), *Hippodamia convergens* Guérin-Ménéville (*Coccinellidae*), *Cycloneda sanguinea* L. (*Coccinellidae*), *Collops* spp. (*Malachiidae*) (Anaya *et al.*, 1992; Davidson y Lyon, 1992; Apablaza y Vaughan, 1990; Marín y Bujanos, 2001).

Con respecto a los patógenos, el virus de la poliedrosis nuclear (VPN) (*Baculoviridae*) es el factor de mortalidad más importante que contribuye substancialmente a regular las poblaciones de *S. exigua* (Anaya *et al.*, 1992).

### **Métodos de control**

En los últimos años, el control de insectos plaga se ha basado mayoritariamente en el uso de insecticidas sintéticos (Karam *et al.*, 2004). Sin embargo, la tendencia actual en investigación de plaguicidas químicos está orientada al uso de nuevos ingredientes activos que posean una mayor especificidad y respeto por la fauna benéfica o especies no blanco (Dhaliwal *et al.*, 2004). Los insecticidas más utilizados para el control de *S. exigua* son: Carbamatos (metomilo, carbaril, propoxur, tiodicarb), organofosforados (clorpirifos, metamidofos, fenitrotión), piretroides (Fenvalerato, bifentrina, cipermetrina, deltametrina) (Torres *et al.*, 1998).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cría del insecto

Las larvas de *S. exigua* se criaron en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) en Morelia, Mich., donde se realizaron los bioensayos. Las larvas se alimentaron con dieta artificial (Cotton Bollworm; Southland Products Inc, Lake Village, Arkansas, EUA). Los adultos se alimentaron con una solución de miel de abeja al 15% y se provieron de papel filtro como sustrato de oviposición, el cual se reemplazó periódicamente. Las condiciones ambientales de cría y de los bioensayos fueron de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $75 \pm 5$  % de HR y 16:8 (L: O).

### Replicación de los Baculovirus

Los aislamientos de baculovirus se obtuvieron en el laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Estos virus se aislaron de larvas de *S. exigua* procedentes de Villa de Arista, San Luis Potosí y del Ejido Bachigualato, Sinaloa, México, las cuales se recolectaron en cultivos hortícolas durante los años 2006 y 2008. Para fines de la investigación, los cuatro aislamientos se identificaron como SLP-2006, SLP-2008, SIN-2006 y SIN-2008. Además, se utilizó el producto comercial SpoD-X<sup>®</sup> como patrón de referencia, el cual contiene a un aislado del SeMNPV procedente de Florida, Estados Unidos de América.

En todos los casos, la replicación de los virus se realizó en larvas de cuarto estadio mediante la técnica de ingestión de gota (Hughes y Wood, 1981). Para ello, el virus se dispersó en pequeñas gotas sobre cajas de Petri. Las larvas que ingirieron la solución viral en un periodo de 10 min se transfirieron a celdas individuales provistas con dieta semisintética. Las larvas infectadas y muertas con evidentes síntomas del virus, se maceraron en una solución de sodio duodecil sulfato (SDS) a 0.1%. La purificación de cuerpos de inclusión se realizó por centrifugación y un gradiente de sacarosa a 40% (Anexo 1). El virus que precipitó se resuspendió en agua destilada y la cuantificación de los cuerpos de inclusión se realizó en una cámara de conteo Neubauer

( $10^{-4}$  cm<sup>3</sup>) a 40x con un microscopio con contraste de fases. Finalmente, la suspensión del virus se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **Bioensayos**

Se realizaron bioensayos para determinar la CL<sub>50</sub> y el TMM de cada uno de los aislamientos antes mencionados. Para ello, se utilizaron larvas de segundo estadio de *S. exigua* tratadas con el método de ingestión de gota descrito anteriormente. Para determinar las CL<sub>50</sub>s, se prepararon seis concentraciones de los virus en un rango de  $3.09 \times 10^2$  a  $9.621 \times 10^5$  OBs/ml. Los virus se resuspendieron en agua destilada y se les agregó 0.001% (p/v) de un colorante artificial verde (McCormick® & Company, Inc, Estados Unidos). Los bioensayos se mantuvieron bajo las mismas condiciones que la cría del insecto descrita arriba. Se realizaron cuatro repeticiones de 24 individuos por concentración y 24 individuos control tratados sólo con agua más el colorante. La mortalidad larvaria se registró en periodos de 24 h durante ocho días.

Para determinar el TMM, se aplicó una sola concentración de los virus con la cual se esperó obtener ~ 90% de mortalidad larvaria. Las condiciones de los bioensayos fueron las mismas que las descritas para los bioensayos anteriores, pero en este caso la mortalidad se registró cada 12 h.

También se realizaron bioensayos para observar la mortalidad larvaria acumulada cuando se aplicó una sola concentración para todos los aislamientos ( $1 \times 10^6$  OBs/ml). Estos bioensayos se realizaron con las mismas condiciones anteriormente descritas para el TMM.

## **Análisis Estadístico**

Para el cálculo de la  $CL_{50}$  de cada uno de los aislamientos de virus, se realizó un análisis probit (Finney, 1972) con el programa POLO PC (LeOra Software, 1987). Mediante este programa se obtuvieron las líneas de regresión. El grado de heterogeneidad se calculó mediante la prueba de  $\chi^2$  para un nivel de significancia de 95%. Los valores de la  $CL_{50}$  se calcularon en OBS/ml.

El cálculo del TMM se realizó en el programa GLIM (Generalized Linear Interactive Modeling, Numerical Algorithms Group 1993) con una distribución de sobrevivencia (Aitkin *et al.*, 1989), donde se excluyó a los individuos vivos (Farrar y Ridgway, 1998), por lo tanto, el censor ( $w$ ) fue invariablemente  $w=1$ .

Los bioensayos que se realizaron con una sola concentración ( $1 \times 10^6$  OBS/ml), se analizaron con una prueba  $t$ -student en el programa estadísticos SPSS versión 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL.). Con esta prueba se compararon los porcentajes de mortalidad acumulada entre SpoD-X<sup>®</sup> y cada uno de los aislamientos evaluados.

## RESULTADOS

### Estimación de las CL<sub>50</sub>s

Los valores de las CL<sub>50</sub>s calculados para las larvas de *S. exigua* tratadas con los aislamientos SLP-2006 ( $1.07 \times 10^6$  OBS/ml) y SLP-2008 ( $3.92 \times 10^6$  OBS/ml) fueron significativamente mayores que el valor calculado para SpoD-X<sup>®</sup> ( $3.82 \times 10^4$  OBS/ml) de acuerdo a los límites de confianza al 95% (Cuadro 1). El valor de la CL<sub>50</sub> para el aislado SIN-2006 ( $9.75 \times 10^4$  OBS/ml) no fue estadísticamente diferente a SpoD-X<sup>®</sup>. Sin embargo, el calculado para el aislado SIN-2008 ( $4.11 \times 10^3$  OBS/ml) fue significativamente menor comparado con éste último y con los demás aislamientos (Cuadro1).

Cuadro 1. Valores de las CL<sub>50</sub>s de cinco aislamientos de baculovirus en larvas de segundo estadio de *S. exigua*.

Virus	b ± EE	CL <sub>50</sub> <sup>a</sup> (OBS/ml)	L.C. 95 %		χ <sup>2</sup>	g. l. <sup>b</sup>
			Inferior	Superior		
SpoD-X <sup>®</sup>	0.51±0.053	$3.82 \times 10^4$	$2.34 \times 10^4$	$6.61 \times 10^4$	2.76	6
SLP-2008	0.74±0.84	$3.92 \times 10^6$	$1.90 \times 10^6$	$1.32 \times 10^7$	8.35	4
SLP-2006	0.39±0.48	$1.07 \times 10^6$	$4.43 \times 10^5$	$3.88 \times 10^6$	4.41	5
SIN-2006	1.54±0.12	$9.75 \times 10^4$	$5.10 \times 10^4$	$1.75 \times 10^5$	5.96	3
SIN-2008	0.66±0.058	$4.11 \times 10^3$	$2.60 \times 10^3$	$6.15 \times 10^3$	4.96	6

Los parámetros fueron obtenidos con el programa POLO PC (LeOra Software, 1987).

<sup>a</sup>Concentración expresada en cuerpos de inclusión (OBS) por mililitro.

<sup>b</sup>Grados de libertad.

### Estimación del Tiempo Medio para Morir (TMM)

La aplicación de los diferentes aislamientos provocó una mortalidad larvaria entre el 91 y 96% a los ocho días posteriores al bioensayo, lo cual es congruente con la mortalidad esperada (CL<sub>90</sub>) para cada una de las concentraciones utilizadas (Cuadro 2). En la figura 4 se presentan los síntomas de la enfermedad observados en los bioensayos.

Los valores del TMM para las larvas de *S. exigua* tratadas con dichas concentraciones, no difirieron significativamente entre los aislamientos evaluados (Cuadro 2). Lo anterior también se reflejó en la mortalidad acumulada para cada caso, ya que todos los aislados provocaron la misma tendencia de mortalidad en un periodo de 96 a 184 h posteriores a la exposición de los tratamientos (Figura 5).

Cuadro 2. Tiempo medio para morir (TMM) de cinco aislamientos de baculovirus en larvas de segundo estadio de *S. exigua*.

Virus	OBs/ml <sup>a</sup>	Mortalidad (%)	TMM (h) <sup>b</sup>
SpoD-X®	1.64 x 10 <sup>6</sup>	93.0	121a
SLP 2008	5.39 x 10 <sup>7</sup>	93.7	117a
SLP 2006	1.55 x 10 <sup>7</sup>	95.8	120a
SIN 2006	3.43 x 10 <sup>5</sup>	90.6	122a
SIN 2008	7.49 x 10 <sup>4</sup>	93.7	125a

<sup>a</sup>Concentración en cuerpos de inclusión (OBs) por mililitro. <sup>b</sup>Valores dentro de la misma columna seguidas por la misma letra no son significativamente distintas (Análisis Weibull, P >0.05).



Figura 4. Sintomatología de una larva de *S. exigua* previa a la muerte (A) y muerta (B) por la acción del nucleopoliedrovirus ocho días posteriores a la inoculación (fotografía de Álvarez, A. F).

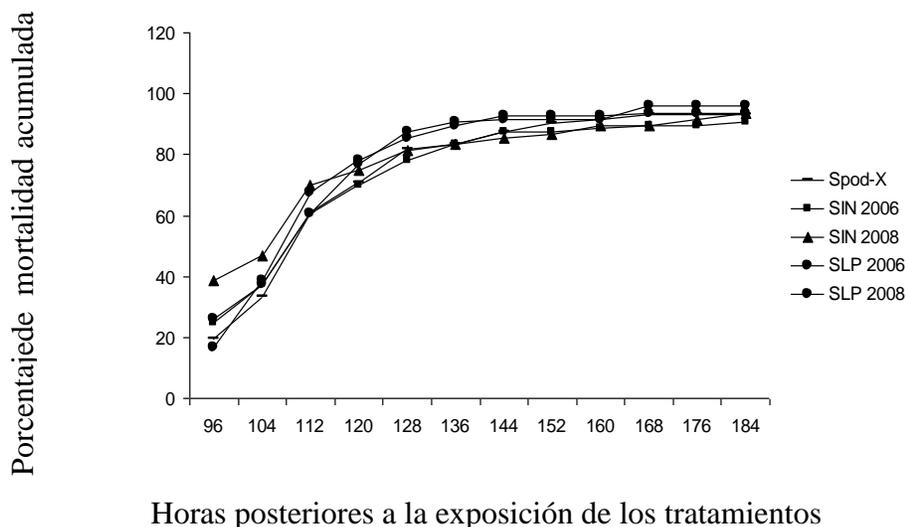


Figura 5. Mortalidad acumulada de larvas de segundo estadio de *S. exigua* tratadas con cinco aislados de baculovirus. Las concentraciones de los aislados fueron calculadas para provocar  $\approx 90\%$  de mortalidad.

### Mortalidad Acumulada

En la figura 6 se muestran las comparaciones del porcentaje de mortalidad acumulada entre las larvas tratadas con Spod-X<sup>®</sup> y los aislamientos SLP-2006, SLP-2008, SIN-2006 y SIN-2008 a una concentración de  $1 \times 10^6$  OBS/ml, los cuales alcanzaron niveles de  $79.6 \pm 1.85$ ,  $57.4 \pm 3.7$ ,  $66.6 \pm 6.4$ ,  $98.1 \pm 1.85$  y  $100 \pm 0.0\%$ , respectivamente, a los ocho días posteriores a la inoculación (Figura 6 A-D). La mortalidad provocada el aislamiento SLP-2006 fue menor que Spod-X<sup>®</sup> (Figura 6A), con excepción de los valores a las 96, 128, 136 y 144 h posteriores a la exposición del tratamiento ( $P > 0.13$ , para todos los casos). La mortalidad acumulada causada por el aislamiento SLP-2008 fue significativamente igual que Spod-X<sup>®</sup> (Figura 6B), con excepción de los valores observados a las 104 h posteriores a la exposición del tratamiento ( $P \leq 0.05$ ). En contraste, se observó un incremento significativo de la mortalidad larvaria causada por los aislamientos SIN-2006, SIN-2008 en comparación con Spod-X<sup>®</sup> a partir de las 112 h posteriores al tratamiento ( $P < 0.01$  para todos los casos) (Figura 6C-D).

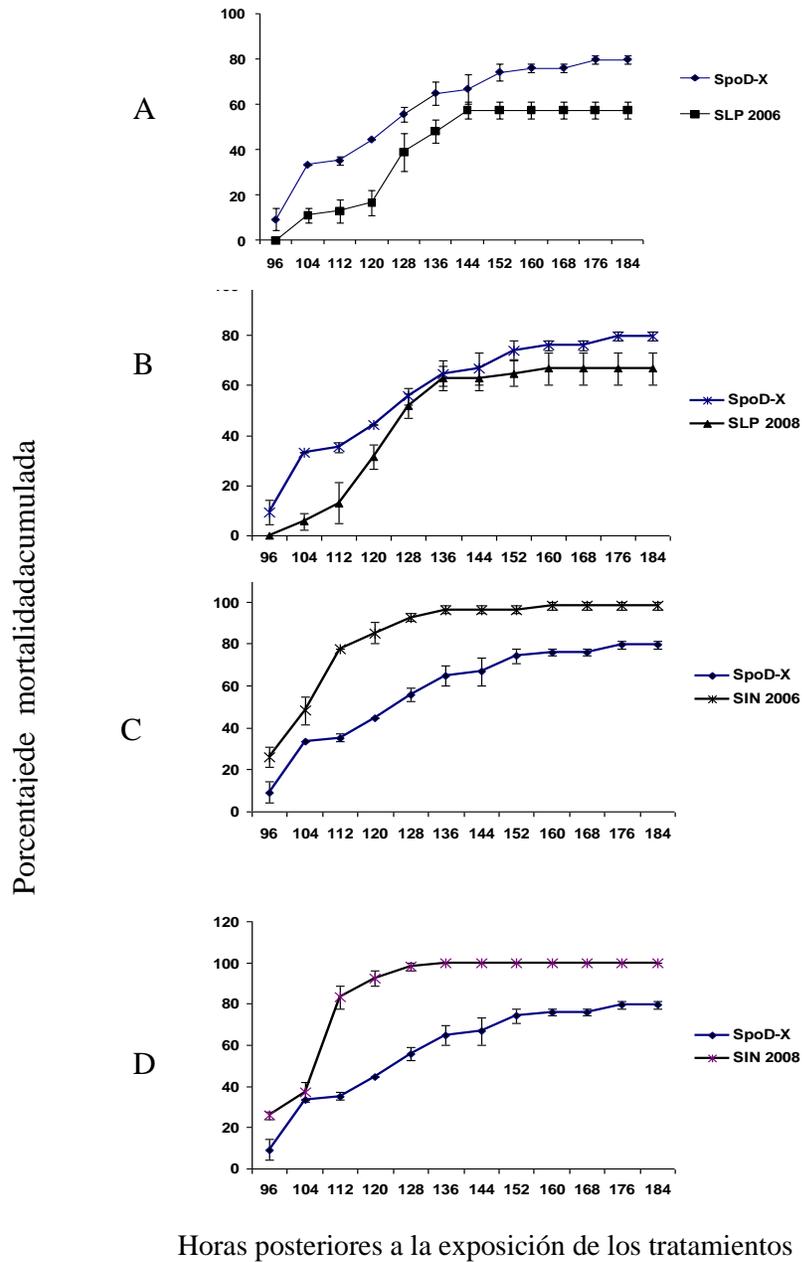


Figura 6. Mortalidad acumulada de larvas de segundo estadio de *S. exigua* tratadas con cuatro aislamientos de baculovirus (A-D) en comparación con el producto comercial SpoD-X<sup>®</sup> a una concentración de  $1 \times 10^6$  OBs/ml (prueba t-student,  $P = 0.05$  para comparaciones en cada tiempo, ver texto).

## DISCUSIÓN

Las larvas de segundo estadio de *S. exigua* fueron altamente susceptibles a los aislamientos colectados en campo y al virus procedente del producto comercial Spod-X<sup>®</sup>, aunque se observó cierta variabilidad en la actividad que mostraron algunos de estos patógenos. Por ejemplo, el virus que se colectó en Sinaloa en 2008 fue 24 y 9.3 veces más activo que el virus colectado en el año 2006 y el producto Spod-X<sup>®</sup>, respectivamente. No se observaron diferencias en la actividad insecticida de los aislamientos que se colectaron en San Luís Potosí en ambos años, pero éstos fueron los menos activos de todos los aislamientos evaluados. La alta actividad de los aislamientos se demuestra al comparar los datos con otras especies de nucleopoliedrovirus. Murillo (2005) y Jakubowska *et al.* (2010) determinaron una CL<sub>50</sub> y una DL<sub>50</sub> de  $2.89 \times 10^5$  OBs/ml y 83 OBs/larva ( $\sim 2.52 \times 10^5$  OBs/ml) para una variante del nucleopoliedrovirus *S. frugiperda* (SfMNPV) y el nucleopoliedrovirus de *Agrotis segetum* Denis & Schiffermueller (AgseNPV) en larvas de segundo estadio de *S. exigua*, respectivamente, lo cual indica una actividad siete veces menor comparada con Spod-X<sup>®</sup>. El valor de la CL<sub>50</sub> calculado para este último ( $3.82 \times 10^4$  OBs/ml) coincide con el valor obtenido por Murillo *et al.* (2003) ( $12.7$  OBs/larva =  $3.84 \times 10^4$  OBs/ml), quienes utilizaron el mismo método de bioensayo, estadio larval y el aislado silvestre con el cual se elaboró el producto comercial.

En el presente trabajo, la variabilidad en la actividad biológica de algunos aislamientos es congruente con otros estudios, puesto que se ha observado una importante diversidad fenotípica entre aislamientos de una misma especie de baculovirus. Por ejemplo, Murillo *et al.* (2006) observaron que genotipos silvestres del SeMNPV aislados de muestras de suelo de diferentes zonas en Almería, España, variaron significativamente en su patogenicidad y virulencia. En otras especies de baculovirus como el SfMNPV, también se ha observado dicha variación entre aislamientos procedentes de distintas zonas geográficas (Escribano *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2011). Al respecto, Simón *et al.* (2004) señalan que la variabilidad entre aislamientos del SfMNPV puede ser atribuida a la amplia diversidad genómica que la especie posee, lo cual puede ocurrir con otras especies de baculovirus. Recientemente,

Barrera *et al.* (2011) indicaron que la variabilidad en la actividad biológica de ciertas especies de baculovirus puede ser una clara ventaja adaptativa para que el virus retenga una alta infectividad contra su población local, presumiblemente como resultado de una continua evolución hospedero-patógeno, lo cual pudiera ocurrir para las poblaciones de *S. exigua* establecidas en México.

Cabe señalar que los aislamientos utilizados en el presente estudio, proceden de zonas agrícolas en donde el producto comercial Spod-X<sup>®</sup> no ha sido liberado como alternativa de control. Lo anterior puede incrementar la posibilidad de que las larvas colectadas en campo y, que murieron posteriormente por baculovirus en el laboratorio, procedan de poblaciones expuestas a epizootias naturales del SeMNPV; sin embargo, para demostrar que la variabilidad en la actividad biológica vista en el presente estudio se deba a la diversidad natural, es necesario realizar estudios genéticos que indiquen la presencia de genotipos silvestres. Lo anterior ha sido demostrado en otros sistemas agrícolas en donde el SeMNPV que provoca epizootias naturales, posee una naturaleza genética muy diversa (Caballero *et al.*, 1992). Por ejemplo, en epizootias en el sur de España se han podido identificar hasta nueve variantes genotípicas del virus, las cuales difieren en actividad con respecto a los genotipos puros (Muñoz *et al.*, 1999).

Un aspecto interesante del presente estudio fue que los valores del TMM no variaron significativamente entre ninguno de los aislamientos, manteniéndose en un rango de 117 y 125 h. De acuerdo con los conceptos de Tanada y Kaya (1993), esto puede indicar que aunque algunos aislamientos difieren en su capacidad de provocar la enfermedad (patogenicidad), estos pueden coincidir en el daño fisiológico provocado en el huésped (virulencia), lo cual también ha sido observado con aislamientos del SfMNPV procedentes de Nicaragua y Colombia, en donde los valores de las CL<sub>50</sub>s fueron significativamente diferentes ( $5.37 \times 10^5$  y  $4.57 \times 10^4$  OBs/ml) y los valores del tiempo medio de mortalidad fueron significativamente iguales (160 y 168 h, respectivamente) (Barrera *et al.*, 2011). El conocimiento de ambos parámetros (CL<sub>50</sub> y TMM) son los aspectos principales que se deben considerar para seleccionar algún aislado como bioinsecticida.

Los datos aquí presentados demuestran que aunque la mortalidad larvaria se manifestó a las 96 h después del tratamiento cuando se aplicó una concentración alta ( $CL_{90}$ ), el valor del TMM general fue máximo de cinco días. Lo anterior sugiere que el modo de acción de los nucleopoliedrovirus es lento cuando se les compara con plaguicidas químicos. Sin embargo, se conoce que esta limitante puede ser minimizada mediante la incorporación de sustancias potenciadoras o fotoprotectoras en sus formulados (ejem., Spinosad<sup>®</sup>, abrillantadores ópticos), logrando con ello incrementar la persistencia, actividad insecticida y, en algunos casos, la velocidad de acción (Méndez *et al.*, 2002). Específicamente, Murillo *et al.* (2003) mostraron que la mezcla del SeMNPV con un abrillantador óptico (Tinopal LPW) a una concentración de 1%, produjo una mejora significativa de su patogenicidad en todos los estadios larvario de *S. exigua*.

Cuando las larvas se expusieron a una sola concentración de los aislamientos ( $1 \times 10^6$  OBs/ml) (Figura 6), se observó un patrón de mortalidad acumulada diferente entre los aislamientos de San Luis Potosí y Sinaloa comparado con Spod-X<sup>®</sup>. Los aislamientos SLP-2006 y SLP-2008 tuvieron menor o igual mortalidad que Spod-X<sup>®</sup> en el transcurso del experimento. La mortalidad larvaria causada por los aislamientos SIN-2006 y SIN-2008 se incrementó a partir de las 112 h posteriores al tratamiento y fue mayor comparada con Spod-X<sup>®</sup>, lo cual ratifica que estos aislamientos pueden ser competitivos para el control de *S. exigua* comparado con el insecticida comercial.

El valor de la  $CL_{50}$  para el aislamiento más activo (SIN-2008) ( $4.11 \times 10^3$  OBs/ml) fue 24 veces menor que el calculado para Spod-X<sup>®</sup> ( $3.82 \times 10^4$  OBs/ml); 24.2 y 9.34 veces menor que el calculado por Tuan *et al.* (1994) (23 OBs/larva =  $9.96 \times 10^4$  OBs/ml) y Murillo *et al.* (2003) (3.7 OBs/larva =  $3.84 \times 10^4$  OBs/ml) para larvas de segundo estadio de *S. exigua* expuestas a un aislado de Florida y Taiwán, respectivamente. Los anteriores valores confirman la alta susceptibilidad de *S. exigua* a su nucleopoliedrovirus (Cherry y Williams, 2001); sin embargo, es posible que las diferencias en la actividad de estos virus se deban a variaciones en el tipo de ensayo realizado y / o al origen de las poblaciones del huésped. En el presente estudio seleccionó la técnica de alimentación de ingestión de la gota debido ésta permite cuantificar la actividad biológica de una manera más precisa, ya que la ingestión se

realiza en una manera más rápida Además, mediante la utilización de un colorante se comprueba que las larvas han ingerido la concentraciones expuestas (Hughes y Wood, 1981).

Se considera que el aislamiento SIN-2008 tiene un alto potencial como bioinsecticida para el control del gusano soldado, pero como se mencionó anteriormente, es necesario conocer su identidad genética para pensar en la posibilidad de su uso en México. Otro punto clave es comparar su actividad con insectos provenientes de área de colecta, puesto que la susceptibilidad podría variar en comparación con la población susceptible de *S. exigua* que se usó en los ensayos. Finalmente, el uso de sustancias que potencialicen la actividad del virus incrementaría su interés como alternativa de control para *S. exigua*.

## CONCLUSIONES

- El aislamiento que se colectó en Sinaloa en el 2008 (Se-SIN2008) fue el más patogénico de todo el grupo analizado, incluso más que el producto comercial Spod-X<sup>®</sup>. Los aislamientos procedentes de San Luis Potosí no mostraron variación entre ellos, pero ambos fueron menos activos que Spod-X<sup>®</sup>. Lo anterior puede indicar una diversidad fenotípica entre aislamientos de baculovirus que proceden de un mismo hospedero.
- La mortalidad acumulada causada por una sola concentración, mostró la misma tendencia entre los aislamientos evaluados.
- El tiempo medio de mortalidad estimado sobre larvas de segundo estadio de *S. exigua* fue significativamente igual para todos aislamientos evaluados, lo cual puede indicar una homogeneidad en su virulencia.
- El altas expectativas que tienen los baculovirus para ser desarrollados como agentes de control biológico, puede incrementarse con una fina exploración de su relación con el hospedero del cual proceden. El presente estudio forma parte de una exploración inicial que debe complementarse con técnicas moleculares que confirmen la identidad de los virus y sus posibles variaciones genotípicas.

## LITERATURA CITADA

- Aitkin, M., D. Anderson, B. Francis, y J. Hinde. 1989. *Statistical Modelling in GLIM*. Oxford Science Publications. 374 p.
- Anaya, R. S. y N. J. Romero. 2007. *Hortalizas plagas y enfermedades*. Editorial Trillas. México. 544 p.
- Anaya, R. S., N. Bautista M. y B. Domínguez, R.1992. *Manejo Fitosanitario de las Hortalizas en México*. Centro de Entomología y Acarología, Chapingo, México. 412 p.
- Apablaza, J. U., y A. M. Vaugham. 1990. Plagas de las hortalizas. En: Latorre, A. B., A. M. Vaughan y G. P. Aguilar (Eds.). *Manual de manejo integrado*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 36 p.
- Barrera, G., O. Simón., L. Villamizar., T. Williams, y P. Caballero. 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biol. Control* 58:113–120
- Boller, E. F., J. Avilla., J. P. Gendrier., E. Jorge y C. Malavolta. 1998. Integrated production in Europe. *IOBC/WPRS Bulletin*. 21: 1-41.
- Brewer, M. J. y J. T. Trumble. 1994. Beet armyworm resistance to fenvalerate and methomyl: resistance variation and insecticide system. *J. Agricult. Entomol.* 11: 291-300.
- Capinera, J. L. 2004. Beetarmyworm, *Spodoptera exigua* Hübner (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Accessed Marzo 2011. <http://edis.ifas.ufl.edu/in262>
- CAB International. 2000. *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CAB Internacional, Wallingford, Reino Unido. 324 p.
- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Alvarez, y J. M. Vlak. 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Sci. Technol.* 2: 145–157.
- Caballero, P., M. López, y T. Williams. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Ed. Phytoma España - UPN, Valencia – Pamplona. 518 p.
- Caballero, P., R. Murillo, D. Muñoz y T. Williams. 2009. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. *Rev. Colomb. Entomol.* 35: 105-115.

- CERTIS. 2011. Spod-X LC biologicalinsecticide - Certis USA. <http://www.certisusa.com/products/spod-x-lc-biological-insecticide>. Htm (1/02/2011).
- Cherry A., y T. Williams. 2001. Control de insectos plaga mediante baculovirus. En: Caballero, P., M. L. López-Ferber, y T. Williams (Eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma-España Valencia, Spain. pp. 389–450.
- Davidson, H. R. y W. F. Lyon. 1992. Plagas de insectos agrícolas y de jardín. Limusa Noriega Editores. México. 443 p.
- Dhaliwal, G. S., K. Opende, y A. Ramesh. 2004. Integrated pest management: Retrospect and prospect. In: Integrated Pest Management. Potential Contrains and Challenges. CABI. Publishing. UK. pp 1-20.
- Evans, H. F. y P. F. Entwistle. 1987. Viral diseases. En: Fuxa J. R. y Y. Tanada (Eds.). Epizootiology of insect diseases. pp 257-322.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. Cave, J. 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: 1079-1085.
- Farrar, R. R., Jr., y R. L. Ridgway. 1998. Quantifying time mortality relationships for nuclear polyhedrosis viruses when survivors are present. Environ. Entomol. 27: 1289 - 1296.
- Federici, B. A. 1986. Ultraestructure of baculovirus. En: Granados, R., B.A. Federici, (Eds.). The biology of baculovirus, biological properties and molecular biology. Vol. 1 .Academic Press, San Diego. pp. 61-88.
- Finney, L. 1972. Probit analysis. Cambridge University Press, London/New York. 333 p.
- Gastélum, R., H. M. Bravo., J. L. Leyva., C. R. Hernández y A. G. Martínez. 1999. Evaluación de sistemas de manejo de “gusano soldado” *Spodoptera exigua* (Hübner) y “gusano del fruto” *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) en tomate en Culiacán Sinaloa. Memorias del XXXIV Congreso Nac. Entomol. pp. 447-451.
- Gallegos, M. G., M. Cepeda, S. y R. P. Olayo. P. 2004. Entomopatogenos. Trillas pp. 115-121.
- Granados, R. R. y K. A. Lawler. 1981. In vivo pathway of *Autographacalifornica* baculovirus invasion and infection. Virology. 108: 297-308.

- Granados, R. R. y B. A. Federici. 1986. The biology of baculoviruses. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. 150 p.
- Horton, H. M. y J. P. Burand. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. *J. Virol.* 67: 1860-1868.
- Hughes, P. R. y H. A. Wood. 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 37: 154-159
- Hunter-Fujita, F. R., P. F. Entwistle., H. F. Evans y N. E. Crook. 1998. Insect viruses and pest management. Wiley, Chichester, Ukrania. 632 p.
- Jehle, J. A., G. W. Blissard, B. C. Bonning, J. S. Cory, E. A. Herniou, G. F. Rohrmann, D. A. Theilmann, S. M. Thiem y J. M. Vlak. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch. Virol.* 151: 1257–1266.
- Jakubowska, A. k., S. Caccia., K. H. Gordon., J. Ferré y S. Herrero. 2010. Downregulation of a Chitin Deacetylase-Like Protein in Response to Baculovirus Infection and Its Application for Improving Baculovirus Infectivity. *J. Virol.* 84: 2547-2555.
- Karam, G. M. A., G. Ramirez, L. P. Bustamante M. y G. J. Manuel. 2004. Plaguicidas y Salud de la Población. *Ciencia Ergo Sum.* 11: 246-254.
- Kirkpatrick B. A., J. O. Washburn, E. K. Engelhard y L. E. Volkman. 1994. Primary infection of insect tracheae by *Autographacalifornica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 203: 184-186.
- Lasa, C. R. 2007. Formulation and efficacy of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in the greenhouses of southern Spain. Tesis doctoral, Universidad Pública de Navarra, Pamplona. pp. 9-10
- LeOra Software. 1987. POLO-PC a user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, California. 19 p.
- Marín, J. A. y R. Bujanos M. 2001. Insectos Plaga de Brócoli y Coliflor y sus Enemigos Naturales en la Región del Bajío, México. INIFAP, Centro De Investigaciones Regional del Centro Campo Experimental Bajío Celaya, Guanajuato, México. Publicación Especial Núm. 2. 24 p.
- Méndez, W. A., J. Valle, J. E. Ibarra, J. Cisneros, D. I. Penagos, y T. Williams. 2002. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Biol. Control.* 25: 195-206.

- Mena, C. J. 2005. Rastreo del Gusano Soldado del Betabel, *Spodoptera Exigua*, y del Gusano del Fruto, *Heliothis Zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Beet Armyworm, *Spodoptera Exigua* And Tomato FruitWorm, *Heliothis Zea* Monitoring In Zacatecas. Segunda Convención Mundial del Chile. México. Pp 101-102.
- Miller, L. K. 1988. Baculoviruses as gene expression genes. Ann. Rev. Microbiol. 42: 177-199.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control Lepidoptera. Ann. Rev. Entomol. 44: 257-289.
- Moscardi, F., L. Morales, B. Santos. 2002. The successful use of AgMNPV for the control of velvet ban caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, in soybean in Brazil. VIII International Colloquium on Invertebrate Pathology And Microbial Control and Microbial XXXV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. pp. 86-91.
- Murillo, P. R., C. R. Lasa, D. Goulson, T. Williams, D. Muñoz, y P. Caballero. 2003. Effect of Tinopal LPW on the Insecticidal Properties and Genetic Stability of the Nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ. Entomol. 96: 1668-1674.
- Murillo, P. R. 2005. Influence of genetic diversity of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus on its ecology and insecticidal properties. Tesis doctoral. Pamplona 2005. Pp. 145-148
- Murillo, P. R., S. Elvira, D. Muñoz, T. Williams, y P. Caballero. 2006. Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain. Biol. Control. 38: 157-165.
- Muñoz, D., R. Murillo P., J. Krell P., J. M. Vlak, P. Caballero. 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. Virus Res. 59: 61-74.
- Nuez, V. F., R. G. Ortega y G. J. Costa. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Grupo Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 158-159.
- Numerical Algorithms Group 1993. The Generalized Linear Interactive Modeling, GLIM system: release 4 manual. B. Francis, M. Green y C. Payne (eds.). Clarendon Press, Oxford, Reino Unido. 708 p.
- Pacheco, M. F. 1994. Plagas de los cultivos oleaginosos en México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias, Centro Regional del Noroeste. Cd. Obregón, Sonora. pp 459-461.

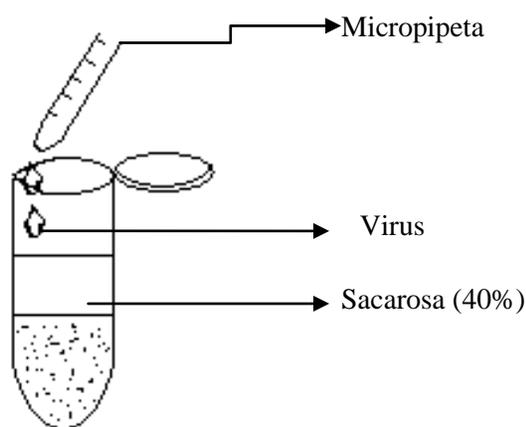
- Szewezyk, B., L Hoyos C. M. Paluszek, I. Skrzecz, y M. Lobo. 2006. Baculoviruses. Re-emerging biopesticides. *Biotech. Advances*. 24: 143-60.
- Smits, P. H. y J. M. Vlak. 1994. Registration of the first viral insecticide in the Netherlands: the development of Spod-X based on *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Med. Fac. Landbouw. Univ. Genet*. 59: 383–392.
- Simón, O., T. Williams, M. López F. y P. Caballero. 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. *Appl. Environ. Microbiol*. 70: 5579-5588.
- Tanada, Y., R. T. Hess y E. M. Omi. 1984. The movement and invasion of a insects baculovirus in tracheal cells of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebr. Pathol*. 44: 18-27.
- Tanada, Y. y H. K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic Press. San Diego, California. 665 p.
- Tuan, S. J., S. S. Kao, y D. J. Cheng. 1994. Histopathology and pathogenicity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan. *Chinese J. Entomol*. 14: 33-45.
- Tellam, R. L. 1996. The peritrophic matrix, En: M. J. Lehaney P. F. Billingsley [eds.], *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, London, UK. pp. 86-114.
- Torres, V. L. M., M. C. Rodríguez M., A. Lacasa, E. Palo, M. Mejías T. y M. Guerrero. 1998. Susceptibilidad a 20 insecticidas de *Helicoverpa armigera* Hb. y *Spodoptera exigua* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae) en las vegas del Guadian (Extremadura). *Bol. San. Veg. y Plagas*. 24: 353-362.
- Toledo, J. y F. Infante. 2008. *Manejo Integrado de Plagas*. Editorial Trillas. pp. 112-115.
- Whalon, M., D. Mota-Sanchez y L. Duynslager. 2004. The data base of arthropod resistance to pesticides. <http://www.pesticideresistance.org/DB/index.html> (Accesada en Octubre de 2010).
- Wang, P. y R. R. Granados. 1998. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusiani* and its role in limiting baculovirus infection. *J. Invertebr. Pathol*. 72: 57-62.
- Williams, T., D. Goulson, P. Caballero, J. Cisneros, M. Martínez A., J. W. Chapman, D. X. Roman, y R. D. Cave. 1999. Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small scale maize growers in Latin America. *Biol. Control*. 14: 67-75.

Zalom, F. G., P. A. Phillips, y N. C. Toscano. 2005. Manejo Integrado de Plagas. Universidad de California. Publicación 3473, UC Agricultura y Recursos Naturales. p. 6

## **ANEXO**

**Anexo 1.** Técnica de purificación de nucleopoliedrovirus con un gradiente de sacarosa.

1. Macerar la muestra utilizando 500  $\mu$ l de SDS al 0.1%.
2. Filtrar la muestra utilizando una tela de muselina.
3. Centrifugar a 800 rpm/5 min.
4. Guardar el sobrenadante.
5. Suspender la pastilla a 500  $\mu$ l de SDS al 0.1% y homogenizar.
6. Centrifugar a 800 rpm/5 min.
7. Guardar el sobrenadante.
8. Mezclar los sobrenadantes de los pasos 3 y 6.
9. Centrifugar a 5000 rpm/10 min.
10. Descartar el sobrenadante.
11. Resuspender la pastilla en 200  $\mu$ l de agua destilada estéril.
12. Filtrar  $\sim$  200  $\mu$ l de suspensión en 500  $\mu$ l de una concentración de sacarosa al 40% (Figura).



13. Centrifugar a 12000 rpm/30 min.
14. Resuspender el pelet en 500  $\mu$ l de SDS al 0.1%.
15. Centrifugar a 5000 rpm/10 min.
16. Resuspender el pelet en 1 ml de agua destilada estéril.
17. Centrifugar a 5000 rpm/10 min.
18. Resuspender el pelet en 500  $\mu$ l de agua destilada estéril.
19. Aforar hasta alcanzar un volumen de 1 ml de solución.