



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**Instituto de Investigaciones Agropecuarias y
Forestales
Programa Institucional de Maestría en Ciencias
Biológicas**



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES**

**CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS Y BIOLÓGICAS DE UN AISLADO DEL
NUCLEOPOLIEDROVIRUS MÚLTIPLE DE *Spodoptera frugiperda*: EFECTO
SOBRE EL DESARROLLO Y REPRODUCCIÓN DEL HUÉSPED**

TESIS

Para obtener el grado académico de:

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

BIOL. LAURA ANGÉLICA HERNÁNDEZ CAMARGO

Directora de tesis:

DRA. ANA MABEL MARTÍNEZ CASTILLO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Morelia, Michoacán, México. Mayo de 2019.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por permitirme desarrollar mi tesis dentro de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el sustento económico para llevar a cabo esta investigación.

A la Coordinación de la Investigación Científica por el financiamiento aportado para este proyecto.

A la Dra. Ana Mabel Martínez Castillo, por su dedicación, sus conocimientos, orientaciones, paciencia y motivación, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, mi más profundo y sincero agradecimiento.

A mis sinodales, Dr. Samuel Pineda Guillermo, Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa, Dr. José Luciano Morales García, Dr. Fernando Tamayo Mejía, por el valioso tiempo que dedicaron en acompañarme en este camino.

A la Universidad Autónoma de Chapingo por recibirme en sus instalaciones del Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios Agroalimentarios y Forestales y haber desarrollado parte del experimento.

A la Dra. Selene Ramos Ortiz, por su valiosa asesoría y continua orientación, además de su gran amistad.

A todos mis amigos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales quienes han sido fuente de apoyo incondicional, y que sin saberlo, han contribuido a la finalización de la presente tesis. Este trabajo les pertenece en parte a todos ellos.

DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios, porque ha estado conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar. A mis padres quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un sólo momento en mi inteligencia y capacidad. A mis abuelos por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo. También dedico este proyecto a mi novio, Esteban Arreola, compañero inseparable de cada jornada. El representó gran esfuerzo y tesón en momentos de declive y cansancio. Sin ellos no hubiera podido culminar esta meta tan esperada.

En memoria de:

Mi abuelo Jesús Camargo y mi tío Víctor Camargo, Gracias por sus enseñanzas, por los mensajes de aliento y su excelente manera de instruirme para afrontar las verdades de esta vida.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS	i
FIGURAS	i
CUADROS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
I. INTRODUCCIÓN	iv
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Importancia del maíz en México	3
2.2 El gusano cogollero, <i>Spodoptera frugiperda</i>	3
2.2.1 Ciclo de vida y morfología.....	4
2.2.2. Reproducción	5
2.2.3 Hábitos y daños que ocasiona	5
2.3 Los Baculovirus	6
2.3.1 Estructura y composición de los baculovirus.....	7
2.3.2 Ciclo de infección y sintomatología de los baculovirus.....	8
2.4 Biología molecular.....	10
2.5 Diversidad genética de los baculovirus	11
2.6 Nucleopoliedrovirus múltiple de <i>S. frugiperda</i> (SfMNPV).....	13
2.7 Transmisión horizontal y vertical	13
2.8 Infecciones latentes y de persistencia	15
2.9 Efectos subletales.....	15
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVO GENERAL	17
4.1 Objetivos Particulares	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1 Cría del insecto	18

5.2 Replicación del SfMNPV	18
5.3. Características genéticas del SfMNPV-MER	18
5.3.1. Extracción y precipitación del ADN genómico	18
5.3.2 Amplificación y secuenciación parcial del gen <i>polh</i>	19
5.4 Bioensayos de patogenicidad y productividad del SfMNPV-MER.....	20
5.5 Efecto sobre el desarrollo y reproducción del huésped	22
VI. RESULTADOS	24
6.1. Características genéticas de los virus.....	24
6.1.1. Extracción del ADN genómico	24
6.1.2. Amplificación y secuenciación parcial del gen <i>polh</i>	24
6.2. Bioensayos	27
6.2.1. Producción de OB por larva.....	28
6.3. Efecto sobre el desarrollo del huésped	29
6.3.1 Efecto del virus sobre la reproducción y longevidad de los adultos de <i>S. frugiperda</i>	29
6.4 Efecto sobre el desarrollo de la descendencia (F1) de <i>S. frugiperda</i>	32
VII. DISCUSIÓN	35
VIII. CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFIA	42

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infección y replicación de un nucleopoliedrovirus.....	10
Figura 2. Diferencias morfológicas utilizadas para la separación de sexos en estado de pupa.....	23
Figura 3. Extracción del ADN genómico del SfMNPV de los dos aislados de referencia (SfMNPV-NIC y SfMNPV-CHI) y el aislado de SfMNPV-MER.....	24
Figura 4. Amplificación específica por PCR del gen de la poliedrina (<i>polh</i>) en tres aislados del SfMNPV.....	24
Figura 5. Árbol filogenético entre los aislados SfMNPV-NIC, SfMNPV-CHI y SfMNPV-MERIDA (aislados del estudio); SfMNPV-FLORIDA, USA; SfMNPV-ESPINAL y MEDELLIN, Colombia.....	25
Figura 6. Secuencias del alineamiento parcial del gen <i>polh</i> en tres aislados del SfMNPV (SfMNPV-MER, SfMNPV-CHI y SfMNPV-NIC).....	26
Figura 7. Total de muertos de larvas de <i>S. frugiperda</i> inoculadas con el SfMNPV-MER en el tercer estadio mediante el método de la gota.....	27
Figura 8. Promedio de peso (mg ± EE) en los individuos tratados con la CL90 (9.5×10^5 OBs/ml) y el testigo previo al experimento.....	29
Figura 9. Longevidad de adultos infectados con el aislado SfMNPV-MER (4.8×10^4 OBs/ml).	32
Figura 10. Mortalidad de la descendencia de larvas tratadas con el aislado SfMNPV-MER (4.8×10^4 OBs/ml).....	33

CUADROS

Cuadro 1. Diagrama de los principales eventos transcripcionales relacionados con el ciclo viral.....	12
Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial del gen <i>polh</i>	19
Cuadro 3. Análisis de regresión a las 192 y 264 h post-inoculación de larvas de tercer estadio de <i>S. frugiperda</i> muertas por la exposición al aislado SfMNPV-MER.....	28
Cuadro 4. Parámetros de vida de <i>S. frugiperda</i> (\pm EE) en individuos tratados con el SfMNPV-MER a una concentración de 4.8×10^4 OBs/ml.....	30
Cuadro 5. Fecundidad y fertilidad de adultos de <i>S. frugiperda</i> provenientes de larvas de tercer estadio tratadas con el SfMNPV-MER a una concentración de 4.8×10^4 OBs/ml.....	31
Cuadro 6. Duración del estado de huevo y porcentaje de mortalidad por virus de la F1 de larvas de tercer estadio infectadas con el SfMNPV-MER (4.8×10^4 OBs/ml).....	33
Cuadro 7. Parámetros de vida de los descendientes de <i>S. frugiperda</i> tratados con el SfMNPV-MER.....	34

RESUMEN

El uso excesivo de los insecticidas químicos para el control de plagas tiene un impacto negativo en las poblaciones de organismos benéficos y puede causar el desarrollo de resistencia. Una alternativa a esta problemática es el uso de entomopatógenos, tal es el caso de los baculovirus. En el presente estudio se determinaron las características genéticas y la actividad biológica de un aislado nativo del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) sobre larvas de su huésped, *S. frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), la plaga de mayor importancia económica del cultivo del maíz en México. El virus nativo se comparó genéticamente con otro virus local y un aislado procedente de Nicaragua. La comparación se realizó a través de la secuenciación parcial del gen *polh*. Las secuencias de los tres aislados del SfMNPV se alinearon y se analizaron en una base de datos pública mediante BLAST mostrando una similitud de 99%. Para observar la actividad biológica se realizaron bioensayos con larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*, donde se observó una relación positiva entre la mortalidad y la concentración. La mayor mortalidad se observó a las 120 h post-inoculación (hpi) y el ajuste de la concentración letal cincuenta (CL₅₀) se obtuvo a las 192 hpi. Se determinó una producción de $1.21 \times 10^8 \pm 2.59 \times 10^7$ OBs (cuerpos de inclusión por sus siglas en inglés)/larva cuando se inocularon larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* con una concentración de 9.5×10^5 OBs/ml. Además, se evaluó el efecto de una CL₄₀ (4.8×10^4 OBs/ml) sobre el desarrollo y reproducción del insecto. Los pesos de las pupas de *S. frugiperda* que derivaron de las larvas inoculadas en el tercer estadio no fueron significativamente distintos comparados con el testigo; sin embargo, los adultos tuvieron una longevidad significativamente menor (8.2 ± 1.5) comparada con los adultos del testigo (10.7 ± 0.98). La fecundidad y fertilidad de *S. frugiperda* en el tratamiento con virus fue significativamente menor comparado con el testigo. Cuatro por ciento de las larvas de la generación F1 murieron a causa de la infección por virus y las pupas tuvieron un menor peso (155 ± 1.13 mg) respecto al testigo (167 ± 1.04 mg). En conclusión, las larvas de *S. frugiperda* fueron susceptibles al aislado nativo. El impacto de este patógeno sobre los insectos sobrevivientes, en términos de desarrollo y reproducción, podría afectar futuras generaciones y con ello favorecer el control del insecto.

Palabras Clave: baculovirus, efectos subletales, entomopatógenos, plagas, gen *polh*.

ABSTRACT

The excessive use of chemical insecticides for the control of pests has a negative impact on the populations of beneficial organisms and can cause the development of resistance. An alternative to this problem is the use of entomopathogens, such is the case of baculoviruses. In the present study, the genetic characteristics and the biological activity of a native isolate of the multiple nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) were determined on larvae of its host, *S. frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), the most important maize pest in Mexico. The native virus was genetically compared with another local virus and an isolate from Nicaragua. The genetic comparison was made through the partial sequencing of gene *polh*. The sequences of the three SfMNPV isolates were aligned and analyzed in a public database using BLAST, which showed a similarity of 99%. To observe the biological activity, bioassays were carried out using third instar *S. frugiperda*, where a positive relationship between mortality and concentration was observed. The highest mortality was observed at 120 h post-inoculation (hpi) and the adjustment of median lethal concentration (LC₅₀) was obtained at 192 hpi. A production of $1.21 \times 10^8 \pm 2.59 \times 10^7$ OBs (occlusion bodies)/larva was determined when third instar larvae of *S. frugiperda* were inoculated with a concentration of 9.5×10^5 OBs/ml. In addition, the effect of a CL₄₀ (4.8×10^4 OBs/ml) on the development and the reproduction of the insect was evaluated. The weights of pupae of *S. frugiperda* derived from larvae inoculated in the third instar did not differ significantly compared with the control; however, the adults had a longevity significantly lower (8.2 ± 1.5) than that observed in the control (10.7 ± 0.98). Fertility and fertility of *S. frugiperda* in the virus treatment was significantly lower compared to the control. Four percent of the larvae of the generation F1 died due to virus infection and the pupae had a weight significantly lower (155 ± 1.13 mg) than that observed in the control (167 ± 1.04 mg). In conclusion, the larvae of *S. frugiperda* were susceptible to the native isolate. The impact of this pathogen on the surviving insects, in terms of development and reproduction, could affect future generations and thereby favor the control of the insect.

Keys words: baculoviruses, sublethal effects, entomopathogens, pest, gene *polh*.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz, *Zea mays* L., es una de las tres especies más cultivadas en el mundo (Jaramillo-Albuja *et al.*, 2018). El rendimiento mundial de este cultivo en México se estimó en 2.96 toneladas métricas por hectárea con una producción de 0.98 millones de toneladas métricas durante el ciclo 2016/17 (USDA, 2018). Los principales estados productores de maíz son Sinaloa, Guanajuato, Estado de México, Jalisco, Michoacán y Chihuahua, entidades que aportan el 61.5% de la producción nacional (SAGARPA, 2017). Sin embargo, el maíz es atacado por diversos insectos plaga que pueden afectar su desarrollo y rendimiento. Entre éstas destaca el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), el cual se alimenta de la planta desde las primeras etapas de desarrollo hasta la etapa de floración y formación del fruto (Murúa *et al.*, 2006).

Los insecticidas químicos han sido la forma más común para controlar a *S. frugiperda*, no obstante, su uso excesivo tiene un impacto negativo en las poblaciones de organismos benéficos (parasitoides y depredadores) (Williams *et al.*, 1999) y puede favorecer el desarrollo de resistencia hacia estos compuestos (Chandler y Summer, 1991). Además, el uso de los insecticidas químicos puede afectar la salud de los productores agrícolas por no contar con medidas apropiadas de protección (Tinoco y Halperin, 1998; Wyckhuys *et al.*, 2013). Esta situación ha incrementado la necesidad de estudiar opciones que ecológicamente tienen mayor aceptación para el control de insectos. Una alternativa es el uso de entomopatógenos, entre los que destacan los virus pertenecientes a la familia Baculoviridae (Yasem de Romero *et al.*, 2009). Estos son virus patógenos de insectos ampliamente utilizados a nivel mundial como bioinsecticidas para el control de diferentes plagas de importancia agrícola (Gómez y Villamizar, 2013).

El nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* (SfMNPV) es un baculovirus que ha sido aislado de poblaciones del gusano cogollero en Estados Unidos de América, Nicaragua, Colombia, Argentina, México, entre otros (Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2011; Ríos-Velasco *et al.*, 2011; Villamizar *et al.*, 2012). El SfMNPV posee una alta actividad insecticida sobre *S. frugiperda*, obteniendo altas mortalidades (~80%) del insecto en campo (Valicente y Da Costa, 1995). En relación a ello, es ampliamente reconocido que la actividad biológica de los nucleopoliedrovirus

(NPVs) puede variar dependiendo de su ubicación geográfica, características genéticas, origen del hospedero y características fenotípicas (Escribano *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2011). Por lo tanto, los estudios encausados al uso de los baculovirus como agentes de control, requieren ser evaluados en términos de su identidad genética y actividad biológica (Caballero *et al.*, 2009). Uno de los métodos utilizados para reconocer las variaciones genéticas de los baculovirus es mediante la secuenciación de los distintos genes relacionados con su estructura y actividad biológica. Además, mediante este método se pueden observar diferencias entre aislados que proceden de distintos sitios geográficos (Lange *et al.*, 2004; Simón *et al.*, 2005; Rowley *et al.*, 2010). El gen de la poliedrina (*polh*) se considera fundamental para la sobrevivencia del virus y es uno de los genes más conservados en los NPVs de lepidópteros; usado en varios estudios filogenéticos (Jehle *et al.*, 2006; Rowley *et al.*, 2010; Hewson *et al.*, 2011).

Por otro lado, la patogenicidad y la productividad de las partículas infectivas de los baculovirus son los parámetros más importantes que se deben determinar para conocer sus características insecticidas (Hodgson *et al.*, 2001). Además, la persistencia del patógeno en su huésped y el impacto de su presencia sobre el desarrollo y reproducción del mismo, son otros aspectos fundamentales que se debe conocer en la interacción patógeno-huésped (Cabodevilla *et al.*, 2011). Estudios recientes han indicado que un aislado del SfMNPV colectado en una zona agrícola de México (SfMNPV-MER) tiene una alta actividad insecticida y puede ser utilizado para el control del gusano cogollero (García-Banderas, 2016). Sin embargo, para validar su uso como un agente de control biológico, se requieren más estudios que determinen su naturaleza genética, actividad biológica (en estadios de desarrollo del insecto que aún no han sido evaluados) y el impacto del patógeno sobre el desarrollo y reproducción del huésped.

II. ANTECEDENTES

2.1 Importancia del maíz en México

El cultivo del maíz se extiende a lo largo y ancho del territorio nacional, por ello, es el grano de mayor importancia social. Alrededor de 2 millones de personas se dedican al cultivo de maíz, cifra que representa el 30% de la población ocupada en el sector primario de la economía del país (SAGARPA, 2016). Mesoamérica se considera como el centro de origen del maíz, el cual ha sido extendido alrededor del mundo debido a su gran capacidad para adaptarse a diversas condiciones ecológicas y edáficas (Benz, 2001; OCDE, 2003; Benz, 2006). En México, se producen diversas variedades del maíz, siendo las más importantes: el maíz blanco y amarillo, puesto que es la base de una gran cantidad de productos de consumo humano y pecuario, además de su uso industrial (Aragón-Cuevas *et al.*, 2006).

2.2 El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*

Es conocido comúnmente como gusano cogollero, es el lepidóptero plaga más importante del maíz en el norte de Argentina y en diferentes países de la región Neotropical. *Spodoptera frugiperda* es un insecto polífago y presenta un amplio rango de hospederos entre los que destacan, además del maíz, el sorgo (*Sorghum* spp., Moench), algodón (*Gossypium herbaceum* L.), soya (*Glycine max* L.), papa (*Solanum tuberosum* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y distintas especies de pastos (Pacheco, 1994).

En diversas entidades de México, se han registrado pérdidas de producción causadas por este insecto que van de un 13 a 60%, y en ocasiones pérdidas totales del cultivo especialmente cuando este se encuentra en la etapa fenológica de floración. Al respecto, en un estudio realizado por Rodríguez y De León (2008) mostraron que las pérdidas en el rendimiento, causadas por la presencia de la plaga en el cultivo de maíz, oscilan entre 30 y 40%.

2.2.1 Ciclo de vida y morfología

Spodoptera frugiperda es un insecto que presenta una metamorfosis completa u holometábola, ya que pasa por cuatro estados de desarrollo bien diferenciados: huevo, larva, pupa y adulto. Al igual que en otros insectos, la duración del ciclo de vida del gusano cogollero depende de las condiciones del ambiente, puede variar entre 30 y 90 días en verano e invierno, respectivamente (Capinera, 1999). Cada hembra oviposita un promedio de 1000 huevos a lo largo de su vida, agrupados en masas que promedian los 100 a 150 huevos cada una (Murúa y Virla, 2004; Murúa *et al.*, 2008). Las masas de huevos son protegidas por secreciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo que sirven como protección contra algunos enemigos naturales o factores ambientales adversos (Valverde *et al.*, 1995; Capinera, 1999).

Los huevos son esféricos, blanquecinos, estriados y miden aproximadamente 0.4 mm de diámetro y 0.3 mm de largo. Cada huevo posee 48 a 50 costas radiales con notables costas transversales y tiene una duración aproximada de cinco días (Pacheco, 1994; Bautista, 2006). Las hembras depositan los huevos tanto en el haz como en el envés de las hojas de sus hospederos y habitualmente éstos son puestos en las primeras horas de la noche (Clavijo y Pérez-Greiner, 2000; Murúa *et al.*, 2009). El período larval tiene un promedio de 25 días, pasando generalmente por seis estadios (Murúa *et al.*, 2003; Murúa y Virla, 2004; Murúa *et al.*, 2008).

Las larvas recién emergidas son de color blanco o cremoso; están cubiertas por pequeños puntos negros pubescentes y su cabeza es negra. Las suturas epicraneales están bien marcadas formando una Y invertida. Las larvas conservan, en todos sus estados, protuberancias dispuestas en todos los segmentos del cuerpo sobre las cuales se presenta un pináculo setífero. El cuerpo puede tomar color castaño claro, castaño oscuro o verde pálido, con una línea media longitudinal de color café oscuro entre dos líneas laterales en igual sentido de color castaño claro (Murillo, 1991). Presentan puntos elevados en la parte dorsal del cuerpo, que son de color negro con espinas (Capinera, 1999). Las larvas del último estadio descienden al suelo para dar inicio con la formación de la pupa, éstas generalmente se encuentran a una profundidad de 3 a 5 cm durante un periodo de nueve a 13 días aproximadamente (Pacheco, 1994; Miranda *et al.*, 2002). La larva construye un capullo suelto, de forma ovalada y de 20 a 30 mm de longitud, uniendo partículas de tierra

con seda. La pupa es de color marrón rojizo y mide de 14 a 18 mm de largo y aproximadamente 4.5 mm de ancho (Capinera, 1999).

Los adultos miden aproximadamente 2 cm de longitud por 32 a 38 mm de expansión alar, son de color gris con tonos café (Pacheco, 1994; Murúa y Virla, 2004). Presenta dimorfismo sexual, las alas anteriores de las hembras varían de gris a café, con manchas claras, mientras que las de los machos son beige con una mancha elíptica blanquecina cerca del centro y a un lado de esta mancha tiene otra franja diagonal de color claro dirigida del margen costal hacia el centro (Bautista, 2006). La duración de la vida adulta se estima que promedia unos 10 días, con un rango de aproximadamente siete a 21 días (Capinera, 1999).

2.2.2. Reproducción

La fertilidad de los insectos depende de varios factores, los principales son: temperatura, nutrición y el factor hormonal. El ritmo de la reproducción está influenciado por la temperatura, especialmente en los machos, ya que a temperaturas elevadas los espermatozoides pierden su movilidad y pueden degenerarse. En el caso de las hembras, la producción de huevos está más relacionada con la calidad de las proteínas (Llanderal, 2000; Escaso *et al.*, 2010). Las hembras de *S. frugiperda* normalmente depositan el mayor número de huevos durante los primeros tres a cuatro días de su vida (Capinera, 1999), pero la temperatura y la alimentación forma parte fundamental para el total producido. Estudios indican que el rango óptimo de la capacidad reproductiva de *S. frugiperda* es entre 20 y 30°C, ya que a los 35°C, las hembras producen huevos infértiles (Clavijo-Santiago *et al.* 1991). Así mismo, la fertilidad de los huevos puede variar dependiendo de la alimentación de las larvas, Murúa-Virla (2004) observaron una fertilidad del 92.1% cuando las larvas se alimentaron con maíz, mientras que al alimentarse con pastos, la fertilidad incrementó a 96.4 y 99.8 %, respectivamente.

2.2.3 Hábitos y daños que ocasiona

Las larvas causan daño al consumir follaje y comienzan los daños una vez que consumen el corión del huevo (Murillo, 1991), las larvas jóvenes inicialmente consumen

tejido foliar desde un lado, dejando intacta la capa epidérmica opuesta. En el segundo o tercer instar, las larvas comienzan a hacer orificios en las hojas, y comen desde el borde de las hojas hacia adentro. Las densidades de las larvas generalmente se reducen a uno o dos por planta cuando las larvas se alimentan muy cerca la una de la otra, debido al canibalismo. Las larvas con edades más avanzadas causan defoliación extensa, a menudo dejando sólo las nervaduras y los tallos de las plantas de maíz. Los adultos son nocturnos y muy activos en climas cálidos y húmedos (Capinera, 1999).

Los daños más importantes que ocasiona esta especie se presenta entre los tres y 15 días después de la germinación del maíz (Murillo, 1991). Las larvas también se esconden en el punto de crecimiento (yema, verticilo, etc.), destruyendo el potencial de crecimiento de las plantas o recortando las hojas (Capinera, 1999).

2.3 Los Baculovirus

La palabra baculovirus fue propuesta por Mauro Martignoni, quien sugirió este nombre debido a la forma de varilla de sus viriones, que se deriva del latín baculum = bastón (Rohrmann, 2008). La familia Baculoviridae es la más numerosa y ampliamente estudiada de todos los grupos de virus patógenos de insectos. Agrupa a virus de ADN de doble cadena cuyos viriones están característicamente incluidos en una matriz protéica llamada poliedro o cuerpo de inclusión (OB del inglés *occlusion body*) (Caballero *et al.*, 2009). El tamaño del genoma oscila entre 85 y 166 kb (Blissard y Rohrmann, 1990).

Según la forma y estructura los OBs, se clasifican en nucleopoliedrovirus (NPVs) y granulovirus (GVs). Los NPV se caracterizan por su forma poliédrica y por tener múltiples viriones por OBs, que a su vez pueden tener una o varias nucleocápsidas, por lo que se clasifican en SNPV (simples) o MNPV (múltiples) (Caballero *et al.*, 2001). La secuenciación de muchos genomas completos y un análisis filogenético más detallado de los virus y sus huéspedes naturales se utilizó para definir cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (lepidópteros NPV), *Betabaculovirus* (lepidópteros GV), *Gammabaculovirus* (himenópteros NPV) y *Deltabaculovirus* (dípteros NPV) (Jehle *et al.*, 2006; Herniou *et al.*, 2012).

La distribución espacial de los OBs de los baculovirus varía en función del tipo de ecosistema, las diferentes combinaciones baculovirus-insecto y de las distintas plantas sobre las que se alimentan los insectos hospederos (Fuxa, 2004). Además, el uso insecticida de los baculovirus, debido a su estrecho espectro de hospedero y a la ausencia de otros posibles efectos perjudiciales, constituye riesgos ambientales menores. Por ello, en diferentes partes del mundo se ha demostrado que la utilización de bioinsecticidas basados en baculovirus puede reducir de forma significativa el consumo de plaguicidas químicos (Moscardi, 1999; Caballero *et al.*, 2009).

2.3.1 Estructura y composición de los baculovirus

Las nucleocápsidas de los baculovirus son entre 230-385 nm de longitud y entre 40-60 nm de diámetro (Rohrmann, 2013). Su función básica es transportar la información genética del virus, en una forma altamente compactada, hasta la célula huésped. Esta estructura consiste en una vaina o cápsida cilíndrica, tapada en ambos extremos (base y tapa) cuyo interior constituye el núcleo donde se encuentra el ADN genómico enrollado y condensado. La estructura de la cápsida consiste en una serie de anillos apilados perpendicularmente que configuran la forma cilíndrica y entre cada anillo hay una separación aproximada de 4.5 nm (Federici, 1986; Tanada y Hess, 1991).

Los viriones son los principales elementos infecciosos de los baculovirus tanto en la dispersión del virus entre los individuos de una población como entre los distintos órganos y tejidos dentro del mismo huésped (Caballero *et al.*, 2001). El virión maduro se forma cuando la nucleocápsida adquiere, en un momento determinado de la replicación del virus, una envoltura o membrana que tiene una estructura trilaminar típica compuesta por una capa de lípidos entre dos capas de proteínas (Federici, 1986). Los viriones están envueltos y se han reconocido dos fenotipos: el virus derivado de la oclusión (ODV) y el virus brotado (BV). Estos dos tipos de viriones contienen el mismo genoma, pero difieren en la morfogénesis, en la composición de su envoltura y sus funciones en el ciclo de vida del virus. Sus estabildades en el medio ambiente, así como sus infecciones al insecto blanco, son extremadamente diferentes (Rohrmann, 2013).

Los BV contienen una sola nucleocápsida y son morfológicamente iguales, y se originan a partir de nucleocápsidas que una vez que han sido sintetizadas se mueven y

abandonan las células del huésped; además son los responsables de diseminar la infección entre los órganos y los tejidos de la cavidad hemocélica del insecto (Blissard y Rohrmann, 1990). Los ODV están encerrados en una matriz de proteína paracristalina (poliedrina o granulina) formando un OB al final del proceso infeccioso, según el género del virus. Su estructura es muy resistente a las diversas condiciones ambientales y por lo tanto, facilita la persistencia y la transmisión horizontal de la enfermedad en la naturaleza. Los ODV están formados por una o más nucleocápsidas encerradas en una sola membrana envolvente de lipoproteína. Diferentes baculovirus se caracterizan porque sus OBs contienen ya sea un solo virión con una sola nucleocápsida, múltiples viriones con una única nucleocápsida cada uno o múltiples viriones que contienen haces de varias nucleocápsidas. La superficie de los OBs está cubierta por un sobre o cáliz compuesto de proteína con una gran proporción de carbohidratos (Rohrmann, 2013).

Los OBs son insolubles en agua y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos y también a tratamientos físicos como la congelación, desecación o liofilización (Jacques, 1985), características que les permiten la persistencia en el medio. Los OBs de los NPVs miden aproximadamente 0.6-2 μm de tamaño, lo suficientemente grandes para ser vistos bajo un microscopio de luz (Bonning, 2005). Los OBs de los GVs son ovales con diámetros entre 0.2 y 0.4 μm , y la proteína principal es la granulina (Jehle *et al.*, 2006; Herniou *et al.*, 2012).

2.3.2 Ciclo de infección y sintomatología de los baculovirus

Después que un huésped susceptible se alimenta de follaje contaminado con OBs, los viriones son liberados debido a que la proteína de éstos se disuelve por el pH alcalino (8-11) que prevalece en el intestino del insecto (Figura 1). Una vez disueltos los viriones se liberan y se enfrentan a la membrana peritrófica (MP), misma que está conformada de quitina, mucopolisacáridos y proteínas que separa el alimento del tejido del intestino grueso (Hegedus *et al.*, 2009). La MP tiene tamaños de poro que varían de 21 a 36 nm de diámetro (Barbehenn y Martin, 1995) de modo que las partículas pequeñas pueden pasar libremente a través de la red como parte del proceso digestivo, pero el paso de partículas más grandes, tales como patógenos, está restringido. Los viriones deben dañar la MP para obtener acceso al epitelio del intestino medio. Para ello, algunos baculovirus codifican una clase de

metaloproteasas llamadas enhancinas, que cortan las proteínas de tipo mucina que unen las cadenas de quitina en la red de la MP (Wang y Granados, 1997).

Los viriones infectan a las células epiteliales del intestino medio para iniciar el primer ciclo de replicación o infección primaria (Possee *et al.*, 2010). Alternativamente, algunas nucleocápsidas atraviesan el citoplasma y, sin pasar por el núcleo, se dirigen a la zona basal. Las nucleocápsidas 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). En el hemocele, los BVs llevan a cabo la segunda fase del proceso infeccioso, infectando las células de los órganos y tejidos por endocitosis. Estos viriones utilizan el sistema respiratorio de tráqueas como una red de caminos para dispersarse en el insecto (Engelhard *et al.*, 1994). Los tejidos del cuerpo graso, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda, también son afectados (Ibarra y Del Rincón, 1998).

Las larvas de los lepidópteros que son infectadas por los baculovirus muestran signos visibles de la infección en un período de dos a cinco días después de la ingestión del virus (Tanada y Kaya, 1993). Estos signos incluyen un cambio gradual de color, se tornan lentas en sus movimientos, reducción del apetito y cese de la alimentación. Previo a la muerte, las larvas 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).

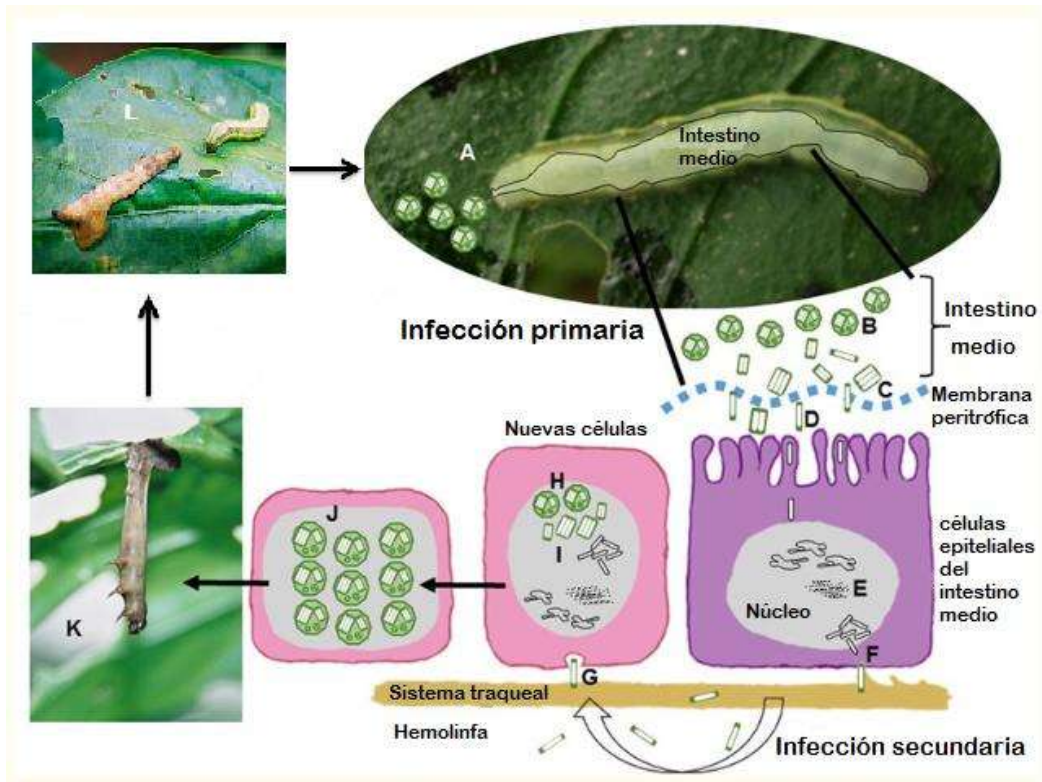


Figura 1. Ciclo de infección y replicación de un nucleopoliedrovirus (figura adaptada de Williams *et al.*, 2017). (A) Ingestión de follaje contaminado con OBs; (B) Dilución de OBs en el intestino medio; (C) Liberación de ODV que pasan a través de la membrana peritrófica y se fusionan con las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio; (D) Las nucleocápsidas viajan al núcleo donde liberan el genoma viral; (E) Las nucleocápsidas de la progenie se ensamblan y brotan a través de la membrana basal; (F) durante la cual adquieren una envoltura que contiene proteína de fusión GP64 o F presente en la membrana celular modificada por el virus. Estos viriones (BV) se dispersan en la hemolinfa o a lo largo de las células del sistema traqueal para diseminar la infección a nuevas células; (G) Ingreso de BV a las células por endocitosis y replicación en el núcleo. Las nucleocápsidas recién ensambladas; (I) pueden salir de la célula o pueden estar envueltas para formar ODV que están ocluidos en OB; (H) Al final del ciclo infeccioso se acumulan OBs en el núcleo; (J) Al morir, las larvas cuelgan típicamente de las hojas superiores de la planta huésped; (K) el tegumento larval se rompe y libera OB que contaminan el follaje para ciclos posteriores de transmisión horizontal (L).

2.4 Biología molecular

La expresión de los genes de los baculovirus se divide en tres fases: temprana, tardía y muy tardía; las cuales se desencadenan a manera de cascada y se definen en función de su relación con la replicación del ADN del virus. Los genes tempranos son transcritos por la

maquinaria de transcripción de la célula huésped usando la ARN polimerasa II celular, en esta etapa se expresan los genes tempranos requeridos para la replicación viral (Cuadro 1) y otros genes tempranos que requieren de los inmediatos para su expresión. Los genes que se expresan en la fase temprana incluyen los que participan en la regulación de la replicación (*e.g.*, ADN polimerasa [adnpol] y helicasa [hel]) y los que participan en la fase de expresión tardía (LEFs [late expresión factores]), los cuales se consideran genes altamente conservados dentro del genoma (Chen *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2011).

La etapa tardía comienza aproximadamente a las 6 horas post-infección (hpi) conjuntamente con el inicio de la replicación del ADN viral y se extiende hasta las 24 hpi, se producen proteínas estructurales necesarias para la formación de los BV (Romanowski y Ghrihelli, 2001). El virus deja de usar la ARNpol de la célula huésped para la transcripción de los genes tempranos. Las proteínas producidas en esta fase incluyen las proteínas estructurales de los viriones como por ejemplo la p6.9, de unión al ADN viral.

En la etapa muy tardía se sintetiza la poliedrina o granulina, los ODVs se ocluyen en esta proteína que es la de mayor cantidad de las que conforman a los OBs. En esta etapa también actúan las proteínas virales catepsina y quitinasa, las cuales están involucradas en el proceso de licuefacción del insecto (Daimon *et al.*, 2007).

2.5 Diversidad genética de los baculovirus

Los baculovirus han sido aislados de más de 700 especies de insectos, éstos patógenos han co-evolucionado con sus insectos hospederos y se han diversificado genéticamente (Herniou *et al.*, 2004), de tal manera que la organización del genoma es más conservada en los Granulovirus que en los Nucleopoliedrovirus (Lange *et al.*, 2004), pero en general se observa alta variabilidad genotípica en los baculovirus. Dicha variabilidad se encuentra tanto entre aislamientos colectados de la misma especie hospedera en diferentes sitios geográficos, como entre aislamientos colectados en el mismo lugar e inclusive en un único individuo (Cory y Myers, 2003; Hitchman *et al.*, 2007). Por ejemplo, en un aislado de Nicaragua el NPV de *S. frugiperda* (SfMNPV) es una mezcla de nueve genotipos y el SfMNPV aislado en Colombia tiene 12 genotipos diferentes (Simón *et al.*, 2004, 2005). Dicha diversidad puede ser consecuencia de mutaciones puntuales, la duplicación de secuencias y transferencia horizontal entre baculovirus, sus hospederos y otros patógenos

del hospedero. Toda esta diversidad viral tiene un propósito benéfico, que es la de proporcionar ventajas para la selección natural, ya que pequeños cambios en el genoma pueden originar modificaciones significativas en las características biológicas del virus como son patogenicidad, la virulencia y la productividad (Cory y Myers, 2003; Hitchman *et al.*, 2007; Harrison, 2009).

Cuadro 1. Diagrama de los principales eventos transcripcionales relacionados con el ciclo viral (tomado de Romanowski y Ghrihelli, 2001).

Comienzo de la Infección:



Tiempo	0 h	6-8 h	18 h
Transcripción mediada por	RNA pol II y factores de transcripción del huésped. Transactivadores virales. Potenciadores virales	ARN Polimerasa viral , resistente a α amanitina	
Transcripción de genes tempranos			
Transcripción de genes tardíos			
Transcripción de genes muy tardíos			
Replicación del DNA			
Genes Transcriptos	ie-0, ie-1, ie-2, iap 1, iap2, dnapol, dnahel, hcf-1, p43, p47, p94, lefs (1, 3, 5, 6, 7,8), pe38, me53, gp64, etc.	ie-0, ie-1, ie-2, iap 1, iap2, dnapol, dnahel, hcf-1, me53, gp64, lefs (2,9,10,11), vp39, vlf-1, chiA, ubi, p78/83, etc.	Vp39, lefs?, vlf-1, chiA, ubi, p10, polh, p74, gp41, odv-e66, odv-ec27, odv-e56, etc.
Producción de BVs			
Producción de OBs			

2.6 Nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* (SfMNPV)

El SfMNPV se encuentra clasificado dentro de la familia Baculoviridae, el cual ha sido estudiado ampliamente desde su primer reporte a comienzos de la década de los 70's (Summers y Anderson, 1973). Este virus prevalece en las poblaciones naturales de *S. frugiperda* y es capaz de generar epizootias cuando se encuentra en altas densidades (Hamm y Young, 1971). Las poblaciones naturales de *S. frugiperda* son afectadas por el SfMNPV y algunos aislamientos del patógeno han mostrado un claro potencial para el control de esta plaga (Escribano, 1999; Harrison *et al.*, 2008). Se han realizado diversos trabajos con el SfMNPV para validar su uso como un agente de control en varios países de América (Mullock *et al.*, 1990; De Oliveira, 1998; Williams *et al.*, 1999).

Escribano *et al.* (1999) determinaron que tres aislados del SfMNPV procedentes de Argentina, Nicaragua y Estados Unidos fueron estructural y genéticamente muy similares con base a un análisis de restricción enzimática; sin embargo, el aislado procedente de Nicaragua (Sf-NIC) (2.04×10^5 OBs/mL) fue 15 veces más patogénico comparado con el virus de Argentina (3.06×10^6 OBs/mL), con base en las CL_{50} determinadas para cada virus. Debido a ello, dicho aislado fue seleccionado para evaluar su efectividad como bioinsecticida sobre cultivos de maíz (Williams *et al.*, 1999). Simón *et al.* (2004) determinaron que una población natural del SfMNPV posee una amplia diversidad genómica. En el aislado silvestre Sf-NIC se identificaron nueve genotipos diferentes. El genotipo completo fue caracterizado en términos de su mapa físico con las endonucleasas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y *BamHI* (Simón *et al.*, 2005).

En un estudio realizado en México por Ríos-Velasco *et al.* (2012) se caracterizaron mediante enzimas de restricción cuatro virus aislados de suelo (NAV1, CAD, AN1 y AN2), encontrando diferencias entre los aislados AN1 y AN2 y los demás, lo cual se vio reflejado en su patogenicidad.

2.7 Transmisión horizontal y vertical

La transmisión es el proceso por el cual un patógeno pasa de una fuente de infección a un huésped susceptible (Andreadis, 1987; Cory *et al.*, 1997). La transmisión horizontal se define como la transferencia del patógeno, que sucede por contacto entre individuos, ingestión de alimento contaminado por individuos de una misma generación o

determinados comportamientos de canibalismo (Chapman *et al.*, 1999). El canibalismo es una característica común en varias especies de lepidópteros. Las heces y la regurgitación contaminadas de insectos infectados también podrían ayudar a la transmisión del virus. La eficiencia de dicha transmisión depende tanto de la densidad de la población del virus como del hospedero. En varios sistemas hospedero-baculovirus se han observado bajos porcentajes de mortalidad larvaria en ausencia de una exposición continua al virus, lo cual sugiere la presencia de infecciones de baculovirus en las poblaciones de sus hospederos (Fuxa, 2004).

La transmisión vertical permite que el virus pueda ser transportado dentro del insecto infectado a su descendencia e iniciar nuevos focos de infección en generaciones subsecuentes, ocurre de padres a hijos (Kukan, 1999; Fuxa, 2004) y puede ocurrir tanto las rutas transovárica la cual implica el proceso de transmisión del virus desde el progenitor materno a los embriones dentro del huevo, como a través de la contaminación de la superficie del huevo con partículas virales que infectan a las larvas recién nacidas cuando ingieren el corion durante la eclosión (Kukan, 1999; Cory y Myers, 2003). Este proceso ha sido documentado en varias especies de insectos, particularmente en el género *Spodoptera* (Smits y Vlak, 1988; Fuxa y Richter, 1991; Fuxa *et al.*, 1992). Por ejemplo, Fuxa y Richter (1991) demostraron la presencia de OBs en el 3-10% de la progenie de *S. frugiperda* adultos sub-letalmente infectados. La presencia de infección encubierta en la descendencia de los apareamientos entre hembras no infectadas y machos infectados, y viceversa, indicó que ambos sexos estaban involucrados en la transmisión vertical (Burden *et al.*, 2002; Cabodevilla *et al.*, 2011; Virto *et al.*, 2013).

Los baculovirus adoptan una estrategia de transmisión de modo mixto que involucra tanto la transmisión horizontal como la transmisión vertical que es común en una amplia gama de virus, parásitos, simbiosis y microbiota (Ebert, 2013). Como la transmisión vertical requiere la reproducción del hospedero, está claro que esta ruta sólo es posible para los virus que pueden adoptar una estrategia de utilización de hospedero de baja virulencia (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005). Para los baculovirus, la baja virulencia se asocia con infección encubierta. Las larvas de insectos que ingieren OB pero no mueren pueden continuar su desarrollo y emerger como adultos encubiertamente infectados. Las infecciones encubiertas (también conocidas como infecciones ocultas, subletales o latentes ocultas) se caracterizan

por la ausencia de signos visibles de enfermedad (Cory *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2017).

2.8 Infecciones latentes y de persistencia

Las infecciones por baculovirus son normalmente letales, pero algunas infecciones pueden ser persistentes o latentes (Cory *et al.*, 1997; Hughes *et al.*, 1997). Las infecciones latentes implican un mínimo de expresión génica viral en el huésped (Hughes *et al.*, 1993, 1997), mientras que las infecciones persistentes son aquellas en las que se produce todo el espectro de transcripción viral que da lugar a la replicación del virus en un nivel bajo (Burden *et al.*, 2003). Tanto las infecciones persistentes como las latentes permiten que los baculovirus sobrevivan en poblaciones hospederas aparentemente sanas (Aruga, 1970; Burden *et al.*, 2003). En el caso de las infecciones latentes, algunos estudios han indicado que el virus puede activarse y causar una infección letal manifestada por el estrés, los factores tales como baja temperatura (*Bombyx mori* NPV), alimentación con virus heterólogo (*Spodoptera littoralis* NPV) o dieta deficiente (*Pieris rapae* GV) (Evans y Entwistle, 1987; Cory *et al.*, 1997).

Cuando la supervivencia del huésped parece estar amenazada, las oportunidades de transmisión influyen en las rutas horizontales más que en las verticales, lo que requiere un marcado aumento en la producción de ODV, OB y un correspondiente aumento de la virulencia. La infección encubierta en sí misma puede ser productiva o no productiva dependiendo de si el virus adopta un modo de infección persistente o latente (Williams *et al.*, 2017).

2.9 Efectos subletales

Las enfermedades virales subletales pueden tener efectos importantes sobre la dinámica de la población de insectos (Boots y Norman, 2000). Estos efectos se han documentado ampliamente en sistemas de insectos-baculovirus (Burand y Park, 1992; Goulson y Cory, 1995; Rothman y Myers, 1996; Myers *et al.*, 2000; Matthews *et al.*, 2002). Los efectos subletales típicos incluyen tiempos de desarrollo prolongados en las etapas de larva y pupa (Goulson y Cory, 1995; Milks *et al.*, 1998; Cabodevilla *et al.*, 2011), una

reducción de la fecundidad (Shapiro y Robertson, 1987; Patil *et al.*, 1989), viabilidad reducida del huevo (Santiago-Álvarez y Vargas-Osuna, 1988; Patil *et al.*, 1989), la reducción del peso corporal (Myers *et al.*, 2000), así como reducción del peso de la pupa (Murray *et al.*, 1991; Myers *et al.*, 2000; Duan y Otvos, 2001; Matthews *et al.*, 2002; Monobrullah y Shankar, 2008) y los cambios en la proporción de sexos (Melamed-Madjar y Racciah, 1979; Santiago-Álvarez y Vargas-Osuna, 1988).

Los efectos subletales pueden deberse a la desviación de los recursos energéticos del huésped para combatir la enfermedad (Bong y Sikorowski, 1991) y/o los cambios hormonales inducidos en el huésped sub-letalmente infectado (O'Reilly y Miller, 1989). Es importante señalar que pocos estudios han presentado evidencias de la presencia del virus en los supervivientes de dosis subletales de inoculo (Burden *et al.*, 2002). Los efectos subletales también tienden a ser más pronunciados en los insectos que son infectados en los instares posteriores más que en los primeros instares (Rothman y Myers, 1996; Myers *et al.*, 2000). El período de pre-oviposición también fue significativamente más largo en los sobrevivientes de *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera. Noctuidae) con el SeMNPV desafiados (Cabodevilla *et al.*, 2011), *S. exempta* (Vilaplana *et al.*, 2008) y *Pieris brassicae* (Sood *et al.*, 2010), por lo que las polillas hembras pueden viajar distancias más largas que las conespecíficas sanas antes de comenzar a poner huevos, lo que resulta en una mayor dispersión de la progenie infectada de forma encubierta.

Cabodevilla *et al.* (2011) realizaron un estudio de infecciones subletales con un aislado del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV), la infección subletal fue asociada con reducciones significantes en peso pupal, emergencia de adultos, fecundidad y fertilidad (eclosión de los huevos) e incrementos significativos en el tiempo de desarrollo larval.

III. HIPÓTESIS

El SfMNPV posee una alta actividad insecticida sobre *S. frugiperda* y afecta la aptitud biológica de los individuos sobrevivientes a la infección.

IV. OBJETIVO GENERAL

Conocer el patrón genético del aislado SfMNPV-MER, actividad biológica y su impacto sobre el desarrollo y la reproducción del insecto huésped.

4.1 Objetivos Particulares

- Analizar las características genéticas del aislado SfMNPV-MER mediante la secuenciación parcial del gen *polh*.
- Evaluar la patogenicidad y productividad del SfMNPV-MER en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*.
- Evaluar el efecto del aislado SfMNPV-MER sobre el desarrollo, reproducción y progenie de su huésped.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cría de *S. frugiperda*

Los individuos de *S. frugiperda* que se utilizaron en la presente investigación provinieron de una colonia del laboratorio de Entomología Agrícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF). Los adultos se alimentaron con una solución con miel de abeja a 15 %. Las larvas se alimentaron con una dieta semi-sintética modificada de Poitout y Bues (1974). Las condiciones ambientales de cría y de los bioensayos fueron de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ de Humedad Relativa y 16:8 h (Luz: Oscuridad).

5.2 Replicación del SfMNPV

El SfMNPV bajo estudio se obtuvo del laboratorio de Patología de Insectos del IIAF, el cual está denominado como SfMNPV-MER. Como patrón de referencia se utilizó un virus procedente de Nicaragua (SfMNPV-NIC), el cual fue caracterizado previamente por Escribano *et al.* (1999). Para observar el patrón genético, el cual se describe más abajo, también se utilizó un virus procedente de muestras de suelo colectadas en el estado de Chiapas (SfMNPV-CHI). Las larvas infectadas y muertas con evidentes síntomas del virus, se maceraron y purificaron mediante filtración. Por último, se cuantificaron los OBs en una cámara de conteo Neubauer (10^{-4}cm^3) a 40x con un microscopio con contraste de fases. Finalmente, la suspensión del virus se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.3 Características genéticas del SfMNPV-MER

5.3.1 Extracción y precipitación del ADN genómico

El ADN viral se obtuvo a partir de una suspensión purificada del SfMNPV-MER, SfMNPV-CHI y SfMNPV-NIC. Una alícuota (300 μl) de cada una de las suspensiones se mezcló con 500 μl de buffer de extracción, el cual contiene 100 mM tris HCl, 50 mM EDTA y 1.4 M NaCl, 50 μl CTAB al 10%, 50 μl SDS al 20%; y 5 μl de Proteinasa k, la mezcla se agitó y se incubó a 38°C durante 30 min, posteriormente se agitó nuevamente y se incubó a 65°C durante 30 min para permitir la disolución de proteínas. Enseguida, a la mezcla se le agregaron 700 μl de cloroformo-alcohol-isoamílico, se agitó en vórtex y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 640

μl de isopropanol y 60 μl de acetato de sodio (3.5M), éstos se mezclaron por inversión y la muestra se colocó a -20°C durante 10 min. Después, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm y se desechó el sobrenadante, se dejó la pastilla a la cual se le agregaron 500 μl de etanol, y posteriormente se despegó la pastilla con pequeños golpes. Finalmente, la muestra se centrifugó 5 min a 13,000 rpm, se desechó el etanol y se secó boca abajo el microtubo. Posteriormente se resuspendió la pastilla de ADN en 50 μl de agua miliQ. Para visualizar la muestra de ADN, se colocaron 5 μl del ADN viral con 3 μl de buffer de carga, se mezcló y se corrió en un gel de agarosa al 2%, con amortiguador TAE 1x (40 mM Tris-acetatoTris, pH 8,0; 1 mM EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotodocumentaron en un transiluminador de UV (BioDoc-It2® Upland, CA, USA) (100-115V~50/60 Hz).

Las extracciones se validaron por la cuantificación de la concentración del ADN en ng/μl, evaluando su pureza por medio de la relación (A260/A280) con un espectrofotómetro UV (Quawell Technology, Inc. U.S.A).

5.3.2 Amplificación y secuenciación parcial del gen *polh*

La amplificación parcial del gen *polh* de los tres aislados de SfMNPV se llevó a cabo a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos específicos que se utilizaron se diseñaron con base a los estudios de González *et al.* (1989) y De Moraes y Maruniak (1997) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación parcial del gen *polh*.

Gen <i>polh</i>	Tamaño del fragmento esperado
5' TACGTGTACGACAACAAGT 3' (forward)	575 pares de bases
5' TTGTAGAAGTTCTCCCAGAT 3' (reverse)	

La amplificación por PCR se realizó en SelectCycler II (California, EE. UU.). Para la reacción se utilizaron los siguientes componentes para un volumen final de 25 µl usando agua ultrapura: MgCl₂ 1.25 mM, dNTPs 0.52 mM, 1 mM de cada oligonucleótido (directo o inverso), 0.2 U Taq ADN polimerasa, y 1 µl de ADN. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial (95°C, 5 min) seguida de 35 ciclos de desnaturalización (95°C, 30 s), elongación (48°C, 30 s) y extensión (72°C, 1 min), con una etapa de extensión final (72°C, 10 min). Los productos de la PCR se observaron en un gel de agarosa TAE al 2% teñido con 0.5 µg / ml de bromuro de etidio y se fotodocumentaron en un transiluminador UV. Se incluyeron controles positivos (SfMNPV ADN) y negativos (H₂O).

Todas las amplificaciones se secuenciaron en ambas direcciones por el método de Sanger y Coulson (1975), la secuenciación de los amplicones se realizó por la empresa Macrogen de Corea. Con el fin de corroborar la identidad taxonómica de la especie bajo estudio se analizaron las secuencias de los tres aislados (SfMNPV-NIC, SfMNPV-CHI y SfMNPV-MER) para encontrar el porcentaje mayor de similitud en una base de datos pública mediante BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Posteriormente, se llevó a cabo un alineamiento múltiple con las tres secuencias de los virus bajo estudio utilizando la herramienta Clustal-Omega (Higgins, 1988) y el alineamiento se revisó manualmente en BioEdit (Hall, 1999). Además, como pauta comparativa se incorporaron tres aislados más del SfMNPV obtenidos del GenBank, dos procedentes de Colombia (Medellin y Espinal) y uno de Florida, EE.UU. Se utilizó nuevamente el programa Clustal-Omega para manipular, analizar, comparar y visualizar el árbol filogenético más óptimo el cual agrupó a las secuencias de los aislados comparados en un árbol resuelto.

5.4 Bioensayos de patogenicidad y productividad del SfMNPV-MER

Las larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* (0-8 horas después de la muda) se inocularon con el aislado SfMNPV-MER con la técnica de contaminación por gota descrita por Hughes y Wood (1981), con modificaciones. Para ello, el aislado del virus se resuspendió en agua destilada + colorante artificial azul (McCormick®, Inc, EE.UU.) a 0.01% vol/vol y 20% de una solución de sacarosa como fagoestimulante, las muestras se

homogeneizaron con la ayuda de un vortex y se prepararon 200 µl de cada concentración y todo el volumen se dispersó sobre la superficie de la caja de Petri en pequeñas gotas con un volumen promedio de 6.2 µl cada una. Las larvas que ingirieron la gota en un periodo de 10 minutos, se transfirieron individualmente a cajas para cultivo de tejido de 24 celdas provistas con dieta semisintética libre del virus. Los bioensayos se mantuvieron en una cámara ambiental a 25 °C y 65% de humedad relativa. Se realizaron cuatro repeticiones de 24 individuos por cada concentración (1.92×10^3 , 9.6×10^3 , 4.8×10^4 , 2.4×10^5 , 1.2×10^6 y 6×10^6 OBs/ml). Así mismo, 24 larvas por concentración como testigo, las cuales se trataron solamente con agua destilada, colorante artificial azul y la solución de sacarosa. La mortalidad de las larvas se registró cada 12 horas a partir del tercer día después de la inoculación del virus durante ocho y 11 días. Los datos de mortalidad se sometieron a un análisis probit (Finney, 1972) con el programa POLO PC (LeOra Software, 1987).

Para la producción de OBs/larva se utilizó la misma metodología de inoculación descrita anteriormente, en este caso se utilizaron los valores correspondientes a la CL_{90} (9.5×10^5 OBs/ml). Los bioensayos se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales que las señaladas en el apartado anterior. La mortalidad de las larvas se registró cada 24 horas a partir del tercer día post-inoculación. Se realizaron tres repeticiones de 48 individuos y el testigo. Con el objetivo de estimar la producción del virus, en OBs/larva, una vez que las larvas presentaron síntomas evidentes de la infección se pesaron previo a la muerte y transfirieron a microtubos estériles de 0.6 ml (Murillo *et al.*, 2007). Los virus se conservaron a -20 °C hasta el conteo de los OBs.

Para determinar la cuantificación de los OBs, las larvas muertas se colocaron individualmente en un microtubo de 1.5 ml y se homogenizaron en 100 µl de agua destilada. El número de OBs producido por larva se estimó por triplicado mediante el conteo en una cámara de Neubauer. Para el conteo de los OBs, se seleccionaron al azar 40 larvas que murieron en un rango de tiempo aproximado de 168 h, en el cual existió la mayor mortalidad larvaria.

5.5 Efecto sobre el desarrollo y reproducción del huésped

Se utilizó la misma metodología descrita anteriormente, pero en este caso se emplearon 100 larvas de tercer estadio que se inocularon con una concentración que provocara ~40% de mortalidad (4.8×10^4 OBs/ml). Esta concentración se determinó en ensayos previos (datos no mostrados). Antes de la inoculación, las larvas se pesaron y después de ingerir el virus, se individualizaron en vasos de plástico de 29 ml que contenían dieta artificial. Los individuos sobrevivientes se pesaron en pupa y se sexaron de acuerdo a las características morfológicas establecidas por Sannino *et al.* (1987) (Figura 2). Después de su emergencia, se eligieron 10 parejas al azar y se observaron diariamente para determinar el promedio de huevos por hembra. Para ello, cada pareja se colocó en una bolsa de papel estraza del No. 2. En cada bolsa se colocó un vaso de plástico de 10 ml que contenía algodón impregnado con una solución de miel de abeja al 15%. Una vez que inició el periodo de oviposición, las bolsas de papel se reemplazaron diariamente y se contabilizó el número de masas y el número de huevos por masa por día.

Todos los adultos se revisaron diariamente hasta su muerte. Los huevos de la tercer puesta de todas las parejas se utilizaron para contabilizar la fertilidad: los huevos fértiles (aquellos donde existió formación y emergencia de las larvas y aquellos donde claramente se observó la formación de la larva pero no hubo emergencia) y los huevos infértiles (donde no existió formación de la larva). De los huevos que se seleccionaron para evaluar la fertilidad, se individualizaron 24 larvas por pareja para observar posible muerte por virus. Todo el experimento se repitió tres veces.

Los parámetros de peso de pupa, porcentaje de eclosión, promedio de huevos por hembra y porcentaje de huevos fértiles se analizaron mediante una prueba *t*-student. La proporción de sexos se analizó mediante una prueba G. El resto de los parámetros biológicos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de U de Mann Whitney. Para calcular la mortalidad por virus de los individuos se realizó un ajuste de Abbott (1925) para eliminar la muerte del testigo. Todos los análisis se realizaron en el paquete estadístico IBM SPSS versión 21(© Copyright IBM Corporation, EUA).

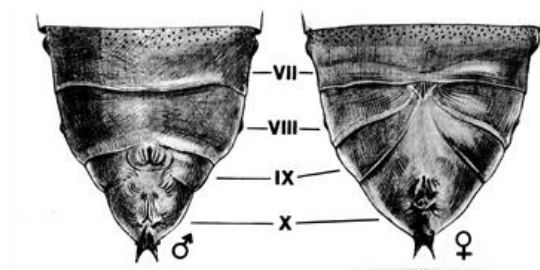


Figura 2. Diferencias morfológicas utilizadas para la separación de sexos en estado de pupa. En el 9º segmento abdominal de los machos se encuentra, sobre un área circular, una pequeña elevación señalada por una incisión. La hembra no presenta relieve tegumentario, hay una incisión longitudinal diferenciada que alcanza el margen del 7º segmento abdominal y se prolonga por los segmentos 9º y 10º (Sannino *et al.*, 1987).

VI. RESULTADOS

6.1. Características genéticas de los virus

6.1.1. Extracción del ADN genómico

El ADN genómico extraído de los aislados SfMNPV-MER, SfMNPV-CHI y SfMNPV-NIC se comprobó a través de la electroforesis en gel de agarosa 1% (Figura 3).

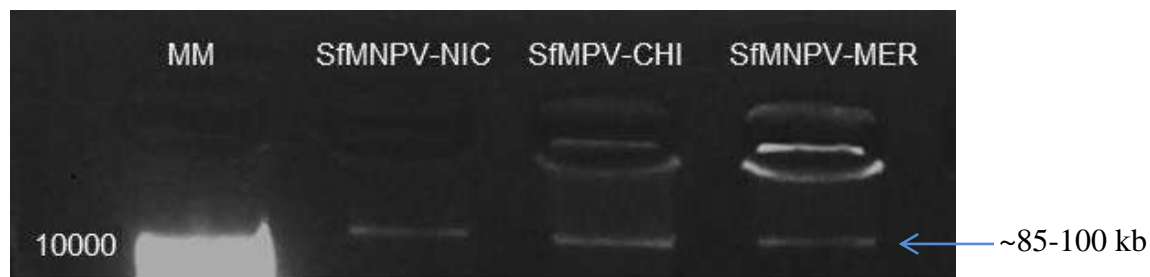


Figura 3. Extracción del ADN genómico del SfMNPV de los dos aislados de referencia (SfMNPV-NIC y SfMNPV-CHI) y el aislado de SfMNPV-MER. MM, marcador molecular 1 Kb plus (Ladder Invitrogen).

6.1.2. Amplificación y secuenciación parcial del gen *polh*

Con los oligonucleótidos *polh* utilizados con los dos virus de referencia (SfMNPV-NIC y SfMNPV-CHI) y el virus bajo estudio (SfMNPV-MER) se amplificaron fragmentos de 575 pares de bases (pb) que corresponden con el tamaño esperado de la región (Figura 4).

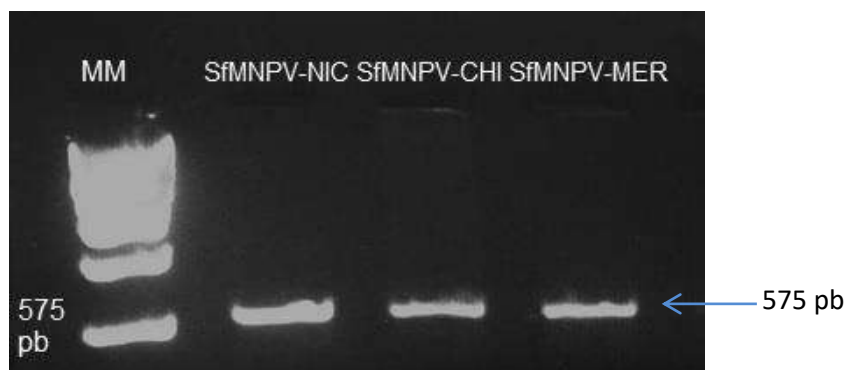


Figura 4. Amplificación específica por PCR del gen de la poliedrina (*polh*) en tres aislados del SfMNPV. MM, marcador molecular 1 Kb plus (Ladder Invitrogen).

Las secuencias del gen *polh* de los tres aislados de SfMNPV se alinearon y se analizaron en una base de datos pública mediante BLAST mostrando una identidad de similitud de 99% con el gen *polh* de la misma especie (GQ923749, Genbank acc.) (Figura 6). La matriz del porcentaje de identidad entre los tres virus bajo estudio mostró que los virus mexicanos SfMNPV-MER y SfMNPV-CHI tienen una identidad de 94 y 95% con respecto al virus SfMNPV-NIC, respectivamente. Así mismo, la identidad entre los dos virus mexicanos fue de 94%.

El árbol filogenético, para comparar a los seis aislados de SfMNPV, arrojó tres ramas bien definidas; la primera agrupó a los tres aislados del estudio, separando el aislado de SfMNPV-NIC (Nicaragua) mostrando que los aislados mexicanos SfMNPV-MER y SfMNPV-CHI forman un grupo monofilético (Figura 5). Así mismo, los dos aislados colombianos tomados del Gen Bank se agruparon en una sola rama (grupo monofilético) y el aislado de Florida fue independiente con respecto a todos los demás.



Figura 5. Árbol filogenético entre los aislados SfMNPV-NIC, SfMNPV-CHI y SfMNPV-MERIDA (aislados del estudio); SfMNPV-FLORIDA, USA; SfMNPV-ESPINAL y MEDELLIN, Colombia.

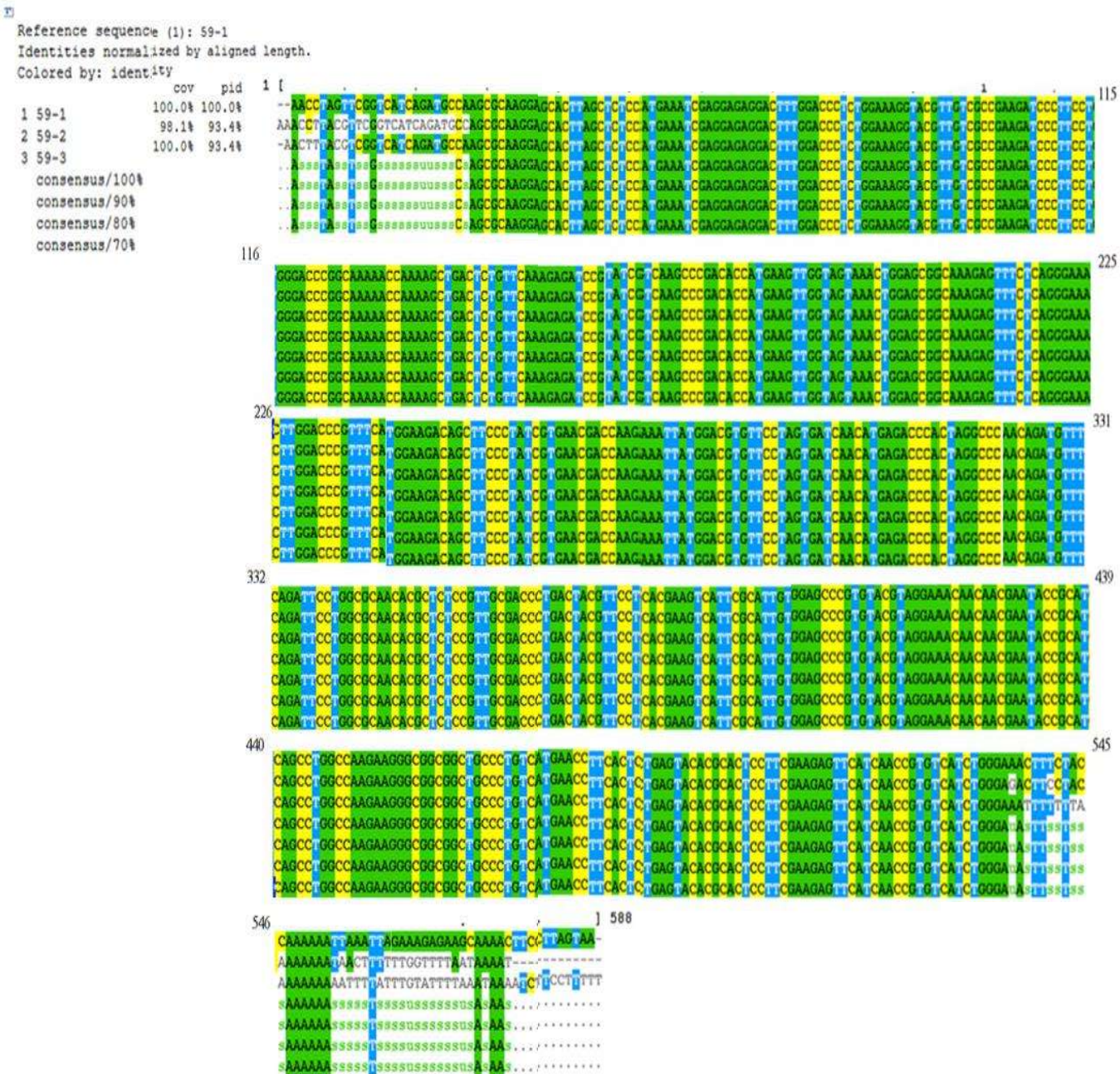


Figura 6. Secuencias del alineamiento parcial del gen *polh* en tres aislados del SfMNPV (SfMNPV-MER, SfMNPV-CHI y SfMNPV-NIC).

6.2. Bioensayos

El inicio de la mortalidad larvaria se observó a partir de las 72 h post-inoculación (Figura 7). En general, se observó una relación positiva entre la mortalidad y la concentración. El ajuste al modelo Probit se calculó a las 192 y 264 h (Cuadro 3). La mortalidad total en el testigo fue de 7%. No se observó un cambio significativo en los valores de la CL_{50} entre los dos tiempos analizados, con base a los límites de confianza al 95%.

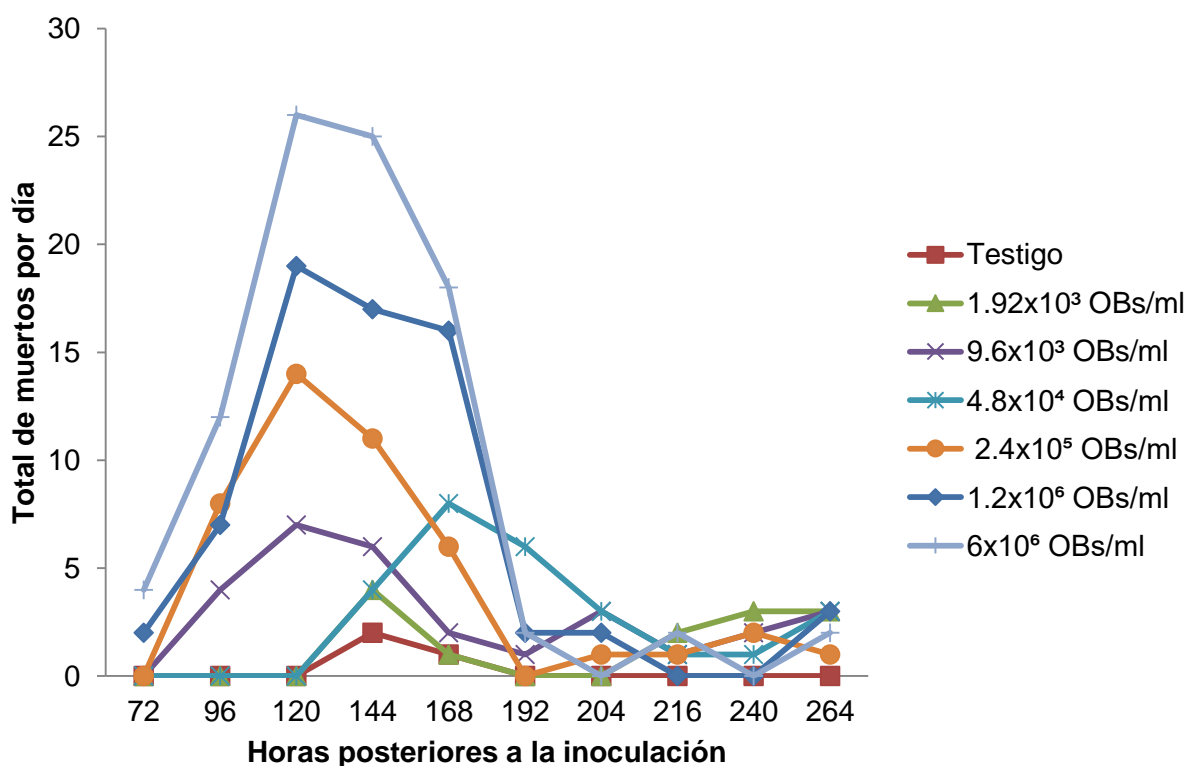


Figura 7. Mortalidad total de larvas de *S. frugiperda* inoculadas con el aislado SfMNPV-MER en el tercer estadio mediante el método de la gota.

Cuadro 3. Análisis de regresión a las 192 y 264 h post-inoculación de larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* expuestas al aislado SfMNPV-MER mediante el método de la gota.

	OBs/ml	Límites de confianza		Ordenada en el origen \pm EE	Pendiente \pm EE	χ^2
		al 95%				
192 h						
CL ₄₀	3.79×10^5	$1.78 \times 10^5 - 7.68 \times 10^5$		-3.81 ± 0.34	0.64 ± 0.06	4.6 ^a
CL ₅₀	9.44×10^5	$4.70 \times 10^5 - 2.11 \times 10^6$				
264 h						
CL ₄₀	1.77×10^5	$4.4 \times 10^3 - 4.3 \times 10^5$		-3.03 ± 0.29	0.53 ± 0.051	5.7 ^a
CL ₅₀	5.35×10^5	$2.20 \times 10^5 - 1.49 \times 10^6$				

^aValores de la χ^2 se encuentran dentro de los valores tabulados al 95% de confianza.

6.2.1. Producción de OB por larva

Previo a la inoculación de las larvas, no se observaron diferencias significativas entre los pesos de las larvas del testigo (2.1 ± 0.018 mg) y las destinadas a la infección (2.1 ± 0.016 mg) ($U = 9806$, $p = 0.42$) (Figura 8). Sin embargo, el peso promedio que se registró previo a la muerte de las larvas infectadas fue significativamente menor (17.1 ± 0.49 mg) comparado con el testigo (52.0 ± 1.78 mg) ($U = 413.5$, $p < 0.001$). El peso promedio de las pupas de los individuos infectados fue significativamente menor (184.14 ± 4.80 mg) comparado con el registrado en el testigo (193.44 ± 4.05 mg) (Figura 8) ($t = -1.313$, $p = 0.191$). Los síntomas de la infección en las larvas se presentaron entre el séptimo y décimo día post-inoculación. Se obtuvo una producción media de OBs por larva de $1.21 \times 10^8 \pm 2.59 \times 10^7$.

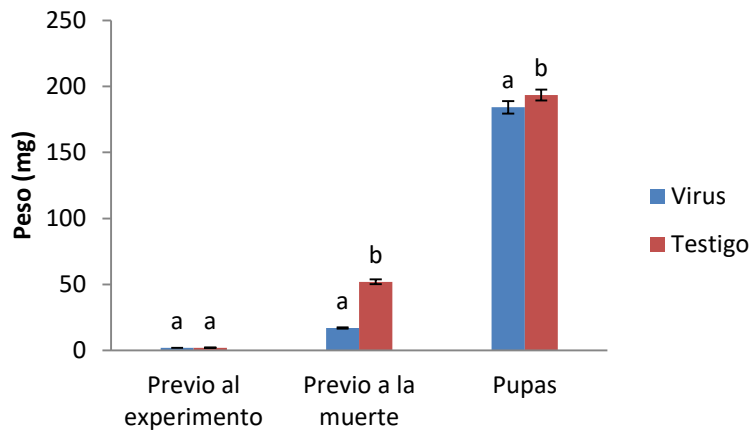


Figura 8. Promedio de peso (mg \pm EE) en los individuos tratados con la CL₉₀ (9.5×10^5 OBs/ml) y el testigo previo al experimento. Medias \pm EE entre par de columnas seguidas por la misma letra no son significativamente distintas.

6.3. Efecto sobre el desarrollo del huésped

Aunque se observó un incremento significativo en los pesos medios de las larvas de tercer estadio utilizadas en el testigo en comparación con el tratamiento con virus, no se observaron diferencias significativas cuando los individuos llegaron al estado de pupas (Cuadro 4). Once días después de la inoculación, se obtuvo un porcentaje medio de mortalidad por virus de 42.2 ± 3.9 % (rango entre repeticiones de 37.8 a 50%), el cual fue esperado de acuerdo a la concentración utilizada. La muerte en el testigo fue de 0.7% y se atribuye que fue por contaminación local. No se observaron diferencias significativas en la proporción de hembras entre los individuos del testigo y los sobrevivientes a la infección por virus.

6.3.1 Efecto del virus sobre la reproducción y longevidad de los adultos de *S. frugiperda*

El promedio de huevos por hembra de *S. frugiperda* en el testigo mostró un incremento significativo (1.2 veces) con respecto al tratamiento con virus. Así mismo, el

porcentaje de huevos fértiles fue significativamente mayor (1.2 veces) en el testigo comparado con el tratamiento virus (Cuadro 5).

Cuadro 4. Parámetros de vida de *S. frugiperda* (\pm EE) en individuos tratados con el SfMNPV-MER a una concentración de 4.8×10^4 OBS/ml.

Tratamiento	Peso de larvas de tercer estadio previo al experimento ^a		Pupa ^b		Porcentaje de hembras (N)
	mg	N	mg	N	
Testigo	1.73 \pm 0.01 a	290	150.5 \pm 2.06 a	181	53.78 (71) a
Virus	1.62 \pm 0.01 b	299	151.9 \pm 2.48 a	133	42.10 (56) a

Medias \pm EE dentro de la misma columna seguida por la misma letra no son significativamente distintas. ^a $t = 4.13$; $p < 0.001$; ^b $t = -0.44$, $p = 0.65$; ^c $G = 0.384$, $p = 0.54$.

Cuadro 5. Fecundidad y fertilidad de adultos de *S. frugiperda* provenientes de larvas de tercer estadio tratadas con el SfMNPV-MER a una concentración de 4.8×10^4 OBs/ml.

Parámetro evaluado	Tratamientos	
	Testigo	Virus
Porcentaje de parejas que produjeron huevos	100	100
^a Promedio de huevos/hembra.	1561.87 ± 0.78 a	1294.0 ± 27.48 b
^b Porcentaje de huevos fértiles.	91.63 ± 1.10 a	73.0 ± 3.73 b

Medias \pm EE dentro de la misma fila seguidas por la misma letra no son significativamente distintas. ^a $t = 9.7416, p = 0.0006$; ^b $t = 4.7844, p = 0.008$.

Los individuos sobrevivientes a la infección por el virus, tuvieron una longevidad significativamente menor (8.16 ± 1.53) comparada con los adultos del testigo (10.73 ± 0.98) (U de Mann Whitney = 63; $P < 0.001$) (Figura 9). Sin embargo, tanto en el tratamiento de virus como en el testigo se obtuvo una emergencia de adultos del 100%.

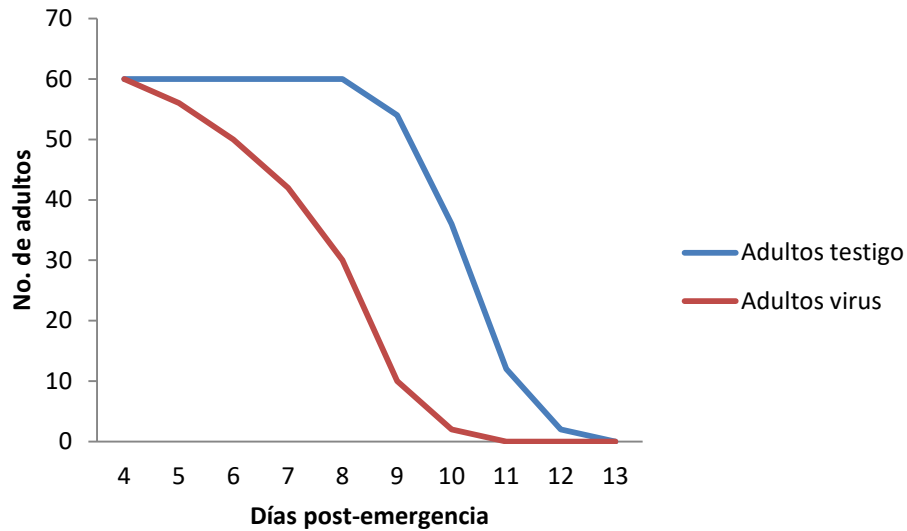


Figura 9. Longevidad de adultos infectados con el aislado SfMNPV-MER (4.8×10^4 OBs/ml).

6.4 Efecto sobre el desarrollo de la descendencia (F1) de *S. frugiperda*

No se observaron diferencias significativas en la duración del estado de huevo de la F₁ entre el testigo y los huevos procedentes del tratamiento virus (Cuadro 6); sin embargo, se observó un incremento significativo (3.8 veces) en el porcentaje de muerte por virus en las larvas cuyas progenitoras fueron sobrevivientes al tratamiento con virus. El incremento de dicha mortalidad se observó mayoritariamente entre el tercer y sexto día de la eclosión (Figura 10). Se atribuye que la muerte del testigo fue por razones metodológicas, puesto que la mortalidad de las larvas progenitoras infectadas fue sumamente baja (x%, n = 300) y también se le atribuyen a una contaminación local.

Cuadro 6. Duración del estado de huevo y porcentaje de mortalidad por virus de la F1 de larvas de tercer estadio infectadas con el SfMNPV-MER (4.8×10^4 OBs/ml).

Parámetros	Tratamientos	
	Testigo	Virus
Parejas (N)	30	30
Larvas (N)	694	704
Duración del estado de huevo ^a (días)	4.4 ± 0.10 a	4.5 ± 0.09 a
Mortalidad por virus ^b (%)	1.10 ± 0.19 a	4.26 ± 0.49 b

Medias \pm EE dentro de la misma fila seguidas por la misma letra no son significativamente distintas. ^aU de Mann-Whitney = 413.5, $p = 0.5408$; ^bU de Mann-Whitney = 225, $p = 0.0002$.

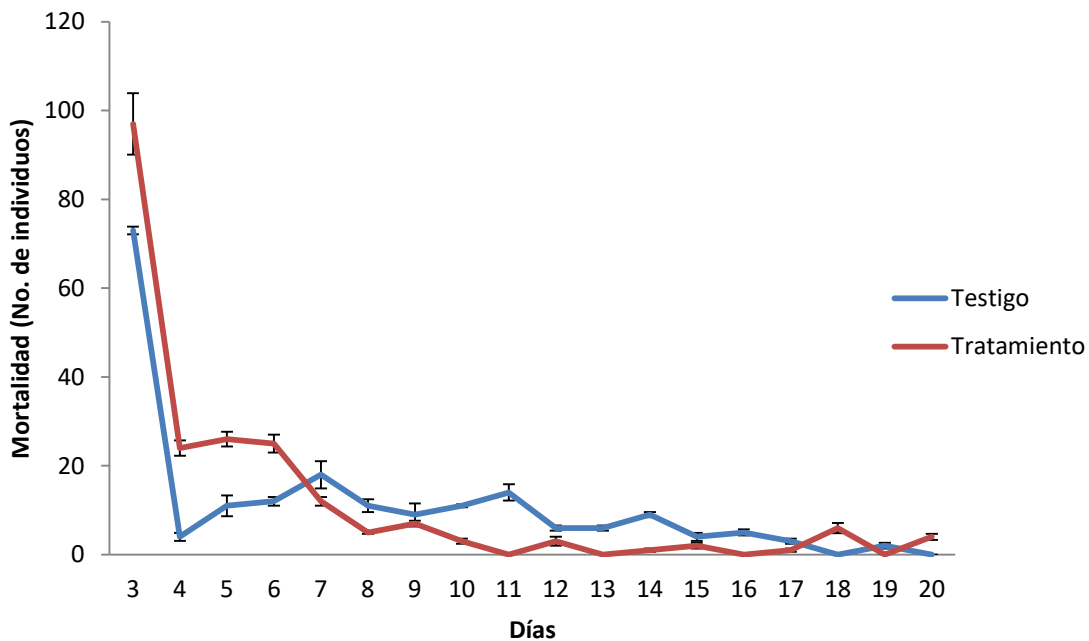


Figura 10. Mortalidad de la descendencia de larvas tratadas con el aislado SfMNPV-MER (4.8×10^4 OBs/ml).

Los pesos de las pupas de los individuos descendientes de padres infectados fueron significativamente menores (1.1 veces) comparado con el testigo. En relación a la proporción de hembras y machos, no se observó una diferencia significativa entre el testigo y el tratamiento virus (Cuadro 7).

Cuadro 7. Parámetros de vida de los descendientes de *S. frugiperda* tratados con el SfMNPV-MER.

Tratamiento	Peso Pupas ^a		Porcentaje de adulto (N) ^b	
	mg	N	Machos	Hembras
Testigo	166.86 ± 1.04 a	462	48.48 (240)	51.51(255) a
Virus	154.84 ± 1.13b	436	45.17 (220)	54.82(267) a

Medias ± EE dentro de la misma columna seguida por la misma letra no son significativamente distintas. ^aU de Mann-Whitney =6.32E+04, $p < 0.000$; ^bPrueba G = 1.1, g.l. = 1, $p = 0.30$.

VII. DISCUSIÓN

Los baculovirus son virus específicos de insectos que presentan como rasgo morfológico la formación de OBs proteicos, los cuales les proporcionan resistencia después de ser liberados de su huésped (Blissard y Rohrmann, 1990; Tanada y Kaya, 1992). Las proteínas que conforman a los OBs (poliedrina o granulina, dependiendo del género) son altamente conservadas y se sintetizan al final del proceso infeccioso (Rohrmann *et al.*, 1981; Rohrmann, 1992; Hayakawa *et al.*, 1999; Okano *et al.*, 2006). Los genes *polh* que codifican para las proteínas de los OBs han sido anteriormente estudiados para diferenciar especies de baculovirus (De Moraes y Maruniak, 1997) y para observar diferencias entre aislados de una misma especie. Al respecto, Lange *et al.* (2004) y Rowley *et al.* (2010) establecieron un método basado en PCR para la identificación y clasificación de baculovirus específicos de lepidóptera, incluyendo el SfMNPV (Rowley *et al.*, 2010), mediante el uso de genes altamente conservados (*polh*, *lef-8* y *lef-9*) e involucrados en la formación de los OBs y en la transcripción de los genes tardíos y muy tardíos, respectivamente.

En el presente estudio, los productos de PCR secuenciados de los tres aislados mostraron una alta similitud (99%) con respecto al gen *polh*-SfMNPV (Genbank No. GQ923749). Similarmente, García-Gutiérrez *et al.* (2013) observaron que el producto de PCR (575 bp) de un aislado mexicano del SfMNPV tuvo 99% de identidad con el gen *polh*-SfMNPV (Genbank No. J04333.1). Si bien, estos resultados confirman la identidad de los propios aislados (Rowley *et al.*, 2010), también pueden indicar su amplia dispersión geográfica (Simón *et al.*, 2011) y su alta prevaencia entre las poblaciones del huésped (Fuxa, 1982). *Spodoptera frugiperda* es una especie que se distribuye ampliamente desde el norte al sur de América, comportamiento que incrementa la posibilidad de dispersión del patógeno y la interacción entre los aislamientos de distintas zonas geográficas (Fuxa, 1982; Simón *et al.*, 2011). Este tipo de dispersión puede realizarse tanto por adultos contaminados superficialmente como por una infección subletal o latente (Dias-Vasconcelos, 2001; Virto *et al.*, 2013). Además, en el presente estudio se observó un grupo monofilético bien resuelto entre los tres aislados bajo estudio; donde los aislados mexicanos (SfMNPV-MER y SfMNPV-CHI) surgieron más recientemente a partir del virus procedente de Nicaragua (ancestro). Lo anterior puede indicar que existe una relación más cercana por zona

geográfica entre los aislados mexicanos, los cuales aparentemente interactúan con sus huéspedes bajo condiciones ambientales similares. Además, no se descarta la posibilidad de que el virus de Nicaragua sea el antecesor que se diversificó hacia México.

Por otro lado, se considera que la pequeña variación que se observó entre los genomas (entre 5 y 6%) de los tres aislados bajo estudio, quizás pueda impactar en sus características fenotípicas como se ha reportado para varios estudios (Escribano *et al.*, 1999; Cory y Myers, 2003; Murillo *et al.*, 2006; Serrano *et al.*, 2015). Por ejemplo, Escribano *et al.* (1999) obtuvieron un rango de las CL_{50} entre 2.5×10^4 y 1.23×10^7 OBs/ml para tres aislados distintos del SfMNPV (Argentina, EE.UU y Nicaragua). Así mismo, Rangel-Núñez *et al.* (2014) obtuvieron un rango de las CL_{50} entre 4.9 y 18.5×10^4 OBs/ml para tres aislados originarios de Argentina, Honduras y EE.UU. En ambos estudios, la variabilidad en la actividad biológica estuvo relacionada con los cambios genéticos observados mediante enzimas de restricción.

Previamente, García-Banderas (2016) demostró que la actividad biológica del aislado SfMNPV-MER, el mismo utilizado en el presente estudio, fue distinta comparado con el aislado SfMNPV-NIC en larvas del segundo estadio de *S. frugiperda*, pero esta diferencia dependió del origen del insecto huésped. Así mismo, Ríos-Velasco *et al.* (2011) obtuvieron un rango muy amplio de los valores de las CL_{50} s (4.3×10^2 - 1.5×10^6 OBs/mm²) al evaluar 10 aislados del SfMNPV provenientes del norte y oeste de México sobre larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* de una población de laboratorio (sin especificar origen). En general, varios autores señalan que la heterogeneidad genética y fenotípica de los baculovirus dentro de la población huésped puede darse como una ventaja de adaptación, evolución y de sobrevivencia en el campo (Ikeda *et al.*, 2015). Además, dicha variabilidad puede ayudar a que estos patógenos puedan adaptarse a los cambios en su huésped (Kolodny-Hirsch y van Beek, 1997; Hitchman *et al.*, 2007; Ikeda *et al.*, 2015). La variabilidad natural de los baculovirus puede estar regulada por deleciones, transposiciones y/o recombinación del genoma (Muñoz y Caballero, 2001), fenómeno que ha quedado demostrado con la caracterización de distintas variantes presentes dentro un mismo aislado (Muñoz y Caballero, 2001; Harrison *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2015), incluyendo el SfMNPV (Escribano *et al.*, 1999; Rowley *et al.*, 2010).

Sin duda, una parte sustancial para poder considerar a los baculovirus como agentes de control, es conocer su actividad biológica y su posible efecto sobre la progenie del huésped. Debido a ello, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar tanto las características fenotípicas del SfMNPV-MER como su efecto sobre el desarrollo, reproducción y progenie de su huésped. En general, las larvas de *S. frugiperda* fueron altamente susceptibles al aislado. La mortalidad inició a partir de las 72 horas post-inoculación como lo describen Tanada y Kaya (1993) y con los síntomas característicos de las larvas infectadas por NPVs: pérdida de apetito y movilidad, cambio en la coloración, fragilidad y ruptura del tegumento (Caballero *et al.*, 2001; Vásquez *et al.*, 2002; Fuxa, 2004 y Williams *et al.*, 2017). La mortalidad se relacionó positivamente con la concentración utilizada y los valores de la CL₅₀ no fue significativamente distinta entre las 192 (9.44 x 10⁵ OBs/ml) y 264 h post-inoculación (5.35 x 10⁵ OBs/ml), lo cual se atribuye a la cercanía de los tiempos analizados.

Los valores de las CL_{50s} del presente estudio tuvieron un patrón de actividad similar con respecto a dos aislados argentinos y uno brasileño del SfMNPV sobre larvas de *S. frugiperda* de cinco días de edad procedentes de Argentina (rango de 4.5 x 10⁵ a 1.5 x 10⁶ OBs/ml) (Yasem de Romero *et al.*, 2009). García-Banderas (2016) obtuvo un rango de valores de las CL_{50s} entre 6.10 x 10³ y 9.01 x 10⁴ OBs/ml para tres aislados del SfMNPV; sin embargo, en este caso las diferencias en la susceptibilidad se atribuyen al segundo estadio *S. frugiperda* utilizado. Las curvas de mortalidad por tiempo de las diferentes concentraciones utilizadas en este estudio (rango de 1.92 x 10³ a 6 x 10⁶ OBs/ml) alcanzaron en su mayoría el pico más alto entre las 120 y 144 hpi. Similarmente, García-Gutiérrez *et al.* (2013) evaluaron la actividad biológica de un aislado del SfMNPV en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* y registraron el mayor pido de muerte (97-100%) a las 120 hpi. Posteriormente, García-Banderas (2016) registró el mayor pico de mortalidad entre las 84 y 96 hpi para larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* inoculadas con el aislado SfMNPV-MER, es decir 24 y 48 h antes que las larvas de tercer instar registradas en el presente estudio, lo cual se atribuye a un cambio de susceptibilidad influenciada por la edad del huésped. Un patrón similar se observó en larvas de segundo estadio de *S. exigua* inoculadas con el SeMNPV, cuya mortalidad se incrementó entre las 80-96 hpi (Zamora-Avilés *et al.* 2016). Es claro que la variación de muerte a través del tiempo puede estar

relacionada con distintos factores como la especie y concentración del virus, edad del huésped y condiciones ambientales, entre otros. No obstante, esto también refleja la expresión genética en los baculovirus, puesto que la *fase muy tardía* se caracteriza por la expresión de genes *polh* y *p10* que codifican para la formación de los OBs en la infección secundaria y su proceso de liberación, respectivamente, lo cual también se relaciona con un incremento en la tasa de muerte del huésped (Simon *et al.*, 2008).

La cantidad de OBs de un aislado de NPV que pueda producir cada individuo infectado es otro factor importante a considerar en la selección de un baculovirus como bioinsecticida (Claus y Sciocco De Cap, 2001; Reid *et al.*, 2014). El número de OBs/larva obtenido en el presente estudio (1.21×10^8 OBs/larva) coincide con los estudios de Ríos-Velasco *et al.* (2012), quienes observaron que las larvas de tercer instar de una colonia de laboratorio se obtuvo una producción de 1.06×10^8 OBs/larva tras la infección con aislado mexicano procedente de Saltillo, Coahuila, México (SfMNPV-AN2). En contraste, estos valores son mayores que el observado en un estudio con larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* procedentes de una colonia colombiana inoculadas con un virus local y el SfMNPV-NIC (7.5 y 6.4×10^7 OBs/larva, respectivamente) (Barrera *et al.*, 2011). En otros estudios se obtuvo una productividad de 52.0×10^6 OBs/larva (Simón *et al.* 2008) y 29.5×10^5 OBs/larva (Barrera *et al.*, 2013) con un aislado nicaragüense (el mismo evaluado en el presente estudio) y uno colombiano, respectivamente. Estas diferencias pueden deberse las distintas edades utilizadas, puesto que se sabe que el peso corporal de los insectos influye fuertemente sobre la productividad del virus (Claus y Sciocco De Cap, 2001).

Es ampliamente conocido que el impacto de los baculovirus sobre la población huésped puede llevarse a cabo mediante la muerte de una misma generación o mediante su transmisión vertical, esto último es referido como el mecanismo que permite que el virus pueda ser transportado para iniciar nuevos focos de infección en generaciones subsecuentes (Kukan, 1999; Fuxa, 2004; Cory y Myers, 2003). Además, los individuos sobrevivientes a una infección viral pueden ser afectados en términos de su desarrollo (Goulson y Cory, 1995; Milks *et al.*, 1998; Cabodevilla *et al.*, 2011) y reproducción (Shapiro y Robertson, 1987; Patil *et al.*, 1989). Este mecanismo ha sido documentado en varias especies de insectos, particularmente en el género *Spodoptera* (Smith y Vlak, 1988; Fuxa y Richter, 1991; Fuxa *et al.*, 1992).

En el presente estudio, el peso corporal de los individuos sobrevivientes (56%) a una concentración 4.8×10^4 OBs/ml no fue significativamente afectado. Así mismo, Murray *et al.* (1991) determinaron que el peso de las pupas de *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Erebidae) de individuos sobrevivientes a dosis subletales de su nucleopoliedrovirus (LdMNPV) no fue significativamente distinto al testigo. En contraste, Myers *et al.* (2000) observaron que un grupo de pupas de *L. dispar* que sobrevivieron a una infección causada por el LdMNPV tuvieron un peso significativamente menor (1.58 g) que las del testigo (1.91 g). Por otro lado, varios autores han observado una mayor proporción de hembras en individuos sobrevivientes a los NPVs (Santiago-Alvarez y Vargas-Osuna, 1988; Scheepens y Wysoki, 1989; Cabodevilla *et al.* 2011). Sin embargo, en el presente estudio la proporción de sexos no fue significativamente afectada. Las diferencias entre estos estudios, incluyendo el nuestro, posiblemente se relacionen con las características de los distintos aislados y su concentración utilizada.

Los adultos de *S. frugiperda* que sobrevivieron a la infección por el SfMNPV-MER tuvieron una longevidad significativamente menor (8.16 ± 1.5 d) comparada con los adultos del testigo (10.7 ± 0.98 d). Así mismo, la fecundidad y fertilidad de los mismos adultos sobrevivientes disminuyó significativamente. De manera similar, Milks *et al.* (1998) y Cabodevilla *et al.* (2011) observaron alteraciones tanto en el desarrollo como en la tasa reproductiva de *S. exigua* y *Trichoplusia ni* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), respectivamente, cuando las larvas se inocularon con sus NPVs homólogos. Cory y Myers (2009) identificaron que después de una epizootia natural en *Malacosoma californicum pluviale* (Dyar) (Lepidoptera: Lasiocampidae) provocada por un NPV, su nivel poblacional descendió posiblemente como resultado de una menor fecundidad de insectos infectados subletalmente. Aunque no se conoce con profundidad por qué los individuos sobrevivientes a los baculovirus disminuyen su tasa reproductiva, esto puede relacionarse con ciertas alteraciones fisiológicas (Vargas-Osuna, 2001) y morfológicas. Al respecto, Santiago-Álvarez y Vargas-Osuna (1988) sugirieron que la reducción en la fertilidad de *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae) tratada con NPV podría deberse a una orientación inadecuada de los espermátóforos.

Por otro lado, la transmisión vertical de un baculovirus puede impactar a largo plazo en la población huésped y, con ello, reducir los niveles de infestación de la plaga (Rothman y Myers 2000). En el presente estudio, aunque la duración del estado huevo y la proporción sexual no fueron afectadas, la descendencia de los sobrevivientes a la infección (F1) tuvo una reducción en el peso de pupas (155 mg) con respecto al testigo (167 mg). Además, 4.3% de las larvas descendientes murieron de una infección típica por NPVs, lo cual está acorde con otros estudios que indican que el SfMNPV es capaz de persistir en su huésped por transmisión vertical (Martínez *et al.*, 2005). Así mismo, Becnel *et al.* (2003) detectaron un bajo nivel de transmisión vertical (~ 5%) del virus CuniNPV en las puestas de huevos de *Culex nigripalpus* Theobald (Diptera: Culicidae) que al parecer se contaminaron con los OBs liberados en el meconio de las hembras adultas. Así mismo, diversas investigaciones que involucran los NPVs del gusano de seda, *Bombyx mori* L. (Khurad *et al.*, 2004), *L. dispar* (Myers *et al.*, 2000), *S. exigua* (Virto *et al.*, 2014, 2017) y el gusano cogollero africano, *Spodoptera exempta* (Walker) (Vilaplana *et al.*, 2010) también observaron poca prevalencia del virus en sus huéspedes.

Las infecciones encubiertas en especies altamente móviles o migratorias proporcionan un mecanismo para la dispersión del virus a grandes distancias (Hostetter y Bell, 1985; Burden *et al.*, 2003; Vilaplana *et al.*, 2008). Sin embargo, en el caso de los baculovirus se sabe muy poco sobre los factores que intervienen en el establecimiento y la persistencia de infecciones subletales (Cabodevilla *et al.*, 2011). Finalmente, desde una perspectiva de control de plagas, los efectos subletales en los sobrevivientes de insectos pueden ser deseables y beneficiar el control de plagas en las siguientes generaciones, ya que los insectos infectados pueden ser más susceptibles a una segunda aplicación de virus, de modo que se pueda lograr un control efectivo de plagas con menor frecuencia de aplicaciones de OBs (Virto *et al.*, 2017).

VIII. CONCLUSIONES

- Los producto de PCR (575 bp) de los tres aislados del SfMNPV tuvieron 99% de identidad con el gen de la poliedrina del SfMNPV (GQ923749, Genbank acc.); el análisis filogenético sugiere que los virus mexicanos (SfMNPV-MER y SfMNPV-CHI) surgieron a partir del virus procedente de Nicaragua (SfMNPV-NIC).
- Las larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* fueron altamente susceptibles al SfMNPV-MER.
- El virus provocó un efecto significativo en los parámetros de desarrollo larvario, reproducción del insecto (fecundidad y fertilidad) y longevidad de los adultos. Sin embargo, no se observaron cambios en el porcentaje de emergencia de adultos y la proporción sexual.
- La duración del estado de huevo no tuvo cambios en la F₁; sin embargo, el 4% de las larvas que eclosionaron murieron a causa de la infección por virus. Aunado a ello, las pupas procedentes de las larvas sobrevivientes a la infección tuvieron un menor peso. Con base a lo anterior, se concluye que el virus puede prevalecer y afectar la aptitud biológica del insecto huésped.

BIBLIOGRAFIA

- Abbott WS. 1925. **A method of computing the effectiveness of an insecticide.** Journal of Economic Entomology 18(2):265-267.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., y Lipman, D.J. 1990. **Basic local alignment search tool.** *J. Mol. Biol.*, vol. 215: 403-410
- Andreadis, T. G. 1987. **Transmission. In: Epizootiology of insect diseases** (J. R. Fuxa and Y. Tanada, eds.), pp. 159-176. Wiley, New York.
- Aragón-Cuevas, F., S. Taba, C. J. Hernández, J. C. Figueroa, A. V. Serrano y G. F. Castro. 2006. **Catálogo de maíces criollos de Oaxaca.** INIFAP-SAGARPA: Libro Técnico Núm. 6. Oaxaca, Oaxaca. 344 pp.
- Aruga, H. 1970. **Induction of infections. In: Insect pathology, an advance treatise** (E. A. Steinhaus, ed.), pp. 499-530. Academic Press, New York.
- Barbehenn, R.V.; y M.M. Martin, 1995. **Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects.** Journal of Insect Physiology 41, 301–311.
- 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.** Biological Control 58: 113-120.
- Barrera, G., T. Williams, L. Villamizar, P. Caballero y O. Simón. 2013. **Deletion genotypes reduce occlusion body potency but increase occlusion body production in a Colombian *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population.** PLoS One 8: e77271.
- Bautista, M. N. 2006. **Insectos plaga. Una guía ilustrada para su identificación.** Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México. México. 113 pp.
- Becnel, J., J. & E. White y S. & S, Alexandra. (2003). ***Culex nigripalpus* nucleopolyhedrovirus (CuniNPV) infections in adult mosquitoes and possible mechanisms for dispersal.** Journal of invertebrate pathology. 83. 181-3. 10.1016/S0022-2011(03)00058-2.

- Benz, B. F. 2001. **Archaeological evidence of teosinte domestication from Guilá Naquitz.** Proceedings of the National Academy of Science 98: 2104-2106.
- Benz, B. F. 2006. **Maize in the Americas.** En: Staller J. E., R. H. Tykot y B. F. Benz (eds.) **Histories of Maize.** Elsevier-Academic Press. EUA. pp. 9-20.
- Berretta, M. F., M. L. Rios y A. Sciocco de Cap. 1998. **Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina.** Journal of Invertebrate Pathology 71: 280-282.
- Blissard, G. W. y G. F. Rohrmann. 1990. **Baculovirus diversity and molecular biology.** Annual Review of Entomology 35: 286-605.
- Bong, C. F. J., y P. P. Sikorowski. 1991. **Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus and bacterial contamination on growth and development of the corn earworm, *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Invertebrate Pathology 57: 406-412.
- Bonning, B.C. 2005. **Baculoviruses: Biology, biochemistry, and molecular biology.** In Comprehensive Molecular Insect Science; Kostas, I., Lawrence, G., Sarjeet, G., Eds.; Elsevier Pergamon: Oxford, UK. pp. 233–270.
- Boots, M., y R. Norman. 2000. **Sublethal infection and the population dynamics of host-microparasite interactions.** J. Anim. Ecol. 69: 517-524.
- Burand, J. P., y E. J. Park. 1992. **Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and pupation of gypsy moth larvae.** Journal of Invertebrate Pathology 60: 171-175.
- Burden, J. P., C. M. Griffiths, J. S. Cory, P. Smith, y S. M. Sait. 2002. **Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the indian meal moth, *Plodia interpunctella*.** Mol. Ecol. 194: 608-615.

- Burden, J. P., C. P. Nixon, A. E. Hudgkinson, R. D. Possee, S. M. Sait, L. A. King, y H. S. Halis. 2003. **Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses.** *Ecol. Lett.* 6: 524-531.
- Caballero, P., M. F. López y T. Williams. 2001. **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** Phytoma. Valencia, España. 518 pp.
- Caballero, P., R. Murillo, D. Muñoz y T. Williams. 2009. **El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: un análisis de avances recientes en España.** *Revista Colombiana de Entomología* 35: 105-115.
- Cabodevilla, O., E. Villar, C. Virto, R. Murillo, T. Williams y P. Caballero. 2011. **Intra- and Intergenerational Persistence of an Insect Nucleopolyhedrovirus: Adverse Effects of Sublethal Disease on Host Development, Reproduction, and Susceptibility to Superinfection.** *Applied and Environmental Microbiology.* 77: 2954–2960.
- Capinera, J. L. 1999. **Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).** University of Florida. USA. <http://edis.ifas.ufl.edu/in255> (Accesada el 15 de Abril de 2018).
- Chandler, L. D. y H. R. Summer. 1991. **Effect of various chemigation methodologies on suppression of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in corn.** *Florida Entomologist* 74: 270-279.
- Chapman, J. W., T. Williams, A. Escribano, P. Caballero y R. D. Cave. 1999. **Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*.** *Ecol. Entomol.* 24: 268-275.
- Chen, X., F. J. W. IJkel, C. Z. de A. P. Dominy Marinho, H. Yoshifumi, F. Ouriel, H. Tohrú, W. Chung-Hsiung, P. Arumagam, M. Sinnakaruppan, P. J. Krell, Z. J. Hu, y

- M. Vlask. 1999. **Identification, sequence analysis and phylogeny of the *lef-2* gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus.** *Virus* 65: 21-32.
- Claus, J. D. y A. Sciocco de Cap. 2001. **Producción masiva de baculovirus.** En: Caballero, P., M. López-Ferber y T. Williams (eds.) **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** Phytoma. Valencia, España. pp. 260-312.
- Clavijo, S. A., A. Fernández-Badillo, A. Ramírez, A. Delgado y J. M. Lathullerie. 1991. **Influencia de la temperatura sobre el desarrollo de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** *Agronomía Tropical* 41 (5-6): 245-256.
- Clavijo, S. y G. Perez-Greiner. 2000. **Protección y Sanidad Vegetal.** En: Fontana-Nieves, H. y C. González-Narváez (eds.) **Insectos plagas del maíz.** Fundación Polar. Caracas, Venezuela. pp. 345-361.
- Cory, J. S., R. S. Hails, y S. M. Sait. 1997. **Baculovirus ecology.** In: **The Baculoviruses** (L. K. Miller, ed.), pp. 301-339. Plenum Press, New York.
- Cory, J., y J. Myers. 2003. **The ecology and evolution of insect baculoviruses.** *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics.* 34: 239–272.
- Cory J. S., Myers J. H. 2009. **Within and between population variation in disease resistance in cyclic populations of western tent caterpillars: a test of the disease defence hypothesis.** *J. Anim. Ecol.* 78 646–655.
- Daimon T., S. Katsuma, W. K. Kang, y T. Shimada. 2007. **Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus.** *Archives Virology* (152): 1655-1664.
- De Moraes, R.R., Maruniak, J.E., 1997. **Detection and identification of multiple baculoviruses using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis.** *J. Virol. Methods* 63, 209 – 217.

- De Oliveira, M.R. 1998. **World Survey: South America**. En: Insect viruses and pest management. (Hunter-Fujita, F.R., P.F. Entwistle, H.F. Evans y N.E. Crook, Eds.) Wiley, Chichester, Reino Unido. P. 239-235.
- Dias-Vasconcelos, S. 2001. **Ecología de los baculovirus**. En: Caballero, P. F. López, F. M. y Williams. T. (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Ed. Phytoma. España. pp. 143-201.
- Duan L., y Otvos I. S. 2001. **Influence of larval age and virus concentration on mortality and sublethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae)**. Environmental Entomology. 30 136–146.
- Ebert D. 2013. **The epidemiology and evolution of symbionts with mixed-mode transmission**. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics. 44 623–643.
- Engelhard, E.K., L.N.W. Kam-Morgan, J.O. Washburn y L.E. Volkamn. 1994. **The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus**. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 91: 3224-3227.
- Escaso, F., J. L. Martinez y R. Planello. 2010. **Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal**. En: Pearson, (Ed) Reproducción y Desarrollo. pp. 256-260.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. D. Cave, J. W. Chapman y P. Caballero. 1999. **Selection of a Nucleopolyhedrovirus for Control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, Genetic, and Biological Comparison of Four Isolates from the Americas**. Journal of Economic Entomology 92 (5): 1079-1085.
- Evans, H. F., y P. F. Entwistle. 1987. **Viral diseases. In: Epizootiology of insect diseases**. (J. R. Fuxa and Y. Tanada eds.), pp. 257-322. John Wiley & Sons, Toronto.

- Federici, B. A. 1986. **Ultrastructure of baculoviruses**. En: Granados, R. R. and B. A. Federici (eds.) **The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology**. Academic Press, San Diego. pp. 61-88.
- Finney, L. 1972. **Probit analysis**. Cambridge University Press, London/New York.
- Fuxa JR. 1982. **Prevalence of viral infections in populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in southeastern Louisiana**. Environmental Entomology 11:239-242.
- Fuxa J. R., y A. R. Richter. 1991. **Selection for an increased rate of vertical transmission of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus**. Environmental Entomology 20: 603-609.
- Fuxa, J. R., H. E. Weidner, y A. R. Richter. 1992. **Polyhedra without virions in a vertically transmitted nuclear polyhedrosis virus**. Journal of Invertebrate Pathology 60: 53-58.
- Fuxa, J.R. 2004. **Ecology of insect nucleopolyhedroviruses**. Agriculture, Ecosystems and Environment 103: 27-43.
- García-Banderas, D. 2016. **Actividad biológica de tres nucleopoliedrovirus sobre distintas poblaciones mexicanas del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)**. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Morelia Michoacán, México. 69 pp.
- García-Gutierrez, C., C.M. Escobedo-Bonilla y M.A. López. 2013. **Infectivity of a Sinaloa Native Isolate of Multicapsid Nuclear Polyhedrosis Virus (SfMNPV) against Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Southwestern Entomologist, 38(4):597-604.
- Gómez, V.J., y L. Villamizar. 2013. **Baculovirus: Hospederos y especificidad**. Revista Colombiana de Biotecnología 13(1): 143-155.

- Gonzalez, M.A., Smith, G.E. y Summers, M.D. 1989. **Insertion of the SfMNPV polyhedrin gene into an AcM-NPV polyhedrin deletion mutant during viral infection.** *Virology* 170, 160~175.
- Goulson, D., y J. S. Cory. 1995. **Sublethal effects of baculovirus in the cabbage moth *Mamestra brassicae*.** *Biological Control* 5: 361-367.
- Hamm, J. J. y J. R. Young. 1971. **Value of virus presilk treatment for corn earworm and fall armyworm control in sweet corn.** *Journal of Economic Entomology* 64: 144-146.
- Harrison, R., B. Puttler y H. Popham. 2008. **Genomic sequence analysis of a fastkilling isolate of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus.** *Journal of General Virology* 89: 775-790.
- Harrison, R. 2009. **Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution.** *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 181 – 186.
- Hayakawa, T., R. Ko, K. Okano, S. Seong, C. Goto y S. Maeda. 1999. **Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome.** *Virology* 262:277-297.
- Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; y Toprak, U. 2009. **New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function.** *Annual Review of Entomology* 54, 285–302.
- Herniou, E., J. Olszewski, D. O'reilly y J. Cory. 2004. **Ancient coevolution of baculoviruses and their insect host.** *Journal of Virology* 78(7): 3244-3251.
- Herniou, E.A., B.M. Arif, J.J. Becnel, G.W. Blissard, B. Bonning, R. Harrison, J.A. Jehle, D.A. Theilmann, y J.M. Vlak. 2012. **Baculoviridae. In Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses;** King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J., Eds. Elsevier Academic Press: San Diego, CA, USA. Pp. 163-173.

- Hewson, I., M. J. Brown, A. S. Gitlin, y D. F. Doud. 2011. **Nucleopolyhedrovirus detection and distribution in terrestrial, freshwater, and marine habitats of appledore island, gulf of maine.** *Microbiology Ecology* (62): 48–57.
- Hitchman, R., Hodgson, D., King, L., Hails, R., Cory, J., y Possee, R. 2007. **Host mediated selection of pathogen genotypes as a mechanism for the maintenance of baculovirus diversity in the field.** *Journal of Invertebrate Pathology*. 94 : 153 – 162.
- Hodgson, D. J., A. J. Vanbergen, A. D. Watt, R. S. Hails y J. S. Cory. 2001. **Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a Lepidopteran baculovirus.** *Evolutionary Ecology* 3: 687-701.
- Hostetter, D.L. y M.R. Bell. 1985. **Natural dispersal of baculoviruses in the environment**, p. 249-284. En: K. Maramorosch y K.E. Sherman (ed.), *Viral insecticides for biological control*. Academic Press Inc., Orlando.
- Hughes, P. R. y H. A. Wood. 1981. **A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses.** *Journal of Invertebrate Pathology* 37 (2): 154-159.
- Hughes, D. S., R. D. Possee, y L. A. King. 1993. **Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassicae* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassicae* insects.** *Virology*. 194: 608-615.
- Hughes, D. S., R. D. Possee, y L. A. King. 1997. **Evidence for the presence of a low-level, persistent baculovirus infection of *Mamestra brassicae* insects.** *Journal of General Virology*. 197: 1801-1805.
- Ibarra, J., y Del Rincón, M. 1998. **Virus entomopatógenos.** En: *Curso Nacional de Control Biológico*. Río Bravo, Tamaulipas, México: Sociedad Mexicana de Control Biológico. P.90-103.
- Jacques, R. P. 1985. **Stability of insect viruses in the environment.** En: Maramorosch K. and K. E. Sherman (eds.) **Viral insecticides for biological control**. Academic Press. Nueva York. pp. 285-360.

- Jaramillo-Albuja, J.G., B.V. Peña, J.H. Hernández, R. Díaz y A. Espinosa. 2018. **Caracterización de productores de maíz temporal en Tierra Blanca, Veracruz.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 9 número 5.
- 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.** Archives of Virology 151: 1257-1266.
- Jehle, J.A., M. Lange, H. Wang, Z. Hu, Y. Wang, y R. Hauschild. 2006. **Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera.** Virology 346: 180-193.
- Kolodny-Hirsch DM, van Beek NAM. 1997. **Selection of a morphological variant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with increased virulence following serial passage in *Plutella xylostella*.** Journal of Invertebrate Pathology 69: 205–211.
- Kukan, B. 1999. **Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects.** Journal of Invertebrate Pathology. 74: 103-111.
- Khurad A. M., Mahulikar A., Rathod M. K., Rai M. M., Kanginakudru S., Nagaraju J. 2004. **Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L.** Journal of Invertebrate Pathology 87 8–15.
- Lange, M., Wang, H., Zhihong, H., y Jehle, J. 2004. **Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran specific baculoviruses.** Virology. 325: 36-47.
- LeOra Software.1987. **POLO-PC a user's guide to probit or logit analysis.** Berkeley, California.
- Llanderal, C. C. 2000. **Introducción a la fisiología de insectos.** Publicaciones. México. Pp.190.

- Martínez, A. M., T. Williams, M. López-Ferber y P. Caballero. 2005. **Optical brighteners do not influence covert baculovirus infection of *Spodoptera frugiperda***. Applied and Environmental Microbiology. 71: 1668-1670.
- Matthews, H. J., I. Smith, y J. P. Edwards. 2002. **Lethal and sublethal effects of a granulovirus on the tomato moth *Lacanobia oleracea***. Journal of Invertebrate Pathology 80: 73-80.
- Melamed-Madjar, V., y B. Raccach. 1979. **The transstadial and vertical transmission of a granulosis virus from the corn borer *Sesamia nonagroides***. Journal of Invertebrate Pathology 33: 259-264.
- Milks M. L., Burnstyn I., y Myers J. H. 1998. **Influence of larval age on the lethal and sublethal effects of the nucleopolyhedrovirus of *Trichoplusia ni* in the cabbage looper**. Biological Control 12 119–126. 10.1006/bcon.1998.0616
- Miranda, A. M., F. P. Guevara y R. B. García. 2002. **Circadian locomotor activity in the larva and adult fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae): effect of feeding with the resistant variety of maize CML67**. Biological Rhythm Research 33: 475-486.
- Monobrullah M., y Shankar U. 2008. **Sub-lethal effects of SpltMNPV infection on developmental stages of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Biocontrol Sci. Technol. 18 431–437.
- Moscardi, F. 1999. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera**. Annual Review of Entomology 44: 257-289.
- Mullock, B.S., S.S. Swezey, C. Narvaez, P. Castillo y C.M. Rizo. 1990. **Development of baculoviruses as a contribution to biological control of lepidopterous pests of basic grains in Nicaragua**. Proc. XXIII Int. Conf. Soc. Invertebr. Pathol. Adelaide, Australia, 20-24 de agosto.

- Muñoz, D. y P. Caballero. 2001. **Diversidad natural de los baculovirus**. En: Caballero, P., M. López-Ferber y T. Williams (eds.) **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas**. Phytoma. Valencia, España. pp. 107.
- Murillo, A. 1991. **Distribución, importancia y manejo del complejo *Spodoptera* en Colombia**. In **Memorias Seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos**. Zuluaga, J. L. Muñoz, G. (comp., ed.) Calí, Colombia 96p. Pag. 15-23.
- Murillo, R., S. Elvira, D. Muñoz, T. Williams, and P. Caballero, P., 2006. **Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain**. *Biological Control*. 38: 157–165.
- Murillo, R., D. Muñoz., C. Ruíz-Portero, M. D. Alcázar, J. E. Belda, T. Williams y P. Caballero. 2007. **Abundance and genetic structure of nucleopolyhedrovirus populations in greenhouse substrate reservoirs**. *Biological Control*. 42: 216-225.
- Murray K. D., Shields K. S., Burand J. P., y Elkinton J. S. 1991. **The effect of gypsy moth metamorphosis on the development of nuclear polyhedrosis virus infection**. *Journal of Invertebrate Pathology*. 57 352–361.
- Murúa, G., V. Defagó y E. Virla. 2003. **Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides**. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas* 29: 43-51.
- Murúa, M. G. y E. Virla. 2004. **Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucumán (Argentina)**. A laboratory study. *Acta Zoologica Mexicana* 1: 199-210.

- Murúa, M. G., J. Molina-Ochoa y C. Coviella. 2006. **Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in Northwestern Argentina.** Florida Entomologist 89: 175-182.
- Murúa, M. G., M. T. Vera, S. Abraham, M. L. Juárez, S. Prieto, G. P. Head y E. Willink. 2008. **Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina.** Annals of the Entomological Society of America 101: 639-649.
- Murúa, M. G., M. L. Juárez, S. Prieto y E. Willink. 2009. **Distribución temporal y espacial de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en diferentes hospederos en provincias del norte de Argentina.** Revista Industrial y Agrícola de Tucumán 86: 25-36.
- Myers, J. H., R. Malakar, y J. S. Cory. 2000. **Sublethal nucleopolyhedrosis infection effects on female pupal weight, egg mass size, and vertical transmission in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae).** Environmental Entomology. 29: 1268-1272.
- Okano K, Vanarsdall AL, Mikhailov VS, Rohrmann GF. 2006. **Conserved molecular systems of the Baculoviridae.** Virology 344,77–87.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). 2003. **Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize).** Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology. No. 27.
- O'Reilly, D. R., y L. K. Miller. 1989. **A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase.** Science 245: 1110-1112.

- Pacheco, M. F. 1994. **Plagas de los cultivos oleaginosos en México**. Centro de Investigación Regional del Noroeste. INIFAP. Cd. Obregón, Sonora, México. 600 pp.
- Patil U. R., C. J. Savanurmath, S. B. Mathad, P. I. Aralaguppi, y S. S. Ingahalli. 1989. **Effects of nuclear polyhedrosis virus on the growth, development and reproduction in the surviving generations of the armyworm *Mythimna (Pseudaletia) separata* (Walker)**. J. Appl. Entomol. 108: 527-532.
- Poitout S. y R. Bues. 1974. **Elevage de chenilles de vingt-huit especes de lepidopteres. Noctuidae et de deux especes d' elevage selon les especes d' Artiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l' elevage selon les especes**. Annales de Zoologie Ecologie Animale 6: 341-411.
- Possee, R. D., C. M. Griffiths, R. B. Hichman, A. Chambers, F. Murguia-Meca, J. Danquah, A. Jeshtadi y A. King. 2010. **Baculoviruses: biology, replication, and exploitation**. En: Asgari, S. y K. Johnson (eds.), Insect virology, pp. 35-57. Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido.
- Rangel-Núñez, J. C., M. F. Vázquez-Ramírez y M. C. Del Rincón-Castro. 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)**. Folia Entomologica Mexicana 39: 320-326.
- Reid, S., L. Chan y M. Van Oers. 2014. **Production of Entomopathogenic Viruses**. En: Morales Ramos-Ramos, J., G. Rojas and D. I. Shapiro (eds.) **Mass Production of Beneficial Organisms**. Elsevier. USA. pp. 442-444.
- Rios-Velasco, C., M. G. Gallegos, M. C. Del Rincón, C. E. Cerna, P. S. Sánchez y S. M. Cepeda. 2011. **Insecticidal activity of native isolates of *Spodoptera***

***frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus from soil samples in Mexico.**
Florida Entomologist 94: 716-718.

Rios-Velasco, C., D. I. Berlanga-Reyes, G. Gallegos-Morales y M. C. Del Rincón-Castro.
2012. **Characterization of baculovirus isolates obtained from soil by restriction
fragment patterns.** African Journal of Microbiology Research 6: 4546-4549.

Rios-Velasco, C., G. Gallegos-Morales, D. Berlanga-Reyes, J. Cambero-Campos y A.
Romo-Chacón. 2012. **Mortality and production of occlusion bodies in
Spodoptera frugiperda larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with
nucleopolyhedrovirus.** Florida Entomologist 95:752-757.

Rodríguez, M. y C. De León. 2008. **El cultivo del maíz. Temas selectos.** 1ª ed. Colegio de
Posgraduados - Mundi-Prensa. México. 152 pp.

Rohrmann GF, Pearson MN, Bailey TJ, Becker RR, Beaudreau GS. 1981. **N-Terminal
polyhedrin sequences and occluded baculovirus evolution.** Journal of Molecular
Evolution 17,329–333.

Rohrmann GF. 1992. **Baculovirus structural proteins.** Journal of General Virology
73,749–761.

Rohrmann, G. 2008. **Baculoviruses as insecticides: Three examples. An NPV of the
velvet bean Caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*: Application in Brazil.** En:
Baculovirus Molecular Biology.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>. (Accesada el 22 de
Julio de 2017).

Rohrmann, G.F. 2013. **Baculovirus Molecular Biology: Third Edition.** Bethesda (MD):
National Center for Biotechnology Information (US). Available online:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/> (Accesada el 22 de Julio de 2017).

Romanowski, V., y D. P. Ghirnhelli. 2001. **Biología molecular de los baculovirus (replicación y regulación de la expresión genética)**. En: Caballero, P. F. López, F. M. y Williams. T. (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Ed. Phytoma. España. pp. 119-142.

Rothman, L. D., y J. M. Myers. 1996. **Debilitating effects of viral diseases on host Lepidoptera**. Journal of Invertebrate Pathology 67: 1-10.

Rothman, L. D., y J. H. Myers. 2000. **Ecology of insect viruses**. In: J. Hurst (ed.), Viral ecology. Academic Press, New York, NY. pp. 385-412.

Rowley, L. D., R. R. Farrar, B. M. Blackburn, y L. R. Harrison. 2010. **Genetic and biological variation among nucleopolyhedrovirus isolates from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Virus Genes (40):458-468.

SARGARPA. 2017. **Fortalece México autosuficiencia en la producción de maíz blanco**
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/Paginas/BNSAGENE322017.aspx#> (consultado 12 de mayo de 2018).

Sanger, F., y Coulson, A.R. 1975. **A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase**. J. Mol. Biol. 94, 441-448.

Sannino, L., A. Balbiani and B. Espinosa. 1987. **Osservazioni morfobiologiche su alcune specie del genere *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) e rapporti di parasitismo con la coltura del tabacco in Italia**. Informatore fitopatológico 11: 29-40.

Santiago-Alvarez, C., y E. Vargas-Osuna. 1988. **Reduction in the reproductive capacity of *Spodoptera littoralis* males by nuclear polyhedrosis virus (NPV)**. Journal of Invertebrate Pathology 52: 142-146.

- Scheepens, M.H.M. & Wysoki, M. 1989. **Pathogenicity of AcMNPV for larvae of *Boarmia selenaria*, *Heliothis armigera*, *Heliothis peltigera*, *Spodoptera littoralis*, and *Ephestia cautella*.** Journal of Invertebrate Pathology. 53. 183-189.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (SAGARPA). 2016. **Maíz blanco y amarillo, alimentación e industria** <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/maiz-blanco-y-amarillo-alimentacion-e-industria> (Accesada el 23 de Abril de 2018).
- Serrano A., P. G. Pijlman, M. J. Vlak, D. Muñoz, y T. Williams. 2015. **Identification of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus genes involved in pathogenicity and virulence.** Journal of Invertebrate Pathology 126: 43–50.
- Shapiro, M., y J. L. Robertson. 1987. **Yield and activity of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus recovered from survivors of viral challenge.** Journal of Economic Entomology. 80: 901-905.
- Shapiro-Ilan D. I., Fuxa J. R., Lacey L. A., Onstad D. W., y Kaya H. K. 2005. **Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology.** Journal of Invertebrate Pathology 88 1–7.
- Simon, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M., y Caballero, P. 2004. **Virus entry or the primary infection cycle are not the principal determinants of host specificity of *Spodoptera spp.* nucleopolyhedroviruses.** Journal of General Virology. 85 : 2845-2855.
- Simon, O., Gutierrez, S., Williams, T., Caballero, P., y López-Ferber, M. 2005. **Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *pif* gene of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV).** Virus Research.108 : 213 220.

- Simon, O., Williams, T., Lopez-Ferber, M., y Caballero, P. 2005. **Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population.** Applied and Environment Microbiology. 71 : 4254-4262.
- Simón, O., T. Williams, M. López-Ferber, J. M. Taulemesse and P. Caballero. 2008. **Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus.** Biological Control 44: 321-330.
- Simón, O., L. Palma, I. Beperet, D. Muñoz, M. López-Ferber, P. Caballero y T. Williams. 2011. **Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates: detecting positively selected genes.** Journal of Invertebrate Pathology 107: 33-42.
- Smith, P. H., y J. M. Vlak. 1988. **Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae.** Journal of Invertebrate Pathology 51: 107-114.
- Sood P., Mehta P. K., Bhandari K., y Prabhakar C. S. 2010. **Transmission and effect of sublethal infection of granulosis virus (PbGV) on *Pieris brassicae* Linn. (Pieridae: Lepidoptera).** J. Appl. Entomol. 134 774–780.
- Su, J., O. Lung, y G. W. Blissard. 2011. **The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus *lef-5* gene is required for productive infection.** Virology (416): 54-64.
- Summers, M. D. y D. L. Anderson. 1973. **Characterization of nuclear polyhedrosis virus DNAs.** Journal of Virology 12: 1336-1346.
- Tanada, Y. y R. T. Hess. 1991. **Baculoviridae. Granulosis viruses.** En: Adams, J. R. and J. R. Bonami (eds.) Atlas of invertebrate viruses. Academic Press, San Diego. pp. 227-257.

- Tanada, Y. y H.K. Kaya.1992. **Insect Pathology**. San Diego, USA: Academic Press Inc.
<https://doi.org/10.1017/S0007485300039869>
- 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.
- Tinoco, R., y Halperin, D. 1998. **Poverty, production and health: Inhibition of erythrocyte cholinesterase through occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico**. *Arch. Environ. Health* 53, 29–35.
- Valicente, F. y E. Da Costa. 1995. **Controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), com o baculovirus *Spodoptera* aplicado via água de irrigação**. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 24: 61-67.
- Valverde, L., Z. A. De Toledo y S. Popich. 1995. **Ciclo biológico de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Acta Zool. Lilloana*. 43(1): 131-143.
- Vargas.Osuna, E. 2001. Efectos de dosis subletales. En: Caballero, P., M. López-Ferber y T. Williams (eds.) **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas**. Phytoma. Valencia, España. pp. 373-387.
- Vásquez, J., J. L. Zeddám y A. A. Tresierra. 2002. **Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) con el Baculovirus SfVPN, en Iquitos Perú**. *Folia Amazoniaca* 13: 25-39.
- Vilaplana L., Redman E., Wilson K., y Cory J. S. 2008. **Density-related variation in vertical transmission of a virus in the African armyworm**. *Oecologia* 155 237–246.

- Vilaplana L., Wilson K., Redman E., Cory J. 2010. **Pathogen persistence in migratory insects: high levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm.** *Evol. Ecol.* 24 147–160.
- Villamizar, L., Guevara, J., Espinel, C., Gómez, J., Cuartas, P., Barrera, G., Cruz, M., Santos, A., Uribe, L., Ruiz, C., Castro, O., López-Ferver, M., Valicente, F., Caballero, P., Simón, O., López Ávila, A., Martínez, F., y Cotes, A.M. 2012. **Desarrollo de un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*.** Bogotá: Corpoica. 100p.
- Virto C., Zarate C. A., Lopez-Ferber M., Murillo R., Caballero P., y Williams T. 2013. **Gender-mediated differences in vertical transmission of a nucleopolyhedrovirus.** PLoS ONE 8:e70932 10.1371/journal.pone.0070932.
- Virto, C., Navarro, D., Tellez, M.M., Herrero, S., Williams, T., Murillo, R., & Caballero, P. 2014. **Natural populations of *Spodoptera exigua* are infected by multiple viruses that are transmitted to their offspring.** *Journal of Invertebrate Pathology* 122, 22–27.
- Virto C., Williams T., Navarro D., Tellez M. M., Murillo R., Caballero P. 2017. **Can mixtures of horizontally and vertically transmitted nucleopolyhedrovirus genotypes be effective for biological control of *Spodoptera exigua*?** *J. Pest Sci.* 90 331–343. 10.1007/s10340-016-0743-x.
- Wang, P.; y Granados, R.R. 1997. **An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer.** *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 94, 6977–6982.
- Williams, T., D. Goulson, P. Caballero, J. Cisneros, A. M. Martínez, J. W. Chapman, D. X. Roman y R. D. Cave. 1999. **Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small scale maize growers in Latin America.** *Biological Control* 14: 67-75.

- Williams T., Virto C., Murillo R., y Caballero P. 2017. **Covert infection of insects by baculoviruses**. *Front. Microbiol.* 8:1337.
- World Agricultural Production , USDA. 2018. Production.
<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf> (consultado 12 de mayo de 2018).
- Wyckhuys, G. A. K., K. Lu, H. Morales, L. L. Vazquez, C. J. Legaspi, A. P. Eliopoulos, y M. L. Hernandez. 2013. **Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world**. *Biological Control* 65(1): 152-167.
- Yasem de Romero, M. G., E. Romero, D. Sosa Gómez y E. Willink. 2009. **Evaluación de aislamientos de baculovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lep: Noctuidae), plaga clave del maíz en el noroeste argentino**. *Revista Industrial Agrícola de Tucumán* 86: 7-15.
- Zamora-Avilés, N., P. Caballero, R. Murillo, R. Lasa, S. Pineda, J. I. Figueroa, A. Bravo, O. Díaz, J. L. Corrales, y A. M. Martínez. 2016. **Genetic and biological characterization of four nucleopolyhedrovirus for the Control of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Journal of Economic Entomology* 110(4):1465-1475.