



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
*Cuna de héroes, crisol de pensadores*

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO

Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales



---

**El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioinsecticida para control de este insecto: un análisis genético, biológico y de producción masiva.**

**Tesis que para obtener el grado de:**

Doctora en Ciencias Agrícolas, Forestales y Ambientales

PRESENTA:

**NORMA ZAMORA AVILÉS**

Directora de tesis:

**DRA. ANA MABEL MARTÍNEZ CASTILLO**

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Codirector de tesis:

**RODRIGO LASA COVARRUBIAS**

Instituto de Ecología A.C.

Morelia, Michoacán, México. Septiembre de 2017.

## *Dedicatoria*

*A Abelardo y Alicia quienes fueron la tinta y el  
papel de esta tesis que ha de aportar un grano de  
arena a tan vasto mundo científico...*

*"a mis héroes, mis padres".*

## AGRADECIMIENTOS

---

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para mi desarrollo doctoral y la estancia de investigación.

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por las facilidades otorgadas para la realización de la tesis.

Al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI) por brindar parte del apoyo para mi estancia internacional de investigación.

Un especial agradecimiento a la Dra. Mabel por instruirme desde que inicié mi interés por esta área, sin duda los profesores que te atraen a áreas tan necesarias dentro de la Biología es lo que hace falta en todas las instituciones, y estoy completamente agradecida por el ejemplo de profesionalismo, constancia y dedicación que me ha brindado y con los cuales hoy parto feliz.

Al Dr. Rodrigo Lasa por la seriedad, constancia y profesionalismo con la que compartió la enseñanza a lo largo de mi proyecto de tesis.

A mis sinodales el Dr. Alejandro Bravo, Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa y Dr. Samuel Pineda Guillermo por enriquecer enormemente este trabajo de investigación científica con sus ideas y conocimientos.

Al Dr. Primitivo Caballero y Dra. Rosa Murillo, por permitirme realizar la caracterización molecular y parte de la biológica de los aislados colectados en México en el Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Gobierno de Navarra y por su valiosa asesoría durante mi estadía.

Al Dr. Trevor Williams y Gabriel Mercado por poner a tu entera disposición su laboratorio, su material de trabajo y reponer en varias ocasiones la población de *S. exigua*. Especialmente, al Dr. Trevor por aportar valiosas contribuciones en los artículos redactados en este proyecto.

Al Dr. Rafael Salgado por apoyarnos en la realización de experimentos en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Michoacán, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Benjamín Gómez por compartir sus conocimientos y aportar en la realización de análisis estadísticos en el proyecto, y que con su frase “estás haciendo todo perfectamente mal”, me motivó a hacerlo bien.

A los profesores José Luis Abrego Aranda y Martín Megía de los cuales no olvido esas sabias palabras que me impulsaron y me dieron aliento para seguir en este hermoso mundo de la ciencia.

A Víctor mi esposo amado por reiterarme incansablemente que la vida cobra significado cuando te sientes motivado, así creas metas y las persigues de forma imparable y estas metas a su lado el día de hoy, las he cumplido.

A mis hermanos Elsa, Beatriz, Manuel, Miguel, Gabriela y cuñados; Everardo, Martha, Lorena y Chris que me apoyaron en todos aspectos los cuales me enseñaron que, a diferencia de muchas otras cosas, la esperanza puede recuperarse y que motivarán cada vez que me caía en este largo proceso del saber.

A mis sobrinos que con sólo una sonrisa hacen que todo en la vida valga la pena y hacen que siga siendo una niña a su lado.

A mis amigas Araceli, Marilu, Joh, Yali, Sandy e Itzu y amigos Gerardo, Val, Omar, Aaron, Miguel, Archi y primos que me enseñaron a no seguir buscando respuestas a algo que es tan simple, “vivir”.

A mis compañeros y amigos de laboratorio de Entomología Agrícola, Alicia, Eder, Diana Vely, Manuel, Jesus, Sinue y Dalia, con quienes compartí largos días de trabajo y de quienes recibí apoyo cuando lo solicité.

*“El amor por todas las criaturas vivientes es el más noble atributo del hombre”.*

*Charles Darwin*

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS .....	i
Figuras.....	i
Cuadros .....	ii
I. RESUMEN GENERAL .....	1
II. GENERAL ABSTRAC.....	4
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	7
CAPÍTULO I.....	12
ANTECEDENTES GENERALES .....	12
Los baculovirus .....	12
Generalidades y clasificación taxonómica .....	12
Estructura de los baculovirus: nucleocápsidas, viriones y OBs .....	14
Ciclo de infección y sintomatología.....	17
Expresión y estructura genética de los baculovirus.....	19
Expresión genética de los NPV .....	20
Regiones homólogas “ <i>hr</i> ” .....	21
Regiones V0.....	22
Genoma del SeMNPV .....	23
Aspectos ecológicos de los baculovirus .....	24
Transmisión horizontal y vertical.....	25
Producción masiva de los baculovirus .....	26
Factores que afectan la producción <i>in vivo</i> de los BVs.....	28
Insecto hospedero.....	28
Inoculo viral y dosis .....	29
Condiciones ambientales.....	30
Dieta semisintética .....	31
Contenedores.....	33
Formulación de los baculovirus y su almacenaje.....	34
Formulaciones sólidas .....	34
Formulaciones líquidas .....	35
Almacenamiento de las formulaciones.....	36
Factores que afectan el almacenamiento .....	36

Referencias .....	38
IV. HIPÓTESIS .....	53
V. OBJETIVOS .....	54
V.I. Generales.....	54
V.II. Particulares .....	54
VI. RESULTADOS.....	55
CAPÍTULO II .....	56
Genetic and biological characterization of four nucleopolyhedrovirus collected in Mexico for the control of <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) .....	56
Abstract .....	57
Introduction .....	58
Materials and Methods .....	61
Insect rearing.....	61
Viruses isolates and amplification.....	61
Viral DNA purification and restriction endonuclease analysis (REN) .....	62
PCR and RFLP analysis of virus DNA .....	62
Determination of dose–mortality and dose–time .....	63
Determination of OB yield.....	64
Results .....	66
REN analysis of DNA genomic of the seven isolates .....	66
Determination of dose–mortality and dose–time .....	69
Production of OBs.....	72
Discussion .....	75
References .....	80
CAPÍTULO III .....	88
Cool textured diets for use in baculovirus production .....	88
Abstract .....	88
Introduction .....	90
Material and methods.....	92
Insect rearing, semi-synthetic diets and baculovirus.....	92
Ingestion of cool texturing diets.....	92
Fagostimulant and attractive color to improve ingestion .....	94

Reduction of salts to improve ingestion .....	94
Optimal concentration of OBs for SeMNPV production .....	94
Semi-massive production of SeMNPV in both diets.....	95
Statistical analyses.....	96
Results .....	97
Ingestion of cool texturing diets.....	97
Fagostimulant and attractive color to improve ingestion .....	97
Reduction of salts to improve ingestion .....	97
Optimal concentration of OBs for SeMNPV production .....	98
Medium scale production of SeMNPV .....	99
Discussion .....	101
Acknowledgements .....	104
References Cited .....	105
CAPÍTULO IV .....	109
Uso de un antioxidante en un formulado de baculovirus: evaluación bajo dos condiciones de almacenamiento.....	109
Resumen.....	109
Abstract .....	111
Introducción .....	113
Materiales y métodos .....	115
Multiplicación y purificación del virus .....	115
Selección de los compuestos antioxidantes.....	115
Técnica ABTS .....	116
Efecto del ácido gálico en la estabilidad del formulado.....	117
Actividad biológica .....	117
Análisis de ADN .....	118
Análisis microbiano.....	118
Análisis estadístico.....	118
Evaluación de los compuestos antioxidantes .....	120
Determinación de la CAO de los formulados del SeMNPV .....	121
Actividad biológica .....	122
Integridad del ADN viral de los formulados y presencia bacterias .....	124



Discusión.....	125
Referencias.....	129
CAPÍTULO V .....	135
El gusano soldado, <i>Spodoptera exigua</i> (Hübner): una revisión de su importancia agrícola y manejo en México.....	135
Resumen.....	135
Abstract .....	136
Introducción .....	137
Distribución.....	138
Biología y Ecología.....	141
Control de <i>S. exigua</i> .....	147
Insecticidas convencionales. ....	149
Reguladores de crecimiento de los insectos y spinosad. ....	149
Diamidas antranílicas. ....	151
Feromonas. ....	152
Entomopatógenos.....	153
Entomófagos. ....	155
Otros sistemas de control. ....	156
Conclusiones y Perspectivas .....	158
Agradecimientos .....	160
Referencias.....	161
VII.  DISCUSIÓN GENERAL.....	175
Referencias.....	181
VIII.  CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	187

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

### Figuras

Figura 1. Clasificación actual de la familia Baculovirus (Jehle <i>et al.</i> , 2006).....	14
Figura 2. Ciclo típico de la replicación de los baculovirus (figura adaptada de Clim y Pasarelli, 2013; Caballero <i>et al.</i> , 2009). (A) Esquematación de las células epiteliales infectadas por los OBs. Ingestión de hojas inoculadas con OBs, por larvas. Dentro de los OBs se encuentran los ODVs y Bvs y (B) Los cuerpos de inclusión (OBs) ingeridos se solubilizan en el mesenterón de la larva liberando los viriones derivados de la inclusión (ODVs) (1). La membrana del virión se fusiona con la membrana de la célula epitelial (2) y las nucleocápsidas (NC) desnudas atraviesan el citoplasma (3) y se dirigen al núcleo donde se produce una primera replicación del ADN viral (5). Alternativamente, algunas nucleocápsidas atraviesan el citoplasma (4) y, sin pasar por el núcleo, se dirigen a la zona basal. (C) Las nucleocápsidas atraviesan la membrana celular formando los viriones brotados (Bvs) (6) y pasan a la cavidad hemocélica a través de las traqueolas (T) evitando la membrana basal (MB). En el hemocele, los Bvs llevan a cabo la segunda fase del proceso infeccioso, infectando las células de los órganos y tejidos por endocitosis (7). Las NC forman nuevamente BVs favoreciendo la dispersión de la infección (8). Alternativamente forman viriones y OBs completos (9), en una fase más avanzada del proceso infeccioso, que se acumulan en la célula y finalmente producen su lisis liberando los OBs al medio.....	18
Figura 3. Sintomatología de infección de larvas <i>S. exigua</i> previa a la muerte (A) y muerta (B) por la acción de su nucleopoliedrovirus. ....	19
<b>Figura 4.</b> Localización de regiones variables (V01-V05). Barras verdes indican a las regiones homólogas ( <i>hr1- hr6</i> ) y los números en el centro denotan la posición nucleotídica en genoma en kpb (kilo-pares de bases) del genoma del SeMNPV. Imagen modificada de Murillo <i>et al.</i> (2006). ....	23
<b>Figura 5.</b> Mapa circular del ADN de SeMNPV mostrando la organización genómica. ....	24
Figura 6. Efectos de factores ambientales y de recipientes para el sistema de replicación masiva de NPVs. Datos tomados de: Shapiro, (1986), Jacques, (1977), Kelly y Entwistle, (1998), Sosa-Gómez y Moscardi, (1996), Camacho et al. (2013).....	31
Fig. 7. REN profiles with BglIII of DNA from seven isolates. A) SeSP2, SeUS2, SeSIN8, SeSLP6 and SeSLP8; B) SeSIN6; C) SeUS1. Positions of size markers (in kb) are indicated to the right of each image (M). Lettered fragments are RFLP diagnostic fragments for the genotypes (d-f). Asterisks represent submolar fragments visible in the profiles.....	66
Fig. 8. PCR-RFLP profiles of DNA of seven SeMNPV isolates: SeSP2, SeUS1, SeUS2, SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, and SeSLP8, electrophoresed in a 1% agarose gel. ....	68
Fig. 9. Mortality over time following inoculation in second instars Se-Mex (A) and Se-Swiss (B) insect colonies, and in fourth instar Se-Mex insect colony (C) with Mexican isolates (SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, SeSLP8) and the reference SeMNPV isolates (SeSP2, SeUS1, SeUS2).....	73
Fig. 10. Mean OBs production ( $\pm$ SE) obtained per container after larval inoculation with two different virus-contaminated diets. Columns headed by identical letters were not significantly different ( <i>t</i> -test, $P > 0.05$ ). ....	100

Figura 11. Capacidad antioxidante del ácido gálico a diferentes concentraciones a los 0, 8, 60 y 94 días. ....	121
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA genómico de OBs del SeMNPV después de 0, 4, 5 y 12 meses de almacenamiento a 25 o -20°C. SeMNPV solo (líneas 1) y SeMNPV+ ácido gálico (línea 2). Marcador molecular de 1 kb (M). ....	124
Figura 13. Ciclo de vida de <i>S. exigua</i> . A) adulto, b) masa de huevos cubiertos con escamas, c) huevo, d) larvas neonatas, e) mancha pleural en larva de quinto estadio, f) larva de quinto estadio, g) pre pupa, h) pupa de macho e i) pupa de hembra. ....	144

## Cuadros

Cuadro 1. Ventajas y desventajas de producción <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de los baculovirus. ....	28
Table 2. PCR primers sequences, predicted amplicon size, annealing (Ta) and elongation (Te) temperatures for amplification of SeMNPV genome regions V01, V04, and V05 in the reference SeUS1 genome. ....	53
Table 3. Amplicon sizes from the five SeMNPV variable regions (V01, V04, and V05) and haplotypes resulting upon amplicon digestion with the enzymes BglII, EcoRV, HaeIII and SalI (S1). ....	69
Table 4. Probit regression lines of virus induced mortality in second instar <i>S. exigua</i> larvae inoculated with seven SeMNPV isolates. Isolates were compared with the reference isolate (SeSP2) originated from virus-killed larvae in Spain. ....	70
Tabla 5. Mean time to death (MTD) values of SeMNPV isolates in <i>S. exigua</i> second and fourth instar from two different laboratory colonies originating from Mexico (Se-Mex) and Swiss (Se-Swiss). ....	71
Table 6. Mean larval weight recorded when infected (initial weight) and prior to death, mean occlusion bodies (OB) yield per larva and OBs per mg of larva (considering the weight prior to death) in fourth instar <i>S. exigua</i> larvae inoculated with SeMNPV isolates. ....	74
Table 7. Concentrations and prices of components of both semi-synthetic diets used on experiments. ....	93
Table 8. Initial body weight of recently molted fourth instar <i>S. exigua</i> and final weight after feeding during 24 h in different semi-synthetic diets. ....	98
Table 9. Means ( $\pm$ SE) of OB production and total larval weight of larvae collected from containers inoculated with a standard agar diet and a cool texturing diet with soya fiber that were inoculated with different OBs concentrations. ....	99
Cuadro 10. Porcentajes de capacidad antioxidante (CAO) de diferentes compuestos evaluados mediante la técnica ABTS. ....	120

Cuadro 11. Medias de mínimos cuadrados de los porcentajes de la capacidad antioxidante del ácido gálico, SeMNPV o la combinación SeMPNP + Ácido gálico por efecto triple: tratamiento, condición y tiempo..... 122

Cuadro 12. Medias de mínimos cuadrados de porcentajes de mortalidad larvaria de *S. exigua* por efecto triple: tratamiento, condición y tiempo en larvas de segundo estadio inoculadas con una DL90 (144.2 OBs/larva). ..... 123

Cuadro 13. Principales cultivos atacados por *S. exigua* en diferentes estados de México..... 139

Cruadro 14. Tiempo de desarrollo de diferentes estadios de *S. exigua* criada en dieta semisintética y diferentes plantas hospederas..... 145

## I. RESUMEN GENERAL

---

Los baculovirus (BVs) son virus patógenos de insectos, que actualmente son utilizados a nivel mundial como bioinsecticidas para el control de diferentes plagas de importancia agrícola. El nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV, por sus siglas en inglés) es un virus que posee una alta especificidad, patogenicidad y virulencia. Debido a ello, es considerado como una prometedora alternativa para el control de su hospedero, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), una de las plagas más importantes de hortalizas a nivel mundial. Es ampliamente conocido que la composición genotípica y propiedades insecticidas de los BVs pueden diferir entre aislados que proceden de un mismo hospedero, así como de distintas zonas geográficas. Por tanto, la selección de un aislado más efectivo para una determinada especie plaga es un importante elemento para desarrollar un bioinsecticida. El primer objetivo de este estudio fue estudiar la diversidad genética y la actividad biológica de cuatro aislados del SeMNPV (SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6 y SeSLP8) colectados en dos zonas agrícolas de México (Capítulo II). Estos aislados se compararon con dos aislados previamente caracterizados de este mismo virus, procedentes de Estados Unidos (SeUS1 y SeUS2) y uno de España (SeSP2). El análisis del genoma viral mediante enzimas de restricción confirmó que todos los aislados mexicanos son aislados del SeMNPV. Sin embargo, con el uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en combinación con la técnica de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), se observaron diferencias moleculares entre éstos y los aislados de referencia. Por ejemplo, los aislados mexicanos SeSLP6 y SeSIN6 se consideraron como variantes genotípicas del SeMNPV, mientras que los aislados SeSIN8 y SeSLP8 tuvieron un patrón muy similar de ADN comparado con el virus SeUS1. Por otro lado, la caracterización biológica de todos los aislados se realizó en dos colonias de laboratorio, una procedente de México (Se-Mex) y otra de Suiza (Se-Suiza). Las larvas de segundo estadio de la colonia Se-Mex fueron menos susceptibles a la infección que los insectos de la colonia Se-Suiza. En la colonia Se-Mex, el aislado SeSP2 fue el más patógeno (Dosis Letal 50;  $DL_{50} = 5.6$  OBs/larva) seguido de SeSIN6 ( $DL_{50} = 10.58$  OBs/larva), pero la

virulencia de este último fue casi similar a la mayoría de los aislados evaluados. En la colonia Se-Suiza se observaron valores similares de  $DL_{50}$  para cinco de los siete aislados (SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, SP2 y SeUS1) [rango de 0.91 a 1.62 cuerpos de oclusión opr larva (OBs/larva)]. Cuando las larvas de cuarto estadio de la colonia Se-Mex se inocularon con los distintos aislados, la virulencia fue mayor para el aislado SeSLP6 (109.1 h), el cual también tuvo la mayor producción de OBs ( $1.44 \pm 0.07 \times 10^7$  OBs/mg).

Con el fin de ampliar perspectivas sobre el uso del SeMNPV como un bioinsecticida para el control de *S. exigua*, también se estudió el uso de una dieta texturizada en frío, elaborada con fibra de soya, como un método alternativo a las dietas de agar utilizadas para la inclusión del viurs en sistemas de producción masiva (Capítulo III). Se hipotetizó un posible efecto perjudicial de la temperatura cuando el baculovirus se incluyó en dietas gelificadas con agar y que este factor podría reducir las condiciones óptimas de producción de OBs frente a una dieta preparada en frío. Larvas de *S. exigua* que se alimentaron con la dieta texturizada en frío con 120, 140 ó 160 g/l de fibra de soya, como sustituto del agar, mostraron un incremento de peso que no difirió significativamente de las larvas que se alimentaron con una dieta a base de agar durante un período de 24 h. El incremento de peso de las larvas alimentadas en las dietas texturizadas con 140 g/l de fibra de soya no aumentó al adicionar clorofila y colorante verde como fagoestimulante o atrayente, respectivamente, o al extraer algunas sales. En este mismo experimento, se evaluaron distintas concentraciones del virus y se determinó que 36 OBs/mg de dieta fue la concentración óptima para ambos tipos de dieta. Posteriormente, ésta fue expuesta a grupos de 250 larvas de cuarto estadio de *S. exigua* y se observó que la productividad del SeMNPV fue igual cuando el virus se incorporó a una dieta elaborada con agar ( $26.4 \pm 4.6 \times 10^9$  OBs/contenedor) que al mezclarla con la dieta texturizada en frío ( $32.8 \pm 4.7 \times 10^9$  OBs/contenedor). Sin embargo, la dieta a base de fibra de soya mostró algunas ventajas, tales como un menor costo (~ 32%) y un tiempo de preparación más corto (~ 63%).

Así mismo, se evaluó el efecto de un compuesto antioxidante (ácido gálico) como estabilizador de un formulado líquido del SeMNPV en dos condiciones de almacenamiento (Capítulo IV). La incorporación del ácido gálico [1 (mili Molar) mM] en el formulado líquido del SeMNPV tuvo como objetivo capturar los posibles radicales libres (RLs) que se generan en los procesos de oxidación de compuestos en la formulación y que pueden desactivar al

virus. Para ello, se utilizó la técnica de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) para determinar los niveles de la capacidad antioxidante (CAO) del compuesto. Aunque el ácido gálico mostró una alta CAO (rango de 90 a 100%) a lo largo del tiempo (15 meses), su incorporación en el formulado no incrementó la persistencia de la actividad del SeMNPV a una temperatura de almacenamiento de 25°C. Estos resultados pueden indicar que existen varios factores aún por estudiar y que pueden estar afectando la actividad del virus. Como puede ser el caso del pH, contenido enzimático y otros procesos químicos que se desencadenan en el formulado por la presencia de distintos microorganismos.

Finamente, en esta tesis se realizó una revisión bibliográfica sobre la importancia agrícola y manejo de *S. exigua* en México (Capítulo V). El análisis de esta información indica los importantes esfuerzos que se han realizado sobre la evaluación de distintos métodos de control entre ellos los enemigos naturales de esta plaga. Sin embargo, son pocos o nulos los estudios publicados acerca de su biología, ecología y dinámica poblacional del insecto en las diferentes zonas agrícolas de México, por lo que la implantación de estrategias de manejo integrado para su control resultan complicadas.

En conclusión, la identificación de aislados nativos de BVs para el control de plagas y la evaluación de sistemas que optimicen su uso a nivel local o regional, pueden ser los principales campos de estudio que merecen futuras investigaciones. Así mismo, el uso de alternativas de control más amigables con el ambiente y la salud humana pueden ser la pauta para promover una agricultura más sostenible y eficiente.

Palabras clave: SeMNPV, Caracterización, Producción masiva, Baculovirus, Formulaciones líquidas.

## II. GENERAL ABSTRACT

---

Baculoviruses (BVs) are pathogens viruses of insects, which are used currently around the world as bioinsecticides for the control of different agricultural pest. The *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) have a high specificity, pathogenicity, and virulence. Due that, it is considered as a promising alternative for controlling its host *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), one of the most important pest of worldwide of vegetables. It is widely known that the genotypic composition and insecticidal properties of BVs can differ among isolates from the same host as well as from different geographical regions. Therefore, selection of most effective isolate for a determined pest is very important in the development of a bioinsecticide. The first objective of this work was to study the genetic diversity and biological activity of four isolates of SeMNPV (SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, and SeSLP8) collected in two agricultural regions of Mexico (Chapter II). These isolates were compared with two characterized SeMNPV from the United States (SeUS1 and SeUS2) and one from Spain (SeSP2). Analysis of the viral genome with restriction enzymes confirmed that all Mexican isolates were SeMNPV isolates. However, molecular differences between the Mexican and the reference isolates were observed using PCR combined with restriction fragment length polymorphism (RFLP). For example, the Mexican isolates SeSLP6 and SeSIN6 were considered genotypic variants of the SeMNPV, while SeSIN8 and SeSLP8 isolates had a very similar pattern of DNA compared to the SeUS1 isolate. On the other hand, biological characterization of all isolates was performed against two *S. exigua* laboratory colonies, one from Mexico (Se-Mex) and another from Switzerland (Se-Swiss). Second instar larvae from the Se-Mex colony were less susceptible to infection than insects from Se-Swiss colony. In the Se-Mex colony, SeSP2 was the most pathogenic isolate (5.6 OBs/larvae) followed by SeSIN6 (10.58 OBs/larvae), but the virulence of the latter was similar to most of the isolates tested. In Se-Swiss colony, similar LD<sub>50</sub> values were observed for five of the seven isolates (ranged from 0.91 to 5.48 OBs/larvae). When forth instar larvae from Se-Mex colony were inoculated with the different isolates, the virulence



was higher for the SeSLP6 isolate (109.1 h), which also had the highest OBs yield ( $1.44 \pm 0.07 \times 10^7$  OBs per mg).

In order to increase the perspectives on the use of SeMNPV as bioinsecticide for the control of *S. exigua*, the use of a cold textured diet, made with soybean fiber, as a simple method for mass production of the virus, was also studied (Chapter III). In addition, the effect of an antioxidant compound (gallic acid) as a stabilizer for a liquid formulation of SeMNPV in two storage conditions was evaluated (Chapter IV). *Spodoptera exigua* larvae fed with cold textured diet with 120, 140 or 160 g/l of soybean fiber, instead of agar, showed an increase in weight that was no significantly different from larvae fed on an agar-based diet over a 24 h period. The larval weight was not increase when fed with a textured diet with 140 g/l of soybean fiber plus chlorophyll, a phage-stimulating and green colorant attractant, respectively, or when some salts were eliminated from the diet. In this same experiment, several concentrations of the viruses were evaluated and it was determined that 36 OBs/mg of diet was the optimum concentration. After that, this concentration of OBs was exposed to fourth instar *S. exigua* and it was observed that the productivity of the SeMNPV was the same when was incorporated into a diet made with agar ( $26.4 \pm 4.6 \times 10^9$  OBs/container) that when mixed with the cold textured diet ( $32.8 \pm 4.7 \times 10^9$  OBs/container). However, the soybean fiber diet-based showed some advantages, such as a minor cost (~ 32%) and a shorter preparation time (~ 63%).

The incorporation of gallic acid (1 mM) to the liquid formulation of SeMNPV was aimed to capturing the possible free radicals (FRs) generated in the oxidation processes of the compounds in the formulation, which in addition, can deactivate the virus. For that, the ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline) -6-sulfonic acid) technique was used to determine the antioxidant capacity (AC) of the compound. Although gallic acid showed a high AC (between 90 to 100%) over time (15 months), its incorporation into the formulation did not increase the persistence of SeMNPV activity at 25 ° C of storage. Our results indicate that several factors can be affecting the virus activity; for example, pH, enzymatic content and other chemical process derived from the formulation due to microorganism presence.

Finally, a survey on the agricultural importance and management of *S. exigua* in Mexico was realized in this study (Chapter V). We have found that important efforts have

been done in relation to the natural enemies of this pest and that several control methods also have been evaluated. However, little information is available about biology, ecology, a population dynamic of this pest in the different agricultural regions of Mexico, and for that its control is very complicated.

In conclusion, the identification of BVs native isolates for pest control, as well as evaluation of systems that optimize their use, locally or regionally, may be the main study fields that merit more research. Likewise, control alternatives that are friendlier with environment and human health may be the guideline to promote a more sustainable and efficient agriculture.

### III. INTRODUCCIÓN GENERAL

---

El gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), es una especie originaria del sureste asiático con distribución en todo el mundo, pero con mayor abundancia en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (CAB Internacional, 2000). Es una plaga que ataca a diversos cultivos de invernadero y campo abierto en muchas regiones del mundo (Belda, 1994; Berdagué *et al.*, 1998; Azidah *et al.*, 2006; Caballero y Williams, 2008). En México, el gusano soldado se alimenta de un importante número de plantas cultivadas, entre las que destacan el tomate rojo, amaranto, sorgo, garbanzo, arroz y chile (Beutelspacher y Balcázar, 1999; Greenberg *et al.*, 2001). El principal método de control contra *S. exigua* se ha basado en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro; sin embargo, estos productos provocan contaminación ambiental y daños a los agricultores. Además, *S. exigua* es uno de los insectos plaga más difíciles de controlar a nivel mundial debido a que ha desarrollado altos niveles de resistencia a la mayoría de los insecticidas químicos (Moulton *et al.*, 2002; Smagghe *et al.*, 2003; Lasa *et al.*, 2007; Wyckhuys *et al.*, 2013). Esta situación ha incrementado la necesidad de estudiar alternativas ecológicamente aceptables para el control de insectos como parte de programas de manejo integrado de plagas.

*S. exigua* es susceptible a la infección por varios nucleopoliedrovirus múltiple (MNPV) (Baculoviridae), como el MNPV aislado de *Autographa californica* Speyer (AcMNPV), *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (SpliMNPV), *S. frugiperda* J. E. Smith (SfMNPV), *Mamestra brassicae* L. (MbMNPV) y *Helicoverpa armigera* Hübner (HaMNPV). No obstante, su MNPV homólogo (SeMNPV) es el más virulento y patogénico hacia distintos estadios larvarios (Murillo *et al.*, 2003). Debido a que el SeMNPV puede provocar epizootias naturales entre las poblaciones de sus hospederos, este virus ha sido aislado tanto de larvas como de muestras de suelos procedentes de distintas áreas geográficas (Caballero *et al.*, 1992a; Murillo *et al.*, 2006). Un aislamiento del SeMNPV originario de Florida, USA, se ha desarrollado como un producto comercial registrado bajo el nombre de Spod-X<sup>®</sup> (Certis, USA). Otros dos productos comerciales del mismo virus, que son distribuidos en Europa, son Virex<sup>®</sup> (Biocolor S.A., España) y Spexit (Andermatt Biocontrol AG, Suiza) (Elvira *et al.*, 2013). Además, existen referencias del uso del

SeMNPV por el Departamento de Agricultura de Tailandia de los productos Ness A y Ness E comercializados en la India (Cherry *et al.*, 1997; Elvira *et al.*, 2013).

La composición genotípica y propiedades insecticidas de los baculovirus pueden diferir entre aislamientos que proceden de un mismo hospedero y de distintas zonas geográficas (Caballero *et al.*, 1992b; Caballero *et al.*, 2009). Uno de los métodos más utilizados para reconocer variantes genotípicas del SeMNPV es la combinación de las técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) (ambas abreviaciones por sus siglas en inglés). Mediante PCR–RFLP se puede lograr una diferenciación precisa de los diferentes genotipos o la detección de posibles cambios que éstos puedan experimentar durante su replicación (Caballero *et al.*, 2009). Al respecto se ha demostrado que el SeMNPV que provoca epizootias naturales en España cuenta con una naturaleza genética muy diversa, lo cual fue confirmado al identificar mediante PCR–RFLP de variantes genotípicas que mostraron variabilidad en su actividad insecticida con respecto a los genotipos puros (Ijkel *et al.*, 1999; Murillo *et al.*, 2006). Cabe señalar que en dichos estudios se identificaron cinco regiones con una alta variabilidad genética (V01-V05), las cuales, a su vez, contienen regiones de interés altamente variables, denominadas regiones homólogas (*hr*).

Si bien, el conocimiento de la diversidad genética y la actividad biológica de los baculovirus (BVs) son aspectos fundamentales al momento de desarrollar un bioinsecticida, también es imprescindible conocer el proceso de su producción masiva y tipos de formulación. En este sentido, la explotación comercial de un baculovirus requiere el desarrollo de una tecnología que haga posible la producción del virus a un costo aceptable, esto como condición necesaria para la obtención de un producto técnico (Lasa *et al.*, 2008). En la actualidad, existen sistemas de infección a partir de inoculación del virus mediante aplicación en superficie de dieta o de inclusión en la dieta. Los sistemas de inclusión en dieta son más homogéneos que los de aplicación superficie, ya que garantizan una infección más homogénea con la ingesta, lo que repercute directamente en la homogeneidad de mortalidad y los costos de recolección. No obstante, uno de los principales problemas de la inclusión del virus en dietas semisintéticas es su posible degradación parcial al incluirlos a altas temperaturas (~55-60 °C), esto debido al uso de gelificantes que requieren dicha temperatura para la formación del gel y cuyos costos son elevados. El uso de productos texturizantes en frío y el desarrollo de nuevas formulaciones para la infección sincronizada con dietas que incluyan el virus, podrían permitir establecer estrategias eficientes y

económicas para la infección de larvas y lograr así una mejora en los sistemas actuales de producción *in vivo* de los baculovirus (Williams y Cisneros, 2001).

Otro de los puntos importantes en la obtención de formulados de baculovirus es la estabilidad del producto en almacenamiento. La estabilidad de BVs producidos *in vivo* y mantenidos a temperaturas relativamente bajas ( $\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) es alta, pero esta es afectada cuando aumenta la temperatura de conservación a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Lasa *et al.*, 2008). Uno de los principales factores que parece influir en la inactivación de los BVs al incrementar la temperatura es la generación de radicales libres (RLs) como consecuencia de la auto-oxidación de grasas. Pocos estudios han sido realizados para mejorar la estabilidad de productos almacenados a temperatura ambiente. El uso de compuestos antioxidantes, que tienen una importante capacidad de neutralizar estos RLs, podría tener un efecto importante sobre la estabilidad del virus cuando es almacenado a temperaturas superiores a los  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante periodos prolongados. Debido a que la generación de RLs se incrementa en un efecto cascada, el uso de este tipo de productos podría tener un efecto en la ralentización de ese proceso de inactivación. Al respecto, se tiene conocimiento que la inclusión en formulaciones líquidas de BVs, de algunos compuestos como el manitol, inhibidores de peróxidos o los flavonoides podrían favorecer o ralentizar los procesos de inactivación del virus cuando es aplicado a los cultivos (Hoover *et al.*, 2001). Por su parte, Hoover (1998) realizó experimentos con plantas de algodón y lechuga, corroborando la hipótesis de que la acción fitoquímica por enzimas con acción oxidante (ejemplo, peroxidasas) generadas por la planta, dañan al virus al ser ingerido junto con el follaje, y comprobaron que la efectividad del AcMNPV se ve afectada en presencia de fenoles, peroxidasas y polifenoles oxidadas. Por otro lado Ignoffo y García (1994) corroboran que la radiación ultravioleta (UV) es otro de los factores que potencian la producción de RLs y con esto el daño ocasionado en los OBs, tras la inclusión de antioxidantes, mostrando una neutralización de este efecto de degradación de la actividad de los inóculos del HzSNPV y apoyando la hipótesis de que los radicales reactivos, generados por rayos UV, pueden causar la inactivación de los insecticidas microbianos virales aplicados en el campo y otros.

En el grupo de investigación de Entomología Agrícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF), de la Universidad Michoacana de San

Niclas de Hidalgo (UMSNH), se tienen estudios recientes que indican que aislamientos del SeMNPV colectados en zonas agrícolas de México pueden ser explorados como bioinsecticidas para el control de *S. exigua* (Zamora, 2013). Sin embargo, es necesario realizar su caracterización genética y fenotípica, así como realizar una exploración de los procesos de su producción masiva y los medios óptimos para mantener la integridad de los virus bajo condiciones de almacenamiento.

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES GENERALES

---

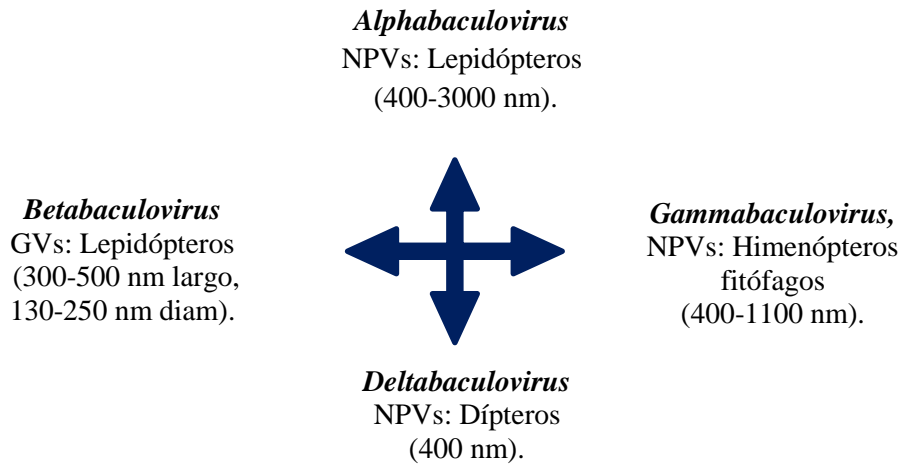
#### Los baculovirus

##### Generalidades y clasificación taxonómica

Los baculovirus (BVs) (Familia: Baculoviridae) han recibido una gran atención como herramienta para el manejo de plagas y estudios ecológicos. Se asocian y regulan a las poblaciones de algunas especies de artrópodos, lo que les hace importantes candidatos para el control de insectos plaga (Cory y Evans, 2007). Su nombre hace referencia a la forma de varilla o de bastón (baculum = bastón) de las entidades infecciosas, llamadas viriones. El término baculovirus fue sugerido por el Dr. Mauro Martignoni en el año 1973 y el nombre de la familia se definió en el año de 1973 (Vago, 1974). Los primeros caracteres que se seleccionaron para la clasificación taxonómica fueron el tamaño y forma de las estructuras encargadas de la dispersión y protección de los viriones, denominadas cuerpos de inclusión u OB por sus siglas en inglés de occlusion body, además del uso de pruebas serológicas. Inicialmente, esta familia se clasificó en dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV) (Theilmann *et al.*, 2005), los NPVs han sido aislados de más de 500 especies de insectos, la mayoría perteneciente al orden Lepidoptera. Los NPV incluyen a dos tipos morfológicos de virus; a los simples (SNPVs), aquellos que tiene una sola nucleocápsida por virión y múltiples (MNPVs), los que contienen un número variable de nucleocápsidas por virión. Los GVs se caracterizaban por su forma granular y porque el tamaño de sus OBs (400-300 nm) son mas pequeños que el de los NPVs (400-3000 nm) (Fig. 1) (Rohrmann, 2008). Los GVs han sido aislado de aproximadamente 100 especies, todas del orden Lepidoptera (Rohrmann, 1992; Molina y Jiménez, 2007). Con la aportción de conocimiento sobre secuenciación genómica y relaciones foogenéticas, han surgido cambios en la clasificación de esta familia, debido a que esta a virus de ADN de doble cadena que contienen de 100 a 200 genes (Szewczyk *et al.*, 2006) y su tamaño es de 80 a 180 Kb (Daimon *et al.*, 2007). Estos conocimientos de secuenciación genómica y



relaciones genéticas han permitido sugerir la división de esta familia en cuatro géneros (Fig. 1) (Jehle *et al.*, 2006):



**Figura 1.** Clasificación actual de la familia Baculovirus (Jehle *et al.*, 2006).

### **Estructura de los baculovirus: nucleocápsidas, viriones y OBs**

**La nucleocápsida (NC).** Es la estructura donde se encuentra empaquetado el ADN genómico viral enrollado y altamente condensado, debido a la presencia de la proteína P6.9, la cual se une con el ADN y neutraliza sus residuos ácidos, es de forma cilíndrica o de vaina, tapada por ambos extremos (base y tapa). Las NCs tienen un diámetro entre 30-60 nm y una longitud de 250-300 nm, la variación se debe al tipo de virus ya que su tamaño es proporcional al material genético. Otras proteínas presentes en las NCs son la VP39 y PP78/83, las cuáles ayudan a su desplazamiento a través de la célula (Federici, 1986). La proteína GP41 se encuentra localizada entre la envoltura del virión y la cápside, constituyendo una estructura denominada tegumento requerida para que la NC abandone del núcleo (Olszewski y Miller, 1997). Otras proteínas importantes, como la p49 (requerida en la NC para formar después a los viriones derivados de la inclusión (ODVs) que serán ocluidos en los OBs) (McCarthy y Theilmann, 2008), está presente en todos los baculovirus secuenciados (Rohrmann, 2008). Las proteínas 144, 101, 142 del MNPV de *A. californica* están involucradas en la posible síntesis del DNA, en su empaquetamiento y en la morfogénesis de la NC (Vanarsdall *et al.*, 2007). Las proteínas VLF (very late factor)-1 o Ac77 están asociadas al funcionamiento óptimo de la NC, éstas se localizan en la región

terminal de la NC, además de estar presente como proteína estructural en los ODVs y en los viriones brotantes (Bvs) (Yang y Miller, 1998).

Los viriones son las unidades infecciosas de los baculovirus y son los responsables de la dispersión en órganos y tejidos (Caballero *et al.*, 2001). Existen dos tipos de viriones, con funciones diferentes: los viriones brotantes (Bvs) y los viriones derivados de cuerpos de oclusión (ODVs), ambas abreviaciones por sus siglas en inglés. Los Bvs inician las infecciones secundarias y dispersan la infección a través de la hemolinfa por todo el hospedero, mientras que los ODVs son los elementos infecciosos responsables de la transmisión horizontal entre los individuos susceptibles de la población (Theilmann *et al.*, 2005). Muchos de los componentes estructurales de los Bvs y ODVs son iguales, incluida la doble hebra de ADN circular; sin embargo, las diferencias para adecuar sus respectivas funciones en un ciclo de infección radican principalmente en los componentes de sus respectivas envolturas (Possee *et al.*, 2010); la composición de la envoltura de los Bvs les permite infectar a nivel sistémico, de célula a célula, a través de la hemolifa del insecto, mientras que los ODVs infectan sólo a células del epitelio intestinal, aunque estas últimas estructuras pueden ser hasta 10.000 veces más efectivas que las de los Bvs (Rohrmann, 2008).

Los Bvs se originan a partir de nucleocápsidas sintetizadas en el núcleo, después se mueven a otras células hospederas y adquieren su membrana a partir de la membrana citoplasmática de la célula hospederas donde se encuentra una glicoproteína (GP64) codificada por el virus, actuando como una proteína de fusión. La GP64 no se encuentra en todos los virus (Monsma *et al.*, 1996), por lo que su actividad es reemplazada por una proteína denominada F (prot. F), aunque algunos baculovirus tienen ambos ORFs, sólo hacen uso de GP64. Tanto la proteína GP64 como la F son responsables de la unión del virus a los receptores celulares y necesarias para la entrada y la replicación de los virus dentro de la célula hospederas (Wang *et al.*, 2009). Considerando a éstas, cómo las únicas proteínas de fusión de membrana funcional dentro de la familia. Postulados establecidos explican la posible adquisición de GP64 en diferentes linajes de los baculovirus en los cuales la actividad de la proteína F fue desplazada (Rohrmann, 2008). Por estos hallazgos, ahora los NPVs se definieron grupos denominados I y II, basándose en la presencia/ausencia del ORF (F). Otras características de los Bvs es que contienen sólo una

NC y todos son morfológicamente iguales y contienen el mismo genoma, pero difieren en estructura y composición de lípidos, ácidos grasos y proteínas (Blissard y Rohrmann, 1990).

Los ODVs se originan a partir de nucleocápsidas que permanecen en la misma célula. Por su forma, los ODVs son de dos tipos: los que contienen una sola nucleocápsida por virión, denominados viriones simples y los que presentan un número variable de nucleocápsidas por virión, denominados viriones múltiples (Caballero *et al.*, 2001), los ODVs se encuentran incluidos en los OBs (ver descripción abajo). Poseen una envoltura constituida por diversas proteínas designadas como ODV-E. Homólogos a esta proteína se encuentran casi todos los baculovirus, excepto los aislados de himenópteros y dípteros (Van Oers y Vlak, 2007). Otro grupo de proteínas que se encuentran en la envoltura que rodea a los ODVs se asocia a la infección de los insectos por vía oral, por lo cual fueron designadas con el nombre de *per os infectivity factors* (PIF). Las proteínas PIF1, PIF2, y p74 actúan mediando de forma específica la unión de los ODV a las células del intestino medio, sugiriéndose que están directamente involucradas en la interacción virus-célula en las etapas iniciales de la infección (Ohkawa *et al.*, 2005).

Los OBs son las entidades que se originan al final del proceso infeccioso. La mayor cantidad de OBs se obtiene de los tejidos con mayores niveles de actividad metabólica y con mayor contenido de nutrientes (cuerpo graso, epidermis y matriz traqueal) (Federici, 1993; Claus y Sciocco de Cap, 2001). Al sintetizarse grandes cantidades de la proteína poliedrina o granulina (según el género de baculovirus), los viriones quedan inmersos en estas proteínas, las cuales se cristalizan para formar una matriz proteica. Los OBs permiten conservar la capacidad infecciosa del patógeno fuera del hospedero, puesto que son insolubles en agua, resistentes a la putrefacción y a la desintegración por algunos agentes químicos, así como a la congelación, la desecación o la liofilización (Jacques, 1985). El diámetro de los OBs en los NPVs varía entre 0.5 y 15  $\mu\text{m}$ , aunque el tamaño medio oscila entre 0.8 y 2  $\mu\text{m}$ ; su forma puede ser cúbica, dodecaédrica, tetraédrica e irregular. El tamaño de los OBs de los GVs es bastante homogéneo y varía entre 160 y 300 nm de ancho por 300-500 nm de largo (Federici, 1986).

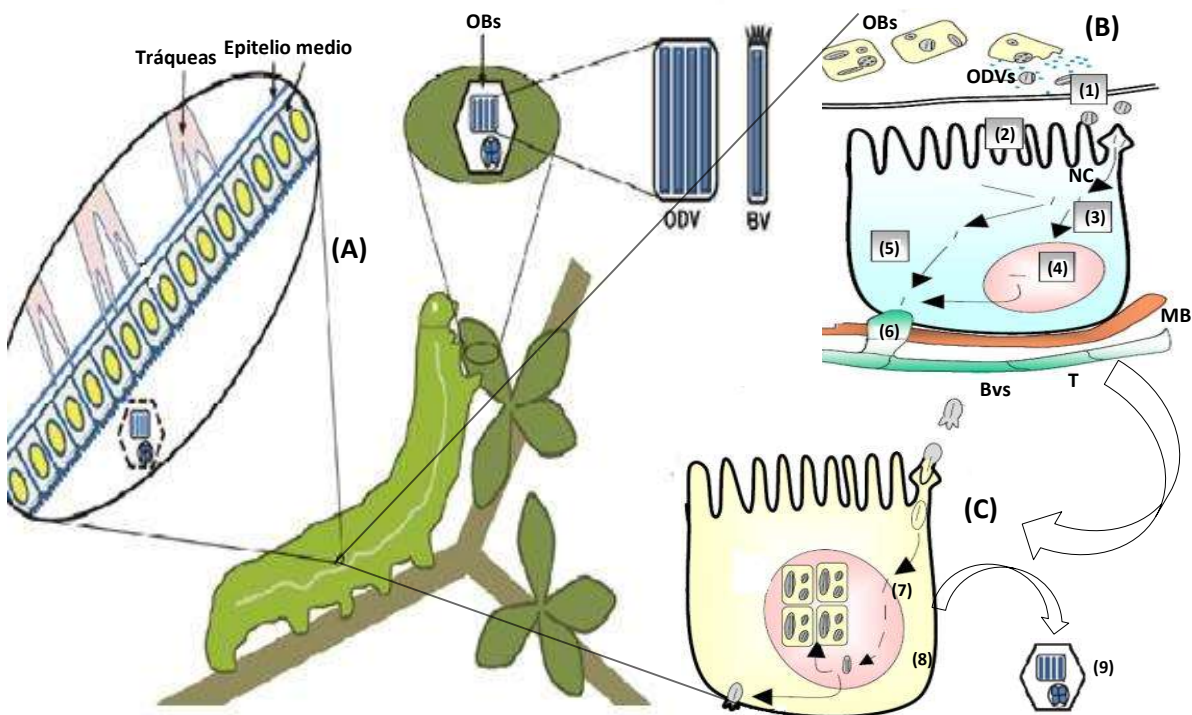
### **Ciclo de infección y sintomatología**

La mayoría de las larvas de lepidópteros que son infectadas por baculovirus muestran signos de la infección en un periodo de dos a cinco días después de la ingestión del virus (Fig. 2A), lo cual depende tanto de la patogenicidad (capacidad del patógeno para provocar una enfermedad) como de la virulencia (grado de patogenicidad o daño fisiológico que el virus causa al hospedero) (Tanada y Kaya, 1993). La infección primaria de los baculovirus se inicia después de la ingestión de los OBs presentes en el alimento de las larvas (Fig. 2B). Debido a las condiciones de alta alcalinidad (pH 9.5-11) que prevalecen en el intestino del insecto, la proteína de los OBs, se solubiliza (Granados y Williams, 1986) y debido a la acción de proteasas alcalinas presentes en los jugos intestinales, los ODVs se liberan (Salvador, 2011). Una vez liberados, los ODVs atraviesan la membrana peritrófica del intestino y se unen. Mediante fusión de sus membranas, a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio (Engelhard *et al.*, 1994), las NCs contenidas en su interior son liberadas en el citoplasma de las células (Flipsen *et al.*, 1995). Después las NC se dirigen al núcleo y entran por el poro nuclear iniciando la expresión y replicación del DNA (Granados y Williams, 1986; Salvador, 2011).

La mayor parte de las proteínas necesarias para la replicación del DNA viral están incluidas en el ODV: DNA polimerasa, helicasas, IE1, LEF1 y LEF3 (Braunagel *et al.*, 2003). Una vez replicado el material genético e iniciado el proceso de la cascada transcripcional de los genes virales que permite la formación de nuevas NCs, éstas salen del núcleo por brotación llevando una envoltura procedente de la membrana nuclear que contiene al menos una proteína viral (GP16) (Gross *et al.*, 1993). Según Blissard y Rohrmann (1990), el núcleo de la célula se hipertrofia y los nucléolos se dirigen hacia la periferia nuclear y disminuyen en tamaño, para dar inicio a la transcripción de los primeros genes virales.

La infección secundaria de los baculovirus se logra debido a la diseminación de los Bvs dentro del hospedero, las NCs formadas son transportadas a la membrana celular, desde donde abandonan la célula a través de la membrana basal. Previamente, grandes cantidades de proteínas virales (GP64 o proteína F) son acumuladas sobre la membrana celular que constituirá la envoltura del Bv (Braunagel *et al.*, 2003; Pearson *et al.*, 2001). La

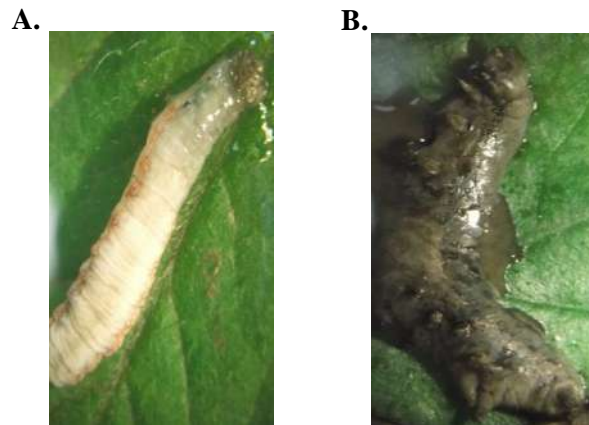
entrada de los Bvs a las células se produce por endocitosis. Mientras que algunos virus son retenidos en el intestino medio, otros son liberados e infectan diferentes tejidos; entre ellos: hemocitos, tráqueas, epidermis, tejido adiposo, muscular, nervioso, reproductivo, granular y células pericardiales (Passarelli, 2011). Durante el proceso de infección secundaria también se producen ODVs que gradualmente son ocluidos dentro de una matriz proteica cristalina (poliedrina) para desarrollar los OBs (hiperexpresión de genes tardíos, produciendo altos niveles de proteínas como P10 y poliedrina) (Xu *et al.*, 2008), los cuales llenan el núcleo y finalmente son liberados tras la lisis celular (Cory, 2010; Sciocco de Cap, 2001) (Fig. 2C).



**Figura 2.** Ciclo típico de la replicación de los baculovirus (figura adaptada de Clim y Pasarelli, 2013; Caballero *et al.*, 2009). (A) Esquematización de las células epiteliales infectadas por los OBs. Ingestión de hojas inoculadas con OBs, por larvas. Dentro de los OBs se encuentran los ODVs y Bvs y (B) Los cuerpos de inclusión (OBs) ingeridos se solubilizan en el mesenterón de la larva liberando los viriones derivados de la inclusión (ODVs) (1). La membrana del virión se fusiona con la membrana de la célula epitelial (2) y las nucleocápsidas (NC) desnudas atraviesan el citoplasma (3) y se dirigen al núcleo donde se produce una primera replicación del ADN viral (5). Alternativamente, algunas nucleocápsidas atraviesan el citoplasma (4) y, sin pasar por el núcleo, se dirigen a la zona basal. (C) Las nucleocápsidas atraviesan la membrana celular formando los viriones brotados (Bvs) (6) y pasan a la cavidad hemocélica a través de las traqueolas (T) evitando

la membrana basal (MB). En el hemocele, los Bvs llevan a cabo la segunda fase del proceso infeccioso, infectando las células de los órganos y tejidos por endocitosis (7). Las NC forman nuevamente BVs favoreciendo la dispersión de la infección (8). Alternativamente forman viriones y OBs completos (9), en una fase más avanzada del proceso infeccioso, que se acumulan en la célula y finalmente producen su lisis liberando los OBs al medio.

La sintomatología se observa sólo cuando la infección producida por el baculovirus se encuentra en estados avanzados. Las larvas se tornan a un color blanquecino amarillento (Fig. 3). Posteriormente, los insectos pierden movilidad y tienen un retraso en su desarrollo. La muerte de las larvas de lepidópteros de los primeros estadios se produce a los dos o tres días posteriores a la ingestión de los OBs; en los individuos de mayor tamaño, la muerte ocurre a los cinco o siete días. Las larvas emigran hacia la parte superior de la planta, donde quedan colgadas de sus propatas (Sciocco de Cap, 2001). Evidencias expuestas por Hoover *et al.* (2011) indican que el gen *egt* es el responsable de este comportamiento en el insecto. Finalmente, el integumento se degrada y se liberan millones de nuevos OBs para después dar origen a un nuevo ciclo de infección (Granados y Lawler, 1981).



**Figura 3.** Sintomatología de infección de larvas *S. exigua* previa a la muerte (A) y muerta (B) por la acción de su nucleopoliedrovirus.

### **Expresión y estructura genética de los baculovirus**

Las secuencias genómicas de las diferentes especies de BVs hasta ahora conocidas y la información proporcionada por las mismas, han aportado al conocimiento de su evolución y organización genómica (López *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2012). Además, ha facilitado la caracterización de variantes genotípicas observadas con frecuencia en poblaciones

colectadas directamente de campo (Muñoz *et al.*, 1999). Frecuentemente, los aislados silvestres de los baculovirus que proceden de un mismo hospedero pueden tener una gran proximidad filogenética, pero sus perfiles de restricción pueden diferir lo suficiente como para ser considerados variantes genotípicas de un mismo virus (Zeddám *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2011; Caballero *et al.*, 2009; Murillo *et al.*, 2006). Debido a ello, uno de los aspectos principales que se deben analizar para caracterizar algún aislado es conocer su composición genotípica, la cual se puede analizar por métodos de hibridación del ADN, digestión con enzimas de restricción o mediante la secuenciación de regiones específicas del genoma (Caballero *et al.*, 2001). La PCR es otro método utilizado para la identificación rápida de aislamientos de baculovirus. Además, este método puede permitir el estudio de la variación genética entre aislamientos incluso cuando se trata de pequeñas cantidades de material o de muestras mal preservadas (Rowley *et al.*, 2010).

### **Expresión genética de los NPV**

La expresión de los genes de los baculovirus se divide en tres fases temporales: temprana, tardía y muy tardía; las cuales se desencadenan un proceso en 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 hospedero usando la ARN polimerasa II celular, los virus cuentan con elementos promotores que son muy similares a los de los insectos, lo que hace posible su replicación exitosa en estos organismos. Los genes tardíos y muy tardíos son transcritos por una ARN polimerasa viral a partir de que se inicia la replicación del ADN viral. La secuencia de sus promotores tiene un motivo ATAAG específico desde donde se inicia la transcripción (Su *et al.*, 2011). Algunos genes pueden expresarse en más de una fase del ciclo de replicación.

**I. Fase temprana.** Esta etapa se expresan los genes tempranos requeridos para la replicación viral (ej., IE-0, IE-1 [transactivadores de genes tempranos], IE-2 [transactivadores de genes tempranos y bloqueo del ciclo celular]) (Pullen y Friesen, 1995), 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 (ej., DNA polimerasa [dnapol] 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. Entre los genes de la fase temprana, se incluyen también, a los genes encargados de actuar tanto intra como extracelularmente durante la infección viral (Chen *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2011).

**II. Fase tardía.** Esta fase comienza aproximadamente a las 6 h post infección (hpi) paralelamente con el inicio de la replicación del ADN viral y se extiende hasta las 24 hpi, que es cuando se producen proteínas estructurales necesarias para la formación de los Bvs (Romanowski y Ghrihelli, 2002). El virus deja de usar la ácido ribonucleico polimerasa (RNAPol) de la célula hospedera, necesaria 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.

**III. Fase muy tardía.** Conocida también como fase de oclusión, ya que es necesaria para la formación de los OBs. En esta etapa 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. El gen de la poliedrina se considera como un gen fundamental para la sobrevivencia del virus y es uno de los genes más conservados en los NPVs de lepidópteros; usado en varios estudios filogenéticos (Jahele *et al.*, 2006; Hewson *et al.*, 2011; Rowley *et al.*, 2010). En esta etapa también actúan las proteínas virales catepsina y quitinasa, las cuales están involucradas en el proceso de licuefacción de insecto. **La catepsina** rompe las membranas de las células dentro de los insectos, mientras que la **quitinasa** degrada la quitina en el exoesqueleto de las larvas (Daimon, 2007).

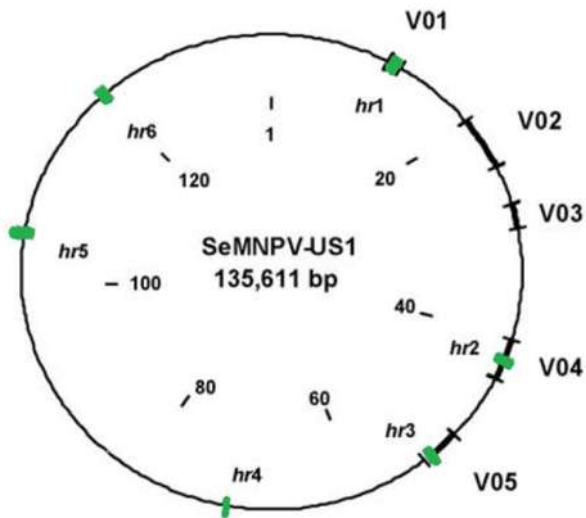
### **Regiones homólogas “hr”**

Existen otras secuencias cortas dentro del genoma, las cuales son altamente variables y que posiblemente están implicadas en la determinación de características únicas en cada especie, como puede ser la especificidad del hospedero y la virulencia (Luque, 2002). Las denominadas “regiones homólogas” (*hr*) que son loci menos conservados y usados ampliamente para el estudio de variabilidad genética de los NPVs (Muñoz *et al.*, 1998; Hayakawa *et al.*, 2000 y Li *et al.*, 2002). Dentro del genoma del SeMNPV se han reconocido seis *hrs* y se caracterizan por presentar de uno a ocho fragmentos repetidos

dentro de sus secuencias o conocidas también como regiones palindrómicas imperfectas (Murillo, 2005). La mayoría de las *hr* se encuentran en regiones no codificantes del genoma, es por eso que se conoce que pueden actuar como potenciadores (enhancers) de transcripción (Lin *et al.*, 2010) o como orígenes de replicación del ADN. Aunado a esto, también se sabe que pueden actuar como activadores de la transcripción de genes tempranos por la ARNpol II, esta función se activa sólo en presencia de la proteína IE- 1, uniéndose a las *hr* (Pearson y Rohrmann, 1995). También son reportadas como grandes fuentes de variación y co-evolución (Cory y Myers, 2003). Las *hr* han sido identificadas en el genoma de un gran número de baculovirus tales como el NPVde *Orgyia psedosugata* (OpMNPV) (Ahrens *et al.*, 1997), NPVde *Bombyx mori* (BmNPV) (Majima *et al.*, 1993), NPV de *Limantria dispar* (LdMNPV) (Pearson y Rohrmann, 1995), MNPV de *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV) (Xie *et al.*, 1995) y MNPVde *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) (García-Maruniak, *et al.*, 1996). Al observar que las *hrs* se siguen manteniendo dentro de muchos genomas de los baculovirus, esto podría indicar un papel importante en el ciclo biológico de los virus (Luque, 2002).

### **Regiones V0**

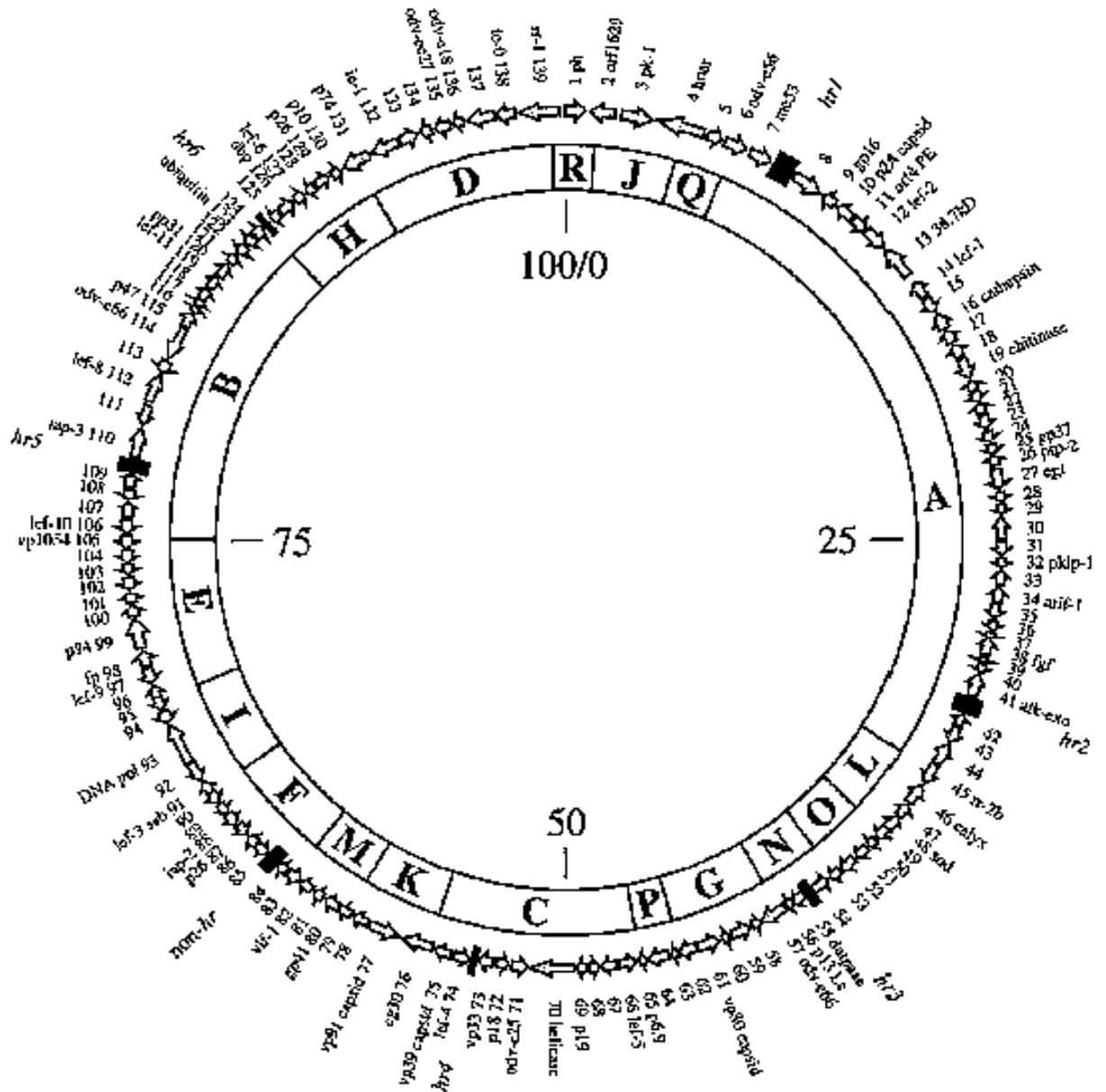
El estudio constante del genoma de los baculovirus ha generado conocimientos acerca de otras regiones altamente variables, como lo son las *hrs*. Hasta el momento se han reconocido cinco regiones; denominadas: **V01, V02, V03, V04 y V05** (Fig. 4) (Dai *et al.*, 2000; Heldens *et al.*, 1996). Al ser altamente variables, Estas regiones al ser altamente variables, estas regiones son capaces de presentar deleciones grandes en estas regiones como la V02 o dentro de estas mismas se pueden encontrar *hr* como *hr1, hr2 y hr3* (V01, V04, V05) (Ijkel *et al.*, 1999). Mismas regiones que Murillo (2006) y colaboradores analizaron en tres aislamientos colectados en España y observaron que las regiones V01 y V05 mostraron altos niveles de polimorfismo (Fig. 4). De igual forma, estos autores determinaron que la región V01 tiene un alto poder de resolución, misma zona que ayudó a identificar a cada uno de los aislamientos; incluyendo un genotipo clonado en laboratorio (US1A) y a un aislamiento colectado en EU (US2) similar al aislado presente en el producto comercial Spod-X®.



**Figura 4.** Localización de regiones variables (V01-V05). Barras verdes indican a las regiones homólogas (*hr1*- *hr6*) y los números en el centro denotan la posición nucleotídica en kpb (kilo-pares de bases) del genoma del SeMNPV. Imagen modificada de Murillo *et al.* (2006).

### Genoma del SeMNPV

El genoma completo del SeMNPV consta de 135, 611 pb y 139 marcos de lectura abiertos u ORFs (por sus siglas en inglés de *open reading frame*). Cada ORF se define como un segmento de ADN de 150 nt de largo como mínimo; 130 ORFs tienen homología con los de AcMNPV, y otros 16 ORFs tienen homólogos en otros baculovirus; 20 ORFs son únicos de SeMNPV. De acuerdo al orden que se dio a los genes (Fig. 5), la parte central del genoma es altamente conservada, aunque el orden de los genes ha estado sujeto a continuas modificaciones (Ijkel *et al.*, 1999). Muestran sitios de restricción con la enzima *Xba*I; fragmentos indicados de la letra A a la R, de acuerdo a fragmentos más pequeños al más largo. La posición de los 139 ORFs identificados está indicada con flechas que representan también la dirección de la transcripción. Flechas sombreadas indican ORFs homólogos en otros baculovirus. Flechas abiertas representan ORFs únicos para SeMNPV. Los números al lado de los ORFs indican el número de ORF. Las posiciones de *hr* están indicadas por cajas negras. La escala en el círculo interior está en unidades de mapa (imagen tomada de Ijkel *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Mapa circular del ADN de SeMNPV mostrando la organización genómica.

### Aspectos ecológicos de los baculovirus

Los estudios de ecología de los BVs están hechos con relación a la sobrevivencia del hospedero o a la dinámica de población del mismo. Sin embargo, un conocimiento profundo de su biología y ecología son la clave para que estos patógenos tengan impacto en programas de manejo de insectos plaga (Cory y Evans, 2007; Cory, 2010). La persistencia

de los baculovirus en el ambiente indica una importante adaptación fuera de su hospedero, en donde la infección de un nuevo hospedero se lleva a cabo principalmente a través de la transmisión horizontal. Aunque los OBs son susceptibles a la inactivación por radiación ultravioleta, pueden persistir en el ambiente por varios periodos de tiempo. Fuxa *et al.* (2007) señalaron que los NPVs han controlado a insectos plaga durante varios años en suelos agrícolas expuestos a la lluvia, incluyendo a estos suelos a ciclos de rotación de cosecha.

El principal reservorio natural de los NPVs es el suelo, pero éstos son transportados abióticamente a insectos hospederos y a plantas (hojas y frutos) para iniciar epizootias. Los OBs que contienen viriones múltiples ayudan a conservar su diversidad dentro de las poblaciones de virus y permitir una rápida adaptación (Cory y Evans, 2007). La capacidad de dispersión de los baculovirus depende de los cambios en el comportamiento del hospedero infectado, por la distancia que recorre y el sitio donde muere, lo anterior desencadena la propagación del virus dentro y entre generaciones de los hospederos (Cory y Myers, 2003).

### **Transmisión horizontal y vertical**

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) o necrofagia, un comportamiento recientemente publicado como facilitador de la transmisión de SeMNPV en *S. exigua* (Rebolledo *et al.*, 2015). 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. 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, tal como ha sido documentado para los NPVs de *S. frugiperda* y *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Fuxa, 2004). Así mismo se ha identificado este tipo de transmisión del SeMNPV e incluso de otro grupo de virus entomopatógenos de la familia Iridoviridae en poblaciones *S. exigua*, procedentes de

campo y en colonias de laboratorio usadas para la producción masiva del SeMNPV (Virto *et al.*, 2014). Incluso, se ha documentado que los inflavirus pueden influir en las propiedades insecticidas del SeMNPV, logrando reducir la concentración letal media ( $CL_{50}$ ,  $3.7 \times 10^3$  OBs/ml) del SeMNPV cuando se mezcló con el inflavirus, en comparación a la  $CL_{50}$  ( $14.3 \times 10^3$  OBs/ml) obtenida tras la infección de larvas de *S. exigua* con el SeMNPV solo. Además de reiterar que en presencia del inflavirus existe una alta prevalencia del SeMNPV y un aumento significativo de adultos con infección subletal (Carballo *et al.*, 2017). Más recientemente Virto *et al.* (2016), revelaron la eficiencia de transmisión vertical de mezclas de genotipos de SeMNPV al infectar larvas de *S. exigua* y detectar posteriormente los genotipos transmitidos verticalmente en adultos de *S. exigua*.

### **Producción masiva de los baculovirus**

En la actualidad, el sistema de producción *in vivo* de los baculovirus es el método que ofrece los mejores resultados. Por esta razón, el desarrollo y optimización de los procesos es de gran importancia para conocer la relación costo beneficio de la producción de bioinsecticidas con fines comerciales. La producción *in vivo* de baculovirus, comenzó en la década de los años 70's, al contar con equipamientos y condiciones controladas para mantener poblaciones de insectos bajo laboratorio y con la implementación de las primeras dietas semisintéticas (Claus y Sciocco de Cap, 2001).

Una de las ventajas que ofrece la producción *in vivo* es que no se requiere de un equipo altamente especializado (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Ziemnicka, 2007) (Cuadro 1). Específicamente, en el año 1975 se comenzaron los trabajos de optimización de los procesos de producción masiva de un BVs para controlar a *H. zea*. Este baculovirus fue distribuido bajo el nombre comercial de Elcar™ y producido por la casa comercial Sandoz Inc. (USA). A inicios de este siglo, existían aproximadamente más de 30 bioinsecticidas a base de baculovirus utilizados en diversos países del mundo para el control de plagas agrícolas (Martínez *et al.*, 2003; Copping, 2004). En Centroamérica, la Universidad de León en Nicaragua cuenta con dos nucleopoliedrovirusvirus producidos de manera semi-comercial y distribuidos bajo congelación, uno de ellos para controlar a *S. exigua* y otro para *Spodoptera sunia* (Guenée) (López *et al.*, 2004). Existen antecedentes de la producción de BVs a escala comercial o piloto en países latinoamericanos menos industrializados, por ejemplo, la producción de AgMNPV (en México, Brasil, Argentina,

Bolivia y Paraguay), SeMNPV (México), AcMNPV (Guatemala), *Cydia pomonella* GV (Argentina y Chile), *Phthorimaea operculella* GV (Colombia y Perú), SfMNPV (Brasil), entre otros (Grzywacz *et al.*, 2013).

El uso de cultivos celulares (*in vitro*) también es un método de replicación de los baculovirus (Gupta *et al.*, 2007); sin embargo, este tipo de producción tiene desventajas por su alto costo de inversión inicial y por la pérdida de genes de supervivencia en este medio de desarrollo y por la rápida adaptabilidad; que provoca una importante reducción en la actividad insecticida de los OBs producidos (Weiss *et al.*, 1994; Caballero y Williams, 2008). Además, pocas líneas celulares han mostrado ser altamente productivas en cortos periodos de tiempo (Reid *et al.*, 2014) (Cuadro 1).

El objetivo de la replicación *in vivo* a gran escala de los baculovirus, es lograr una producción continua, homogénea y eficiente al menor costo (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Ziemnicka, 2007; Grzywacz *et al.*, 2013). El procedimiento se basa a grandes rasgos en mantener a la cría de insectos bajo condiciones controladas sobre una dieta semi-sintética o natural, para luego ser alimentados con dieta tratada con virus (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Ziemnicka, 2007). En ciertos casos, la biología del insecto hospedero puede generar algunos problemas de costos para la producción *in vivo*, ya que algunas especies (ej., *S. frugiperda* y *H. armígera*) presentan canibalismo y, por consiguiente, se requiere el uso de contenedores individuales para evitar pérdidas del material biológico (Claus y Sciocco de Cap, 2001).

Por otro lado, algunas especies muestran un alto grado de apoptosis celular, dificultando con ello la recolección de los OBs (Szewczyk *et al.*, 2006). El establecimiento de las condiciones más favorables para el desarrollo del insecto (estado larval y dieta artificial) y la replicación viral (inóculo de infección) son algunos de los factores más importantes para la producción masiva de estos patógenos (Moscardi *et al.*, 1997; Ziemnicka, 2007; Elvira *et al.*, 2010). Estos factores tanto bióticos, como abióticos, están asociados a un determinado de sistema de cría y condicionan la sincronización de la adquisición de la infección y por ende, la eficiencia en el proceso de recolección del virus. Esta sincronización es fundamental para reducir el costo del proceso productivo y poder escalarlo.

**Cuadro 1.** Ventajas y desventajas de producción *in vivo* e *in vitro* de los baculovirus (Weiss *et al.*, 1995; Claus y Sciocco de Cap, 2001).

<i>Ventajas o desventajas</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Costos	Bajos	~10X ***
Equipo	No especializado	Especializado
Producción a gran escala	Proceso complicado	Proceso factible
Viabilidad en producción de *BVs	Alta	Baja
Control de calidad	Medio	Alto
Producción de OBs	Alta	Variable a gran escala
Producción de **rNPVs	Si	Si
Modificaciones genéticas rápidas	No	Si

\*Baculovirus, \*\*Nucleopoliedrovirus recombinantes, \*\*\*10 veces más costos que la producción *in vivo*. \*\*\*\*10 veces más costos que la producción *in vivo*

### Factores que afectan la producción *in vivo* de los BVs

#### Insecto hospedero

Para la producción *in vivo*, es imprescindible seleccionar la especie de hospedero adecuado en el que se replicará el virus de interés, así como tomar en cuenta su procedencia, ya que pueden presentar diferencias en parámetros biológicos importantes como la fertilidad, problemas de endogamia o mecanismos para la resistencia a la infección por estos patógenos (Shapiro y Argauer, 2001; Elvira *et al.*, 2010). La edad de las larvas utilizada para inocular el virus es uno de los factores más importantes para maximizar la producción de los OBs (Ignoffo, 1966). Los penúltimos instares larvarios son los comúnmente seleccionados para la inoculación viral, ya que los últimos estadios tienden a pupar antes de



finalizar la infección (Lasa *et al.*, 2007), o bien, necesitan altas dosis del inóculo de virus. Por otro lado, en los sistemas de producción masiva de virus, y más específicamente en la producción del SeMNPV, es más sencillo conseguir grandes cantidades de insectos homogéneos (24 h a 48 h después de la muda) de larvas en el penúltimo estadio (cuarto), como es el caso de *S. exigua* (Lasa, R. comunicación personal). La homogeneidad del material de inicio es de suma importancia en la eficiencia del sistema infeccioso y repercutirá de manera directa en los costos. Claus y Sciocco de Cap (2001) demostraron que existe una relación constante entre el peso del hospedero al momento de la muerte y la producción de OBs, la cual depende además del incremento en peso registrado durante el proceso de infección. Esto obliga a ajustar bien las dosis de infección y la metodología para que permita una ingestión homogénea del virus que genere el máximo incremento de peso en las larvas.

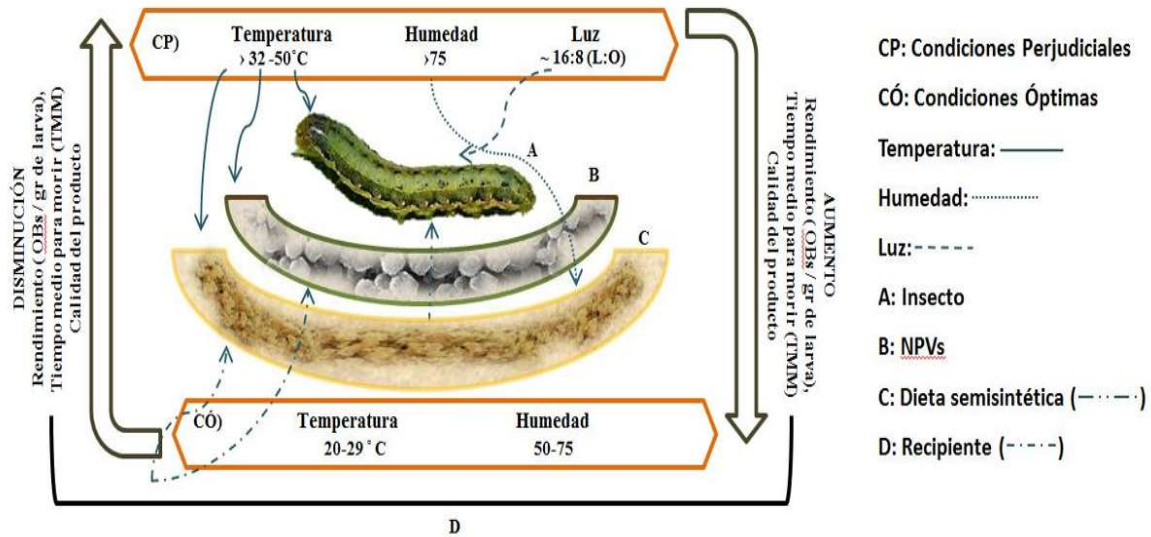
### **Inoculo viral y dosis**

El inóculo viral que será utilizado para la producción masiva debe ser previamente replicado y caracterizado morfológica, biológica y genéticamente con la finalidad de seleccionar el mejor candidato y crear un stock de virus inicial a partir del cual se amplifica para un proceso de producción masiva (Claus y Sciocco de Cap, 2001). La caracterización biológica, da una mayor pauta para la selección de un inóculo que de mayor efectividad. Entre los parámetros más importantes se incluyen: **a) la patogenicidad**, misma que se define como la capacidad de los OBs para matar al hospedero según el valor de la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), es decir, la dosis que mata el 50% de larvas tratadas con el virus; **b) la velocidad para matar** al hospedero, descrita como el tiempo que transcurre entre la infección inicial y la muerte del hospedero generalmente medida por el tiempo medio de mortalidad (TMM), y **c) el rendimiento**, descrito como el número de OBs liberados después de la muerte del hospedero. La velocidad para matar, el tiempo medio de mortalidad y el rendimiento o producción de OBs por mg de larva puede variar dependiendo del estadio larval utilizado (Claus y Sciocco de Cap, 2001, Hogdson *et al.*, 2001). Además el inóculo viral debe de tener una baja carga de bacterias y estar libres de ciertos contaminantes como virus de otros insectos o enterobacterias patógenas de humanos (Black *et al.*, 1997).

El costo de producción y control de calidad de este material stock es alto y, por ello, debe utilizarse con la mayor eficiencia posible en el sistema de producción masiva. La determinación de la dosis a administrar para el inóculo del virus de las larvas, se realiza tras la selección de la dosis letal que provoque entre el 95 y 100% de mortalidad y que además se obtenga la mayor concentración de OBs por mg de larva (Federici, 1986). Las dosis de inoculación pueden variar entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  OBs/ml de dieta (Claus y Sciocco de Cap, 2001). Si la dosis utilizada para producción masiva es muy baja, es probable que el insecto no muera por la infección viral y se obtenga un alto porcentaje de pupas (Shapiro *et al.*, 1986).

### **Condiciones ambientales**

La cría bajo laboratorio utilizada para la replicación de BVs debe favorecer un crecimiento homogéneo, rápido y vigoroso para garantizar el rendimiento del proceso. Este crecimiento y vigor dependen, a su vez, de otros factores, como: el tamaño del recipiente de cría, la temperatura, la humedad y las condiciones de luz (**Figura 6**) (Shieh y Bohmfalk, 1980). No obstante, las condiciones ideales deben ser ajustadas de manera específica para cada insecto y baculovirus. El incremento de la temperatura ( $> 35$  °C) y la humedad ( $> 75\%$ ), pueden causar efectos negativos en el crecimiento del insecto hospedero y, en consecuencia, la velocidad de muerte por la infección y la producción de OBs por larva pueden ser afectados (Kelly y Entwistle, 1988; Young *et al.*, 2001; Subramanian *et al.*, 2006). Al respecto, Shapiro (1986) observó una reducción en la producción del nucleopoliedrovirus múltiple de *L. dispar* (LdMNPV) cuando las larvas de este insecto se incubaron a una temperatura de 32 °C. Además, se ha documentado que a mayor temperatura y humedad hay una mayor probabilidad de proliferación de microorganismos, especialmente hongos y bacterias (Podgwaite *et al.*, 1983; Sosa-Gomez y Moscardi, 1996).



**Figura 6.** Efectos de factores ambientales y de recipientes para el sistema de replicación masiva de NPVs. Datos tomados de: Shapiro, (1986), Jacques, (1977), Kelly y Entwistle, (1998), Sosa-Gómez y Moscardi, (1996), Camacho et al. (2013).

### Dieta semisintética

La habilidad por mantener a una cría de insectos a bajo costo sigue siendo parte fundamental para la producción de baculovirus. Los insectos criados masivamente demandan tener un amplio conocimiento de la especie, sus hábitos, requerimientos nutricionales y condiciones ambientales para su desarrollo (Chapman *et al.*, 2000; Claus y Sciocco de Cap, 2001). Los requerimientos nutricionales de los insectos constan de fuentes que les provean carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, los cuales son esenciales para todas las rutas metabólicas de los insectos, después de su ingestión y absorción, éstos son transportados a cada tipo de células que constituyen el cuerpo del insecto, donde son usados apropiadamente (Johnson y Felton, 2001; Carson, 2005). Otros aditivos que son necesarios para proveer características de textura son los emulsificantes y los agentes gelificantes. Otras son las sustancias utilizadas para conservar a la dieta en buen estado, como por ejemplo los estabilizadores, sustancias modificadoras de pH, agentes antimicrobianos y antioxidantes (Johnson y Felton, 2001). Aunque los fundamentos sobre los componentes necesarios para un crecimiento óptimo de insectos son hasta ahora extensos, hace falta la integración de los mismos en el desarrollo de dietas simplificadas.

Dentro de los sistemas de cría masiva de insectos para la producción de bioinsectidas pueden distinguirse tres tipos de dieta: **i)** la dieta de producción de larvas hasta su momento de infección, **ii)** dieta para infectar las larvas y **iii)** dieta para replicación del virus en el hospedero. Estas dietas pueden diferir en algunos componentes con respecto a la dieta que se utiliza para la población que genera el excedente de larvas (población stock que se mantiene para el ciclo completo). Entre estas dietas, la que despierta mayor interés en este estudio es la dieta de infección de larvas. Los sistemas de infección de larvas pueden realizarse mediante inclusión del virus en la dieta o mediante aplicación en su superficie. El primer sistema es el más complicado, pero ayuda a obtener una infección más homogénea de las larvas. La segunda manera de inoculación es más sencilla, pero da resultados de infecciones más heterogéneos. Debido a que la utilización del penúltimo instar requiere de infecciones más homogéneas, el uso de sistemas de inoculación por inclusión de OBs se hacen necesarios. Uno de los principales problemas de la inclusión del virus en dietas semisintéticas es su posible degradación parcial al incluirlos a temperaturas cercanas a los  $\sim 55-60^{\circ}\text{C}$  (Martignoni y Iwai, 1977; Shapiro, 1981; Ribeiro y Pavan, 1994).

Los principales gelificantes utilizados actualmente para el desarrollo de las dietas semisintéticas son a base de agar o carragenatos, los cuales requieren de altas temperaturas para formar un gel. El agar de alta calidad, y cuyo costo es muy elevado, permite una gelificación a temperaturas inferiores a los  $45-50^{\circ}\text{C}$  y pueden ser usados para incluir el virus en dieta. Los carragenatos son muchos más económicos y ampliamente utilizados como sustitutos del agar en el desarrollo de dietas de insectos para la producción masiva; sin embargo, no pueden ser utilizados para tal fin porque gelifican a temperaturas superiores a los  $55-60^{\circ}\text{C}$ . En estas condiciones, la inactivación del virus podría cambiar debido a la variación en la temperatura de la dieta durante e inmediatamente después de la inmersión de los OBs, dando como resultado una mayor heterogeneidad entre lotes de larvas infectadas. El desarrollo de una dieta de elaboración sencilla y económica, que gelifique en frío podría permitir sistemas de inoculación más eficientes.

Por otra parte, resultados previos indican que el uso de fagoestimulantes y atractivos visuales también puede ser utilizados para lograr mayor atracción de las larvas al ser incorporados a la dieta y aumentar la ingestión a través de respuestas visuales y gustativas. Por ejemplo, Villegas y Rosas, (2013) adicionaron colorantes artificiales

(diferentes escalas del color verde) a dietas semisintéticas y fagoestimulantes como la clorofila y mostraron que existió una respuesta visual y gustatoria por parte de las larvas de *S. frugiperda*.

Algunos componentes que gelifican o texturizan una dieta en frío proveen un alto contenido de agua en estado sólido (o gel) y ayudan a prevenir las reacciones que tienen lugar entre los ingredientes. La formación de geles y el aumento de la viscosidad de las dietas son formas de mejorar texturas de dieta. Algunos gelificantes con estas características son proteínas (por ejemplo, fibra de soya) e hidratos de carbono (por ejemplo, gomas de origen vegetal, almidones y pectinas), componentes que a su vez tienen un aporte nutricional. Los hidratos de carbonos son los agentes gelificantes más comunes, en éstos se incluyen a la goma arábiga, goma de guar, goma de algarrobo, carboximetil celulosa, carragenina, agar, almidón y pectina, además de otras gomas como la xanthan. Cabe resaltar que existen componentes que no son comúnmente añadidos a las dietas de insectos, pero que también actúan como texturizantes. Al respecto, en 1989 se dio a conocer una patente (US 4840800) que se basa en el uso de una dieta semisintética para el desarrollo de larvas de *Heliothis* spp. Con ésta se demostró que al adicionar proteína de fibra de soya como sustitutivo de agar se obtuvo un desarrollo y peso final de pupa similares a los de la dieta a base de agar (Harris, 1989). Estos interesantes resultados dan la pauta para una investigación más profunda sobre el desarrollo de dietas en frío y su uso potencial para la inclusión de virus en sistemas de producción *in vivo*. Es importante recalcar, que aunque esta patente fue publicada hace más de 20 años y cuya vigencia ya ha expirado, es casi nula la bibliografía existente sobre la sustitución del agar por fibra de soya para texturizar dietas de lepidópteros y menos aún en su uso para infecciones masivas con baculovirus.

### **Contenedores**

Un aspecto importante que se debe considerar para la producción *in vivo* es el uso de contenedores o recipientes que permitan una adecuada distribución de los insectos, la dieta y mantengan condiciones de temperatura y humedad homogéneas que sean óptimas para el desarrollo del insecto hospedero. Para la reducción de costos, se deben considerar tanto el tamaño de los mismos como la densidad de larvas que se introducirán en el sistema (Shapiro, 1986). Altas densidades del insecto en un mismo contenedor pueden provocar una

mayor susceptibilidad a enfermedades y por consiguiente una reducción en los rendimientos, por ejemplo, en *L. dispar* cuando la densidad por contenedor se incrementó de 10 a 14 larvas se obtuvo una menor productividad (Shapiro *et al.*, 1986). Esta densidad larvaria es muy importante en especies que tengan comportamiento caníbal o necrófago.

### **Formulación de los baculovirus y su almacenaje**

Las formulaciones adecuadas podrían facilitar la manipulación y aplicación de productos bioinsecticida por agricultores acostumbrados a tratar con productos químicos (Castillejos *et al.*, 2002). La producción y formulación de los bioinsecticidas puede repercutir de manera importante en la estabilidad de las propiedades insecticidas del principio activo (BVs). Las formulaciones líquidas y sólidas (ej., polvos mojables, gránulos y microencapsulados) son las que hasta el momento se han desarrollado para la comercialización de los BVs (Cory y Bishop, 1995). Aunque las formulaciones líquidas son las más comúnmente utilizadas debido a su fácil elaboración y bajo costo, los formulados granulares y polvos mojables han dado buenos resultados (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Villamizar *et al.*, 2010).

### **Formulaciones sólidas**

Las formulaciones sólidas tienen como objetivo principal mejorar su uso y protegerlo de factores ambientales (Cory y Bishop, 1995). La liofilización es un proceso que provee alta estabilidad al formulado y se basa en la congelación y deshidratación bajo vacío de la suspensión viral. La pastilla obtenida se muele y almacena (Claus y Sciocco de Cap, 2001). Los NPV de *L. dispar*, *O. pseudotsugata*, y *S. littoralis*, han sido producidos y comercializados utilizando este tipo de formulación (Shapiro, 1981; Margtinoni, 1978; McKinley *et al.*, 1989). Cabe destacar que la liofilización de grandes volúmenes de suspensiones virales sigue siendo costosa y lleva mucho tiempo para su procesamiento (Claus y Sciocco de Cap, 2001). Al respecto se han implementado otro tipo de técnicas para la obtención de polvos como es la deshidratación por presión, la cual se basa en el secado de gotas de una suspensión viral utilizando aire caliente seco. Algunos ejemplos de NPVs que se han formulado de esta manera son los de *A. californica*, *Tricoplusia ni*, *Helicoverpa zea* y *A. gematalis* (Jones *et al.*, 1993, Hunter-Funjita *et al.*, 1998); sin embargo, hay

antecedentes que confirman la inestabilidad en otras especies de virus sometidos a este proceso (Cunningham *et al.*, 1978; Young y Yearian, 1986).

El uso de formulaciones granulares también se encuentra documentado, incluso en el uso con otro grupo de patógenos (cepa de *Bacillus thuringiensis*) usados para el ataque del barrenador de la caña de azúcar. Por otro lado, la microencapsulación es otro método que actualmente ha cobrado interés. Por ejemplo, Gómez *et al.* (2013) observaron que un microencapsulado elaborado con base en el SfMNPV y un polímero (ácido metacrílico) provocaron una mortalidad larvaria de *S. frugiperda* mayor a 70 % en cultivos de maíz. Además, una de las ventajas de este tipo de formulados es que pueden actuar como protectores de la luz UV (Gifani *et al.*, 2015). El uso de polvos es otra alternativa para las formulaciones sólidas; sin embargo, son menos comunes debido a la necesidad de mantenerlos muy secos y por el riesgo de su inhalación por parte del agricultor (Claus y Sciocco de Cap, 2001).

### **Formulaciones líquidas**

El agua es el portador más utilizado en las formulaciones líquidas de BVs. El uso de otras sustancias, como los aceites, también se utilizan con la finalidad de obtener emulsiones que mantengan al virus en mejores condiciones y evite su precipitación durante el almacenaje y su evaporación después de ser aplicado en campo. La glicerina es otro compuesto que se ha utilizado a los formulados líquidos; por ejemplo, el producto comercial Virin-Gyap® para el control de *L. dispar*, incluye a este compuesto (Williams y Cisneros 2001). Otras de las ventajas del uso del agua como portador es que puede combinarse con una serie de coadyuvantes (ej., surfactantes, adherentes, fotoprotectores y algunos potenciadores) que facilitan la aspersion y/o incrementan su efecto en campo. Además, se han realizado diversas pruebas para mejorar la calidad de un formulado líquido, por ejemplo, para liberarse del tegumento no degradado se han realizado procedimientos adicionales de semi-purificaciones y micro filtraciones (datos no publicados, Parnell y Jones), e incluso para reducir la carga bacteriana se han sometido muestras de formulaciones a altas temperaturas (50°C) y ultrapresión (550-580 MPa) por 30-120 min (Butz *et al.*, 1995).

### **Almacenamiento de las formulaciones**

Los productos comerciales a base de BVs pueden pasar un periodo largo almacenados hasta el momento de su aplicación en campo, debido a ello es indispensable que durante ese periodo de tiempo el producto se mantenga estable y no experimente pérdida significativa en la viabilidad del virus o descomposición de otros componentes de la formulación. Así mismo, periodos prolongados pueden provocar cambios importantes en la composición física del formulado, como por ejemplo, sedimentación o agregación de virus en suspensiones o endurecimiento de polvos (Cory y Bishop, 1995; Williams *et al.*, 2002). En general, cualquier insecticida se almacena durante periodos largos a temperaturas de entre 35 y 40 °C, sobre todo en países tropicales. En el caso de los BVs se recomienda mantenerlos bajo refrigeración o incluso bajo congelación, sobre todo si estos permanecerán largos periodos bajo almacenamiento; sin embargo, estas condiciones pueden ser costosas y no prácticas para los agricultores (Margitoli, 1978; Shapiro, 1982). Las presentaciones en polvo de los BVs se pueden conservar a temperatura ambiente por periodos algo superiores a las formulaciones líquidas. No obstante, el almacenamiento dependerá del tipo de virus, calidad de la producción y proceso de obtención del formulado. Por ejemplo la preparación seca del producto comercial TM Biocontrol-1<sup>®</sup> para controlar a *O. pseudotsugata* puede permanecer bajo almacenamiento hasta cinco años (Margitoli, 1978), mientras que otros productos a base de NPV de *Orgyia leucostigmata* (Smith) perdieron hasta un 46 % de efectividad cuando se almacenó durante dos años (Cowan *et al.*, 1986). En general, aunque se han realizado varios esfuerzos por mantener la efectividad de formulaciones líquidas a base de BVs, incluyendo aceites vegetales y minerales o de, cacahuate, no se ha logrado mantener la efectividad del bioinsecticida cuando este se almacena por periodos hasta de un año (Bathista-Filho *et al.*, 1991).

### **Factores que afectan el almacenamiento**

El mantenimiento de la eficacia y estabilidad de las formulaciones bajo condiciones de almacén es uno de los principales objetivos para el éxito de los bioinsecticidas (Williams y Cisneros, 2001; Tamez-Guerra *et al.*, 2006); sin embargo, son pocos los procesos conocidos que conducen a la pérdida del grado de su virulencia durante su almacenamiento (Lasa *et al.*, 2008). Uno de los factores importantes es prevenir o minimizar la proliferación de microorganismos contaminantes y el alto contenido de lípidos que pueden acelerar los



procesos de auto-oxidación, reacciones que podrían reducir fuertemente las propiedades insecticidas del patógeno (Lasa *et al.*, 2008).

La liberación de grasas de los tejidos del insecto durante el proceso de producción parecen ser uno de los factores implicados en los procesos de autooxidación y generación de radicales libres (RLs) (Ignoffo y García, 1994). Los RLs son moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en su orbital más externa; confiriéndoles una alta reactividad química y la capacidad de sustraer electrones de otras moléculas, generando así una reacción en cadena (Avello y Suwalsky, 2006). Estas moléculas tienen la propiedad de producir daño oxidativo a los lípidos, proteínas y son capaces de alterar la estructura de los ácidos nucleídos (Ignoffo y García, 1994). Al respecto, Lasa *et al.* (2008) observaron la degradación del material genético de una formulación líquida del SeMNPV después de su almacenamiento por 18 meses a 25 ° C, mientras que el ADN se mantuvo intacto cuando el formulado se almacenó a 4°C durante el mismo periodo. Estos autores sugirieron que la presencia de RLs podría estar implicada en dicha degradación, por lo tanto la estabilidad de un formulado de baculovirus podría mejorarse mediante la reducción de la cantidad de grasas insaturadas y reducción de la disponibilidad de oxígeno (Lasa *et al.*, 2008). Debido a ello, la exploración de compuestos que puedan contribuir a mejorar la estabilidad de los BVs a temperaturas superiores a los 4°C y durante periodos prolongados, es actualmente objeto de estudio.

Los flavonoides (galato de propilo, manitol, catequina, entre otros) son parte del grupo de los polifenoles que actúan como oxidantes y su función radica en secuestrar a los RLs (Pérez, 2003). Otros compuestos salinos, como el ascorbato de sodio o los derivados del furano como el ácido ascórbico, desempeñan también dicha acción antioxidante. Ignoffo y García (1994) sugirieron que el uso de antioxidantes de tipo polifenol pueden conferir hasta un 99% de protección de los OBs cuando son expuestos a los rayos UV, lo anterior basado en la hipótesis de que el incremento de RLs causan una reducción en la actividad biológica de los OBs, los cuales se liberan por la acción de los rayos UV (Ignoffo y García, 1994).

## Referencias

- Ahrens, C. H., R. L. Q. Russell, C. J. Funk, J. T. Evans, S. H. Harwood, y G. F. Rohrmann. 1997. **The sequence of the *Orgyia pseudotsugata* multinucleocapsid nuclear polyedrosis virus genome.** Virology (229): 381-399.
- Avello, M., y M. Suwalsky. 2006. **Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección.** Atenea (Concepción) (494): 161-172.
- Azidah, A. A., y A. Sofian-Azirun. 2006. **Life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants.** Bulletin of Entomological Research (96): 613-618.
- 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(2): 113-120.
- Batista-Filho, A. B., N. T. Augusto., S. B. Alves, y P. B. Cruz. 1991. **Efficiency of baculovirus anticarsia in the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner.** Pesticidas. Revista Técnico Científica.
- Belda, J. E., E. Miraso, A. Escribano, S. Rapallo, y P. Caballero. 1994. **Eficacia de nucleopoliedrovirus (VPNSe) en el Control de *Spodoptera exigua* (Hubner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) en pimiento de invernadero.** Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas 26(4): 619-628.
- Berdegú, M., S. R. Reitz, y J. T. Trumble. 1998. **Host plant selection and development in *Spodoptera exigua*: do mother and offspring know best?** Entomologia Experimentalis et Applicata 89(1): 57-64
- Bell, M. R. 1991. **Effectiveness of microbial control of *Heliothis spp.* development on early season wild geraniums: field and cage tests.** Journal of Economic Entomology 84(3): 851-854.
- Beutelspacher, B. C., y M. Balcázar. 1999. **Lepidoptera.** En: Deloya, L.C. y J. Valenzuela (eds.). Catálogo de Insectos y Ácaros plaga de los cultivos agrícolas de México Sociedad Mexicana de Entomología A.C. Publicaciones Especiales núm. 1 México. pp. 82-98.

- Black, B. C., L. A. Brenan, P. M. Dierks, y I. E. Gard. 1997. **Comercialización of insecticides**. En: L. K. Miller (ed.). *The Baculoviruses*. Plenum Press, New York y London. pp. 341-397.
- Blissard, G. W., y G. F. Rohrmann. 1990. **Baculovirus diversity and molecular biology**. *Annual Review of Entomology* 35(1): 127-155.
- Braunagel, S. C., Russell, W. K., Rosas-Acosta, G., Russell, D. H., y M. D. Summers. 2003. **Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(17): 9797-9802.
- Butz, P., E. Fritsch, J. Huber, B. Keller, H. Ludwig, y B. Tauscher. 1995. **Ultra-high-pressure decontamination of insect biocontrol preparations**. *Biocontrol Science and Technology* 5(2): 243-246.
- CAB International. 2000. **Crop protection compendium CD**. Global Module 2nd Edition. CAB Internacional, Wallingford, Reino Unido. *Entomology* (100): 117-122.
- Caballero, P., H. K. Aldebis, E. Vargas-Osuna, y C. Santiago-Álvarez. 1992a. **Epizootics caused by a nuclear polyhedrosis virus in populations of *Spodoptera exigua* in southern Spain**. *Biocontrol Science and Technology* 2(1): 35-38.
- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Álvarez, y J. M. Vlak. 1992b. **Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus**. *Biocontrol Science and Technology* 2(2): 145-157.
- Caballero, P., M. F. López, y T. Williams. 2001. **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsectidas en el control biológico de plagas**. Phytoma. S. A., Valencia, España. 520 pp.
- Caballero, P., y T. Williams. 2008. **Virus entomopatógenos**. En: J. A. Jacas y A. Urbaneja (eds.). *Control biológico de plagas agrícolas*. Fascículo número 04, Phytoma, España. pp 121-136.
- 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(2): 105-115.

- Camacho, J. E., M. I. Gómez, y L F. Villamizar. 2013. **Efecto de la temperatura y de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda***. Revista Mexicana de Ingeniería Química 12(3): 437-450.
- Carballo, A., R. Murillo, A. Jakubowska, S. Herrero, T. Williams y P. Caballero. 2017. **Co-infection with iflaviruses influences the insecticidal properties of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus occlusion bodies: Implications for the production and biosecurity of baculovirus insecticides**. PloS one, 12(5): e0177301.
- Carson, C. A. 2005. **Microbes in the diet setting**. En: C. A. Carson (Ed.). Insect diets: Science and Technology. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 225-248.
- Castillejos, V., J. Trujillo., L. D. Ortega., J. A. Santizo., J. Cisneros., D. I. Penagos., J. Valle, y T. Williams. 2002. **Granular phagostimulant nucleopolyhedrovirus formulations for control of *Spodoptera frugiperda* in maize**. Biological Control 24(3): 300-310.
- Chapman, J. W. T. Williams, A. M. Martínez, J. Cisneros, P. Caballero, R. D. Cave, y D. Goulson. 2000. **Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* reduce the risk of predation?**. Behaviour, Ecology and Sociobiology (48): 321-327.
- Chen, X., F. J. W. IJkel, C. Z. de A. P. Dominy Marinho, H. Yoshifumi, F. Ouriel, H. Tohru, W. Chung-Hsiung, P. Arumagam, M. Sinnakaruppan, P. J. Krell, Z. J. Hu, y J. M. Vlak. 1999. **Identification, sequence analysis and phylogeny of the *lef-2* gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus**. Virus (65): 21-32.
- Cherry, A. J., M. A. Parnell, D. Grzywacz, y K. A. Jones. 1997. **The optimization of *in vivo* nuclear polyhedrosis virus production in *Spodoptera exempta* (Walker) and *Spodoptera exigua* (Hübner)**. Journal of Invertebrate Pathology 70(1): 50-58.
- Claus, D. J., y Sciocco de Cap, A. 2001. **Producción masiva de baculovirus**. En: Caballero, P., M. López., y T. Williams (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, España. pp. 260-312.
- Clem, J. R., y A. L. Passarelli. 2013. **Baculoviruses: sophisticated pathogens of insects**. PLOS Pathogens 9(11): 1-4 pp.

- Copping, L. G. 2004. **The manual of biocontrol agents (4th Ed.)**. British Crop Protection Council, UK.
- Cory, J., y D. Bishop. 1995. **Use of baculoviruses as biological insecticides**. En: C. Richardson (Ed.) *Baculovirus expression protocols*. Humana Press. Totowa, USA. pp. 277-290.
- Cory, J. S., y J. H. Myers. 2003. **The ecology and evolution of insect baculoviruses**. *Annual Review of Ecology and Systematics* (34): 239-272.
- Cory, J. S., y H. F. Evans. 2007. **Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests**. L. Lacey, and H.K. Kaya, (eds.). Springer. 149-174 pp.
- Cory, J. S. 2010. **Insect Virology**. Caster Academic Press. Norfolk, UK. 419 pp.
- Cowan, D. K., P. V. Vail, M. L. Koi-Yokomi, y F. E. Schreiber. 1986. **Formulation of granulosis virus of *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae): efficacy, persistence and influence on oviposition and larval survival**. *Journal of Economic Entomology* 79(4): 1085-1090.
- Cunningham, J. C. 1978. **Aerial application of spruce budworm baculovirus: tests of virus strains, dosages and formulations in 1977**. Canadian Forestry Service, Forest Pest Management Institute, Department of Fisheries and the Environment, Great Lakes Forest research Centre. 37 pp.
- Daimon, T., S. Katsuma, W. K. Kang, y T. Shimada. 2007. **Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus**. *Archives Virology* 152(9): 1655-1664.
- Dai, X., P. J. Hajos, N. N. Joosten, M. M. van Oers, I. F. W. Ijkel, D. Zuidema, y Pang, M. J. Vlak. 2000. **Isolation of a *Spodoptera exigua* baculovirus recombinant with a 10.6 kbp genome deletion that retains biological activity**. *Journal of General Virology* 81(10): 2545-2554.
- Elvira, S., N. Gorriá, D. Muñoz, T. Williams, y P. Caballero. 2010. **A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production**. *Journal of Economic Entomology* 103(1): 17-24.

- Elvira, S., M. A. Ibargutxi, N. Gorria, D. Muñoz, P. Caballero, y T. Williams. 2013. **Insecticidal characteristics of two commercial *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus strains produced on different host colonies.** Journal of Economic Entomology 106(1): 50-56.
- 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 the United States of America 91(8): 3224-3227.
- Federici, B. A. 1986. **Ultrastructure of baculoviruses.** En: Granados, R. R. y 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.
- Flipsen, J. T., R. M. Mans, A. W. Kleefman, D. Knebel-Mörsdorf, y J. M. Vlak. 1995. **Deletion of the baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene induces early degeneration of malpighian tubules in infected insects.** Journal of Virology 69(7): 4529-4532.
- Fuxa, J. R., A. R. Richter, y M. L. Milks. 2007. **Threshold distances and depths of nucleopolyhedrovirus in soil for transport to cotton plants by wind and rain.** Journal of Invertebrate Pathology 95(1): 60-70.
- Fuxa, J. R. 2004. **Ecology of insect nucleopolyhedroviruses.** Agronomic Ecosystem Environmental 103(1): 27-43.
- García- Maruniak, A., O. H. Pavan, y J. E. Maruniak. 1996. **A variable region of *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences.** Virus Research 41(2): 123-132.
- Gifani, A., R. Marzban, A. Safekordi, M. Ardjmand, y A. Dezanian. 2015. **Ultraviolet protection of nucleopolyhedrovirus through microencapsulation with different polymers.** Biocontrol Science and Technology 25(7): 814-827.
- Gómez, J., J. Guevara, P. Cuartas, C. Espinel, y L. Villamizar. 2013. **Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropod populations in maize.** Biocontrol Science and Technology 23(7): 829-846.

- Granados, R. R., y K. A. Lawler. 1981. **In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection.** *Virology* 108(2): 297-308.
- Granados, R. R., y K. A. Williams. 1986. **In vivo infection and replication of baculoviruses.** En: Granados, R. R.; Federici, B. A. (eds.). *The biology of baculoviruses*. Volumen I. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 89-127. 275.
- Greenberg, M. S., W. T. Sappington, C. B. Legaspi, T. X. Liu y M. Sétamou. 2001. **Feeding and life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants.** *Annals of the Entomological Society of America* 94(4): 566-575.
- Gross, C. H., G. M. Wolgamot, R. L. Q. Russell, M. N. Pearson, y G. F. Rohrmann. 1993. **A 37 kilodalton glycoprotein from a baculovirus of *Orgyia pseudotsugata* is localized to cytoplasmic inclusion bodies.** *Journal of Virology* 67(1):469-475.
- Grzywacz, D., D. Moore, y J. R. Rabindra. 2013. **Mass production of entomopathogens in less industrialized countries.** En: J. A. Morales-Ramos, G. M. Rojas, y I. D. Shapiro (eds.). *Mass production of beneficial organisms*. London. UK. Academic Press. pp. 519-553.
- Gupta, R., J. Raina, y M. Monobrullah. 2007. **Optimization of *in vivo* production of nucleopolyhedrovirus in homologous host larvae of *Helicoverpa armigera*.** *Journal of Entomology* (4): 279-288.
- Harris, R. L. 1989. *U.S. Patent No. 4,840,800*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Hayakawa, T., G. F. Rohrmann, y Y. Hashimoto. 2000. **Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses.** *Virology* 278(1): 1-12.
- Heldens, J. G., E. A. van Strien, A. M. Feldmann, P. Kulcsar, D. Muñoz, D. J. Leisy, D. Zuidema, R. W. Goldbach, y J. M. Vlak. 1996. ***Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus deletion mutants generated in cell culture lack virulence in vivo.** *Journal General of Virology* 77(12): 3127-3134.
- 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(1): 48-57.

- Hoover, K., J. L. Yee, C. M. Schultz, D. M. Rocke, B. D. Hammock, y S. S. Duffey. 1998. **Effects of plant identity and chemical constituents on the efficacy of a baculovirus against *Heliothis virescens***. *Journal of Chemical Ecology* 24(2): 221-252.
- Hoover, K., T. Kenneth., L. Kishida., A. Di Giorgio, J. Workman., S. A. Alaniz., B. D. Hammock, y S. S. Duffey. 2001. **Inhibition of baculoviral disease by plant-mediated peroxidase activity and free radical generation**. *Journal of Chemical Ecology* 24(12): 1949-2001.
- Hoover, K., M. Grove, M. Gardner, D. P. Hughes, J. McNeil, y J. Slavicek. 2011. **A gene for an extended phenotype**. *Science* 333(6048): 1401-1401.
- Hughes, P. R. y H. A. Wood. 1981. **A asynchronous per-oral technique for the bioassay of insect viruses**. *Journal on Invertebrate Pathology* 37(2): 154-159.
- Hunter-Fujita, F. R., P. F. Entwistle, H. F. Evans, y N. E. Crook. 1998. **Insect viruses and pest management**. Wiley, Chichester, Reino Unido.
- Ignoffo, C. M. 1966. **Effects of age on mortality of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* larvae exposed to a nuclear-polyhedrosis virus**. *Journal of Invertebrate Pathology* 8(2): 279-282.
- Ignoffo, C. M., y C. Garcia. 1994. **Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion-bodies of the *Heliothis baculovirus* by simulated sunlight-UV**. *Environmental Entomology* 23(4): 1025-1029.
- Ijkel, W. F., E. A. Van Strien, J. G. Heldens, R. Broer, D. Zuidema, R. W. Goldbach, y J. M. Vlak. 1999. **Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome**. *Journal of General Virology* 80(12): 3289-3304.
- Jacques, R. P. 1985. **Stability of insect viruses in the environment**. En: Maramorosch K. y K. E. Sherman (eds.). *Viral insecticides for biological control*. Academic Press, Nueva York. pp. 285-360.
- 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* 15(17): 1257-1266.



- Johnson, K.S., y G.W. Felton. 2001. **Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco.** *Journal of Chemical Ecology* 27(12): 2579-2597.
- Jones, K. A., A. Westby, P. J. A. Reilly, y M. J. Jeger. 1993. **The exploitation of microorganisms in the developing countries of the tropics.** En: D. G. Jones (ed.). *Exploitation of Microorganisms* Chapman & Hall, London. pp. 343-370.
- Kelly, P. M., y P. F. Entwistle. 1988. **In vivo mass production in the cabbage moth (*Mamestra brassicae*) of a heterologous (*Panolis*) and a homologous (*Mamestra*) nuclear polyhedrosis virus.** *Journal of Virological Methods* 19(3-4): 249-256.
- Lasa, R., P. Caballero, y T. Williams. 2007. **Juvenile hormone analogs greatly increase the production of a nucleopolyhedrovirus.** *Biological Control* 41(3): 389-396.
- Lasa, R., T. Williams, y P. Caballero. 2008. **Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV, Baculoviridae) formulation stored at different temperatures.** *Journal of Economic Entomology* 101(1): 42-49.
- Li, Q., C. Donly, L. Li, L. G. Willis, D. A. Theilmann, y M. Erlandson. 2002. **Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome.** *Virology* 294(1): 106-121.
- Lin, X., Y. Chen, y Z. Z. Yi. 2010. **Baculovirus immediately early 1, a mediator for homologous regions enhancer function in trans.** *Virology* 7(1): 32.
- López, F. M, O. Simón., T. Williams, y P. Caballero. 2003. **Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes.** *Proceedings Biological Sciences* 270(1530): 2249-2255.
- López, J., C. Narváez, C. Rizo. 2004. **Control biológico de insectos mediante virus entomopatógenos.** En: Carballo, M. Guahary, F. (eds.). *Control biológico de plagas agrícolas.* CATIE, Managua, Nicaragua. pp. 56-69.
- Luque, T. 2002. **Organización genómica y evolución.** En: Caballero, P. López, F. M. y Williams T. (eds.). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.* Phytoma. España. pp. 73-94.
- Majima, K., R. Kobara, y S. Maeda. 1993. **Divergence and evolution of homologous regions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus.** *Virology* 67(12): 7513-7521.

- Martignoni, M. E., y P. J. Iwai. 1977. **Thermal inactivation characteristics of two strains of nucleopolyhedrosis virus (Baculovirus Subgroup A) pathogenic for *Orgyia pseudotsugata***. Journal Invertebrate Pathology 30(2): 255-262.
- Martínez, A. M., O. Simón, T. Williams, y P. Caballero. 2003. **Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda***. Entomologia Experimentalis et Applicata 109(2): 139-146.
- McCarthy, C. B., y D. A. Theilmann. 2008. **AcMNPV ac143 (odv-e18) is essential for mediating budded virus production and is the 30th baculovirus core gene**. Virology 375(1): 277-291.
- McKinley, D. J., G. Moawad, K. A. Jones, D. Grzywacz, y C. Turner. 1989. **The development of nuclear polyhedrosis virus for the control of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) in cotton**. Pest Management in Cotton. Ellis Horwood, New York, 93-100.
- Moulton, K., A. Pepper, K. Jansson, y J. Dennehy. 2002. **Proactive management of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to tebufenozide and methoxyfenozide: baseline monitoring, risk assessment, and isolation of resistance**. Journal of Economic Entomology 95(2): 414-424.
- Muñoz, D., J. I. Castillejo, y P. Caballero. 1998. **Naturally occurring mutants are parasitic genotypes in a wild type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua***. Applied and Environmental Microbiology 64(11): 4372-4497.
- Muñoz, D., R. Murillo, P. J. Krell, J. M. Vlak, y P. Caballero. 1999. **Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeSP2) are distinguishable by a hypervariable genomic región**. Virus Research 59(1): 61-74.
- Murillo, R., D. Muñoz, y P. Caballero. 2003. **Host range and biological activity of three *Spodoptera* nucleopolyhedrovirus genotypic variance and the effect of Tinopal LPW on the most active variant**. International Journal of Pest Management 49(2): 147-153.
- Murillo, R. P. 2005. **Influence of genetic diversity of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus on its ecology and insecticidal properties**. Tesis Doctoral.

- Departamento de Producción Agraria. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, España. 165 pp.
- Murillo, R., S. Elvira, D. Muñoz, T. Williams, y P. Caballero. 2006. **Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus islots from greenhouse soils in southern Spain.** *Biological Control* 38(2): 157-165.
- Molina, N., y R. Jiménez. 2007. **Ultraestructura de Baculovirus dione de larvas de *Dione juno andicola* (Bates, 1864) (Lepidoptera) en Ecuador.** *Revista Nicaragüense de Entomología* (67): 7-16.
- Monsma, S., A. Oomens, y G. Blissard. 1996. **The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell to cell transmission of infection.** *Journal of Virology* 10(7): 4607-4516.
- Moscardi, F., L. Leite, y C. Zamataro. 1997. **Production of Nuclear Polyhedrosis Virus of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of virus dosage, host density and age.** *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 26(1): 121-132.
- Ohkawa, T., J. O. Washburn, R. Sitapara, E. Sid, y L. E. Volkman. 2005. **Specific binding of *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus occlusion-derived virus to midgut cells of *Heliothis virescens* larvae is mediated by products of pif genes Ac119 and Ac022 but not by Ac115.** *Journal of Virology* 79(24): 15258-15264.
- Olszewski, J., y L. K. Miller. 1997. **Identification and characterization of a baculovirus structural protein, VP1054, required for nucleocapsid formation.** *Journal of Virology* 71(7): 5040-5050.
- Passarelli, A. L. 2011. **Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections.** *Virology* 411(2): 383-392.
- Pearson, M. N., R. L. Russell, y G. F. Rohrmann. 2001. **Characterization of a baculovirus-encoded protein that is associated with infected-cell membranes and budded virions.** *Virology* 291(1): 22-31.
- Pearson, M. N., y G. F. Rohrmann. 1995. ***Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins.** *Virology* 69(1): 213-221.

- Pérez, C., A. Mercedes, C. M. Jirón Pérez, L. Torres, y A. Cecilia. 2003. **Evaluación de la persistencia del virus de la poliedrosis nuclear (VPN), expuesto a la luz solar en diferentes períodos de tiempo.** (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León.
- Podgwaite, J. D., R. B. Bruen, y M. Shapiro. 1983. **Microorganisms associated with production lots of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar* [Lep.: Lymantriidae].** *BioControl* 28(1): 9-15.
- Possee, R. D., C. M. Grififiths, R. B. Hichman, A. Chambers, F. Murguia-Meca, J. Danquah, A. Jeshtadi y A. King. 2010. **Baculoviruses: biology, replication, and exploitation.** En: S. asgari y K. Johnson (eds.). *Insect Virology*. Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido. 35-57 pp.
- Pullen, S. S., y P. D. Friesen. 1995. **Early transcription of the *ie-1* transregulator gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus is regulated by DNA sequences within its 5' noncoding leader region.** *Journal of Virology* 69(1): 156-165.
- Reid, S., L. Chau, L., y M. M. van Oers. 2014. **Production of entomopathogenic viruses.** *Mass production of beneficial organisms: invertebrates and entomopathogens.* Academic Press, London. UK. pp. 437-582.
- Ribeiro, H. C., y O. H. O. Pavan. 1994. **Baculovirus thermal stability.** *Journal of Thermal Biology* 19(1): 21-24.
- Romanowski, V., y D. P. Ghrinhelli. 2002. **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.
- Rohrmann, G. F. 1992. **Baculovirus structural proteins.** *Journal of General Virology* 73(4): 749-761.
- Rohrmann, G. F., 2008. **Baculovirus Molecular Biology. National Library of Medicine (US).** National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD. 110-142. pp.
- 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(3): 458-468.
- Salvador, R. 2011. **Caracterización biológica y molecular de genes involucrados en la virulencia de baculovirus de importancia agronómica.** Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina. 161 pp.
- Sciocco de Cap, A. 2001. **Biología y patología 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. S. A., Valencia, España. pp. 47-67.
- Shapiro, M. 1986. ***In vivo* production of baculoviruses.** En: R.R. Granados y B.A. Federici (eds.). The Biology of Baculoviruses. Vol.II Practical Application for Insect Control). CRC Press, Boca Raton. pp. 31-61.
- Shapiro, M., D. C. Owens, A. R. Bell, y A. H. Woo. 1981. **Simplified, efficient system for *in vivo* mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus.** Journal of Economic Entomology 74(3): 341-343.
- Shapiro, M., y R. A. Bell. 1982. **Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid.** Annals of the Entomological Society of America 75(3): 346-349.
- Shapiro, M., y R. Argauer. 2001. **Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Economic Entomology 94(2): 339-343.
- Shieh, T. R., y G. T. Bohmfalk. 1980. **Production and efficacy of baculviruses.** Biotechnology and Bioengineering 22(7): 1357-1375.
- Simón, O., T. Williams., M. F. López., M., y P. Caballero. 2012. **Deletion of *egt* is responsible for the fast-killing phenotype of natural deletion genotypes in a *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus population.** Journal of Invertebrate Pathology 111(3): 260-263.
- Sosa-Gomez. D. R., y F. Moscardi. 1996. **Producción de virus patógenos de ácaros empleados en el control microbiano de insectos plaga.** Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires, Argentina. p. 223-236.

- Su, J., O. Lung, y G. W. Blissard. 2011. **The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus lef-5 gene is required for productive infection.** *Virology* 416(1): 54-64.
- Subramanian, S., Santharam, G., Sathiah, N., Kennedy, J. S., y R. J. Rabindra. 2006. **Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus.** *Biological Control* 37(3): 367-374.
- Szewczyk, B., L. Hoyos-Carvajal, M. Paluszek, W. Skrzecz, y M. L. de Souza. 2006. **Baculoviruses re-emerging biopesticides.** *Biotechnology Advances* 24(2): 143-160.
- Tamez-Guerra, P., V. Zamudio, J. L. Martínez-Carrillo, C. Rodríguez-Padilla, R. S. Tamez-Guerra, y R. A. Gómez-Flores. 2006. **Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida.** *Ciencia UANL* 9(2).
- Tanada, Y., y H. K. Kaya. 1993. **Insect pathology.** Academic Press. San Diego, California. 267 pp.
- Theilmann, D. A., G. W. Blissard, B. Boning, J. A. Jehle, D. R. O'reilly, G. F. Rohrmann, y J. M. Vlak. 2005. **Baculoviridae.** En: *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier/Academic Press. pp. 177-185.
- Vago, C., K. Aizawa, C. M. Ignoffo, M. E. Martignoni, L. Tarasevitch, y T. W. Tinsley. 1974. **Present status of the nomenclature and classification of invertebrate viruses.** *Journal of Invertebrate Pathology* 23(2):133-134
- Vanarsdall, A. L., V. S. Mikhailov, y G. F. Rohrmann. 2007. **Baculovirus DNA replication and processing.** *Current Drug Targets* 8(10): 1096-1102.
- Van Oers, M. M., y J. M. Vlak. 2007. **Baculovirus genomics.** *Current Drug Targets* 8(10): 1051-1068.
- Villegas, J. M., y N. M. Rosas. 2013. **Visual and gustatory responses of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to artificial food dyes.** *Florida Entomologist* 96(3): 1102-1106.
- Virto, C., D. Navarro, M. M. Tellez, S. Herrero, T. Williams, R. Murillo y P. Caballero. 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., T. Williams, D. Navarro, M. M. Tellez, R. Murillo y P. Caballero. 2016. **Can mixtures of horizontally and vertically transmitted nucleopolyhedrovirus genotypes be effective for biological control of *Spodoptera exigua*?** *Journal of Pest Science* 90(1): 331-343.
- Yang, S., y L. K. Miller. 1998. **Expression and mutational analysis of the baculovirus very late factor 1 (vlf-1) gene.** *Virology* 245(1): 99-109.
- Young, S. Y., y W. C. Yearian. 1986. **Formulation and application of baculoviruses.** En: R. R. Granados y B. A. Federici (eds.). *The Biology of Baculoviruses. Vol. II "Practical Application for Insect Control"* CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 157-179.
- Young, S. 2001. **Persistence of virus in the environment.** En: Baur, M.E., Fuxa, J.R., (eds.), *Factors affecting the survival of entomopathogens.* Southern Cooperative Series Bulletin s-301/s-265. pp. 35-69.
- Wang, Y., y J. A. Jehle. 2009. **Nudiviruses and other large, double-stranded circular DNA viruses of invertebrates: new insights on an old topic.** *Journal of Invertebrate Pathology* 101(3): 187-193.
- Weiss, S. A., B. F. Dunlop, R. Georgis, D. W. Thomas, P. V. Vail, D. F. Hoffmann, y J. S. Manning. 1994. **Production of baculoviruses on industrial scale.** En: *Proceedings of the VIth International Colloquium Invertebrate Pathology.* pp. 440-446.
- Williams, T. y J. Cisneros. 2001. **Formulación y aplicación de los baculovirus bioinsecticidas.** En: P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams (eds.), *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas,* Phytoma S. A., Valencia, España. pp. 313-372.
- Williams, T. 2002. **Diseño y aplicación de los bioinsecticidas basados en baculovirus. 13º Simposio Internacional.** *Control biológico de plagas y enfermedades: agentes microbianos y entomófagos.* Phytoma, España. No 144.
- 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.

- Xu, H. J., Z. N. Yang, J. F. Zhao, C. H. Tian, J. Q. Ge, X. D. Tang, y C. X. Zhang. 2008. ***Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus ORF56 encodes an occlusion-derived virus protein and is not essential for budded virus production.** Journal of General Virology 89(5): 1212-1219.
- Xie, W. D., B. Arif, P. Dobos, y P.J. Krell. 1995. **Identification and analysis of a putative origin of DNA replication in the *Choristoneura fumiferana* multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome.** Virology 209(2): 409-419.
- Young, S. Y., y W. C. Yearian. 1986. **Formulation and application of baculoviruses.** En: The Biology of Baculoviruses. R. R. Granados and B. A. Federici (eds.). Vol. II "Practical Application for Insect Control". CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 157-179.
- Zamora A. N. 2013. **Diversidad genética de aislamientos del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*, su potencial insecticida y actividad de azadiractina contra el gusano soldado.** (Tesis de Maestría inédita). Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Morelia Michoacán, México. 66 pp.
- Zeddani, J. L., A. Pollet, S. Manggoendiharjo, T. H. Ramaadhan, y M. López-Ferber. 1999. **Occurrence and virulence of a granulosis virus *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) population in Indonesia.** Journal Invertebrate Pathology (74): 48-54.
- Ziemnicka, J. 2007. **Mass production of nucleopolyhedrovirus of the satin moth *Leucoma salicis* (LesaNPV).** Journal of Plant Protection Research 48(1): 23-48



#### **IV. HIPÓTESIS**

H<sub>1</sub>. Las características fenotípicas y genéticas de los aislados del SeMNPV procedentes de México difieren en su mismo hospedero y entre distintas zonas geográficas.

H<sub>2</sub>. Las dietas simplificadas a base de texturizantes favorecen la producción masiva del SeMNPV.

H<sub>3</sub>. Los compuestos antioxidantes reducen la degradación del SeMNPV en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente.

## V. OBJETIVOS

### V.I. Generales

Estudiar la actividad biológica y la diversidad genética de cuatro aislados del SeMNPV colectados en dos zonas agrícolas de México. Además, evaluar los aspectos básicos de su producción masiva y formulación del SeMNPV.

### V.II. Particulares

- Caracterizar genéticamente a cuatro aislados del SeMNPV mediante patrones de restricción enzimática y el uso de PCR-RLFP.
- Evaluar la actividad biológica de cuatro aislados del SeMNPV en larvas de segundo estadio de *S. exigua*.
- Evaluar las condiciones de producción masiva del SeMNPV mediante ingestión de alimento de larvas de *S. exigua* en una dieta simplificada a base de texturizantes. Capítulo III.
- Selección de un antioxidante y evaluación del efecto de uno de ellos implicados en favorecer o ralentizar la degradación del virus en condiciones de temperatura ambiental. Capítulo IV.

## **VI. RESULTADOS**

## CAPÍTULO II

### **Genetic and biological characterization of four nucleopolyhedrovirus collected in Mexico for the control of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)**

---

*Journal of Economic Entomology*. 2017 Aug 1; 110 (4):1465-1475.

DOI: 10.1093/jee/tox130

**N. Zamora-Avilés<sup>1</sup>**, R. Murillo<sup>2</sup>, R. Lasa<sup>3</sup>, S. Pineda<sup>1</sup>, J. I. Figueroa<sup>1</sup>, A. Bravo-Patiño<sup>4</sup>, O. Díaz<sup>5</sup>, J. L. Corrales<sup>6</sup>, and A. M. Martínez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarimbaro, Km 9.5 Carretera Morelia Zinapécuaro, Michoacan, HI 58880. Mexico.<sup>2</sup>Instituto de Agrobiotecnología, CSIC-Gobierno de Navarra, Av. Pamplona 123, Navarra, HI 31192. <sup>3</sup>Instituto de Ecología AC, Xalapa, 351 Carretera antigua a Coatepec, Veracruz, HI 91070. Mexico.<sup>4</sup>Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarimbaro, Km 9.5 Carretera Morelia Zinapécuaro, Michoacan, HI 58880. Mexico.<sup>5</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, 64 Álvaro Obregón st, San Luís Potosí, HI 78000. Mexico. <sup>6</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa, Prolongación Josefa Ortiz de Domínguez st, Sinaloa. HI 80040. Mexico.

### Abstract

This study describes four multiple nucleopolyhedrovirus isolates recovered from infected larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on crops in two different geographical regions of Mexico. Molecular and biological characterization were compared with characterized *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) isolates from United States (SeUS1 and SeUS2) and Spain (SeSP2). Restriction endonuclease analysis of viral DNA confirmed that all Mexican isolates were SeMNPV isolates, but they showed molecular differences between them and the reference isolates by using PCR combined with restriction fragment length polymorphism (RFLP). Amplification of the variable region *V01* combined with RFLP distinguished the two Mexican isolates, SeSLP6 and SeSIN6. *Bgl*III digestions showed that the majority of the isolates contained submolar bands indicating the presence of genetic heterogeneity. Amplification of the variable regions *V04* and *V05* distinguished between American and the Spanish isolates. Biological characterization was performed against two laboratory colonies, one from Mexico, and another from Swiss. Insects from Se-Mex colony were less susceptible to infection than insects from Se-Swiss colony. In Se-Mex colony, SeSP2 was the most pathogenic isolate followed by SeSIN6, although their virulence was almost similar to most of the isolates tested. In Se-Swiss colony, similar values of LD<sub>50</sub> were observed for the five isolates, although the virulence was higher for SeSLP6 isolate, which also had the high OB yield production. We conclude that the native isolates SeSIN6 and SeSLP6 possess insecticidal traits to be explored as biopesticides for the control of populations of *S. exigua*.

**Keywords:** Baculovirus, genetic, variability, SeMNPV, activity.

## Introduction

Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), is a polyphagous pest of worldwide importance that feeds on various agricultural crops (Smagghe et al. 2003). Although it is originally from south-eastern Asia, this insect is now a cosmopolitan pest that is particularly abundant in North and Central America, Africa, Australia, southern Asia and Europe (CAB International 2000, Zheng et al. 2011). In the north-west and central region of Mexico, *S. exigua* represents the second most destructive insect pest of tomato, sweet pepper, cotton, and chilies (Osorio et al. 2008), and is responsible for an estimated 20–25% of the total yield losses attributed to insects (Gastelum 2004). The main method of control of *S. exigua* is based on the use of broad-spectrum insecticides. However, several studies have shown that this insect has developed high levels of resistance to many active ingredients (Osorio et al. 2008, Sayyed et al. 2012). For this reason, significant efforts have been made to identify the natural enemies of *S. exigua* and in some cases, to evaluate their potential as alternative control methods (Alvarado-Rodriguez 1987, Trumble and Alvarado-Rodriguez 1993).

Baculoviruses are natural control agents of a wide range of insect pests. Due their high specificity and high virulence a number of these viruses have been used as biological insecticides (Hunter-Fujita et al. 1998, Moscardi 1999). The *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) plays an important role in regulating its natural host (Gelernter and Federici 1990, Caballero et al. 1992a) and has been isolated from different regions of the world (Kolodny-Hirsch et al. 1993, Hara et al. 1995, Hunter-Fujita et al. 1998). SeMNPV is of particular interest for the bioinsecticide industry due to its very high pathogenicity, fast speed of kill, and total specificity (Smits and Vlak 1987, Ijkel et al. 1999). For this reason, SeMNPV has been produced and commercially registered in several countries for control of *S. exigua* populations both in open-field (Smits and Vlak 1994, Kolodny-Hirsch et al. 1997) and greenhouse crop systems (Smits and Vlak 1987, Bianchi et al. 2002, Lasa et al. 2007).

Genotypic variation is common among baculoviruses (Cory and Myres 2003, Erlandson 2009), especially in *Alphabaculoviruses* (nucleopolyhedrovirus, NPV), which is a genus with many more species (Jehle et al. 2006). The genus *Betabaculovirus* species

(granulovirus, GV) are far less variable than NPVs (Espinel-Correal et al. 2010); however, various genotypes have been found in isolates from the same host species (Smith and Crook 1988, Eberle et al. 2009; Espinel-Correal et al. 2010), from closely related host species (Arif et al. 1986) and from host species belonging to different genera collected in the field (Goto et al. 1992).

High levels of genotypic variation have been observed in natural SeMNPV populations originating from groups of virus-killed larvae collected in the field (Muñoz et al. 1999) and isolates from greenhouse soils (Murillo et al. 2007). For example, four different genotypes (SP2-A to SP2-D) were obtained by cloning from the Almerian (Spain) field isolate SeMNPV-SP2 (Muñoz et al. 1999). Seven genotype variants were identified in a Florida SeMNPV isolate (Se-US2) (Muñoz et al. 1998) and nine in soil samples obtained from greenhouses in Almeria, Spain (Murillo et al. 2007).

In general, phenotypic heterogeneity often reflects important differences in the genotypic characteristics (Muñoz and Caballero 2000, Hodgson et al. 2001, Cory and Myers 2003, Serrano et al. 2015). In this study, we refer to pathogenicity as the capacity of the virus to enter the host, establish infection, reproduce, and cause death, whereas virulence is taken to mean the time elapsing between initial infection and the after death of host (Thomas and Elkinton 2004). The genomic regions V01, V04, and V05 (contain the homologous region *hr1*, *hr2*, and *hr3*, respectively) were previously described as regions of high variability of the SeMNPV genome involved in the generation and maintenance of genotypic variability (Heldens et al. 1996, Muñoz et al. 1998, Dai et al. 2000, Murillo et al. 2006b).

The selection of indigenous isolates that are suitable for development as biological control agents requires the characterization of the isolate present in each geographical region (Figueiredo et al. 2009). To our knowledge, there are no references available about the genetic and phenotypic studies of indigenous SeMNPV isolates from *S. exigua* larvae collected from agricultural crops in Mexico. The present study aimed to determine the molecular characterization of four Mexican SeMNPV isolates extracted from virus-killed larvae collected in the field and compared with Spanish and North America isolates that has been previously characterized. This characterization was determined by PCR and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) using three variable regions of SeMNPV

genome. We also compared the biological activity of the isolates in terms of medium lethal doses ( $LD_{50}$ ), mean time to death (MTD) and OBs (occlusion bodies) yield. This information will be of great value when evaluating the use of new SeMNPV isolates in a control program targeted at *S. exigua* in Mexico.



## Materials and Methods

### Insect rearing

Larvae of *S. exigua* were obtained from two laboratory colonies. One of them, named Se-Mex, was established in the Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales of the Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (IIAF-UMSNH), Mexico, with pupae received from the Instituto de Ecología AC, Xalapa, Veracruz, Mexico. This colony was started two years before using field-collected larvae from the northeast of Nuevo León, Mexico. The second colony, named Se-Swiss, was established at the Universidad Pública de Navarra, Spain (UPNA), with virus-free pupae supplied by the company Andermatt Biocontrol (Grossdietwil, Switzerland). Both colonies were maintained in growth chambers at  $26 \pm 2$  °C, 16h: 8h L: D,  $75 \pm 5$  % RH, using a soybean-based semi-synthetic diet adapted from Hoffman's tobacco hornworm diet (Hunter-Fujita et al. 1998).

### Viruses isolates and amplification

Isolates were obtained from *S. exigua* larvae collected from chile or tomato crops located in the states of Sinaloa and San Luis Potosí, Mexico, in 2006 and 2008. Collected larvae were individually confined in 28.41 ml plastic cups provided with artificial diet and then carried to IIAF-UMSNH. Those larvae showing typical symptoms of baculovirus infection were individually stored at -20 °C after death. To facilitate collections of OBs, cups containing dead infected larvae were placed in a -20 °C freezer until completely frozen. The frozen cadavers were placed individually in 1.5 ml plastic microtubes. For OBs purification the virus-killed larvae were homogenized in 0.1 % (wt/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) and centrifuged at 90 g for five min to remove cell debris. After that, the supernatant was centrifuged at 3000 g for 10 min. The pellet comprising OBs was resuspended in sterile distilled water and counted in a Neubauer Improved chamber (Hunter-Fujita et al. 1998) under a phase contrast microscope ( $\times 400$ ), and stored at 4 °C prior to use. Fresh OB stock was obtained for each isolate by amplification in *S. exigua* fourth instars larvae from the Se-Mex colony using the droplet feeding method (Hughes and Wood 1981). Briefly, 45 fourth instar larvae were fed with 6453 OBs/ml (Murillo et al. 2003) and reared under standard conditions until death. OBs from cadavers were purified as described above.

Samples were identified taking into account either the year (2006 or 2008) or the geographical zone of collection (Sinaloa or San Luis Potosí), and named as follows: SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, and SeSLP8. Three SeMNPV isolates were used as reference: the US isolates SeUS1 (Ijkel et al. 1999) and SeUS2 (Muñoz et al. 1998), and the Spanish isolate SeSP2 (Caballero et al. 1992b), which constitute the active ingredients of the NPV-based products commercialized as Spexit<sup>®</sup> (Andermatt Biocontrol, Grossdietwill, Switzerland), Spod-X<sup>®</sup> (Certis Europe, Marseen, Netherlands), and Vir-ex<sup>®</sup> (BIOCOLOR SA, Almeria, Spain), respectively.

### **Viral DNA purification and restriction endonuclease analysis (REN)**

Viral DNA from a pool of larvae was obtained by dissolving  $10^9$  OBs with the addition of 100  $\mu$ l of 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, and 50  $\mu$ l of 10 % (wt/v) SDS and incubating at room temperature for three minutes. Undissolved OBs and other particles were pelleted by centrifugation at low-speed (6000 g) for 5 min. The supernatant containing the virions was incubated with proteinase K at 50°C for 2.5 h. Viral genomic DNA was extracted with phenol and chloroform, precipitated by the addition of 0.1 vol. 3 M sodium acetate (pH 5.2) and two volumes of 96% ethanol, and finally washed with 70% ethanol and suspended in 30  $\mu$ l water (Muñoz et al. 1997). For REN analysis, genomic DNA was mixed with 10 U of *Bgl*III (Promega) and incubated for 4–8 h at 37°C. DNA reactions were electrophoresed in 0.7% TAE (Tris, acetate and EDTA) agarose gels with 0.12  $\mu$ g/ml ethidium bromide at low voltage (20 V) for 14 h.

### **PCR and RFLP analysis of virus DNA**

The genomic regions V01, V04, and V05 were previously described as regions of high variability of the SeMNPV genome involved in the generation and maintenance of genotypic variability (Heldens et al. 1996, Muñoz et al. 1998, Dai et al. 2000, Murillo et al. 2006b). Therefore, specific primers were used for amplification of these regions (Table 2), given an expected amplicon size of 1.5 Kb, 3.7 Kb, and 3.5 Kb, respectively (Murillo et al. 2006b).

PCR amplification was performed in Robo Cycler Grand 96 (Stratagene, Forest City, USA) under the following conditions: 3 min denaturation step at 94 °C, followed by a number of amplification cycles of 94 °C 30 s, 1 min at the annealing temperature adjusted

for each primer pairs (Table 4), an elongation step of 72 °C, which varied according to the predicted length of the amplicon, and an extra extension cycle of 10 min at 72 °C. For the reaction 1 µl DNA was used as template and mixed with 2.5 µl buffer (10x), 1.25 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.25 µl dNTPs mix (10 mM), 0.5 µl of both forward and reverse primers (10 µM), 18.5 µl sterile milliQ water, and 2 units of DNA Biotaq Polymerase (Biolone, London, UK). A 5 µl volume of each PCR product was electrophoresed in 1% agarose gels during 1 h at 80 volts in TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA). Agarose gels were visualized by staining with ethidium bromide in a UV transilluminator GeneSnap (Syngene, San Diego, USA) at 70v for 90 min.

**Table 2.** PCR primers sequences, predicted amplicon size, annealing (Ta) and elongation (Te) temperatures for amplification of SeMNPV genome regions V01, V04, and V05 in the reference SeUS1 genome.

Region	Amplicon (bp) (location in SeUS1)	Amplicon size (Kbp)	Sequence primers	Number of cycles	PCR reaction conditions	
					aT	eT
V01	10255/10373 11742/11763	1.5	Frw 5'-ctttgcatcgtcacctacg-3' Rev 5'-gagatcatcatcgatgaaac-3'	25	58°C 1'	72°C 1'
V04	40169/40188 43915/43934	3.7	Frw 5'-accgccaacattctatcgac- 3' Rev 5'-gcgacgaaacttgaaaaagc-3'	30	53°C 1'	72°C 2'
V05	50128/50147 53678/53697	3.5	Frw 5'-gcgcaacgtaaagcagtaca-3' Rev 5'-gaccgtcaactcatccacct-3'	30	60°C 1'	72°C 2'

The conditions for each variable region that yielded positive amplification were tested two or three times to assure consistency of the results. A negative control lacking DNA-template was included for each run. Approximately 2 ng of amplified DNA were digested using 1 unit of the correspondent restriction enzymes as described by Murillo et al. (2006b): *Bgl*III for V01 region, *Sal*I for V04 region, and *Sal*I and *Hae*III for V05 region according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs, UK). Electrophoresis was performed at 75 V for 2 h as described above.

### Determination of dose–mortality and dose–time

The medium lethal dose (LD<sub>50</sub>) was determined in second instar *S. exigua* larvae from both Se-Mex and Se-Swiss insect colonies. The pathogenicity of SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, SeSLP8, SeUS1, SeUS2, and SeSP2 isolates was determined by the droplet-feeding

method. For this, newly molted second instars were starved for 16–20 h and allowed to drink from an aqueous suspension containing OBs, 10% sucrose, and 0.01% (wt/v) Fluorella Blue. Seven viral doses containing 0.3, 1, 3, 9, 27, 81, and 243 OBs/larva of each viral inoculum were prepared to produce mortalities between 5 and 95%. Five to seven of these doses were selected for statistical analysis as described by Murillo et al. (2006a). The different suspensions and an OB-free solution were supplied to three batches of larvae, each comprising 24 individuals, for each virus treatment. Larvae that ingested droplets within 10 min were individually transferred to 24-well tissue-culture plates containing diet and incubated at  $25 \pm 2$  °C. Mortality was recorded every 24 h for 7 days. Mortality data were subjected to probit regression (POLO-Plus) (Finney 1971). Pathogenicity was expressed as the LD<sub>50</sub> based on an average ingested volume of 0.33 µl per larva in this instar (Chaufaux and Ferron 1986).

Time-mortality response of the all isolates was determined for the dose of 27 OBs/larvae and 6543 OBs/larvae for second and fourth instar *S. exigua*, respectively. Each concentration was previously determined for each isolate which was previously estimated to result ~ 90 % mortality (Murillo et al. 2006a). Batches of 24 individual larvae were inoculated following the droplet feeding method described above and individually transferred to 24-well tissue-culture plates containing diet and reared at  $25 \pm 2$  °C.

The mortality was recorded every 8 h for 7 days. Bioassays were performed independently three times. The mean times to death (MTD) values were estimated using the Generalized Linear Interactive Modeling (GLIM) program with a Weibull distribution specified (Crawley 1993).

### **Determination of OB yield**

Occlusion body production of each isolate was determined in batches of 45 overnight-starved fourth instar larvae inoculated with an OB concentration (6543 OBs/larvae) that resulted in ~ 90% mortality (Murillo et al. 2003). This procedure was only performed in larvae from the Sf-Mex colony. Newly molted *S. exigua* larvae were individually weighed and allowed to drink from aqueous suspensions as described above. Larvae that consumed the inoculum were placed individually on artificial diet and maintained at 25°C. The weight and molting time of individual larvae was registered daily until death to assess the influence

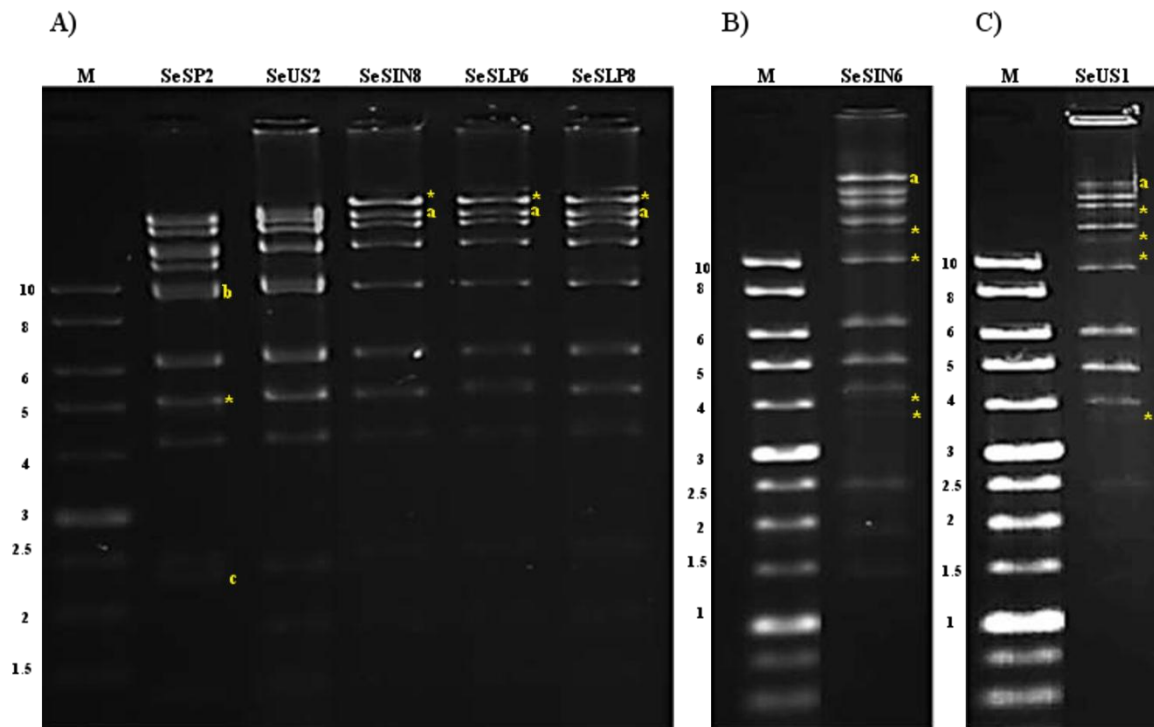
of infection on the development of larvae and OB production. Weight measurements were taken immediately before inoculation in fourth instar larvae and after larvae were checked daily for mortality from 3 days post-infection until death or pupation. When larvae became moribund and showed clear signs of advanced infection, they were individually transferred to clean 1.5 ml vials. The OBs collection was identical to that mentioned above for virus amplification. Three replicates were performed.

OB yields were calculated using 40-45 NPV-killed larvae that were randomly selected for each isolate. OBs were processed and purified as described above. Purified OBs were re-suspended in 1 ml of sterile distilled water and appropriately diluted for titration by triplicate using a Neubauer chamber. Mean values of weight gain, OB yield per larva and OB yield per mg of larvae (using the final weight prior to death) were  $\log_e$ -transformed and subjected to one-way ANOVA, following LSD mean separation test (SPSS, v. 12.0, Chicago, IL).

## Results

### REN analysis of DNA genomic of the seven isolates

Digestion with *Bgl*III resulted in a characteristic DNA profile for the Mexican isolates (SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, and SeSLP8), as indicated by the presence of the marker fragment (a, ~ 25 kb) (Fig. 7A and B), absent in the corresponding profile of the references SeSP2 and SeUS2. Moreover, SeSP2-*Bgl*III isolate showing two *Bgl*III fragments of ~15 and 2.4 kb (Fig. 8 A; letters b and c, respectively), that were absent in the Mexican isolates, whereas SeUS2-*Bgl*III presented a marker fragment of ~9.5 kb that was absent in the Mexican isolates. However, when compares to SeUS1 isolate (Fig.7C), the Mexican isolate *Bgl*III profiles presented a closer pattern of bands, and a number of submolar bands (Fig. 7A, and B). Overall, REN profiles contained a number of submolar bands (Fig. 7A-C), indicating that the isolates comprised genotypic variants in different proportions.



**Fig. 7.** REN profiles with *Bgl*III of DNA from seven isolates. A) SeSP2, SeUS2, SeSIN8, SeSLP6 and SeSLP8; B) SeSIN6; C) SeUS1. Positions of size markers (in kb) are indicated to the right of each image (M). Lettered fragments are RFLP diagnostic fragments for the genotypes (d-f). Asterisks represent submolar fragments visible in the profiles.

### PCR-RFLP analysis of DNA

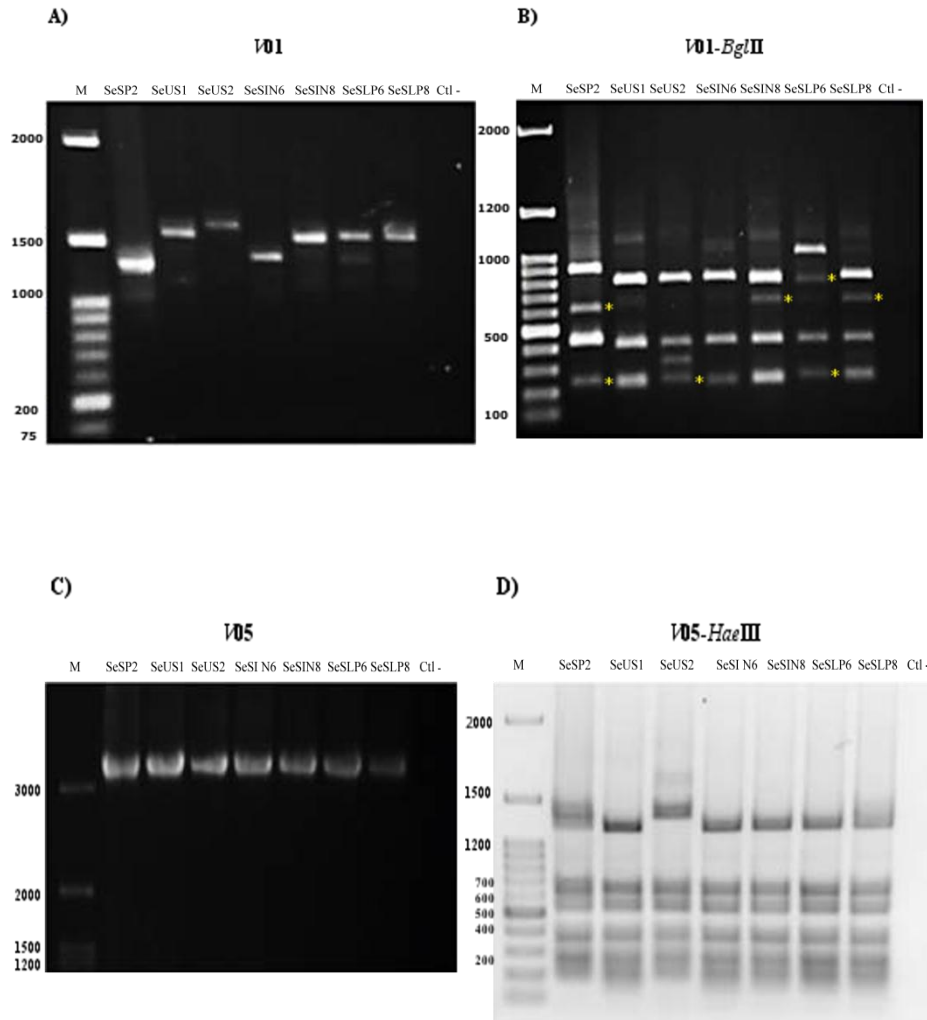
In order to further study the genotypic heterogeneity found in the Mexican isolates by REN analysis, three genomic regions (*V01*, *V04*, and *V05*) were selected among the five SeMNPV regions of high variability described by Murillo et al. (2006) for PCR-RFLP analysis. PCR amplification of the seven isolates studied from Spain (SeSP2), USA (SeUS1, SeUS2), and Mexico (SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, and SeSLP8) showed a single amplicon of ~3.7 kb and ~3.5 kb for the *V04* (data not shown) and *V05* regions, respectively (Fig. 8C). In contrast, four different amplicons sizes were obtained for the *V01* region, ranging from ~1.4 to 1.6 kb (Fig. 8A). SeUS1, SeSIN8, SeSLP6, and SeSLP8 shared a similar ~1.55 kb length amplicon, whereas the SeUS2 produced the largest amplicon of ~1.6 kb, and SeSIN6 and SeSP2 produced two smaller amplicons of ~1.5 and ~1.4 Kb, respectively (Fig. 8A).

The amplification of the *V01* regions followed by *Bgl*III digestion exhibited five different haplotypes (Fig. 8B, Table 3): i) SeSP2 presented two equimolar fragments of ~950 and ~450 bp; ii) SeSIN6 showed three fragments with ~200, 450, and 850 bp, iii) SeUS1, SeSIN8, and SeSLP8 isolates presented equimolar fragments of ~250, 450, and 850 bp; iv) SeUS2 isolate presented equimolar fragments of ~300, 450, and 850 bp, and v) SeSLP6 isolate presented equimolar fragments of ~1100 and 450 bp (Fig. 8B). In addition, all isolates, with the exception of SeUS1, presented submolar fragments in different positions (indicated by asterisks in Fig. 8B).

Amplification of the *V04* region following digestion with *Sal*I (figure not shown) resulted in a common haplotype for US and Mexican isolates (SeUS1, SeUS2, SeSIN6, SeSLP6, and SeSLP8), with equimolar fragments of ~1500, 1150, 700, and 450 bp. Another haplotype was the Spanish isolate (SeSP2), which presented fragments of ~2050, 1800, 1250, and 450 bp. Amplification of the *V05* regions followed by *Sal*I digestion exhibited similar haplotypes as those from *V04* (Table 3), but in the case of the SeSP2 isolate a submolar band of ~1600 bp was observed (figure not shown).

Amplification of the *V05* regions followed by *Hae*III digestion resulted in two different haplotypes: the first included SeSP2 and SeUS2, which presented ~1450, 800, 550, 400 and 300 bp equimolar fragments, and the second included SeUS1 and all Mexican

isolates that showed similar restriction profiles (Fig. 8D, Table 3). No submolar bands were observed in any isolate (Fig. 8D, Table 3).



**Fig. 8.** PCR-RFLP profiles of DNA of seven SeMNPV isolates: SeSP2, SeUS1, SeUS2, SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, and SeSLP8, electrophoresed in a 1% agarose gel. PCR amplicons obtained for (A) V01 (~1.5 Kb), (B) V05 (~3.5 kb) SeMNPV genome regions and the PCR-RFLP combination (C) of V01 region digested with *Bgl* II; (D) V05 digested with *Hae*III. M molecular marker size 1 Kb plus (Promega) or 100 bp plus marker. Asterisk (\*) indicates the location of submolar fragments.



**Table 3.** Amplicon sizes from the five SeMNPV variable regions (V01, V04, and V05) and haplotypes resulting upon amplicon digestion with the enzymes BglIII, EcoRV, HaeIII and SalI (S1).

Isolate	Regions						
	Amplicon size (Kb)	V01	V04	Haplotype	V05	Haplotype	
		Haplotype	Amplicon size (Kb)		Amplicon size (Kb)	SalI	HaeIII
		<i>BglIII</i>		<i>SalI</i>		<i>SalI</i>	<i>HaeIII</i>
SeSP2	1.40	a*	3.7	a	3.5	a*	a*
SeUS1	1.55	b	3.7	b	3.5	b	b
SeUS2	1.60	c*	3.7	b	3.5	b	a
SeSIN6	1.50	e*	3.7	b	3.5	b	b
SeSIN8	1.55	b*	3.7	b	3.5	b	b
SeSLP6	1.55	d*	3.7	b	3.5	b	b
SeSLP8	1.55	b*	3.7	b	3.5	b	b
Numbers of haplotypes		5		2		2	2

\*Haplotype comprising submolar fragments.

### Determination of dose–mortality and dose–time

Laboratory bioassays with second instars of *S. exigua* indicated that insects from the Se-Swiss colony were more susceptible to infection than those from the Se-Mex colony (Table 4). The differences observed between colonies, based on the ratio of LD<sub>50</sub> values, ranged from 5.9-fold for the SeSP2 isolate to 35.5-fold for the SeSLP6 isolate. In both populations, some isolates also differed significantly in their pathogenicity. In the Se-Mex colony insects, SeSP2 was the most pathogenic isolate, while the activity of SeUS1 and SeUS2 isolates was not different to that of the Mexican isolates, based on the overlap of 95% LD values. In the Se-Swiss colony insects, the isolates SeSP2, SeUS1, SeSIN6, SeSIN8, and SeSLP6 were the most pathogenic and no significant differences were observed among them (LD<sub>50</sub>, ranged from 0.94 to 1.7 OBs/larvae). The LD<sub>50</sub> value of SeUS2 was not different from that of SeSLP8. No mortality was observed in the control larvae.

**Table 4.** Probit regression lines of virus induced mortality in second instar *S. exigua* larvae inoculated with seven SeMNPV isolates. Isolates were compared with the reference isolate (SeSP2) originated from virus-killed larvae in Spain.

Isolate	<sup>a</sup> n	Slope ± SE	Intercept ± SE	<sup>b</sup> LD <sub>50</sub> (C.L. 95%) OBs/larvae	<sup>c</sup> χ <sup>2</sup>	<sup>d</sup> Relative potency (C.L. 95%)
<i>Se-Mex colony</i>						
SeSP2	6	1.22±0.09	0.91±0.09	5.6 (4.43-7.01)	1.02	1.00
SeUS1	5	0.90±0.10	-1.26±0.12	25.58 (16.28-46.39)	2.94	0.22 (0.13-0.38)
SeUS2	7	1.38±0.11	-1.83±0.17	21.26 (16.81-26.72)	1.64	0.26 (0.12-0.41)
SeSIN6	5	1.0±0.11	-1.02±0.15	10.58 (5.46-20.04)	5.10	0.39 (0.24-0.53)
SeSIN8	5	1.17±0.16	-1.60±0.23	23.36 (8.12-92.0)	4.98	0.24 (0.14-0.41)
SeSLP6	6	1.93±0.22	-3.0±0.38	35.46 (15.26-66.64)	13.38	0.15 (0.01-0.31)
SeSLP8	7	1.78±0.26	-2.74±0.46	34.90 (21.26-50.0)	5.01	0.16 (0.12-1.54)
<i>Se-Swiss colony</i>						
SeSP2	5	0.96±0.11	0.02±0.11	0.94 (0.15-2.34)	4.79	1.00
SeUS1	5	1.42±0.11	-0.33±0.11	1.70 (1.30-2.56)	0.79	0.56 (0.28-0.87)
SeUS2	6	0.82±0.9	-0.77±0.10	8.85 (6.47-12.33)	3.97	0.11 (0.20-0.41)
SeSIN6	5	1.77±0.17	-0.09±0.09	1.13 (0.89-1.41)	2.78	0.83 (0.41-1.46)
SeSIN8	5	0.89±0.09	0.04±0.10	0.91 (0.50-1.42)	2.41	0.90 (0.59-1.2)
SeSLP6	6	1.23±0.10	-0.26±0.09	1.621 (0.86-2.63)	7.04	0.58 (0.31-0.85)
SeSLP8	6	1.29±0.09	-0.95±0.10	5.48 (3.50-8.47)	7.15	0.18 (0.10-0.44)

Probit regressions were fitted using the PoloPlus program. <sup>a</sup>n = number of virus dosages used, <sup>b</sup>medium lethal dose, <sup>c</sup>Goodness-of-fit of probit model, <sup>d</sup>relative potencies were calculated as the ratio of effective concentrations relative to the SeSP2 isolate. All test for non-parallelism were not significant ( $P > 0.05$ ), exception comparison between SeSP2 and SIN8 isolates in Se-Mex colony.

In second instar *S. exigua* from the Se-Mex colony, MTD values were estimated for virus concentrations that resulted in 80% larval mortality, with the exception of SeUS2 and SeSLP6 isolates that caused 60% larval mortality at 144 hpi. Virus isolates killed infected 2nd instar in a time range of 90-103 h post-inoculation (hpi). SeUS2 was the slowest killing isolate with MTD value of 103 hpi. No significant differences were observed among MTD

values of SeSIN6, SeSIN8, and SeSLP6 isolates (Table 7). However, the latter two isolates had the fastest speed to kill together with SeSLP8, SeSP2, and SeUS1.

**Table 5.** Mean time to death (MTD) values of SeMNPV isolates in *S. exigua* second and fourth instar from two different laboratory colonies originating from Mexico (Se-Mex) and Swiss (Se-Swiss).

Isolates	MTD (h)	<i>Se-Mex</i> colony Fiducial limits (95%)		MTD (h)	<i>Se-Swiss</i> colony Fiducial limits (95%)	
		Low	High		Low	High
<b>Second instar</b>						
SeSP2	91.2 a	87.9	94.5	87.0 a	77.7	89.7
SeUS1	91.9 a	88.9	95.0	83.4 ac	79.8	87.3
SeUS2	103.3 b	99.2	107.5	96.16 b	92.63	99.9
SeSIN6	96.5 c	93.3	99.7	79.7 de	76.0	83.0
SeSIN8	93.0 ac	89.7	96.5	81.0 cd	77.3	84.0
SeSLP6	93.7 ac	89.7	97.7	77.3 e	74.0	81.0
SeSLP8	90.5 a	87.4	93.7	102.0 f	98.0	107.0
<b>Fourth instar</b>						
SeSP2	116.2 ab	112.8	119.6	-	-	-
SeUS1	119.2 ab	116.0	122.6	-	-	-
SeUS2	118.3 ab	114.9	121.6	-	-	-
SeSIN6	110.6 c	109.3	113.8	-	-	-
SeSIN8	117.2 b	113.1	120.8	-	-	-
SeSLP6	109.1 c	105.7	112.5	-	-	-
SeSLP8	111.9 c	108.5	114.9	-	-	-

MTD values within columns for each instar followed by the same letter are not significantly different (Weibull survival analysis,  $P > 0.05$ ).

In the Se-Swiss colony insects, MTD values were estimated for virus concentrations that resulted in 90-97% larval mortality, with the exception of SeUS2 and SeSLP8 isolates that caused 60 and 100% larval mortality at 144 hpi, respectively. In this colony, SeSIN6, SeSIN8, and SeSLP6 isolates had the fastest speed to kill, their MTD values ranged from 77 to 81 hpi. No significant differences were observed in the speed to kill of SeSP2 and SeUS1 isolates. SeUS2 and SeSLP8 were the slowest killing isolates with MTD values of 96 and 102 hpi, respectively.

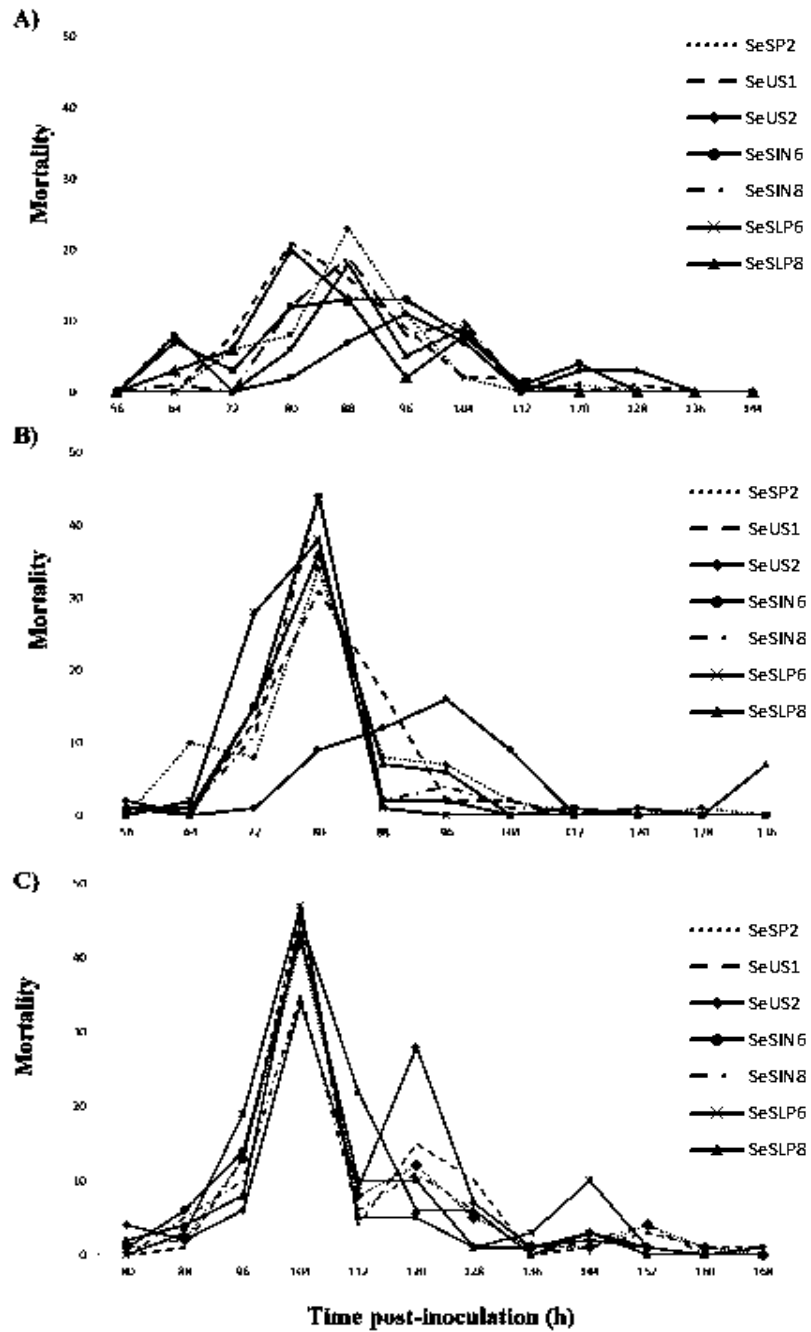
Time–mortality curves of all SeMNPV isolates showed one or two mortality peaks at 80 and 88 hpi for second instars larvae (Fig. 9A, B). The time–mortality patterns were similar among isolates, with the following two exceptions: i) SeUS2 caused the highest

mortality peak at 96 hpi in both insect colonies, and ii) SeSIN6 caused similar mortality peaks in three consecutive times (80, 88, and 96 hpi) in the Se-Mex colony.

The different isolates killed ~70-80% of the fourth instar treated larvae, with exception of SeSIN8 that caused 66% larval mortality. SeSLP6 isolate had the fastest speed of kill, with a MTD value of 109.1 hpi (Table 5). However, the virulence of this isolate was statistically similar to the SeSIN6 (110.6 hpi) and SeSLP8 (111.9 hpi) isolates. The MTD values of the remaining isolates (SeSP2, SeUS1, SeUS2, and SeSIN8) ranged from 116 to 119 hpi. In fourth instar larvae from the Se-Mex colony, the time–mortality curves of all SeMNPV isolates showed one important mortality peak at 104 hpi (Fig. 9A-B), with the exception of US2 that showed a second peak at 210 hpi (Fig. 9C).

### **Production of OBs**

No significant differences were observed in the initial weight of fourth instar larvae at the moment of inoculation ( $F = 1.092$ ,  $df = 6, 258$ ,  $P = 0.367$ ) (Table 6). However, the mean weight recorded prior to death was, in some cases, significantly different among isolates ( $F = 2.90$ ,  $df = 6, 258$ ,  $P = 0.009$ ). The insects with lower weights were those treated with SeSLP6, but this was not significantly different compared with SeSP2, SeSIN6, and SeSLP8 isolates. The OB yield per larva ( $F = 9.18$ ,  $df = 6, 258$ ,  $P < 0.001$ ) and OBs per mg of larva ( $F = 18.26$ ,  $df = 6, 258$ ,  $P < 0.001$ ) varied significantly among isolates. In both cases, the OB yield was significantly highest in the SeSLP6 isolate. Furthermore, SeSLP6-treated larvae tended to have a lower final weight. For OB yield per larva, SeSP2, SeUS1, and SeSIN6 isolates had higher production than SeUS2 and SeSLP8 isolates. No significant differences were observed between SeUS1 and SeSIN8 isolates. In the case of yield of OBs/mg larval weight, SeSP2, SeUS1, and SeSIN6 isolates had the highest yield followed by SeSIN8, SeSLP8, and SeUS2.



**Fig. 9.** Mortality over time following inoculation in second instars Se-Mex (A) and Se-Swiss (B) insect colonies, and in fourth instar Se-Mex insect colony (C) with Mexican isolates (SeSIN6, SeSIN8, SeSLP6, SeSLP8) and the reference SeMNPV isolates (SeSP2, SeUS1, SeUS2).

**Table 6.** Mean larval weight recorded when infected (initial weight) and prior to death, mean occlusion bodies (OB) yield per larva and OBs per mg of larva (considering the weight prior to death) in fourth instar *S. exigua* larvae inoculated with SeMNPV isolates.

Isolates	Initial larval weight (mg) $\pm$ SE	Larval weight prior to death (mg) $\pm$ SE	Total OB per larva ( $1 \times 10^8$ ) $\pm$ SE	OBs per mg ( $1 \times 10^7$ ) $\pm$ SE
SeSP2	10.5 $\pm$ 0.20 a	35.9 $\pm$ 2.32 abc	3.77 $\pm$ 0.33 cd	1.11 $\pm$ 0.09 c
SeUS1	10.8 $\pm$ 0.22 a	39.8 $\pm$ 2.72 bc	3.55 $\pm$ 0.34 bc	0.92 $\pm$ 0.08 c
SeUS2	11.0 $\pm$ 0.22 a	41.1 $\pm$ 2.22 c	2.07 $\pm$ 0.18 a	0.53 $\pm$ 0.04 a
SeSIN6	10.9 $\pm$ 0.26 a	36.3 $\pm$ 1.65 abc	3.41 $\pm$ 0.63 c	0.97 $\pm$ 0.07 c
SeSIN8	10.6 $\pm$ 0.28 a	41.4 $\pm$ 2.62 c	2.80 $\pm$ 0.26 ab	0.70 $\pm$ 0.06 b
SeSLP6	11.1 $\pm$ 0.25 a	31.6 $\pm$ 1.54 a	4.53 $\pm$ 0.30 d	1.44 $\pm$ 0.07 d
SeSLP8	11.2 $\pm$ 0.23 a	34.9 $\pm$ 2.12 ab	2.38 $\pm$ 0.22 a	0.69 $\pm$ 0.05 b

Means within the columns followed by the same letter are not significantly different (LSD tests,  $P > 0.05$ ).

## Discussion

The objective of the current study was determine both the genetic composition and insecticidal activity of four SeMNPV isolates from larvae of *S. exigua* collected in Mexico and compared with three exotic isolates. Restriction endonuclease analysis of the viral genome indicated a similar pattern among seven SeMNPV isolates. However, some differences were observed between Mexican and other isolates. For example, DNA fragment profiles of Mexican isolates showed the presence of an additional fragment and one of them (SeSIN6) presented four submolar bands. REN profiles of SeUS1, SeUS2, and SeSP2 isolates also showed some genetic differences; most evident in SeUS1 that contained five submolar bands, which suggested the presence of different genotypic variants within the isolate (Muñoz et al. 1998, 1999). REN profiles of the three exotic isolates were consistent with those described by Heldens et al. (1996) and Muñoz et al. (1998, 1999).

In addition to analysis of the virus genome, we observed genetic differences in three variable regions (V01, V04, and V05) using the PCR-RFLP method. Variable regions may perform vital functions in the baculovirus replication cycle, because they have been implicated as both transcriptional enhancers and viral replication origins (Possee and Rohrmann 1997, Erlandson 2009). For example, the V01 region that contains the homologous region *hr1* of the SeMNPV genome is considered to be one of the most important genomic regions for generating diversity in NPV populations (Broer et al. 1998, Murillo et al. 2006b, Ikeda et al. 2015).

We observed that in the V01 region most of the isolates were characterized as individual haplotypes. In addition, a greater discriminative capacity by the amplification of this region followed by of *Bgl*III digestion was observed. The majority of the isolates contained submolar bands, most evident in SeSP2 and SeSLP6 isolates that indicate, again, the presence of genetic heterogeneity. DNA amplification from the SeSP2 isolate followed by *Bgl*III digestion was similar to that reported by Murillo et al. (2006b) and Muñoz et al. (1998, 1999). In contrast, profiles of Mexican isolates SeSLP6 and SeSIN6 appeared to be distinct variants of SeMNPV. DNA patterns of SeSIN8, and SeSLP8 isolates were similar to those observed in SeUS1, which could indicated that this virus was introduced into

Mexico, possibly through vertical transmission during southward migration of US host populations (Vasconcelos 1996, Cory et al. 1997). However, to support these hypothesis additional studies, such as sequencing of the Mexican isolates, are needed.

Similar to our study, Murillo et al. (2006b) observed that the region V01 had the highest power of resolution among 11 SeMNPV isolates from North America and Spain, while *PvuI* and *BglIII* digestions of the V02 and V04 amplicons only distinguished two groups; the North American and Spanish isolates (Murillo et al. 2006b). This was also observed in our study, where the restriction enzyme digestions of V04 and V05 amplicons distinguished the same two groups.

Genotypic diversities have been widely reported between and within different geographical isolates of SeMNPV (Gelernter and Federici 1986, Hara et al. 1995, Muñoz et al. 1999, Murillo et al. 2006a). The high level of NPV genotypic heterogeneity may be the result of recombination between different genotypes while co-infecting a single cell (Bull et al. 2001), or alterations occurring during viral DNA replication (Xu et al. 2013, Cory et al. 2005). The persistence of genetic variation in different populations of the same NPV species (Hodgson et al. 2001, Cooper et al. 2003, Murillo et al. 2006a, Eberle et al. 2009), suggested that this heterogeneity is important for virus survival (Cooper et al. 2003). Most importantly, the phenotypic differences between virus variants may alter baculovirus host-population dynamics (Cory et al. 1997).

Genomic differences in the homologous region *hr1* of several cloned variants from Spanish SeMNPV isolates seem to be responsible for differences in their lethal concentrations (Muñoz et al. 1999, Murillo et al. 2006a). Cabodevilla et al (2011) observed phenotypic differences among Europe SeMNPV isolates that later were attributed to changes in 13 open reading frames (ORFs) (Thézé et al., 2014) and deletions of SeMNPV genes named *se4*, *se5*, *se76* and *se129* (Serrano et al., 2015).

In this study, the genetic differences observed among exotic and Mexican isolates, especially in SeSP2, SeUS2, SeSIN6 and SeSLP6, did not always reflect differences in their biological activity or had a systematic effect between both Se-Mexican and Se-Swiss colonies. For example, only the Spanish isolate (SeSP2) was the most pathogenic isolate in the Se-Mex colony, although virulence was almost similar to most of the isolates tested. The Mexican isolate SeSIN6 was the second most pathogenic in the same colony, but its



activity was not different compared with the isolates belonging in a same haplotype (SeUS1, SeSIN8, and SeSLP8). Instead, in larvae from Se-Swiss colony, similar levels of pathogenicity were observed in five of the seven isolates including SeSP2 isolate, although the speed of kill was higher for SeSLP6 isolate. In this colony, SeUS2 and SeSLP8 were the least pathogenic and virulent isolates. Therefore, the variability in the biological activity of these isolates could be related to both genetic changes and/or variation of the host response (Cory et al. 1997, Cabodevilla et al. 2011). Further studies are needed to know the genomic diversity of the Mexican SeMNPV isolates, particularly in the two distinct Mexican variants (SeSLP6 and SeSIN6), and to identify the genes associated with their pathogenic and virulence, including those identified by Serrano et al. (2015).

Some of LD<sub>50</sub> values obtained for Mexican isolates tested in the Se-Mex colony were similar to those determined by Murillo et al. (2006a) (ranged from 20.8 a 54.3 OBs/larvae) for single or mixtures of genotypes of SeMNPV tested on second instars of *S. exigua*. In the same colony, the LD<sub>50</sub> value for SeSP2 (5.6 OBs/larva) was slightly lower than reported by Muñoz et al. (1997) (9.2 OBs/larva) and Lasa et al. (2008) (5-9 OBs/larva). However, the LD<sub>50</sub> value for SeUS2 (21.26 OBs/larva) was two-fold lower than that reported by Muñoz et al. (1998) (49 OBs/larvae). Smits and Vlask (1988) reported a LD<sub>50</sub> value for the SeUS1 isolate of 3 OBs/larva. The reason for some of these differences may be due to bioassay conditions or differences in the genetic background of the insect host (Fuxa 1987).

Unexpectedly, the results of our bioassays clearly showed that healthy-insects from Se-Swiss colony were more susceptible to infection than insects from Se-Mex colony and that their time-mortality curves were different. Possibly these differences were due again to the genetic background of the insects (Cabodevilla et al. 2011). However, other factors that could influence the prevalence of baculovirus infection in laboratory colonies or field populations include the possible interaction with other viral pathogens infecting the same host (Cory et al. 1997), as could be the case of the Se-Mex colony. This interaction has been observed in *S. exigua*, showing a reduction in SeMNPV pathogenicity caused by an iflavirus (order Picornavirales) (Jakubowska et al. 2016), which is a positive single-stranded RNA virus that exclusively infects arthropods (Van Oers 2010) and that possibly has a persistent association with SeMNPV (Jakubowska et al. 2016).

The selection of an isolate as a biocontrol agent requires that geographical variants be tested against an insect population from the locality in which the program is to be run (Escribano et al. 1999). In some NPV systems, the native isolates tend to be more pathogenic to local populations than exotic isolates (Cabodevilla et al. 2011, Barrera et al. 2011). In general, there is an adaptive advantage for the virus to retain high infectivity toward the local population, presumably via the process of host-pathogen coevolution (Escribano et al. 1999; Barrera et al. 2011). Local adaptation is also important because it will maintain polymorphism in host and pathogen population (Cory and Franklin 2012). However, in the present study we observed that the European isolate (SeSP2) was more pathogenic than the other isolates tested against the Se-Mex colony and that the Mexican isolates were of similar activity as the United States isolates.

Similarly, Fuxa (1987) observed that an exotic nucleopolyhedrovirus of *S. frugiperda* (SfMNPV) was significantly more pathogenic towards two different Mexican colonies of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), than a Mexican SfMNPV isolate. Hokkanen and Pimentel (1984) considered that hosts that have been associated with their natural enemies during extended periods are more likely to develop resistance, which may explain, in part, our results and those obtained by Fuxa (1987). However, Fuxa (1987) also reported that this trend was not consistent between the same exotic virus and another Mexican colony collected subsequently, and neither among other exotic SfMNPV isolates and the Mexican colonies. This could indicate that the magnitude of local adaptation in host-parasite systems may vary with ecological, epidemiological or genetic parameters (Adiba et al. 2010). In addition, other authors reported that the phenotypic variation of the viruses may depend of the resource quality and/or to interactions that alter the host immune system (Cory and Franklin 2012; Fleming-Davies et al. 2015) including antiviral activity, phagocytosis and apoptosis responses (Briese 1986; Clem 2005; Ikeda et al. 2015).

In general, the most productive isolates tend to be those with lower virulence in terms of slower speeds of kill (Murillo et al. 2006a, Cabodevilla et al. 2011, Barrera et al. 2011). Although in the present study this was only observed in some cases for fourth instar *S. exigua* (e.g., SeSP2 and USI isolates), whereas we observed one isolate (SeSLP6) with the slowest speed of kill (109 h) and the highest production of OB per mg of larval weight ( $1.44 \times 10^7$ ). This Mexican virus also contained the highest genetic variability, a feature

that may have influenced this result. More studies are needed to determine the effect of genotypic composition on the biological efficacy of this virus.

The OB productivity per larva (range from 2.07 to 4.53 x 10<sup>8</sup>) in this study was in accordance with those observed in fourth instars of *S. exigua* infected with mixed genotype isolates of SeMNPV (~6.5 x 10<sup>8</sup>) (Murillo et al. 2006a). However, these authors observed that the OB productivity per mg larva (range from 1.29 to 1.46 x 10<sup>7</sup>) was slightly higher than those obtained in our study (range from 0.53 to 1.44 x 10<sup>7</sup>). Overall, the parameters OB/larva and OB/per mg of larva are very sensitive to OB dose, duration of infection, growth rate, total weight gain during the infection period, final weight at death, and environmental conditions, among other (Claus and Sciocco de Cap 2001), which could to explain some differences observed between Murillo et al. (2006a) study and ours.

We conclude that the pathogenicity and virulence of SeMNPV isolates can vary according to their host, which may be due to genetic variation in genes that influence insecticidal characteristics. The Mexican isolates SeSLP6 and SeSIN6 might prove suitable as the basis for biological insecticides for control of *S. exigua*. However, more studies are needed to determine the efficacy of these isolates in greenhouse or field conditions.

### **Acknowledgments**

Norma Avilés received financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico. This work was financially supported by the Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. We are grateful to Primitivo Caballero Murillo (Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain) for valuable scientific assistance with molecular characterization of SeMNPV isolates and biological assays in the Se-Swiss colony.

## References

- Adiba, S., M. Huet, and O. Kaltz. 2010.** Experimental evolution of local parasite maladaptation. *J. Evol. Biol.* 23:1195–1205.
- Alvarado-Rodriguez, B. 1987.** Parasites and diseases associated with larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) infesting processing tomatoes in Sinaloa, Mexico. *Fla. Entomol.* 70: 444–449.
- Arif, B. M., Z. Guangyu, and P. Jamieson. 1986.** A comparison of three granulosis viruses isolated from *Choristoneura* spp. *J. Invert. Pathol.* 48: 18–186.
- Barrera, G., O. Simón, L. Villamizar, T. Williams, and P. Caballero. 2011.** *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biol. Control.* 58: 113–120.
- Bianchi, F. J., J. M. Vlak, R. Rabbinge, and W. Van der Werf. 2002.** Biological control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, with baculoviruses in greenhouses: development of a comprehensive process-based model. *Biol. Control.* 23: 35–46.
- Briese, D. T. 1986.** Insect resistance to baculoviruses. pp. 238-259. In: R. R. Granados, and B. A. Federici. *The Biology of Baculoviruses.* (eds.), CRC Press. Boca Raton, FL.
- Broer, R., J. M. Heldens, E. A. Van Strien, R. W. Gol, and J. M. Vlak. 1998.** Identification and characterization of multiple hr-type putative replication origins within the genome of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* 79: 1563–1572.
- Bull, J. C., H. C. J. Godfray, and D. R. O’Reilly. 2001.** Persistence of an occlusion-negative recombinant nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* indicates high multiplicity of cellular infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5204–5209.
- CAB International. 2000.** Crop protection compendium CD. Global Module 2nd Edition. CAB Internacional, Wallingford, Reino Unido. 100: 117–122.
- Caballero, P., H. K. Aldebis, E. Vargas-Osuna, and C. Santiago-Álvarez. 1992a.** Epizootics caused by a nuclear polyhedrosis virus in populations of *Spodoptera exigua* in southern Spain. *Biocontrol Sci. Technol.* 2: 35–38.

- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Alvarez, and J. M. Vlák. 1992b.** Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Sci. Techn.* 2: 145–157.
- Cabodevilla, O., I. Ibañez, O. Simón, R. Murillo, P. Caballero, and T. Williams. 2011.** Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control.* 56: 184–192.
- Chaufaux, J., and P. Ferron. 1986.** Sensibilité différente de deux populations de *Spodoptera exigua* Hub. (Lep., Noctuidae) aux baculovirus et aux pyrèthroides de synthèse. *Agronomie.* 6: 99–104.
- Claus, D. J., and A. Sciocco de Cap. 2001.** Producción masiva de baculovirus. pp. 260–312. *In* P. Caballero, M. López, and T. Williams (eds.), *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.* Phytoma, Spain.
- Clem, R. J. 2005.** The role of apoptosis in defense against baculovirus infection in insects. *Curr. Top. Microbiol.* 289: 113–130.
- Cory, J. S., R. S. Hails, and S. M. Sait. 1997.** Baculovirus ecology. pp. 301–339. *In* L. K. Miller (ed.), *The baculoviruses.* Plenum Press, NY.
- Cory, J. S., and J. H. Myers. 2003.** The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 239–272.
- Cory, J. S., and M. T. Franklin. 2012.** Evolution and the microbial control of insects. *Evol. Appl.* 5: 455–469.
- Cory, J. S., B. M. Green, R. K. Paul, and F. Hunter-Fujita. 2005.** Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *J. Invert. Pathol.* 89: 101–111.
- Cooper, D., J. S. Cory, and J. H. Myers. 2003.** Hierarchical spatial structure of genetically variable nucleopolyhedroviruses infecting cyclic populations of western tent caterpillars. *Mol. Ecol.* 12: 881–890.
- Crawley, M. J. 1993.** *GLIM for ecologists.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
- Dai, X., J. P. Hajós, N. N. Joosten, M. M. van Oers, W. F. Ijkel, D. Zuidema, Y. Pang, and J. M. Vlák. 2000.** Isolation of a *Spodoptera exigua* baculovirus recombinant

- with a 10.6 kbp genome deletion that retains biological activity. *J. Gen. Virol.* 10: 254–554.
- Eberle, K. E., S. Sayed, M. Razapanah, S. Shohai-Estabragh, and J. A. Jehle. 2009.** Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. *J. Gen. Virol.* 90: 662–671.
- Elvira, S., M. A. Ibargutxi, N. Gorria, D. Muñoz, P. Caballero, and T. Williams. 2013.** Insecticidal characteristics of two commercial *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus strains produced on different host colonies. *J. Econ. Entomol.* 106: 50–56.
- Erlandson, A. M. 2009.** Genetic variation in field populations of baculoviruses: mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virol. Sinica.* 24: 458–469.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. D. Cave, J. W. Chapman and P. Caballero. 1999.** Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J. Econ. Entomol.* 92: 1079–1085.
- Espinel-Correal, C., X. Léry., L. Villamizar., J. Gómez., J-L. Zeddám., A. Cotes, and M. F. López. 2010.** Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 7617–7625.
- Figueiredo, E., D. Muñoz, R. Murillo, A. Mexia, and P. Caballero. 2009.** Diversity of Iberian nucleopolyhedrovirus wild-type isolates infecting *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control.* 50: 43–49.
- Finney, D. J. 1971.** Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fleming-Davies, A. E., V. Dukic, V. Andreasen, and G. Dwyer. 2015.** Effects of host heterogeneity on pathogen diversity and Evolution. *Ecol. Lett.* 18: 1252–1261.
- Fuxa, J. R. 1987.** *Spodoptera frugiperda* susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration. *Environ. Entomol.* 16: 218–223.
- Gastelum-Luque, R., H. M. Bravo., J. L. Leyva., C. R. Hernández y A. G. Martínez. 1999.** Evaluación de sistemas de manejo de “gusano soldado” *Spodoptera exigua* (Hübner) y “gusano del fruto” *Heliothis* spp. (Lepidoptera:

- Noctuidae) en tomate en Culiacán Sinaloa. Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Entomología. Sociedad Mexicana de Entomología. pp 447-451.
- Gastelum, L. R 2004.** El papel de los reguladores de crecimiento en el manejo de plagas que atacan tomate y chile. pp. 113–116. *In* Manejo de Plagas en Cultivo de Tomate, Chile y Pepino. Fundación Produce, Sinaloa A.C., Sinaloa, Mexico.
- Gelernter, W. D., and B. A. Federici. 1986.** Isolation, identification and determination of virulence of a *Nucleopolyhedrovirus* from the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). Environ. Entomol. 15: 240–245.
- Gelernter, W. D., and B. A. Federici. 1990.** Virus epizootics in Californian populations of *Spodoptera exigua*: dominance of a single viral genotype. Biochem. Syst. Ecol. 18: 461–466.
- Goto, C., Y. Minobe, and T. Iizuka. 1992.** Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. J. Gen. Virol. 73: 1491–1497.
- Hara, K., M. Funakoshi, and T. Kawarabata. 1995.** *In vivo* and *in vitro* characterization of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Acta Virol. 39: 215–222.
- Heldens, J. G., E. A. Van Strien, A. M. Feldmann, P. Kulcsar, D. Muñoz, D. J. Leisy, D. Zuidema, R. W. Goldbach, and J. M. Vlak. 1996.** *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus deletion mutants generated in cell culture lack virulence *in vivo*. J. Gen. Virol. 77: 3127–3134.
- Hodgson, D. J., A. J. Vanbergen, A. D. Watt, R. S. Hails, and J. S. Cory. 2001.** Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a lepidopteran baculovirus. Evol. Ecol. Res. 3: 687–701.
- Hokkanen, H., and D. Pimentel. 1984.** New approach for selecting biological control agents. Can. Entomol. 116: 1109–1121.
- Hughes, P. R., and H. A. Wood. 1981.** A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. J. Invertebr. Pathol. 37: 154–159.
- Hunter-Fujita, F. R., F. P. Entwistle, H. F. Evans, and N. E. Crook. 1998.** Insect viruses and pest management. Wiley, Chichester, UK.

- Ijkel, W.F., A. E. Van Strien, G. J. Heldens, R. Broer, D. Zuidema, W. R. Goldbach, and M. J. Vlak. 1999.** Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen. Virol.* 80: 3289–3304.
- Ikeda, M., R. Hamajima, and M. Kobayashi. 2014.** Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. *Entomol. Sci.* 18: 1–20.
- Jakubowska, K.A., R. Murillo, A. Carballo, T. Williams, J. W. M. Van Lent, P. Caballero, and S. Herrero. 2016.** Iflavirus increases its infectivity and physical stability in association with baculovirus. *PeerJ.* 4: 1687–1709.
- Jehle, J. A., G. W. Blissard, B. C. Bonning, J. S. Cory, E. A. Herniou, G. F. Rohrmann, D. A. Theilmann, S. M. Thiem and M. J. Vlak. 2006.** On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Arch. Virol.* 151: 1257-1266.
- Kolodny-Hirsch, D. M., D. L. Warkentin, B. Alvarado-Rodríguez, and R. Kirland. 1993.** *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral insecticide for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 86: 314–321.
- Kolodny-Hirsch, D. M., T. Sitchawat, T. Jansiri, A. Chenrchaivachirakul, and U. Ketunuti. 1997.** Field evaluation of a commercial formulation of the *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus for control of beet armyworm on vegetable crops in Thailand. *Biocontrol Sci. Techn.* 7, 475–488.
- Lasa, R., I. Pagola, I. Ibañez, J. E. Belda, T. Williams, and P. Caballero. 2007.** Efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide for beet armyworm in greenhouse of southern Spain. *Biocontrol Sci. Techn.* 17: 221–232.
- Lasa, R., T. Williams, and P. Caballero. 2008.** Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV, Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. *J. Econ. Entomol.* 101: 42–49.
- Moscardi, F. 1999.** Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 257–289.



- Muñoz, D., M. J. Vlak, and P. Caballero. 1997.** *In vivo* recombination between two strains of the genus Nucleopolyhedrovirus in its natural host, *Spodoptera exigua*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3025–3031.
- Muñoz, D., J. I. Castillejo, and P. Caballero. 1998.** Naturally occurring mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4372–4497.
- Muñoz, D., R. Murillo, P. J. Krell, J. M., Vlak, and P. Caballero. 1999.** Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeSP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. Virus Res. 59: 61–74.
- Muñoz, D., and P. Caballero. 2000.** Persistence and effects of parasitic genotypes in a mixed population of the *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. Biol. Control. 19: 259–264.
- Murillo, R., D. Muñoz, and P. Caballero. 2003.** Host range and biological activity of three *Spodoptera* nucleopolyhedrovirus genotypic variance and the effect of Tinopal LPW on the most active variant. Int. J. Pest Manag. 49: 147–153.
- Murillo, R., S. Elvira, D. Muñoz, T. Williams, and P. Caballero. 2006a.** Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain. Biol. Control. 38: 157–165.
- Murillo, R., D. Muñoz, T. Williams, N. Mugeta, and P. Caballero. 2006b.** Application of the PCR–RFLP method for the rapid differentiation of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus genotypes. J. Virol. Methods. 135: 1–8.
- Murillo, R., D. Muñoz, C. Ruíz-Portero, D. M. Alcázar, E. J. Belda, T. Williams, and P. Caballero, 2007.** Abundance and genetic structure of nucleopolyhedrovirus populations in greenhouse substrate reservoirs. Biol. Control. 42: 216–225.
- Murillo, R., M. S. Hussey, and R. D. Possee. 2011.** Evidence for covert baculovirus infections in a *Spodoptera exigua* laboratory culture. J. Gen. Virol. 92: 1061–1070.
- Osorio, A., M. A. Martínez, M. I. Schneider, O. Díaz, L. J. Corrales, C. M. Avilés, and S. Pineda. 2008.** Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. Pest Manag. Sci. 64: 1001–1007.

- Possee, R. D., and G. F. Rohrmann, 1997.** Baculovirus genome organization and evolution, pp. 109-133. *In* L. K. Miller (ed.), *The baculoviruses*, Plenum Press, N.Y., USA.
- Sayed, H. A., M. Naveed, M. Rafique, and M. J. Arif. 2012.** Detection of insecticides resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) depends upon insect collection methods. *Pakistan Entomol.* 34: 7–15.
- Serrano A., P. G. Pijlman, M. J. Vlak, D. Muñoz, and T. Williams. 2015.** Identification of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus genes involved in pathogenicity and virulence. *J. Invertebr. Pathol.* 126: 43–50.
- Smaghe, G., S. Pineda, B. Carton, P. Del Estal, F. Budia, and E. Viñiela. 2003.** Toxicity and kinetics of methoxyfenozide in greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag. Sci.* 59: 1203–1209.
- Smith, I. R. L., and E. N. Crook. 1988.** *In vivo* isolation of baculovirus genotypes. *Virology* 166: 240-244.
- Smits, P. H., and J. M. Vlak. 1988.** Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 51: 107–114.
- Smits, P. H., and J. M. Vlak. 1994.** Registration of the first viral insecticide in the Netherlands: the development of Spod-X based on *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Med. Fac. Landbouww., Rijksuniv. Gent* 59/2A, 385-392.
- Smits, H. P., M. Vrie, and J. M. Vlak. 1987.** Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glasshouse crops. *Entomol. Exp. Appl.* 43: 73–80.
- Thomas, S. R., and J. S. Elkinton. 2004.** Pathogenicity and virulence. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 146–151.
- Thézé, J., O. Cabodevilla, L. Palma, T. Williams, P. Caballero, and E. A. Herniou. 2014.** Genomic diversity in European *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus isolates. *J. Gen. Virol.* 95: 2297–2309.
- Trumble, J., and B. Alvarado-Rodríguez. 1993.** Development and economic evaluation of a IPM program for fresh market tomato production in Mexico. *Agric. Ecosyst. Environ.* 43: 267-284.
- Van Oers, M. M. 2010.** Genomics and biology of iflaviruses. pp. 231-250. *In* S. Asgari and K. Johnson (eds.), *Insect virology*. Caister Academic Press, Norfolk, U. K.

- Vasconcelos, S. D. 1996.** Alternative routes for the horizontal transmission of a nucleopolyhedrovirus. *J. Invertebr. Pathol.* 68: 269–274.
- Xu, Y. P., R. L. Cheng, Y. Xi, and C. X. Zhang. 2013.** Genomic diversity of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus strains. *Genomics.* 102: 63–71.
- Zheng, X. L., P. X. Cong, P. X. Wang, and L. Ch. Lei. 2011.** A review of geographic distribution, overwintering and migration in *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Entomol. Res. Society.* 13: 39–48.

## CAPÍTULO III

### Cool textured diets for use in baculovirus production

---

#### *Biocontrol Science and Technology*

Sometido: ID-CBST-2017-0260

**N. Zamora-Avilés<sup>1</sup>, A. M. Martínez<sup>1</sup>, S. Pineda<sup>1</sup>, A. Bravo-Patiño<sup>2</sup>, J. I. Figueroa<sup>1</sup>, and R. Lasa<sup>3\*</sup>**

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarimbaro, Km 9.5 Carretera Morelia Zinapécuaro, Michoacan, HI 58880. Mexico. <sup>2</sup>Instituto de Ecología AC, Xalapa, 351 Carretera antigua a Coatepec, Veracruz, HI 91070. Mexico. <sup>3</sup>Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarimbaro, Km 9.5 Carretera Morelia Zinapécuaro, Michoacan, HI 58880.

#### **Abstract**

The baculovirus incorporation into semisynthetic diets, have been used for inoculation of large batches of insect larvae reared under gregarious conditions. The preparation of most artificial diets involves heating to dissolve the agar gelling agent followed by cooling to ~ 55-60°C whereupon virus occlusion bodies (OBs) are incorporated into the diet. To avoid exposure of thermolabile OBs to high temperatures, a cool textured diet using soya fiber was evaluated as a simple method to inoculate batches of larvae with the OBs. *Spodoptera exigua* larvae that fed on a diet with 120, 140 or 160 g/l of soya fiber, as a substitute for agar, had a similar weight gain over a 24 h period than larvae that consumed a standard agar diet. The larval weight gain with cool textured diets with 140 g/l of soya fiber was not improved by the addition of chlorophyll, green food die color or by the removal of certain salts. Preliminary tests performed to determine the optimal OBs concentration needed for

inoculation of groups of four instar larvae in agar and soya fiber diets, revealed no virus inactivation in heated diets with a similar optimal concentration of 36 OBs mg<sup>-1</sup> for both diets. Moreover, no significant differences were observed in OB production when each type of diet was used to inoculate groups of 250 larvae reared gregariously in plastic containers. Cool textured diets could be of interest for the production of baculoviruses that require a diet that can be prepared quickly and easily.

**Key words:** cool texturing diets, Baculovirus, mass production, soy fiber.

## Introduction

Baculoviruses have been demonstrated to be effective tools for the control of certain horticultural and forest pests (Hunter-Fujita, Entwistle, Evans, & Crook, 1998; Moscardi, 1999). Several companies and government-funded agencies currently produce baculovirus-based insecticides (Copping, 2004; van Beek & Davis, 2007). Despite recent progress, *in vitro* production of baculovirus is not still feasible for commercial production or may be feasible assuming a low cost medium but very large market would be necessary to obtain an economically profitable system (Claus, Gioria, Micheloud, & Visnovsky, 2012). Additionally, cell lines need to be capable of doubling in short time and to be highly productive, some features that few cell lines have demonstrated (Reid, Chau, & van Oers, 2014). In contrast, *in vivo* production involving the infection of groups of insects from a colony reared on artificial diet has progressed to a cost-competitive status that allows different scales of production (Hunter-Fujita et al., 1998; Lasa, Caballero, & Williams, 2007).

The production of baculoviruses in their hosts has the advantage that these systems can be started without high initial investment costs and using relatively simple technology that can be improved by gradual changes to production process as necessary. However, a key element for the success of this system is quality control, to ensure that production is continuous, homogenous, and efficient (Grzywacz, Moore, & Rabindra 2013). In general, the goal of producing baculovirus in insects is to use host tissue as efficacy as possible for maximal virus replication. For this reason, a considerable amount of research has been performed to determine the optimal parameters for virus production, including larval stage at inoculation, virus dose, method of inoculation, environmental conditions for growth, quality of the virus stock, shape and size of rearing containers (including different materials), and insect diets, among others (Ignoffo, 1973; Granados & Federici, 1986; Shapiro, 1986; Shieh, 1989; Elvira, Gorriá, Muñoz, Williams, & Caballero, 2010a).

One of the most important factors for efficient mass production of baculoviruses is homogeneous mass infection from each batch of larvae. In this regard, when a surface-contaminated diet method is used, a virus acquisition tends to be heterogeneous as some larvae ingest OBs from the surface, whereas other feed from internal parts of the diet that

contain little virus, resulting in a heterogeneous prevalence of infection (R. Lasa pers. obs). To solve this problem, some baculovirus infection systems incorporate the virus into the diet. When the virus is included in an agar gelling diet, OBs are added when the diet has cooled to ~ 55-60°C, a temperature that still permits the diet to be dispensed into containers before solidification. Baculovirus inactivation in diet can occur at temperatures greater than 58 °C (Shapiro, Bell & Owens, 1981). Exposure to elevated temperatures (>60 °C) results in loss of infectivity within a few minutes (Ribeiro & Pavan, 1994). Other studies have also evaluated how the OBs and occluded virions (ODVs) can be inactivated at elevated temperatures (McLeod, Yearian, & Young, 1977; Martignoni & Iwai, 1977). Under these conditions, virus inactivation could vary due to variation in diet temperatures during and immediately after OBs are mixed with the diet, resulting in increased inter-batch heterogeneity in the efficacy of the inoculation process. Moreover, previous results have revealed an improvement of diet attraction and enhance ingestion throughout visual and gustatory responses when green artificial food dyes and chlorophyll are included to diets for *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Villegas & Rosas, 2013).

The present study aimed to explore a simple and cheap method to inoculate larvae using a cool diet with soy fiber that provide proper texture (cool textured diet) in which baculovirus OBs can be included homogeneously without the risk of thermal inactivation. This effect was performed using the Nucleopolyhedrovirus multiple of *Spodoptera exigua* (SeMNPV) and its homologous insect. Growth of larvae on cool diets textured with different concentrations of soya fiber was first compared with an agar-based standard diet. To improve the ingestion of diet, the best concentration of soya fiber was also evaluated with a green color, chlorophyll and without the addition of some salts. An additional study was performed to compare OB concentrations for homogeneous inoculation of larvae using soya fiber diet or agar-based diet. Finally, both diets were evaluated as the basis for a medium scale production system using containers to rear larvae gregariously.

## Material and methods

### Insect rearing, semi-synthetic diets and baculovirus

Larvae of *S. exigua* were obtained from a laboratory colony held at the Instituto de Ecología AC, Xalapa (INECOL), Veracruz, Mexico. This colony was started in 2013 using field-collected larvae from maize in Nuevo León, Mexico. The colony was maintained using a soya-based semi-synthetic diet adapted from Hoffman's tobacco hornworm diet (Hoffman & Lawson, 1964; Hunter-Fujita, Entwistle, Evans, & Crook, 1998) in a growth chamber at  $26 \pm 2$  °C, 16h: 8h light-dark photoperiod,  $75 \pm 5$  % relative humidity. Adults were fed with a 15% honey solution. Brown paper was provided as an oviposition substrate.

The standard agar diet based on Hoffman's tobacco hornworm diet, that used agar-agar Meyer® (Química Suastes, S.A. de C.V., Mexico City, Mexico) for gelatinization, was prepared by dissolving agar in boiling water, adding solid ingredients (wheat germ, soya flour, brewer's yeast and sugar) followed by thorough mixing. The remaining components (vitamins and choline) were added when the mixture had cooled to  $\sim 55$ °C and was thoroughly mixed again. In contrast, the soya fiber diet was prepared by mixing all ingredients (Table 1) together with soya fiber (América Alimentos S.A de C.V., Jalisco, Mexico) in cool water ( $\sim 15$ -20 °C) which was then mixed manually to produce the diet.

Occlusion bodies (OBs) of the SeMNPV-US2 isolate were used to inoculate *S. exigua* fourth instars larvae that were subsequently reared on standard diet until death. Virus-killed larvae were triturated with sterile water and filtered twice through 500  $\mu$ m and 80  $\mu$ m pore size steel mesh to remove debris. OBs were counted using a Neubauer improved chamber (Hawksley, Lancing, United Kingdom) and stored in 600 ml glass jars at 4°C prior to use. Restriction endonucleases analysis confirmed the fidelity of the OB amplification procedure.

### Ingestion of cool texturing diets

In a first experiment, the weight gained by *S. exigua* larvae that fed on different diets during a 24 h period was evaluated. Four different diets were compared: (i) cool textured diet with 120 g/liter of soya fiber, (ii) cool textured diet with 140 g/liter of soya fiber, (iii) cool



textured diet with 160 g/liter of soya fiber, and (iv) standard agar diet. For additional components of both diets see Table 7. The selection of soya fiber concentrations was based on preliminary tests in which the consistency of cool diet was considered to be similar to that of the standard agar diet (data not shown). Diets were prepared with a volume of 100 ml for both diets. Groups of four instar larvae that had molted in previous 6 h period were starved overnight and were individually weighted on a precision electronic balance to an accuracy of  $\pm 0.1$  mg. Larvae weighting between 7 and 11.5 mg were selected for the study. A cube of  $\sim 1.5$  g of each diet was supplied to individualized larvae in a 25 ml plastic cup and covered with a perforated plastic lid. A total of 25 individualized larvae per diet were tested simultaneously. The larvae were kept under laboratory conditions of  $26 \pm 1$  °C, 12 : 12 h light-dark photoperiod and  $70 \pm 10$  % relative humidity during 24 hours. After that period, all larvae were weighted again. The experiment was performed using three different batches of larvae over a one-week period.

**Table 7.** Concentrations and prices of components of both semi-synthetic diets used on experiments.

Ingredients	Standard agar diet		Cool textured soya fiber diet	
	(g/liter)	Cost (US\$/liter)	(g/liter)	Cost (US\$/liter)
Water (ml)	1000	-	1000	-
Agar (g)	14	0.79	-	-
Wheat germ (g)	31.7	0.16	31.7	0.16
Soya fiber (g)	-	-	140	0.37
Soya flour (g)	81	0.15	81	0.15
Brewer's yeast (g)	25	0.10	25	0.1
Sugar (g)	13	0.01	13	0.01
Potassium sorbate (g)	1	0.07	1	0.07
Nipagin (g)	1.6	0.06	1.6	0.06
Ascorbic acid (g)	4.3	0.27	4.3	0.27
Acetic acid 25% (mL)	12	0.24	12	0.24
Choline 15% (mL)	7.3	0.1	-	-
Vitamin mixture*	1	0.14	-	-
Total cost		2.09		1.43

\* Vitamin mixture: 30.8 g niacin, 30.8 g calcium pantothenate, 15.4 g riboflavin, 7.7 g thiamine hydrochloride, 7.7 g folic acid.

**Fagostimulant and attractive color to improve ingestion**

The diet containing 140 g/l soya fiber was selected to evaluate the possible effect on food intake with two diet modifications: (i) the inclusion of liquid chlorophyll (La Naturaleza en Tus Manos SA de CV, Mexico) and (ii) the inclusion of green food dye (McCormick & Co., Inc, USA). Green food dye was selected due a significant larval response to this color observed in preliminary choice tests, compared with red and blue dyes (unpublished data). Three treatments were compared using the 140 g/l soya fiber diet with: (i) 1% (vol./vol.) of liquid chlorophyll, (ii) 1% of green food colorant and (iii) no additional colorants as the control diet. Individualized larvae were allowed to feed on diet for a 24 h period following the procedures described in the previous experiment. Initial and final larval weights were measured in three independent replicates of 25 larvae per diet treatment.

**Reduction of salts to improve ingestion**

In order to simplify the diet, an additional test was performed in which the cool diet was prepared but without the common salts used in the mixture. Three treatments were compared using the cool diet with 140 g/l soya fiber (Table 1): (i) with the absence of potassium sorbate, sodium benzoate and ascorbic acid, (ii) with the absence of ascorbic acid and (iii) the complete cool diet (control). Individualized larvae were allowed to feed on diet for a 24 h period following the procedures described in the previous experiments. Initial and final larval weights were measured in three independent replicates of 25 larvae per diet treatment.

**Optimal concentration of OBs for SeMNPV production**

Two semi-synthetic diets were tested for inclusion of SeMNPV; the standard agar diet and the cool textured diet with 140g/l of soya fiber. Both diets were prepared as indicated above. Four concentrations of SeMNPV OBs were mixed into each diet: 4, 12, 36 and 108 OBs per mg of diet, based on preliminary observations of the concentration-mortality response (data not shown). A stock of  $7.1 \times 10^8$  OBs ml<sup>-1</sup> was used for all experiments. OBs were added to the standard agar diet when it had cooled to ~55°C together with the vitamins and choline content of the diet. In the cool textured diet, OBs were mixed with cool water, prior to mixing all ingredients. Both diets, without the inclusion of OBs, were

used as control diets. A strip (9 x 1 x 1 cm) of diet was placed in a 250 ml circular plastic cup (9 cm diam and 3.5 cm high) covered with nylon mesh for aeration.

Groups of 30 recently molted fourth instars (less than 10 h old) were placed in each cup and allowed to feed during a 24 h period at  $26 \pm 1$  °C. After this time, all diets were replaced by agar standard free-virus diet for an additional period of five days at  $24 \pm 1$  °C for baculovirus replication. All plastic containers were frozen ( $-20$  °C) 6 days after infection to avoid loss of OBs by liquefaction of cadavers due to SeMNPV infection. All the larvae from each container were triturated together in 10 ml distilled water, filtered twice through 500  $\mu\text{m}$  and 80  $\mu\text{m}$  pore size steel mesh to remove debris and OBs were re-suspended in 15 ml sterile water and counted in a Neubauer chamber. Four samples of OBs were counted from each container and averaged for each replicate. A total of six replicates were performed for each diet and concentration treatment.

#### **Semi-massive production of SeMNPV in both diets**

For this experiment, groups of 250 larvae per container were inoculated with OBs production systems. Both diets, standard agar diet and cool textured diet, were prepared with a concentration of 36 OBs  $\text{mg}^{-1}$  diet, determined for both diets in the previous experiment. A strip (21.6 x 2.5 x 1 cm) of diet was placed in a rectangular plastic box (28.5 cm long x 18.2 cm wide and 4.5 cm high) that was covered with a polyvinyl film perforated with a needle for ventilation. Groups of 250 fourth instars (between 10 and 16 h post-molting) were placed in the plastic box and allowed to feed during 24 h at  $26 \pm 1$  °C. Following this period the virus contaminated diet was removed, replaced with non-virus contaminated diet and incubated for an additional period of six days at  $24 \pm 1$  °C. An additional day for virus replication was included in this experiment (7 days), because larvae were a little larger than in the previous test. After incubation, plastic containers were frozen ( $-20$  °C) and all larvae from each container were collected, weighted to obtain the total fresh weight and triturated together in 20 ml of distilled water. The resulting slurry was filtered and OBs were re-suspended in 50 ml sterile water and counted in a Neubauer chamber as described in the previous experiment. A total of six replicates were performed. The time required to prepare 100 ml of each of the diets was also measured on three occasions. The time for diet preparation by one person, was estimated without taking into

account the time needed to weigh the ingredients and the time needed to dispense the diet into the plastic containers because this time was equal for both diets.

### **Statistical analyses**

Mean values of initial and final body weights of larvae that fed on different diets, total larval weight and OB production at different inoculum concentrations were subjected to one-way ANOVA, followed by Tukey's mean separation. Specific comparisons of the larval weight and OBs production for each diet were also compared by *t*-test. OB production per container, OBs/mg of larvae in the production assay, and the time needed for the preparation of each diet, were also compared by *t*-test. OB production values were log transformed prior to analysis. All results were analyzed in STATISTICA V. 10.

## Results

### **Ingestion of cool texturing diets**

No significant differences were observed in the initial weight of recently molted fourth instar larvae selected for experiments ( $F_{3,8} = 1.21$ ,  $P = .368$ ) and similarly no significant differences were observed in the weight gain of larvae ( $F_{3,8} = 1.87$ ,  $P < .213$ ) after 24 hours eating from diets (Table 2A).

### **Fagostimulant and attractive color to improve ingestion**

No significant differences were observed in the initial weight ( $F_{2,6} = 1.00$ ,  $P = .422$ ) or weight gain ( $F_{2,6} = 0.03$ ,  $P = .974$ ) among diets (Table 2B). No phagoestimulant effect, measured as the larval weight gain after 24 h, was observed when chlorophyll or green food dye was included in diets.

### **Reduction of salts to improve ingestion**

No significant differences were observed in the initial weight of larvae ( $F_{2,6} = 2.55$ ,  $P = .157$ ) but significant differences were observed in the larval weight gain after 24 h ( $F_{2,6} = 5.58$ ,  $P = .043$ ) between diets (Table 2C). The absence of ascorbic acid in 140g/l soya fiber diet did not significantly change the larval weight gain after 24 h. In contrast, the absence of salts (potassium sorbate, sodium benzoate and ascorbic acid) significantly reduced in the weight gain of larvae after 24 h when compared with the other two diets.

The weight gain of larvae after 24 h in this test were slightly lower than observed in the two previous experiments (Table 2).

**Table 8.** Initial body weight of recently molted four instar *S. exigua* and final weight after feeding during 24 h in different semi-synthetic diets.

Treatments	Initial weight ± SE (mg)	Final weight ± SE (mg)	n
<b>A. Cool textured diet</b>			
Standard agar diet	9.3 ± 0.1 a	45.1 ± 0.9 a	74
Diet with 120g/l soya fiber	9.5 ± 0.1 a	41.8 ± 0.9 b	74
Diet with 140g/l soya fiber	9.4 ± 0.1 a	42.1 ± 0.7 b	72
Diet with 160g/l soya fiber	9.1 ± 0.1 a	38.8 ± 0.6 c	75
<b>B. Feeding stimulants</b>			
Diet with 140g/l soya fiber	9.4 ± 0.1 a	40.3 ± 0.9 a	70
Diet with 140g/l soya fiber + chlorophyll	9.2 ± 0.1 a	39.0 ± 0.9 a	74
Diet with 140g/l soya fiber 4 + green dye	9.1 ± 0.1 a	38.7 ± 0.8 a	75
<b>C. Effect of salts</b>			
Diet with 140g/l soya fiber	9.1 ± 0.1 a	33.5 ± 0.7 a	75
Diet with 140g/l soya fiber without ascorbic acid	9.5 ± 0.1 a	33.8 ± 0.8 a	73
Diet with 140g/l soya fiber without salts*	9.2 ± 0.1 a	26.7 ± 0.8 b	75

Columns followed by similar letters were not significantly different for comparisons among diets in experiments A, B and C (Tukey's HSD test,  $P > 0.05$ ).

\*Salts include potassium sorbate, sodium benzoate and ascorbic acid.

### Optimal concentration of OBs for SeMNPV production

The weight of larvae that died for infection of SeMNPV was not significantly different between diets at 4 OBs/mg diet ( $t_{(10)} = -1.78$ ,  $P = 0.10$ ), 12 OBs/mg diet ( $t_{(10)} = -0.59$ ,  $P = 0.62$ ), and 36 OBs/mg diet ( $t_{(10)} = 0.24$ ,  $P = 0.81$ ). However, at the highest concentration (108 OBs/mg diet), the weight was significantly higher in the standard agar diet than in the cool textured diet ( $t_{(10)} = -3.53$ ,  $P = 0.005$ ) (Table 9). No significant differences were observed in OB yields between diets for each concentration ( $P > 0.4$  for all analyses) (Table 9). A concentration of 36 OBs/mg of diet was used for the following experiments because this concentration resulted in the highest OB production per container in both diets.

**Table 9.** Means ( $\pm$  SE) of OB production and total larval weight of larvae collected from containers inoculated with a standard agar diet and a cool texturing diet with soya fiber that were inoculated with different OBs concentrations.

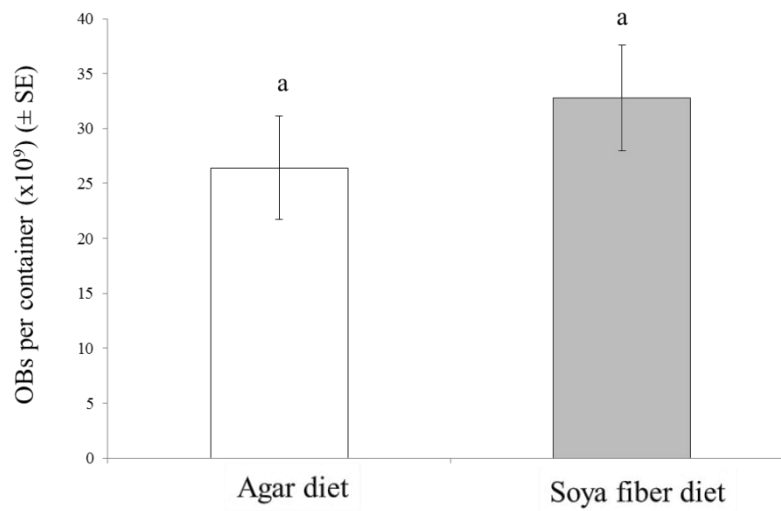
Concentration (OBs/mg diet)	Production OBs/container ( $\times 10^9$ )		Total weight (g)/container	
	Agar diet	Cool textured diet	Agar diet	Cool textured diet
4	4.8 ( $\pm$ 1.2) Aa	6.0 ( $\pm$ 1.4) Aa	4.04 $\pm$ 0.36 Aa	3.05 $\pm$ 0.42 Ba
12	8.0 ( $\pm$ 1.5) Aa	10.4 ( $\pm$ 2.7) ABa	3.52 $\pm$ 0.36 Aa	3.29 $\pm$ 0.42 Ba
36	20.4 ( $\pm$ 12.6) Aa	18.7 ( $\pm$ 5.4) Ba	2.95 $\pm$ 0.29 Aa	3.06 $\pm$ 0.36 Ba
108	8.9 ( $\pm$ 3.8) Aa	12.3 ( $\pm$ 1.8) Ba	3.13 $\pm$ 0.24 Aa	1.95 $\pm$ 0.23 Ab

Values followed by different capital letters in the same column were significantly different (Tukey's HSD test,  $P < 0.05$ ). Values followed by identical lower-case letters are statistically similar for comparisons of a specific concentration in both diets ( $t$ -test,  $P > 0.05$ ).

### Medium scale production of SeMNPV

No significant differences were observed in the total larval weight collected per container from groups of larvae inoculated with standard agar diet ( $6.4 \pm 1.9$  g) and larvae inoculated with the cool textured diet ( $5.1 \pm 2.2$  g) ( $t_{(10)} = 0.501$ ,  $P = 0.286$ ). Moreover, no significant differences were observed in total OB production per container between treatments ( $t_{(10)} = 1.128$ ,  $P = 0.628$ , Fig. 10), or between OB production per mg of larva ( $t_{(10)} = 1.311$ ,  $P = 0.219$ ), for which mean production values were  $6.0 \times 10^6$  OBs/mg of larval weight for the standard diet and  $8.9 \times 10^6$  OBs/mg for the soya fiber diet. A small number of larvae ( $\sim 25\%$ ) were collected at the end of 6 days of infection in both treatments.

The time for the preparation of the standard agar diet ( $8.33 \pm 0.30$  min) was significantly longer than the time required for the cool textured diet ( $3.13 \pm 0.19$  min) ( $t_{(6)} = 16.08$ ,  $P < 0.01$ ). In addition, the methodology for cool textured diet is simpler and reduces energy costs as this diet does not need to be heated during preparation.



**Fig. 10.** Mean OBs production ( $\pm$  SE) obtained per container after larval inoculation with two different virus-contaminated diets. Columns headed by identical letters were not significantly different ( $t$ -test,  $P > 0.05$ ).



## Discussion

Specific studies are necessary for each virus-host system to determine the optimal parameters needed for baculovirus production (Ignoffo, 1973; Granados & Federici, 1986; Shapiro, 1986; Shieh, 1989; Elvira et al., 2010a). The results of production systems can be very variable and it is difficult to uniform all variables during the inoculation, rearing, harvesting and purification processes. Inoculation in mass production systems involves incorporation of OBs within, or onto the surface of a semisynthetic diet (Shapiro et al., 1981). Both methods have been used in production in the past although surface application has been more popular because it is simple, require less inoculum and can be performed separately following diet preparation. The nucleopolyhedroviruses of *Heliothis virescens*, *H. zea* and *T. ni* (Ignoffo 1966; van Beek & Davis, 2007) and *H. armigera* (Grzywacz, Rabindra, Brow, Jones, & Parnell, 2004) have been produced using OB suspensions sprayed on the diet. Curiously, this method has been used when larvae are inoculated individually in small trays or for inoculation of larvae in very low numbers in cups. However, when groups of several hundred larvae were inoculated together in the same container superficial diet contamination by OB treatments usually resulted in heterogeneity in the prevalence of infection and a reduction in the efficacy of OB production (R. Lasa, unpublished results). To solve this problem, OBs were mixed into diet to inoculate groups of 250 *S. exigua* larvae in containers at the pilot production plant for the SeMNPV-based bioinsecticide Virex<sup>®</sup> (Biocolor SA, Almería, Spain) although a relative variation was also observed with this method. The inclusion of OBs into the diet was also used in Brazil to inoculate groups of 300 *Anticarsia gemmatalis* larvae per container in a laboratory production pilot plant established by COODETEC (Cascavel, Parana, Brazil) where ~800,000 larvae were inoculated each day (Moscardi, 2007, R. Lasa pers. obs.).

Variable results in the prevalence of infection in earlier studies, led us to believe that the elevated temperature of the agar gelling diet could be affecting virus integrity resulting in marked inter-batch heterogeneity in OB production. However, our results indicate that the use of a cool textured diet with soya fiber for larval inoculation did not solve this problem, since no significant differences were observed in OBs production or total larval weight, when larvae were inoculated with agar gelling diet or cool textured diet.

Moreover, the variability among replicates, indicated by the standard deviation in OB production was similar for the two different diets.

There are not specific published studies on the effect of high temperatures on SeMNPV inactivation. However, some studies have observed a significantly decrease on the virus activity of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyedrovirus (AgNPV) and *Trichoplusia ni* nucleopolyedrovirus (TnNPV) when exposed at temperatures ( $>60$  °C) in a few minutes (Ribeiro & Pavan, 1994). The 82% and 96.5% of virus activity was lost when exposed at 60 °C during 20 min, and 100 % (both) 80 °C during 5 min for AgNPV and TnNPV respectably (Ribeiro & Pavan, 1994).

However, For others nucleopolyhedrovirus such as *Orgyia pseudotsugata* (OpMNPV) (Martinogli & Iwai, 1977), *Heliothis zea* (HzMNPV) (McLeod et al., 1997), *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) (Camacho, Gómez, & Villamizar, 2013) and a recombinant *Autographa californica* (AcMNPV) (Michalsky, Pfromm, Czermak, Sorensen, & Passarelli, 2008) virus inactivation was only significant when the temperature was maintained during periods above 30 min, but in most cases, above 1-2 h of exposure. Obviously, this period is longer than the time the virus OBs were exposed during diet preparation, a time estimated at less than 8 min during which the temperature was gradually falling as the diet cooled. The absence of significant inactivation of SeMNPV OBs by high temperatures (55-60 °C) could explain why the inoculum concentration needed for consistent OB production on both diets was similar (36 OBs mg<sup>-1</sup> diet).

In our study, no significant improvement in larval weight gain was observed in any of the soya fiber treatments evaluated. The incorporation of chlorophyll or green color dye into the diets was not phagostimulant, which differed from the result observed with *S. frugiperda* larvae when fed on semisynthetic diets with visual and gustatory stimuli (Villegas & Rosas, 2013). Similarly, no improvement in the larval weight gain was observed when salts were removed from the diets although ascorbic acid could be deleted for inoculation diets without a reduction in the larval ingestion.

The OB production per mg of larval weight in containers containing 250 larvae varied from  $6 \times 10^6$  to  $8.9 \times 10^6$  OBs mg<sup>-1</sup> between diets. Our results are similar to those of other studies on SeMNPV. Murillo et al. (2003), using individualized *S. exigua* four instar

larvae, reported yields of  $4.9 \times 10^6$  OBs  $\text{mg}^{-1}$  larva for the same virus. Similarly, Elvira et al. (2010a), reported production of  $6.1 \times 10^6$  and  $6.4 \times 10^6$  OBs  $\text{mg}^{-1}$ , when larvae were reared on a standard and simplified diet, respectively. However, the number of larvae collected in our study was very low and that make our production system inefficient. The percentage of larvae collected after 6 days of incubation were ~25 % due cannibalism and necrophagous behavior of *S. exigua* under crowded conditions. The cannibalistic behavior of *S. exigua* was described by Elvira, Williams, & Caballero (2010b) under crowded conditions, although they considered it to be less prevalent than observed in species such as *Heliothis virescens* Fab. (Gould, Holtzman, Rabb, & Smith, 1980) or *S. frugiperda* (Chapman et al., 1999a). The relationship between the incidence of cannibalism and the degree of larvae crowding was demonstrated (Chapman et al., 1999b) even when food availability was not a limiting factor (Polis 1981; Chapman et al., 2000). Recently, Rebolledo, Lasa, Guevara, Murillo, & Williams (2015) characterized the tendency of healthy *S. exigua* larvae to feed on infected cadavers on plants, even when ample foliage was available as food.

Several conditions, such as a high homogeneous acquisition of virus, a reduced number of insects per container and stable rearing conditions during production should be optimized for this pest to reduce the cannibalism behaviour that greatly influences OB production efficacy.

The use of a cold textured diet based on soya fiber was published in a patent (US 4840800), and was used for rearing *Heliothis* spp. (Harris, 1989). To our knowledge, there are no studies on the use of this diet to inoculate baculovirus, or to extend the use of this type of diet to other lepidopteran species. Although it is not the focus of this research, we believe that the use of this simple cool textured diet using soya fiber could be potentially useful in other situations, such as for the collection of lepidopteran larvae in the field due the simplicity of this diet and the fact that it can be prepared on the spot, as required, with no need for prior refrigeration. However, our observations indicate that the use of this soya fiber diet for continuous rearing may be limited but its tendency to dry out over a 2-3 day period.

The cool textured diet used in this study offer two advantages for a mass production system: i) the cost of diet for inoculation is ~32% lower than the agar-based diet and ii) the time for preparation is substantially lower and easier than the agar-based diet (~63%). However, these are modest savings compared to the overall cost of mass rearing and inoculating insects for baculovirus production.

As a general conclusion, we consider that this study provides useful information on the effect of diet type for the inoculation of larvae in baculovirus production systems. Although results did not indicate that thermal inactivation of OBs was an issue using the agar-based diet, our tests could be of interest for other baculovirus systems or for the *in vivo* production of other microbial pesticides.

### **Acknowledgements**

We thank Trevor Williams for it support in the insect colony and revision of the first draft of this document. This work was financially supported by the Instituto de Ecología AC and the Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Norma Zamora-Avilés received financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico.

## References Cited

- Camacho, E. J., Gómez, I. M., & Villamizar, F. L. (2013). **Efecto de la temperatura y de dos procesos de secado sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda***. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12, 437–450. Retrieved from [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S166527382013000300007&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S166527382013000300007&script=sci_abstract)
- Chapman, W. J., Williams, T., Escribano, A., Caballero, P., Cave, D. R., & Goulson, D. (1999a). **Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda***. *Behavioral Ecology* 10, 298–303. doi: 10.1093/beheco/10.3.298
- Chapman, J. W., Williams, T., Escribano, A., Caballero, P., Cave, R. D., & Goulson, D. (1999b). **Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda***. *Ecological Entomology*, 24, 268–275. doi: 10.1046/j.1365-2311.1999.00224.x
- Chapman, J. W., Williams, T., Martínez, A. M., Cisneros, J., Caballero, P., Cave, R. D., & Goulson, D. (2000). **Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) reduce the risk of predation?** *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 48, 321–327. doi: 10.1007/s002650000237
- Claus, J. D., Gioria, V. V., Micheloud, G. A., & Visnovsky, G. (2012). **Production of insecticidal baculoviruses in insect cell cultures: potential and limitations**. In S. Soloneski, & M. Larramendi (Eds.). *Pesticides - Formulations, Effects, Fate* (pp. 127–152). Rijeka, Croatia: InTech
- Copping, L. G. (2004). **The manual of biocontrol agents** (4th Ed.). British Crop Protection Council, UK. doi: 20053000965.
- Elvira, S., Gorría, N., Muñoz, D., Williams, T., & Caballero, P. (2010a). **A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production**. *Journal of Economic Entomology*, 103, 17–24. doi: 10.1603/EC09246

- Elvira, S., Williams, T., & Caballero, P. (2010b). **Juvenile hormone analog technology: effects on larval cannibalism and the production of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus.** *Journal of Economic Entomology*, *103*, 577–582. doi: 10.1603/EC09325
- Gould, F., Holtzman, G., Rabb, R. L. & Smith, M. 1980. **Genetic variation in predatory and cannibalistic tendencies of *Heliothis virescens* strain.** *Annals of Entomological Society of America*, *73*, 243–250.
- Granados, R. R., & Federici, B. A. (1986). **The biology of baculoviruses.** Vol. II. In R. R. Granados (Ed.). *Practical application for insect control* (pp. 31–62). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Grzywacz, D., Rabindra, J. R., Brow, M., Jones, A. K., & Parnell, M. (2004). ***Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus Production Manual.** Retrieved from <http://www.fao.org/docs/eims/upload/agrotech/2011/HaNPVmanual-pt1.pdf>.
- Grzywacz, D., Moore, D., & Rabindra, J. R. (2013). **Mass production of entomopathogens in less industrialized countries.** In J. A. Morales-Ramos, G. M. Rojas, & I. D. Shapiro-Ilan (Eds.), *Mass production of beneficial organisms* (pp. 519–553). London. UK. Academic Press, doi: 10.1016/B978-0-12-391453-8.00015-7.
- Harris, R. L. (1989). **U.S. Patent No. 4,840,800.** Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Retrieved from <https://docs.google.com/viewer?url=patentimages.storage.googleapis.com/pdfs/US4840800.pdf>
- Hoffmann, J. D., & Lawson, F. R. (1964). **Preliminary studies on mass-rearing of the tobacco hornworm.** *Journal of Economic Entomology*, *57*, 178–182. doi: 10.1093/jee/57.3.354
- Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F., & Crook, E. N. (1998). **Insect viruses and pest management.** (Eds) Chichester, UK: Wiley.
- Ignoffo, C. M. (1966). ***Insect viruses.*** In: Smith, C. N. (Ed) *Insect colonization and mass production.* (pp. 501–530). New York, USA. Academic press.

- Ignoffo, C. M. (1973). **Development of a viral insecticide: concept to commercialization.** *Experimental Parasitology*, *33*, 380–460. doi: 10.1016/0014-4894(73)90041-6
- Ignoffo, C. M. & T. L. Couch. (1981). **The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticide.** In H. D. Burges (Ed.), *Microbial control of pests and plant diseases* (pp. 1970–1980). Academic Press, Michigan, USA.
- Lasa, R., Caballero, P., & Williams, T. (2007). **Juvenile hormone analogs greatly increase the production of a nucleopolyhedrovirus.** *Biological Control*, *41*, 389–396. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.02.012
- Martignoni, M. E., & Iwai P. J. (1977). **Thermal inactivation characteristics of two strains of nucleopolyhedrosis virus (Baculovirus Subgroup A) pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*.** *Journal Invertebrate Pathology*, *30*, 255–262. doi: 10.1016/0022-2011(77)90228-2
- McLeod, P. J., Yearian, W. C., & Young, S. Y. (1977). **Inactivation of baculovirus *Heliothis* by ultraviolet irradiation, dew, and temperature.** *Journal of Invertebrate Pathology*, *30*, 237–241. doi: 10.1016/0022-2011(77)90225-7
- Michalsky, R., Pfromm, P., Czermak, P., Sorensen, C., & Passarelli L. A. (2008). **Effects of temperature and shear force on infectivity of the baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus.** *Journal of Virological Methods*, *15*, 90–96. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.07.030
- Moscardi, F. (1999). **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** *Annual Review of Entomology*, *44*, 257–289. doi: 10.1146/annurev.ento.44.1.257
- Moscardi, F. (2007). **A nucleopolyhedrovirus for control of the velvetbean caterpillar in Brazilian soybeans.** In C. Vincent, M. S. Goettel & G. Lazarovits (Eds.), *Biological Control: A Global Perspective* (pp. 344–352). London, UK. Cromwell press.
- Murillo, R., Lasa, R., Goulson, D., Williams, T., Muñoz, D., & Caballero, P. (2003). **Effect of Tinopal LPW on the insecticidal properties and genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera:**

- Noctuidae**). *Journal of Economic Entomology*, 96, 1668–1674. doi: 10.1603/0022-0493-96.6.1668
- Polis, G. A. (1981). **The evolution and dynamics of intraspecific predation**. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12, 225–251. doi: 10.1146/annurev.es.12.110181.001301
- Rebolledo, D., Lasa, R., Guevara, R., Murillo, R., & Williams, T. (2015). **Baculovirus-induced climbing behavior favors intraspecific necrophagy and efficient disease transmission in *Spodoptera exigua***. *PloS one*, 10, e0136742. doi: 10.1371/journal.pone.0136742
- Reid, S., Chau, L., & van Oers, M. M. (2014). **Production of entomopathogenic viruses**. In J. A. Morales-Ramos, G. M. Rojas, & I. D. Shapiro-Ilan (Eds). *Mass production of beneficial organisms* (pp. 437–582). Academic Press, London. UK.
- Ribeiro, H. C., & Pavan, O. H. O., 1994. **Baculovirus thermal stability**. *Journal of Thermal Biology*, 19, 21–24. doi: 10.1016/0306-4565(94)90005-1
- Shapiro, M., Bell, A. B., & Owens, D. C. (1981). **In vivo mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus**. In C. C. Doane & M. L. McManus (Eds.). *The gypsy moth: research toward integrated pest management* (pp. 633–655), US Forest Service, Washington, DC.
- Shapiro, M., (1986). **In vivo production of baculoviruses**. In R. R. Granados, & B. A. Federici (Eds.), *The biology of baculoviruses. Vol. II. Practical application for insect control* (pp. 31–61). Florida, USA, CRC Press.
- Shieh, T. R. 1989. **Industrial production of viral pesticides**. *Advances in Virus Research*, 36, 315–343. doi: 10.1016/S0065-3527(08)60589-8
- van Beek, N., & Davis, D. C. (2007). **Baculovirus insecticide production in insect larvae**. In Murhammer, D. W. (Ed.). *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols* (pp. 367–378). New Jersey: Humana Press.
- Villegas, J. M., & Rosas, N. M. (2013). **Visual and gustatory responses of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to artificial food dyes**. *Florida Entomologist*, 96, 1102–1106. doi: 10.1653/024.096.0350



## CAPÍTULO IV

### Uso de un antioxidante en un formulado de baculovirus: evaluación bajo dos condiciones de almacenamiento

---

#### En preparación para su publicación.

N. Zamora-Avilés<sup>1</sup>, R. Lasa<sup>2</sup>, S. Pineda<sup>1</sup>, J. I. Figueroa<sup>1</sup>, A. Bravo-Patiño<sup>3</sup>, R. Salgado<sup>4</sup>, A. M. Martínez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, 58880 Tarímbaro, Michoacán, México.<sup>2</sup>Red de Manejo Biorracional de Plagas y Vectores, Instituto de Ecología AC, Carretera antigua a Coatepec, 91070 Xalapa, , Veracruz, . México.<sup>3</sup>Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, 58880 Tarímbaro, Michoacán, México. <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 58030 Morelia, Michoacán, México.

#### Resumen

Una de las limitantes de las formulaciones que contienen baculovirus (BVs) como ingrediente activo es la formación de radicales libres (RLs) que se generan en los procesos de oxidación de distintos compuestos y que pueden desactivar a los virus durante su almacenamiento. En ensayos preliminares se analizó la capacidad antioxidante (CAO) de cuatro compuestos antioxidantes (ácido gálico, ácido ascórbico, ascorbato sódico y manitol) a diferentes concentraciones mediante la técnica ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico). Se seleccionó al ácido gálico porque mostró una CAO mayor (99.9 %) que el resto de los compuestos (rango de 4.6 a 8.8 %), después de cinco días de inicio del experimento. 1 mM del ácido gálico se incluyó en una suspensión líquida del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) ( $1.5 \times 10^9$  OBs/ml), y se

comparó la CAO con respecto a una suspensión SeMNPV sin ácido gálico durante 15 meses de almacenamiento a dos temperaturas (25 °C y -20 °C). La actividad biológica y la integridad del ADN del SeMNPV solo y SeMNPV + ácido gálico se evaluó a distintos tiempos durante los meses de almacenamiento. Aunque el ácido gálico tuvo una alta CAO a lo largo de los 15 meses del estudio, su incorporación en el formulado no evitó una pérdida de la actividad patogénica del virus cuando se almacenó a 25 °C. Cuando los formulados se almacenaron a -20 °C, el virus no redujo de manera significativa su actividad patogénica durante los 15 meses. Los porcentajes de la CAO obtenidos del SeMNPV, solo y en combinación con el ácido gálico, se redujeron significativamente (<51%) en comparación con el ácido gálico en las dos condiciones de almacenamiento (99.0%). Los resultados del presente estudio indican que deben estudiarse varios aspectos (caracterización cualitativa y cuantitativa de los RLs en los formulados de BVs, selección de concentraciones óptimas, adición de sustancias coadyuvantes) para poder validar el uso de compuestos antioxidantes en los formulados de los BVs para incrementar su estabilidad en almacenamiento en condiciones ambientales a mediano-largo plazo.

**Palabras clave:** SeMNPV, ácido gálico, efectividad bioinsecticida.

## Abstract

One of the baculovirus (BVs) formulatio's limitations is the formation of free radicals (FRs) that are generated in the oxidation processes of different compounds and that can deactivate the virus during its storage. In preliminary trials, the antioxidant capacity (AOC) of four antioxidant compounds (gallic acid, ascorbic acid, sodium ascorbate, and mannitol) was analyzed at different concentrations using the ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline) -6-sulfonic acid) technique. Gallic acid was selected because it possessed a greater antioxidant capacity (99.9%) compared to the remaining of compounds (ranged from 4.6 to 8.8 %) five days *after the beginning of the experiment*. 1 mM of the gallic acid was included in a liquid suspension of the nucleopolyhedrovirus multiple of *Spodoptera exigua* (SeMNPV) ( $1.5 \times 10^9$  OBs/ml), and its AOC was compared with a SeMNPV suspension without gallic acid for 15 months storage at two temperatures (25 and -20 ° C). The biological activity and DNA integrity of SeMNPV with and without gallic acid were evaluated at different times during the storage months. Although gallic acid had a high CAO over the 15 months of the study, its incorporation into the formulation did not prevent a loss of the virus pathogenic activity when the virus was stored at 25 ° C. When the formulations were stored at -20 ° C, the virus did not significantly reduce its pathogenic activity during the 15 months. The AOC percentages obtained from SeMNPV alone and mixed with gallic acid were significantly reduced (<51%) compared to gallic acid in both storage conditions (>99.0%). The results of the present study indicate that several aspects (qualitative and quantitative characterization of RLs in BV formulations, selection of optimum concentrations, addition of adjuvants) should be studied to validate the use of antioxidant compounds in formulations of BVs in order to increase their storage stability under environmental conditions in the medium-long term.



## Introducción

Los baculovirus (BVs) son un grupo de virus patógenos específicos de artrópodos que se han utilizado exitosamente como bioinsecticidas para el control de plagas agrícolas y forestales (Hunter-Fujita *et al.*, 1998; Moscardi, 1999). Actualmente, los insecticidas elaborados con base en BVs que se encuentran en el mercado son obtenidos mediante un sistema de producción *in vivo*, que incluye la inoculación masiva de larvas del hospedero de interés (Sciocco de Cap, 2001; Grzywacz *et al.*, 2013). Dos de las ventajas que posee este sistema es la obtención de una mayor concentración de OBs (por sus siglas en inglés) por unidad de volumen y la conservación de sus propiedades insecticidas (Cory y Bishop, 1997; Claus y de Sciocco de Cap, 2001; Ziemnicka, 2007). Sin embargo, el sistema *in vivo* puede tener la limitante de generar una carga importante de microorganismos (Krieg *et al.*, 1979; Smits y Vlak, 1988; Grzywacz *et al.*, 1997). Otras de las limitantes del sistema de producción *in vivo* es la presencia de restos celulares y grasas dentro de los formulados provenientes de los hospederos (Cherry *et al.*, 1996), los cuales pueden estar implicados en la generación de hidrólisis y reacciones de auto-oxidación, con la consiguiente producción de radicales libres (RLs) (Ignoffo *et al.*, 1989; Hoover *et al.*, 1998).

La presencia de RLs ha sido asociada a la degradación de los ácidos nucleídos de los virus (Burges y Jones, 1998; Ignoffo y García, 1994; De Toro, 2006) y este efecto fue asociado a las posibles pérdidas de actividad de formulados del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) durante su almacenamiento (Lasa *et al.*, 2008). Ignoffo y García (1994) observaron que el uso de antioxidantes (galato de propilo, ácido ascórbico y feniltiocarbamida) o enzimas oxidativas (catalasa, peroxidasa y superóxido dismutasa) conservaron la actividad del nucleopoliedrovirus múltiple de *Heliothis zea* (HzSNPV) debido a la inhibición de la actividad de los RLs que se generaron por la presencia de luz UV. De igual forma, el uso de pro-oxidantes, antioxidantes, fenolasas y/o sustratos fenólicos redujeron el daño en la integridad del HzSNPV y el nucleopoliedrovirus múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) como consecuencia de la inhibición de la actividad de los RLs que se generaron sobre las hojas de los cultivos de tomate; *Solanum lycopersicum* (L.), algodón; *Gossypium hirsutum* (L.), o lechuga; *Lactuca capitata* (L.) (Hoover *et al.*, 1998).

Con base en lo anterior, el uso de antioxidantes podría ser utilizado para conservar la integridad de los BVs en formulaciones líquidas, mejorando su estabilidad durante su almacenamiento en condiciones ambientales. Las formulaciones líquidas, son las más utilizadas debido a su fácil elaboración y menor costo (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Villamizar *et al.*, 2010), sin embargo tienen la desventaja de perder su estabilidad más rápidamente comparado con algunas formulaciones sólidas (Cory y Bishop, 1997), especialmente cuando se mantienen a temperatura ambiente ( $\sim 25$  °C) y en periodos prolongados ( $\geq 12$  meses) (Lasa *et al.*, 2008).

En la presente investigación se hipotetizó que la presencia de un antioxidante en un formulado líquido del SeMNPV puede incrementar la estabilidad del patógeno. El antioxidante se seleccionó de una serie de cuatro compuestos tomando en cuenta sus propiedades como captadores de RLs y algunas de sus características fisicoquímicas. La actividad biológica y la integridad del ADN viral del SeMNPV solo y el SeMNPV + 1 mM de ácido gálico se evaluó a diferentes tiempos durante 15 meses de almacenamiento a dos temperaturas. Igualmente, el número de microorganismos presentes en ambas suspensiones del SeMNPV se contabilizó al inicio del ensayo y 15 meses después, para ambas temperaturas.

## Materiales y métodos

### Multiplicación y purificación del virus

Todos los experimentos se realizaron con un aislado del SeMNPV, procedente de Florida, EUA, y que es el ingrediente activo del producto comercial Spod-X<sup>®</sup> (Certis Europe, Marseen, Holanda). Para su replicación, se infectaron 1500 larvas de *S. exigua* de cuarto estadio (8-12 h después de la ecdisis), mediante la ingestión de pequeños bloques de dieta artificial contaminados con una suspensión de  $1 \times 10^9$  OBs/ml durante un periodo de 24 h, concentración que se estimó previamente al experimento para producir una mortalidad larvaria de ~90 %. Las larvas infectadas se criaron sobre dieta artificial libre del virus durante seis días adicionales. Las larvas muertas por infección del virus se colectaron y se maceraron en agua destilada estéril con ayuda de un mortero de porcelana de 500 ml. Los OBs se purificaron por filtración con el uso de dos filtros; uno de 200  $\mu\text{m}$  y otro de 80  $\mu\text{m}$ . Para recuperar a los OBs que pudieran quedar retenidos, los filtros se lavaron dos veces con agua destilada estéril. La cuantificación de los OBs se realizó en una cámara de Neubauer Improved (Hawksley, Lancing, Reino Unido) a 40x con un microscopio con contraste de fases Olympus BX41 (Olympus America Inc., Estados Unidos). A partir de este proceso, se obtuvo una suspensión concentrada del virus que fue diluida en agua destilada hasta una concentración de  $1.5 \times 10^9$  OBs/ml que se conservó a 4 °C hasta su uso.

### Selección de los compuestos antioxidantes

Con base en el pH y la solubilidad se preseleccionaron cuatro compuestos antioxidantes: i) ácido gálico, ii) ácido ascórbico, iii) ascorbato sódico y iv) manitol (Sigma-Aldrich Co. LLC., Estados Unidos). Se determinó la capacidad antioxidante (CAO) de cada compuesto con el objetivo de seleccionar el mejor y que pudiera utilizarse en los formulados del virus. La CAO de cada compuesto se evaluó mediante la técnica ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) siguiendo la metodología descrita por Kuskoski *et al.* (2005) modificando lo siguiente: uso de persulfato potásico a una concentración final de 2.6 mM y agua destilada en sustitución del etanol como solvente principal. La medición de la absorbancia se realizó a 737 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Inc., Estados Unidos).

### Técnica ABTS

Se preparó una solución patrón de cationes radicales ABTS (Sigma-Aldrich Co. LLC, Estados Unidos) a una concentración de 7 mM en un volumen de 10 ml, a la cual se le adicionaron 10 ml de persulfato de potasio a 2.6 mM (Solución 1). Esta solución se dejó en reposo bajo oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 h. Posteriormente y, una vez formado el radical libre ABTS, la Solución 1 la cual tenía una absorbancia no menor a **2.98**  $\pm$  0.1 a 737 nm (longitud de onda de máxima absorción). Por otra parte, se preparó la siguiente solución: 25  $\mu$ l de la Solución 1 + 5.25 ml de agua destilada, con una absorbancia de ( $\pm$  EE) de  $0.70 \pm 0.1$  a 737 nm (Solución 2) o no mayor a 1.5 nm, dicha cantidad rindió para seis reacciones, se preparó el volumen necesario para todas las reacciones. La concentración final del ABTS fue de 16.66 mM.

Para la evaluación de la CAO, se prepararon ocho concentraciones de los diferentes antioxidantes: 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900  $\mu$ M, utilizando una concentración inicial de 1000  $\mu$ M de cada antioxidante. Estas concentraciones se prepararon en un volumen total de 1000  $\mu$ l, utilizando un volumen de 950  $\mu$ l de la Solución 2 que se ajustó con agua y antioxidante según la dilución deseada. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente por siete min en condiciones de oscuridad y las lecturas de la absorbancia se tomaron en el espectrofotómetro anteriormente mencionado, la entidad química medida por el espectrofotómetro es el cation ABTS<sup>+</sup>.

La CAO se calculó con la siguiente fórmula: CAO (%) = (Absorbancia inicial – Absorbancia probada / Absorbancia inicial) x 100 (Miller *et al.*, 1993). Para cada compuesto, la CAO se determinó al tiempo cero (CAO inicial) y a los cinco días de su preparación (CAO final). Al compuesto que presentó la mejor CAO a los cinco días (ácido gálico), se determinó la CAO en un rango de concentraciones (200-800  $\mu$ M) durante un periodo más amplio considerando 8, 60 y 94 días de almacenamiento, lo anterior con el objetivo de corroborar su estabilidad antioxidante en el tiempo. Y dado que a la concentración de 500  $\mu$ M se presentó el mayor potencial de CAO, para incluir este antioxidante en las formulaciones del SeMNPV se incrementó al doble la concentración (1000  $\mu$ M o 1 mM), debido al tiempo de almacenaje de los formulados (15 meses).



### **Efecto del ácido gálico en la estabilidad del formulado**

La CAO de una suspensión del aislado SeMNPV, a una concentración de  $1.5 \times 10^9$  OBs/ml (en viales de 15 ml), se evaluó sola o en combinación con ácido gálico 1mM a dos temperaturas distintas de almacenamiento (25 °C y -20 °C). Los tratamientos fueron los siguientes: i) SeMNPV almacenado a 25 °C, ii) SeMNPV almacenado a -20 °C, iii) SeMNPV + ácido gálico (1mM) almacenado a 25 °C y iv) SeMNPV + ácido gálico (1 mM) almacenado a -20 °C. Soluciones de ácido gálico a 1 mM almacenadas a 25 °C y -20 °C y agua destilada estéril se utilizaron como testigo. Para evaluar la CAO del ácido gálico solo y en combinación con el SeMNPV, se tomó una alícuota de 40 µl de la suspensión y se realizaron tres repeticiones a los 0, 1, 1.9, 2.7, 3.2, 3.8, 4.5, 5.4, 8.5 y 12.3 meses de almacenamiento y cada muestra se analizó mediante el método ABTS anteriormente descrito. Para estas muestras se evaluó también la actividad biológica, la integridad del ADN y la contaminación microbiana según las metodologías descritas a continuación.

### **Actividad biológica**

Los ensayos de actividad biológica se efectuaron mediante la técnica de la inoculación por gota (Hughes y Wood, 1981) con larvas de segundo estadio de *S. exigua*. Las larvas se inocularon con una  $CL_{90}$  (144.2 OBs/larva) estimada previamente para este aislado mediante una recta de regresión (datos no publicados). Se realizaron tres o cuatro repeticiones de 24 individuos para cada tratamiento. Los datos de mortalidad larvaria se obtuvieron al séptimo día después de la inoculación. Se hizo una primera evaluación con los tratamientos SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico al tiempo cero para validar su actividad biológica. Después se realizaron bioensayos con los formulados a los 2, 5, 9 y 15 meses de almacenamiento a -20 °C y 25 °C. En cada tiempo de evaluación, se contabilizó por triplicado el número de OBs presentes en la suspensión de cada tratamiento y repetición. La preparación de la concentración del virus (144.2 OBs/larva) se realizó con base a los conteos de los OBs determinados en cada tiempo. Además, se determinó el pH de los tratamientos SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico al inicio del experimento (tiempo 0) y a los 15 meses de almacenamiento.

### **Análisis de ADN**

Se realizó una extracción de ADN de los tratamientos SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico, cuando los tratamientos tenían 0, 4, 5 y 12 meses de almacenamiento. La extracción de ADN viral se realizó siguiendo el protocolo descrito por Muñoz *et al.* (1998), para esto se tomó una alícuota de 1000 µl de cada réplica de cada uno de los tratamientos bajo las dos condiciones de almacenamiento. Para cada extracción se tomaron 300 µl a disolución los OBs y se obtuvo en una solución alcalina (0.3 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.5 M NaCl, 0.03 M EDTA; pH 10.5), para la dilución de la matriz proteica. Los viriones se incubaron con 25 µl de proteinasa K (25 µg/mL), seguido de una extracción con fenol/cloroformo. La precipitación del ADN se realizó con 0.1 vol de 3 M de NaAc (pH 5.2) y 2 vol. de etanol frío a 96% y un lavado con etanol a 70%. El ADN se disolvió en 25 µl de agua estéril mili-Q. El ADN se visualizó en un gel de agarosa a 1 % teñido con bromuro de etidio y con ayuda de un transiluminador de UV (Syngene, San Diego, Estados Unidos) a 80 V por 30 minutos.

### **Análisis microbiano**

Se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC) de las bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales presentes en las suspensiones de SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico. El concentrado inicial del virus se determinó antes de su formulación y otra después de 15 meses de almacenamiento a las dos temperaturas. Para esta determinación viral se tomó solo una muestra de la primera repetición de cada tratamiento. Los análisis microbiológicos se realizaron en el Centro de Diagnóstico Microbiológico, S.A. de C. V. (CEDEMI-Morelia, Michoacán) siguiendo las normas NOM-092-SSA1-194 y NOM-113-SSA1-194, mediante crecimiento bacteriano en placas con agar-triptona-extracto de levadura y de organismos coliformes totales en placas de agar-rojo-violeta-bilis-lactosa, incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h, respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Los porcentajes iniciales y finales de la CAO de los cuatro antioxidantes, evaluados mediante la técnica ABTS, se analizaron a través de ANOVA de una sola vía, con una separación de medias mediante la prueba de las diferencias mínimas significativas (DMS,  $P = 0.05$ ). El porcentaje inicial y final de la CAO de cada compuesto se analizó mediante una prueba de *t*-student para el ácido ascórbico y ascorbato sódico. Para el ácido gálico y

manitol, estas comparaciones se realizaron con la prueba no paramétrica de U de Mann-Whitney ( $P = 0.05$ ). Estos análisis se realizaron en el programa estadístico Statgraphics Graphic software system (STSC Inc., Rockville, MD, Estados Unidos). Los porcentajes iniciales de mortalidad larvaria (tiempo 0) obtenidos con los tratamientos SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico se analizaron mediante una prueba de *t*-student en el programa estadístico Statistical Analysys System., Inc., Cary, NC, Estados Unidos.

Los porcentajes de mortalidad larvaria y de CAO obtenidos en los ensayos posteriores, se sometieron a un diseño completamente al azar. Y los datos fueron sujetos a un análisis de varianza (ANOVA). Para analizar el porcentaje de mortalidad larvaria se usó una distribución binomial (1 = vivo, 0 = muerto) con un arreglo factorial 2 x 2 x 4: 2 (tratamientos; SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico) x 2 (condición de almacenamiento; 25 °C y -20 °C) x 4 (tiempos; 2, 5, 9 y 15 meses). Para analizar la CAO se realizó un arreglo factorial de 3 x 2 x 10: 3 (tratamientos; ácido gálico, SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico) x 2 (condición de almacenamiento; 25 °C y -20 °C) x 10 (tiempos; 0, 1, 2, 2.5, 3, 3.8, 4, 5, 8 y 12 meses). Ambos parámetros, porcentaje de mortalidad y CAO, se analizaron mediante medidas repetidas utilizando el procedimiento de modelos lineales generalizados (GLM). Las diferencias entre medias de los porcentaje de mortalidad y la CAO entre los tratamientos, tiempo y condición de almacenamiento, se realizaron mediante la comparación de mínimos cuadrados ( $P \leq 0.05$ ) (SAS/STAT versión 8,1; SAS Institute, Cary, NC, Estados Unidos).

## Resultados

### Evaluación de los compuestos antioxidantes

El ácido gálico y el ácido ascórbico tuvieron una CAO inicial (tiempo cero) significativamente mayor comparada con el ascorbato sódico y el manitol ( $F_{3,8} = 2904$ ,  $P < 0.01$ ). La CAO de este último fue significativamente más baja y no superó el 5% ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, la CAO final, cinco días después del inicio del experimento, fue significativamente mayor en el ácido gálico con respecto al resto de los compuestos (ácido ascórbico, ascorbato sódico y el manitol) ( $F_{3,8} = 9763$ ,  $P < 0.01$ ). La CAO final no tuvo cambios significativos comparada con la inicial para el caso del ácido gálico (U de Mann-Whitney = 4,  $p = 0.81$ ) y el manitol (U de Mann-Whitney = 3,  $P = 0.51$ ), mientras que la CAO final disminuyó significativamente con respecto a la CAO inicial para el ácido ascórbico ( $t = 109.73$ ,  $gl = 4$ ,  $P < 0.01$ ) y ascorbato sódico ( $t = 52.19$ ,  $gl = 4$ ,  $P < 0.01$ ) (Cuadro 10).

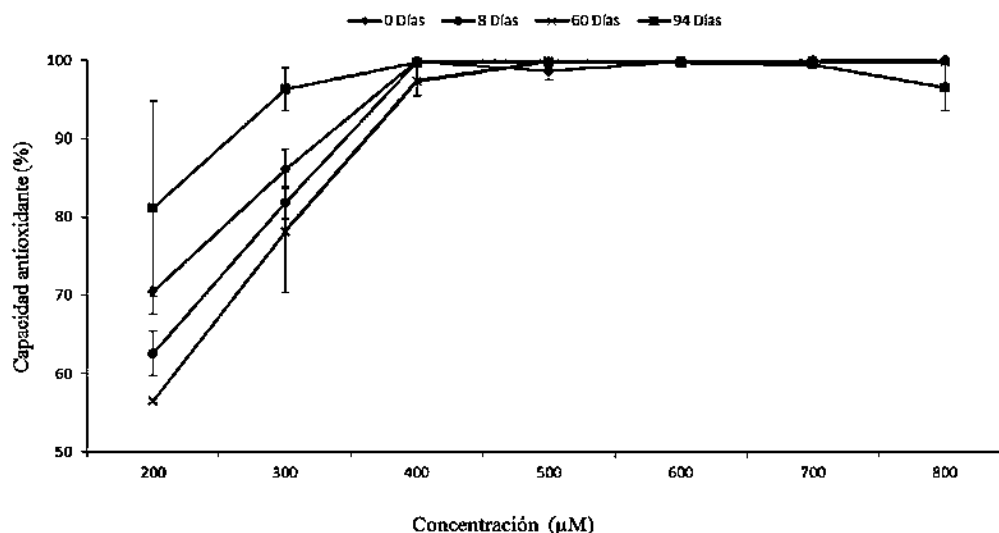
**Cuadro 10.** Capacidad antioxidante (%  $\pm$  EE) de diferentes compuestos evaluados mediante la técnica ABTS.

Compuesto antioxidante	Grupo químico	<sup>a</sup> [C] ( $\mu$ M)	<sup>b</sup> CAO-I $\pm$ EE (%)	<sup>c</sup> CAO-F $\pm$ EE (%)
Ácido gálico	Polifenol	400	99.9 $\pm$ 0.03cA	99.9 $\pm$ 0.13cA
Ácido ascórbico	Polifenol	700	99.8 $\pm$ 0.23cB	18.8 $\pm$ 0.70bA
Ascorbato sódico	Sal sódica	900	88.6 $\pm$ 1.48bB	5.6 $\pm$ 0.58aA
Manitol	Polialcohol	500	4.9 $\pm$ 0.81aA	4.6 $\pm$ 0.09aA

Medias entre la misma columna (letras minúsculas) seguidas de diferente letra difieren significativamente (DMS,  $P = 0.05$ ). Medias entre la misma fila (letras mayúsculas) seguidas de diferente letra difieren significativamente ( $t$  de student para ácido ascórbico y ascorbato sódico; U de Mann-Whitney para el manitol y ácido gálico,  $P = 0.05$ ).<sup>a</sup>Concentración a la cual se obtuvo mayor capacidad antioxidante. <sup>b</sup>CAO-I Capacidad antioxidante inicial (0 días). <sup>c</sup> CAO-F, Capacidad antioxidante final (5 días post-experimento).

El ácido gálico se seleccionó como el antioxidante con mejores perspectivas para su incorporación en el formulado del virus. Este compuesto mostró una CAO en un rango entre 56.5-99.9% a concentraciones que variaron entre 200 y 500  $\mu$ M. A concentraciones superiores a 500  $\mu$ M, no se observaron cambios en el porcentaje de la CAO conforme al

incremento de la concentración para ninguno de los periodos evaluados (0, 8, 60 y 94 días) (Figura 11).



**Figura 11.** Capacidad antioxidante del ácido gálico a diferentes concentraciones a los 0, 8, 60 y 94 días.

### Determinación de la CAO de los formulados del SeMNPV

La CAO cambió significativamente en el transcurso del tiempo ( $F = 86.27$ ,  $gl = 9$ ,  $P \leq 0.0001$ ), un fenómeno que también estuvo influenciado por el tratamiento ( $F = 1001.1$ ,  $g.l. = 2$ ,  $P \leq 0.0001$ ) y la condición de almacenaje ( $F = 4.82$ ,  $g.l. = 1$ ,  $P \leq 0.029$ ). Únicamente en algunos periodos de tiempo se observó una mayor CAO en el tratamiento SeMNPV + ácido gálico comparado con el virus solo a 25 °C (1.2, 5.4 y 8.5 meses) y -20 °C (1.2, 2.7, 3.8 y 5.4 meses) ( $P < 0.05$ ) (Cuadro 11). En siete de los diez tiempos evaluados, la CAO fue significativamente mayor cuando el virus se almacenó a 25 °C comparado con los valores observados a -20 °C (Cuadro 11). A los 2.7 meses de almacenamiento, la CAO de ambos tratamientos con virus fueron significativamente mayores a -20 °C que a 25 °C ( $P < 0.05$ ).

**Cuadro 11.** Capacidad antioxidante (% $\pm$  EE) del ácido gálico, SeMNPV (144.2 OBs/larva) o la combinación SeMNPV + ácido gálico (1 mM) por efecto triple: tratamiento, condición y tiempo.

Tratamientos	Tiempo (meses)	Condición de almacenamiento	
		25 °C	-20 °C
Ácido gálico	0	97.1 $\pm$ 0.0 cA	99.0 $\pm$ 0.1 bA
SeMNPV		23.2 $\pm$ 1.7 aA	27.1 $\pm$ 6.0 aA
SeMNPV + ácido gálico		33.8 $\pm$ 6.8 bB	27.2 $\pm$ 3.4 aA
Ácido gálico	1.9	98.8 $\pm$ 0.0 bA	99.7 $\pm$ 0.0 bA
SeMNPV		25.3 $\pm$ 1.6 aA	25.0 $\pm$ 2.1 aA
SeMNPV + ácido gálico		28.4 $\pm$ 1.3 aA	26.9 $\pm$ 2.3 aA
Ácido gálico	2.7	98.8 $\pm$ 0.0 bA	99.9 $\pm$ 0.0 cA
SeMNPV		28.3 $\pm$ 2.3 aB	35.7 $\pm$ 1.5 aA
SeMNPV + ácido gálico		32.0 $\pm$ 0.6 aA	47.3 $\pm$ 1.1 bB
Ácido gálico	3.8	97.7 $\pm$ 0.1 bA	99.7 $\pm$ 0.0 cA
SeMNPV		23.5 $\pm$ 2.4 aB	17.4 $\pm$ 1.2 aA
SeMNPV + ácido gálico		25.7 $\pm$ 2.1 aA	26.8 $\pm$ 1.0 bA
Ácido gálico	4.5	98.8 $\pm$ 0.0 bA	99.8 $\pm$ 0.0 bA
SeMNPV		12.4 $\pm$ 2.0 aA	10.1 $\pm$ 3.3 aA
SeMNPV + ácido gálico		12.7 $\pm$ 2.1 aA	13.6 $\pm$ 3.5 aB
Ácido gálico	5.4	95.2 $\pm$ 0.0 cA	99.6 $\pm$ 0.1 cA
SeMNPV		7.4 $\pm$ 5.0 aA	4.0 $\pm$ 0.7 aA
SeMNPV + ácido gálico		21.8 $\pm$ 4.4 bB	10.8 $\pm$ 2.1 bA
Ácido gálico	8.5	99.2 $\pm$ 1.6 cA	99.9 $\pm$ 2.2 bA
SeMNPV		44.8 $\pm$ 1.6 aB	38.0 $\pm$ 1.2 aA
SeMNPV + ácido gálico		50.8 $\pm$ 2.9 bB	39.8 $\pm$ 2.7 aA
Ácido gálico	12.3	89.0 $\pm$ 6.7 bA	100 $\pm$ 0.0 bB
SeMNPV		40.2 $\pm$ 3.6 aB	23.3 $\pm$ 1.4 aA
SeMNPV + ácido gálico		36.9 $\pm$ 2.3 aB	23.4 $\pm$ 3.0 aA

Dentro de la misma columna (letras minúsculas) y misma fila (letras mayúsculas) para cada tiempo, datos seguidos con la misma letra no difieren significativamente (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

### Actividad biológica

El pH inicial del SeMNPV + el ácido gálico fue  $\sim 6$ , mientras que al final del (perido de 15 meses) incremento a  $9.1 \pm 0.30$  y  $8.7 \pm 0.12$  a 25 °C, para SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico, respectivamente. A una temperatura de -20 °C el pH se mantuvo en  $\sim 6$  para ambos

tratamientos. Al inicio del experimento (tiempo cero), se observaron diferencias significativas en el porcentaje de mortalidad de *S. exigua* entre el SeMNPV ( $93.17 \pm 1.74\%$ ) y SeMNPV + ácido gálico ( $88.68 \pm 1.76\%$ ) ( $t = 2.68$ , g.l. = 11,  $p = 0.02$ ). Los testigos: agua y ácido gálico, no causaron mortalidad larvaria.

El porcentaje de mortalidad larvaria cambió significativamente en el transcurso del tiempo ( $F = 294.09$ , g.l.= 3,  $P \leq 0.0001$ ) y estuvo influenciada por el tratamiento ( $F = 42.56$ , g.l. = 1,  $P \leq 0.0001$ ) y la condición de almacenamiento ( $F = 1016.8$ , g.l. =1,  $P \leq 0.0001$ ). A partir de los 5 meses de almacenamiento a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el porcentaje de mortalidad de ambos tratamientos, SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico, disminuyó significativamente comparado con su almacenamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $P < 0.05$ ). No se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con excepción de una reducción de la mortalidad larvaria (10 %) en el tratamiento SeMNPV con respecto al SeMNPV + ácido gálico solo a los 15 meses de almacenamiento (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Mortalidad larvaria (% $\pm$  EE) de *S. exigua* expuesta al SeMNPV SeMNPV (144.2 OBs/larva) o la combinación SeMNPV + ácido gálico (1 mM). Comparación por efecto triple: tratamiento, condición y tiempo.

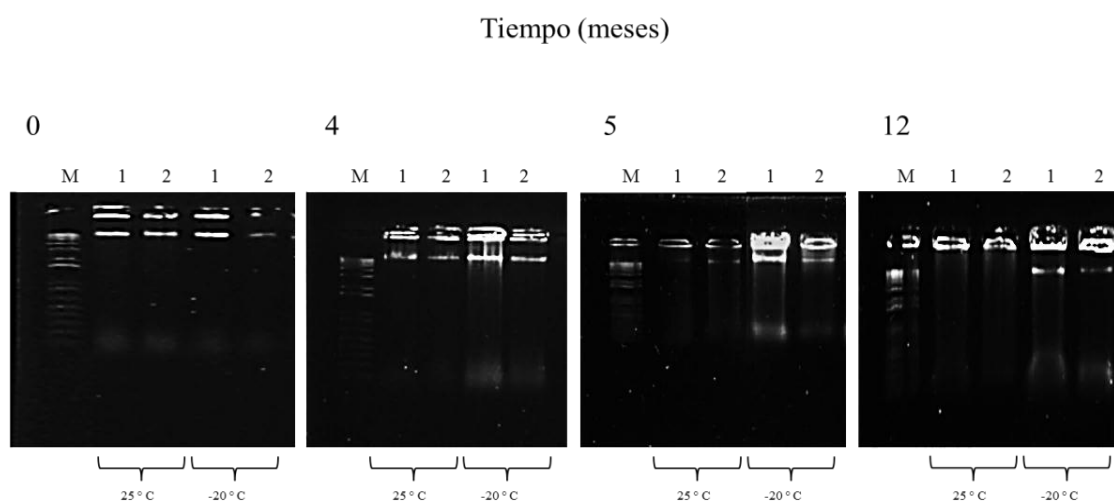
Tratamiento	Tiempo (meses)	Condición de almacenamiento	
		$25\text{ }^{\circ}\text{C}$	$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$
SeMNPV	2	$94.14 \pm 1.5$ aA	$97.60 \pm 1.1$ aA
SeMNPV + ácido gálico		$88.83 \pm 1.9$ aA	$91.00 \pm 1.8$ aA
SeMNPV	5	$67.97 \pm 2.8$ aA	$88.11 \pm 1.9$ aB
SeMNPV + ácido gálico		$55.41 \pm 3.0$ aA	$82.36 \pm 2.4$ aB
SeMNPV	9	$68.71 \pm 2.7$ bA	$96.82 \pm 1.0$ aB
SeMNPV + ácido gálico		$54.0 \pm 3.0$ aA	$96.58 \pm 1.1$ aB
SeMNPV	15	$5.45 \pm 1.6$ aA	$90.79 \pm 2.3$ bB
SeMNPV + ácido gálico		$2.91 \pm 1.8$ aA	$80.87 \pm 2.6$ aB

Dentro de la misma columna (letras minúsculas) y misma fila (letras mayúsculas) para cada tiempo, datos seguidos con la misma letra no difieren significativamente (ANOVA,  $P < 0.05$ ).

### Integridad del ADN viral de los formulados y presencia bacterias

Cuando el formulado se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  no se observó daño sobre la integridad del ADN en ninguno de los tratamientos evaluados (SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico) y tiempo de la evaluación (Figura 12). En contraste, cuando el virus se almacenó a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  se observó una degradación parcial a partir de los cinco meses y una degradación total a los 12 meses en ambos tratamientos (Figura 12).

La concentración de bacterias mesófilas aerobias y de organismos coliformes totales del concentrado viral antes de su formulación fue de  $3.7 \times 10^8$  UFC/ml y  $2.2 \times 10^7$  UFC/ml, respectivamente. Después de 15 meses de almacenamiento de los tratamientos SeMNPV y SeMNPV + ácido gálico a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , la concentración de bacterias mesófilas aerobias fue de  $5.9 \times 10^7$  y  $3.1 \times 10^6$  UFC/ml; respectivamente, mientras que cuando se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fueron de  $8.5 \times 10^8$  y  $9.0 \times 10^8$  UFC/ml, respectivamente. En ambas condiciones, no se encontraron organismos coliformes totales en ninguno de los tratamientos después de 15 meses de almacenamiento.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA genómico de OBs del SeMNPV después de 0, 4, 5 y 12 meses de almacenamiento a  $25$  o  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . SeMNPV solo (línea 1) y SeMNPV+ ácido gálico (línea 2). Marcador molecular de 1 kb (M).



## Discusión

El presente estudio se evaluó la factibilidad del uso de un antioxidante (ácido gálico en este caso) como posible estabilizador de una suspensión líquida del SeMNPV. El ácido gálico se seleccionó respecto a otros antioxidantes porque mostró una alta CAO (> 90 %) en un periodo corto (cinco días). Otros estudios han demostrado que este compuesto tuvo una alta eficiencia para capturar diversos tipos de RLs (ej., los radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) (Brand *et al.*, 1995; Martínez-Flores *et al.*, 2002; Yilmaz y Toledo, 2004) y moléculas altamente reactivas implicadas en el inicio de la cadena de peroxidación (= degradación oxidativa) lipídica (Martínez-Flores *et al.*, 2002; Paixão *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de estas características antioxidantes del ácido gálico, su incorporación en la suspensión viral no mejoró la estabilidad del baculovirus en relación a la actividad biológica del patógeno.

En el presente estudio se observó cómo la CAO del ácido gálico se redujo al inicio del ensayo del ~97% a un ~33% cuando se incluyó en la suspensión de virus. Los valores de la CAO del SeMNPV también fueron muy bajos desde el inicio del ensayo. Esto posiblemente, indica una alta saturación inicial de los RLs que trajo como consecuencia que la CAO del ácido gálico se redujera por efecto de su baja concentración (1 mM). Por otro lado, en algunos casos, los valores de la CAO del ácido gálico fueron muy similares entre ambas condiciones de almacenamiento, lo cual puede deberse a las reacciones oxidoreductoras que se desencadenan en el momento de la descongelación de muestras biológicas (Com. Pers. Salgado, R.) y/o a las reacciones de generación de RLs que pueden llevarse a cabo bajo congelación (-40 a 0 °C) y, que en presencia de catalizadores, pueden permanecer activos (Mendez-Alvarez *et al.*, 2001; Soto-Valdés *et al.*, 2015).

Cuando los formulados se almacenaron a -20 °C, el virus permaneció activo en el transcurso de 15 meses, pero a partir de los cinco meses de almacenamiento a 25 °C, fue evidente una pérdida de la actividad patogénica e integridad del ADN del SeMNPV. Esto nos permite suponer que la posible cantidad de RLs generados a -20 °C y/o al momento de la descongelación de las muestras, no afectó la integridad de los ácidos nucleídos, mientras que en condiciones de mayor temperatura existen otros factores, además de los RLs, que

pueden contribuir a la inactivación del virus. Tal es el caso de la producción de complejos enzimáticos (nucleasas) que provocan la hidrólisis de las proteínas estructurales del virus y de enzimas reparadoras de ADN (endo y exonucleasas) (Sperandio *et al.*, 2000; Menesses-Acosta *et al.*, 2001; De Toro 2006) y/o la presencia de proteasas alcalinas (derivadas del insecto hospederos) que pueden afectar la integridad de los OBs (Burges y Jones, 1998). Así mismo, los valores bajos o altos de pH (ej., 4 y 9) pueden afectar la integridad de los OBs (Burges y Jones, 1998, Williams y Cisneros, 2001), lo cual coincide con la tendencia de la alcalinidad observada en el último periodo de tiempo.

Algunos estudios han demostrado que la presencia de antioxidantes y/o enzimas oxidativas favorecieron la persistencia de la capacidad insecticida de algunas especies de baculovirus (Ignoffo y García, 1994; Hoover *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2002). Posiblemente, las diferencias entre los resultados obtenidos por estos autores y los nuestros se deban a las distintas metodologías utilizadas, puesto que en los estudios previos los antioxidantes se evaluaron con el objetivo de neutralizar las peroxidasas producidas por las hojas de algodón (Zhou *et al.*, 2002) y/o de distintas plantas cuando se expusieron a los rayos UV (Hoover *et al.*, 1998).

Cabe señalar que el funcionamiento adecuado de los antioxidantes puede depender o verse limitados por las reacciones químicas que se generan en el sistema, posiblemente algunos de ellos estuvieron implicados en los formulados de nuestro estudio; por ejemplo, la temperatura, la composición de los ácidos grasos, el incremento de la concentración de oxígeno en cada tratamiento y el pH (Rice-Evans *et al.*, 1996; Kuskoski *et al.*, 2005; Avello y Suwalsky, 2006). El pH es particularmente importante para los compuestos captadores de electrones, como es el caso del ácido gálico (Paixão *et al.*, 2007). Friedman y Jürgens (2002) observaron que este compuesto puede cambiar su estructura y reducir su estabilidad en medios con pH elevados (rango de 9 a 11), lo cual coincide con el valor de pH (~ 9) observado en el presente estudio después de 15 meses de almacenamiento de los distintos formulados.

Por otro lado, la presencia de moléculas pro-oxidantes, capaces de iniciar o inducir la oxidación, también pueden interferir en la captación de RLs, como fue el caso de las pro-fenoloxidasas que se produjeron cuando *Manduca sexta* (L.) y *Drosophila easter* (Fallén)

feron atacados por patógenos (Jiang *et al.*, 1998). Debido a la naturaleza de los formulados evaluados, no se descarta la presencia de este tipo de moléculas derivadas del insecto hospederos. Así mismo, los mecanismos auto-oxidativos generados por las grasas polisaturadas y organismo aerobios presentes también pueden generar un estrés en el microambiente (Halliwell, 1990; Avello y Suwalsky, 2006) y, que a su vez, pueden generar las anteriormente citadas moléculas pro-oxidantes (Beneš *et al.*, 1999).

Otros estudios también han determinado que la actividad de los formulados virales desciende a través del tiempo. Lasa *et al.* (2008) reportaron una marcada disminución de la actividad insecticida cuando un formulado líquido con base al SeMNPV se almacenó a temperatura ambiente por un lapso de 18 meses. En otro tipo de formulaciones (polvo mojable), el NPV de *S. littoralis* almacenando en condiciones laboratorio perdió el 22, 52 y 90% de su actividad en uno, tres y 12 meses, respectivamente (Burges y Jones, 1998). Tamez-Guerra *et al.* (2002) observaron una pérdida de la actividad del NPV de *Anagrapha falcifera* (Kirby) después de 18 meses de almacenamiento a temperatura ambiente. En contraste, algunas formulaciones en polvo pueden conservarse hasta un periodo de cinco años a temperatura ambiente, como el caso del producto comercial TM Biocontrol-1<sup>®</sup> para controlar a *Orgyia pseudotsugata* (McDunnough) (Lepidoptera: Lymantriidae) (Margtinoni y Iwai, 1977).

La contaminación bacteriana en los formulados de BVs deriva de la producción masiva. Cherry *et al.* (1996) y Lasa *et al.* (2008) reportaron que aunque esta contaminación no tiene un impacto negativo directo sobre la integridad del virus, si podría estar implicada en los procesos químicos que aceleraran la inactivación del mismo. Aunque en el presente estudio no se realizó un análisis sistemático del conteo bacteriano, se determinó que el valor inicial de microorganismos fue de  $3.7 \times 10^8$  UFC/mL. Los formulados que se mantuvieron a  $-20$  °C tuvieron después de 15 meses, una concentración similar a la inicialmente observada, pero se redujo hasta 119 veces en los almacenados a  $25$  °C. Lasa *et al.* (2008) determinaron que después de un periodo largo de almacenamiento (18 meses) de un formulado líquido del SeMNPV, la carga bacteriana disminuyó marcadamente desde  $1.9 \times 10^8$  hasta  $2.2 \times 10^3$  UFC/g a  $25$  °C, mientras que no se observaron muchas diferencias con temperaturas de  $4$  y  $-20$  °C ( $8.4 \times 10^8$  y  $4.6 \times 10^7$  UFC/g, respectivamente). Estas

disminuciones de la cantidad de bacterias en los formulados líquidos y almacenados a 25 °C pueden estar ligadas a procesos biológicos naturales, en donde después de una fase exponencial y estacionaria se incrementa la muerte celular (Camper *et al.*, 1991; Engelberg-Kulka *et al.*, 2006). En general, los valores del conteo bacteriano del presente estudio se encuentran entre el rango de los valores reportados por varios autores (de entre  $4 \times 10^6$  y  $7.3 \times 10^8$  UFC/ml o g) (Shapiro *et al.*, 1981; Grzywacz *et al.*, 1997; Podgwaite *et al.*, 1983, Presa-Parra, 2016).

Si bien, el uso de compuestos antioxidantes en los formulados de BVs surge como una expectativa práctica y factible para incrementar su estabilidad a mediano o largo plazo, los resultados del presente estudio indican que aún faltan varios aspectos por estudiar para validar este efecto y determinar las causas de la pérdida de su efectividad, sobre todo los estudios que se relacionan con: i) la caracterización cualitativa y cuantitativa de los RLs en los formulados de BVs, el contenido enzimático y las grasas que se generan en los medios líquidos, ii) la búsqueda de concentraciones óptimas de los antioxidantes que sean capaces de neutralizar los RLs desde el momento de la formulación, y ii) la adición de sustancias coadyuvantes que puedan mejorar la estabilidad del formulado.

**Agradecimientos.** Este trabajo contó con el apoyo financiero la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Norma Zamora-Avilés recibió apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. Agradecimientos especiales a la M. C. Lucero Pimentel y M. C. Rafael Torres Martínez por el apoyo y conocimiento brindado.

## Referencias

- Avello, M., y M. Suwalsky. 2006. **Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección.** Atenea 494: 161-172.
- Beneš, L., Z. Ďuračková y M. Ferenčík. 1999. **Chemistry, physiology and pathology of free radicals.** Life sciences 65(18): 1865-1874.
- Bianchi, F. J., J. M. Vlak, R. Rabbinge y W. Van der Werf. 2002. **Biological control of beet armyworm, *Spodoptera exigua*, with baculoviruses in greenhouses: development of a comprehensive process-based model.** Biological Control 23(1): 35-46.
- Brand, W., M. E. Cuvelier y C. Berset. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 28(1):25-30.
- Burges, H., D., y K. A. Jones. 1998. **Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects.** En: H. D. Burges (ed.). Formulation of microbial pesticides: beneficial microorganisms, nematodes, and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 33-127.
- Camper, A. K., G. A. McFeters, W. G. Characklis y W. L. Jones. 1991. **Growth kinetics of coliform bacteria under conditions relevant to drinking water distribution systems.** Applied and Environmental Microbiology 57(8): 2233-2239.
- Cherry, A., M. A. Parnell, D. Grzywacz, M. Brown y K. A. Jones. 1996. **Long-term storage of baculovirus preparations.** En: Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. pp. 1-7.
- Claus, J. D., y A. Sciocco de Cap. 2001. **Producción masiva de baculovirus.** En: Caballero, P., Williams, T., López-Ferber, M. (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma S.L., Valencia, España, pp. 257-312.
- Cory, J. S., y D. H. Bishop. 1997. **Use of baculoviruses as biological insecticides.** Molecular Biotechnology 7(3): 303-313.

- De Toro, G. 2006. **Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular.** Actas Hispanoamericanas de patología 1: 1-6.
- Engelberg-Kulka, H., S. Amitai, I. Kolodkin-Gal y R. Hazan. 2006. **Bacterial programmed cell death and multicellular behavior in bacteria.** PLoS genetics 2(10): e135.
- Grzywacz, D., D. McKinley, K. A. Jones, y G. Moawad. 1997. **Microbial contamination in *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt.** Journal Invertebrate Pathology 69(2): 151-156.
- Grzywacz, D., D. Moore y J. R. Rabindra. 2013. **Mass production of entomopathogens in less industrialized countries.** En: J. A. Morales-Ramos, G. M. Rojas, y I. D. Shapiro (eds.). Mass production of beneficial organisms. London. UK. Academic Press. pp. 519-553.
- Halliwell, B. 1990. **How to characterize a biological antioxidant.** En: (ed.). Free Radical Research Communication 9: pp. 1-32.
- Hoover, K., T. K. Kihida, A. L. Digiorgio, J. Workman, A. S. Alaniz, D. B. Hammock, y S. S. Duffey. 1998. **Inhibition of baculoviral disease by plant-mediated peroxidase activity and free radical generation.** Journal Chemical Ecology 24(12):1949-2001.
- Hughes, P. R. y H. A. Wood. 1981. **An asynchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses.** Journal on Invertebrate Pathology 37(2): 154-159.
- Hunter-Fujita, F. R., F. P. Entwistle, H. F. Evans, N. E. Crook. 1998. **Insect viruses and pest management.** Wiley, Chichester, Reino Unido.
- Ignoffo, C. M., W. C. Rice y A. H. McIntosh. 1989. **Inactivation of nonoccluded and occluded baculoviruses and baculovirus-DNA exposed to simulated sunlight.** Environmental Entomology 18(1): 177-183.
- Ignoffo, C. M., y C. García. 1994. **Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the *Heliothis* baculovirus by simulated sunlight-UV.** Environmental Entomology 24(4):1025-1029.

- Ijkel, W. F., E. A. Van Strien, J. G. Heldens, R. Broer, D. Zuidema, R. W. Goldbach y J. M. Vlak. 1999. **Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome.** Journal of General Virology 80(12): 3289-3304.
- Jiang, H., Y. Wang, y M. R. Kanost. 1998. **Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: a bacteria-inducible protein similar to *Drosophila easter*.** Proceedings of the National Academy of Sciences 95(21): 12220-12225.
- Kolodny-Hirsch, D. M., T. Sitchawat, T. Jansiri, A. Chenrchaivachirakul y U. Ketunuti. 1997. **Field evaluation of a commercial formulation of the *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus for control of beet armyworm on vegetable crops in Thailand.** Biocontrol Science and Technology 7(4): 475-488.
- Krieg, A., A. Groner y J. Huber. 1979. **Microbiology and decontamination of baculovirus preparations produced *in vivo*.** Journal of Plant Diseases and Protection 86(8): 451-459.
- Kuskoski, E., A. Asuero, A. Troncoso, J. Manzini-Filho y R. Fett. 2005. **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.** Science Technology Aliment 25(4): 726-732.
- Lasa, R., C. Ruiz-Portero, M. D. Alcázar, J. E. Belda, P. Caballero y T. Williams. 2007. **Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain.** Biological Control 40(1): 89-96.
- Lasa, R., T. Williams y P. Caballero. 2008. **Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV, Baculoviridae) formulation stored at different temperatures.** Journal of Economic Entomology 101(1):42-49.
- Martignoni, M. E., y P. J. Iwai. 1977. **Thermal inactivation characteristics of two strains of nucleopolyhedrosis virus (Baculovirus subgroup A) pathogenic for *Orgyia pseudotsugata*.** Journal of Invertebrate Pathology 30(2): 255-262.

- Martínez-Flórez, S., J. González-Gallego, J. M. Culebras y M. Tuñón. 2002. **Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes.** *Nutrición Hospitalaria* 17(6): 271-278.
- Mendez-Alvarez, E., R. Soto-Otero, A. Hermida-Ameijeiras., M. E. López-Martín, y J. L. Labandeira-García. 2001. **Effect of iron and manganese on hydroxyl radical production by 6-hydroxydopamine: mediation of antioxidants.** *Free Radical Biology and Medicine* 31(8): 986-998.
- Meneses-Acosta, A., R. Z. Mendonça, H. Merchant, L. Covarrubias y O. T. Ramírez. 2001. **Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures.** *Biotechnology and Bioengineering* 72(4):441-457.
- Miller, N. J., C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan y A. Milner. 1993. **A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates.** *Clinical Science* 84(4): 407-412.
- Moscardi, F. 1999. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** *Annual Review Entomology* 44(1): 257-289.
- Muñoz, D., J. I. Castillejos y P. Caballero. 1998. **Naturally occurring mutants are parasitic genotypes in a wild type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*.** *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4372-4497.
- Paixão, N., R. Perestrelo, J. C. Marqués y J. S. Câmara. 2007. **Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines.** *Food Chemistry* 105(1): 204-214.
- Podgwaite, J. D., R. B. Bruen y M. Shapiro. 1983. **Microorganisms associated with production lots of the nucleopolyhedrosis virus of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae).** *Entomophaga* 28(1): 9-15.
- Presa-Parra, E. 2016. **Evaluación de compuestos biocidas para el control de la microbiota en insecticidas biológicos a base de un nucleopoliedrivirus. Tesis de Maestría.** Instituto de Ecología AC.. 83 pp.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller y G. Papagnda. 1996. **Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** *Free Radical Biology and Medicine* 20(7):933-956.



- Sciocco de Cap, A. 2001. **Biología y patología 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. S. A., Valencia, España. pp. 47-67.
- Shapiro, M., R. A. Bell, y C. D. Owens. 1981. **In vivo mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus**. En: C. C. Doane y M. L. McManus (eds.). The gypsy moth: research toward integrated pest management. United States Forest Service, Washington, DC. pp. 633-655.
- Smits, P. H., M. Vrie y J. M. Vlák. 1987. **Nuclear polyhedrosis virus for control of *Spodoptera exigua* larvae on glasshouse crops**. Entomologia Experimentalis et Applicata 43(1): 73-80.
- Smits, P. H., y J. M. Vlák. 1998. **Quantitative and qualitative aspects in the production of a nuclear polyhedrosis-virus in *Spodoptera exigua* larvae**. Annals of Applied Biology (112): 249-257.
- Soto-Valdez, H., J. M. Ezquerro-Brauer, E. Márquez-Ríos y W. Torres-Arreola. 2015. **Effect of previous chilling storage on quality loss in frozen (-20° C) sierra (*Scomberomorus sierra*) muscle packed with a low-density polyethylene film containing butylated hydroxytoluene**. Food Science and Technology (Campinas) 35(1): 202-206.
- Sperandio, S., y B. I. Bredesen. 2000. **An alternative, non-apoptotic form of programmed cell death**. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(26): 14376-14381.
- Suwalsky, M., P. Orellana, M. Avello, F. Villena, y C. P. Sotomayor. 2006. **Human erythrocytes are affected in vitro by extracts of *Ugni molinae* leaves**. Food and Chemical Toxicology 44: 1393-1398.
- Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, R. W. Behle, B. S. Shasha y R. L. Pingel. 2002. **Storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spray dried formulations**. Journal of Invertebrate Pathology 79(1): 7-16.
- Tamez-Guerra P, V. Zamudio y J. Martínez. 2006. **Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida**. Ciencia UANL 9(2):149-156.

- Villamizar, L., G. Barrera, A. M. Cotes y F. Martínez. 2010. **Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release.** Journal Microencapsulation 27(4): 314-324.
- Williams T., y J. Cisneros. 2001. **Formulación y aplicación de los baculovirus bioinsecticidas.** En: P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams (eds.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas, Phytoma S. A., Valencia, España. 313-372 pp.
- Yilmaz, Y., y T. R. Toledo. 2004. **Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 52(2):255–260.
- Zamora-Avilés, N., R. Murillo, R. Lasas, S. Pineda, J. I. Figueroa, A. Bravo-Patiño, O. Díaz, J. L. Corrales y A. M. Martínez. 2017. **Genetic and biological characterization of four nucleopolyhedrovirus isolates collected in Mexico for the control of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economic Entomology 110 (4): 1465-1475.
- Zhou, M., X. Sun, Z. Hu y X. Sun. 2002. **SOD Enhances Infectivity of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus against *H. armigera* larvae.** Virologica Sinica 18(5): 506-507.
- Ziemnicka, J. 2007. **Mass production of nucleopolyhedrovirus of the satin moth *Leucoma salicis* (LesanNPV).** Journal of Plant Protection Research 48(1): 23-48.

## CAPÍTULO V

### El gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner): una revisión de su importancia agrícola y manejo en México.

---

#### Artículo de Revisión

#### En preparación para su publicación

N. Zamora-Avilés<sup>1</sup>, R. Lasa<sup>2</sup>, S. Pineda<sup>1</sup>, J. I. Figueroa<sup>1</sup>, A. Bravo-Patiño<sup>3</sup>, y A. M. Martínez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarimbaro, Km 9.5 Carretera Morelia Zinapécuaro, Michoacán, HI 58880, México.<sup>2</sup>Instituto de Ecología AC, Xalapa, 351 Carretera antigua a Coatepec, Veracruz, HI 91070. México.<sup>3</sup>Centro Multidisciplinario de estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tarimbaro, Km 9.5 Carretera Morelia Zinapécuaro, Michoacán, HI 58880, México.

#### Resumen

El gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), es una plaga de importancia económica a nivel mundial que afecta a amplio rango de plantas cultivadas. En México, *S. exigua* se encuentra registrada principalmente en las zonas geográficas del noroeste, este y sureste, en donde los cultivos mayormente afectados son el tomate, pimiento, algodón y chile. Debido a lo anterior, se han realizado importantes esfuerzos por conocer a sus enemigos naturales y evaluar distintos métodos de control. Sin embargo, son pocos o nulos los estudios publicados acerca de su biología, ecología y dinámica poblacional en las diferentes zonas agrícolas. La presente revisión tiene como objetivo realizar una recopilación, síntesis y análisis de aspectos básicos relacionados con la distribución, biología y estrategias de control de *S. exigua*, basada principalmente en trabajos realizados en México. También se discuten nuevas perspectivas para el manejo de este insecto.

**Palabras clave:** *Spodoptera exigua*, control químico, control biológico, plagas agrícolas.

### Abstract

Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), is a polyphagous pest of worldwide importance that feeds on various agricultural crops, including vegetables and ornamentals. The presence of this insect varies according to region since it is present all year round only in certain crop cycles in tropical regions. In Mexico, *S. exigua* has been recorded mainly in the north, east and southeast of the country, where the most affected crops are tomato, cotton, and chile. The main method of control of this pest is based on the use of broad-spectrum insecticides. However, several studies have shown that this insect has developed high levels of resistance to many active ingredients. In Mexico, significant efforts have been made to describe the natural enemies of *S. exigua* and evaluate their potential as biological controls. However there are few or no published studies about the biology, ecology and population dynamics of the pest in the different agricultural settings in Mexico. This review compiles and analyzes basic aspects related to the distribution, biology and control strategies of this pest, based principally on studies performed in Mexico. Moreover, novel perspectives for the biorracional management of this insect and future research lines are discussed.

**Keys words:** *Spodoptera exigua*, chemical control, biological control, agricultural pest.

## Introducción

El territorio mexicano alberga el 12% de la diversidad de especies terrestres del planeta y forma parte del importante corredor biológico mesoamericano que conecta el Norte y Sur de América (CONABIO, 2008; Williams *et al.*, 2013). Esta diversidad es el resultado de la compleja topografía y geología y de los diversos climas y microclimas que se encuentran a lo largo de todo el país (CONABIO, 2008), los cuales favorecen a una diversa producción agrícola durante todo el año (Financiera Rural 2008). En la actualidad, se estima que 22 millones de Ha, equivalentes al 11% del territorio nacional, son utilizadas para la agricultura (SARGARPA-SIAP 2014). A nivel continental, México se encuentra entre los principales productores y exportadores de hortalizas y semillas destacando cultivos de alto valor comercial como el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill), brócoli (*Brassica oleracea* L.) y chile verde (*Capsicum annuum* L.).

Como consecuencia del aumento de la superficie agrícola del país, la globalización y el cambio climático, se han incrementado los problemas fitosanitarios. Dada su ubicación geográfica, México está en constante riesgo de incidencia de plagas de insectos exóticos invasivos que pueden ingresar desde diferentes partes del mundo, pero sobre todo de aquellas colindantes como es el caso de los Estados Unidos de América (EUA), América Central y el Caribe (NOM-081-FITO 2002, Williams *et al.*, 2013). Entre las plagas de interés agrícola, el orden Lepidóptera destaca por las diversas especies que causan daños a la agricultura nacional. Entre las especies de mayor importancia se encuentra el gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Anaya y Romero 1999, NOM-081-FITO 2002). Esta especie tiene importancia a nivel económico debido a que es una especie polífaga y puede alimentarse de hasta 130 cultivos hortícolas pertenecientes a más de 30 familias (Merckx-Jacques *et al.*, 2008, Saeed *et al.* 2010) y a una amplia variedad de plantas silvestres durante los ciclos de no producción (Brown y Dewhurst 1975).

*Spodoptera exigua* se encuentra distribuido en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, tanto en campo abierto como en invernadero (Metcalf *et al.*, 1962, Hill 1987, Zheng *et al.*, 2011). Al igual que otras especies de nóctuidos, su nivel poblacional depende de varios factores, tales como la estación del año, disponibilidad y tipo de alimento y su ubicación geográfica (Garza y Terán, 2007, Mardani *et al.*, 2012). Sin embargo, la presencia de *S. exigua* en México es variable en cada ciclo de cultivo (SENASICA 2010) y puede presentarse cíclicamente

(NOM-081-FITO 2002) en periodos de dos a tres años (CESAVEG, 2001), un fenómeno que se ha presentado en otros países como China y EUA (Luo *et al.*, 2000, Burris *et al.*, 1994) y que en la actualidad se desconocen los factores que lo desencadenan. Hasta hoy, hay dudas sobre si el crecimiento de la plaga se deben a poblaciones locales o poblaciones migratorias, al igual que ocurre en otros países (Zheng *et al.*, 2011).

La presente revisión se centra principalmente en la recopilación, síntesis y análisis de aspectos básicos relacionados con la distribución, biología y estrategias de control de *S. exigua*, basada principalmente en trabajos realizados en México. Además, se discuten nuevas perspectivas para el manejo biorracional de este insecto y posibles líneas de investigación futuras que permitan un mejor entendimiento de la plaga así como de los sistemas más eficientes para su control.

### **Distribución**

El conocimiento exhaustivo de la dinámica poblacional y de la distribución espacial de una determinada especie plaga es fundamental para implementar sistemas integrados de control, especialmente para aquellas que presentan una alta capacidad migratoria como es el caso de *S. exigua* (French 1969, Mikkola 1970, Kimura 1991; Feng *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2011). Esta especie es nativa de la región Sur Oriental de Asia, pero actualmente tiene una amplia distribución geográfica en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (Andrew *et al.*, 1984, Hill 1987, CAB 2000, Pérez *et al.*, 2000). Un estudio sobre la distribución y migración de *S. exigua* señala que esta especie se encuentra distribuida en 101 países y que su localización geográfica va desde los 64° latitud N a 45° latitud S (Zheng *et al.*, 2011). En el continente americano, *S. exigua* se ha encontrado en un rango de 15 a 30° N (Brown 1975). En este continente, el insecto se reportó por primera vez en 1876 en los estados de California y Texas, EUA (Harvery 1876). Posteriormente, este insecto se estableció en Florida y otros estados del sur (Wilson 1932) y, desde entonces, se ha convertido en una plaga en distintos cultivos de importancia económica en dicho país, tales como tomate, chile, maíz (*Zea maíz* L.), soya (*Glycine max* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.), entre otros (Showler 2001). Se desconoce cuándo *S. exigua* ingresó al territorio mexicano pero su distribución actual es muy amplia en este país. Con base en datos de las campañas fitosanitarias (SAGARPA-SENASICA 2009) y otros estudios publicados, *S. exigua* se encuentra registrada principalmente en las zonas agrícolas ubicadas en el noroeste, este y sureste. Aunque no hay referencias recientes de estudios de esta especie en la zona sur, también ha sido detectada con anterioridad en cultivos de algodón del

Soconusco en Chiapas (León 1974). En el Cuadro 13 se muestran varios de los estudios que han documentado la presencia de *S. exigua* en diversos cultivos de México.

Si bien, *S. exigua* es una especie de clima templado, se considera que las poblaciones migran de las zonas de clima cálido, donde invernan, a otras zonas de clima templado y mayor latitud durante el verano (Cayrol 1972). Aunque el insecto puede migrar grandes distancias para encontrar mejores condiciones para desarrollarse, todos sus estados de vida pueden sobrevivir a temperaturas bajo cero (Mitchell y Tumlinson 1994, Kim y Kim 1997), lo que hace suponer que las poblaciones que inciden sobre zonas agrícolas con bajas temperaturas pudieran proceder tanto de poblaciones locales como de adultos migrantes (Adamczyk *et al.*, 2002). Estudios realizados por Zheng *et al.* (2011) demostraron que en cinco zonas agrícolas de China, las cámaras de pupación de *S. exigua* se localizaron debajo de restos vegetales y protegidas con partículas de suelo unidas con seda y localizadas a una profundidad de 0 a 3 cm, unas características que permiten una mayor sobrevivencia del insecto a bajas temperaturas, tal y como sucede en otras especies de insectos hibernantes (Danks 2004). En la actualidad existe bastante controversia sobre la migración de *S. exigua* y varios estudios demuestran que sus poblaciones pueden pasar el invierno en latitudes entre 37.6 y 44° N (Mikola 1970, Zheng *et al.*, 2011).

**Cuadro 13.** Principales cultivos atacados por *S. exigua* en diferentes estados de México.

<b>CULTIVO</b> Nombre común y científico	<b>LUGAR</b>	<b>AUTOR</b>
Tomate, <i>Lycopersicum esculentum</i> Mill.	San Luís Potosí Sinaloa	Osorio <i>et al.</i> (2008) Alvarado-Rodríguez (1987) Trumble y Alvarado-Rodríguez (1993, 1998) Gastélum (1999) Kolondy-Hish <i>et al.</i> (1993)
Maíz, <i>Zea maíz</i> L.	Guanajuato Sinaloa	CESAVEG (2001) García <i>et al.</i> (2012)
Melón, <i>Cucumis melo</i> L.	Sonora	SENASICA (2010)
Alfalfa, <i>Medicago sativa</i> L.	Sonora	SENASICA (2010)

Algodón, <i>Gossypium hirsutum</i> L.	Sonora Huasteca Potosina* (Norte) Coahuila Tamaulipas  Chiapas	SENASICA (2010) Garza y Terán (2007)  Vargas et al. (2004)  León et al. (1974)
Tomate de cascara, <i>Physalis ixocarpa</i> (Hornem)	Guanajuato y Zacatecas  Sinaloa	Terán et al. (1997), Garza y Terán (2007) Medina et al. (2009)  Douglas et al. (1993)
Garbanzo, <i>Cicer arietinum</i> L.	Sinaloa NE	Osorio et al. (2008) Clement et al. (2010)
Cebolla, <i>Allium cepa</i> L.	Huasteca Potosina*	Terán et al. (1997)
Brócoli, <i>Brassica oleracea Plenck</i>	Puebla	Barrientos et al. (2013)
Col, <i>Brassica oleracea</i> L.	Puebla	Barrientos et al. (2013)
Acelga, <i>Beta vulgaris</i> (K. Koch)	Puebla	Barrientos et al. (2013)
Jamaica, <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Puebla	Pérez et al. (2009)
Amaranto, <i>Amaranthus hypocondriacus</i> L.	Puebla, Guanajuato e Irapuato	Aragón et al. (1997), Salas y Baradonenko (2006), Pérez et al. (2011).
Chile, <i>C. annuum</i> L.	Nuevo León Sinaloa y Guanajuato	Martínez y Moreno ( 2009) Osorio et al. (2008)

\*Huasteca potosina: comprende parte de los estados de Tamaulipas (Sur), Veracruz (Norte), San Luis de Potosí, Hidalgo, Sierra Gorda de Querétaro y algunas zonas del estado de Puebla. NE, No especificado.

En México no existen estudios detallados sobre la migración de *S. exigua* y, debido a su amplia distribución y comportamiento de esta especie, parece posible que exista algún tipo de movimiento temporal entre regiones. Los estudios sobre las dinámicas poblacionales en los diferentes cultivos o regiones del país son también muy limitados, posiblemente debido a que en algunos casos su presencia es intermitente entre ciclos de cultivos. En el país pueden presentarse entre tres y cuatro generaciones por año dependiendo de la temperatura de la región (Gastélum



2004, Garza y Terán 2007). Sin embargo, en Florida, EUA, se han reportado hasta seis generaciones durante el verano (Wilson 1934). Garza y Terán (2007) indicaron que, en cultivos de algodón en la Huasteca Potosina, *S. exigua* puede presentar hasta tres generaciones por año. La primera se puede presentar en el mes de agosto y las otras dos a mediados de septiembre e inicios de octubre, las cuales coinciden con la fase de producción de frutos, y se puede observar simultáneamente en otros cultivos como chile, tomate y cebolla. Alvarado-Rodríguez (1987) observó que la densidad de larvas de *S. exigua* se incrementó gradualmente en el cultivo de tomate y tuvo sus mayores niveles entre marzo y abril en cinco localidades del estado de Sinaloa.

En otros países, *S. exigua* se puede presentar durante todo o gran parte del año, pero es evidente su repentino incremento poblacional en determinados periodos del ciclo agrícola, sobretodo en etapas vegetativas y en las etapas iniciales de la floración de los cultivos (Belda *et al.*, 1994, Mitchell y Tumilson 1994, Steward *et al.*, 2000).

### **Biología y Ecología**

*Spodoptera exigua* presenta metamorfosis completa u holometábola (Fig. 13). Pacheco (1994) describió las características morfológicas más importantes de los diferentes estadios de vida de *S. exigua*, los cuales se resumen en la presente revisión, adicionando aspectos de su biología básica y hábitos de comportamiento.

*Adultos.* Son palomillas de tamaño pequeño (15 mm de largo y 30 mm de envergadura alar) (Fig. 13a). Las alas anteriores son de color café grisáceo con finas líneas transversales y con una mancha pálida en el margen medio frontal (Saunders *et al.*, 1998). El apareamiento ocurre aproximadamente 24 h después de la emergencia. Para ello, las hembras emiten feromonas específicas que permiten su localización por parte de los machos (SENASICA 2010). Estas feromonas, como se indicará más adelante, son importantes en estrategias de monitoreo y control. Las hembras una vez fecundadas comienzan a ovipositar entre las 24 y 48 h teniendo unos niveles máximos de puesta entre el tercero y quinto día (SENASICA 2010).

*Huevos.* Son de forma esférica con estrías longitudinales, miden de 0.35 a 0.37 mm de diámetro y generalmente son depositados en masas de entre 10 a 250 huevos cubiertos por escamas que las hembras colocan sobre ellos para su protección (Gastelum 2004, Cayrol 1972) (Fig.13b y c). En general, los huevos son depositados en el envés de las hojas de la parte media-baja de las plantas, tal y como ha sido reportado en tomate, pimiento (*C. annuum*) y

geranio (*Geranium sp.*) (Smits *et al.*, 1987). No obstante, no es una característica específica y puede depender de la especie de cultivo y región, ya que otros autores han descrito la oviposición de este insecto en la parte media-alta en plantas de tomate (Zalom *et al.* 1983) y cebolla (*Allium cepa* L.) (Diawara *et al.*, 1993). *S. exigua* prefiere ovipositar sobre plantas de amaranto (*Amaranthus retroflexus* L. o *Amaranthus hybridus* L.), comparado con plantas de col (*Brassica oleracea* L.), girasol (*Helianthus annuus* L.) y algodón (Greenberg *et al.*, 2001, Showler 2001). Esta preferencia de oviposición parece estar relacionada con una mayor concentración de aminoácidos presentes en *A. hybridus*, los cuales, además, estimulan la alimentación de las larvas de tercer estadio. Diferencias en la oviposición también se observaron entre las plantas de quelite de puerco (*Chenopodium murale* L.) y apio (*Apium graveolens* L.), donde *S. exigua* ovipositó 391 y 154 huevos, respectivamente (Berdegué *et al.*, 1998).

Aunque existe variación en el número total de huevos depositados por hembra, existen registros de que las hembras pueden ovipositar, en promedio, 948 y 426 huevos sobre colza (*Brassica napus* var. RGS L.) y *G. hirsutum* (Var. Varamin), respectivamente (Farahani *et al.* 2011). Belda *et al.* (1994) observaron que las hembras de *S. exigua* tienden a colocar una masa de huevos por planta de pimiento, lo cual puede relacionarse con el uso del recurso, al evitar una sobreexplotación por parte de la descendencia. Además, los estudios de estos autores sugieren un alto grado de agregación, lo que hace suponer que las hembras no recorren mucha distancia dentro del cultivo y seleccionan plantas vecinas para ovipositar.

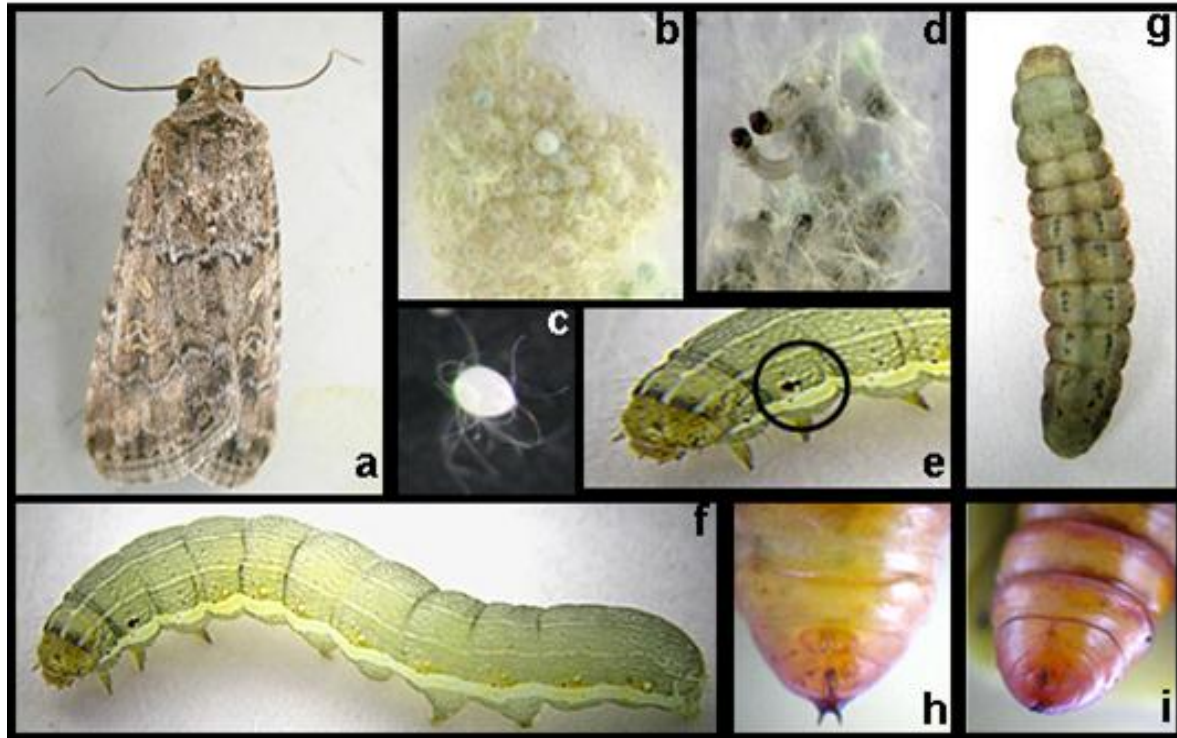
El tiempo de desarrollo embrionario de los huevos varía según la temperatura y puede oscilar de tres a seis días entre 20 a 23°C. Las larvas más jóvenes son gregarias y se alimentan del parénquima en el envés de las hojas, donde se cubren con seda (Fig. 13d). A medida que las larvas se desarrollan, se dirigen a las hojas más tiernas y tallos más próximos, generalmente en las zonas apicales. El estado de larva atraviesa comúnmente por cinco estadios. En el primer estadio (L<sub>1</sub>), las larvas son de color verde oscuro o amarillo pálido y presentan dos manchas negras en la región pleural del segundo segmento torácico, característica importante para su correcta identificación en estadio larval (Fig. 13e). Durante el tercer estadio (L<sub>3</sub>) las larvas tienden a perder el comportamiento gregario y se dispersan de manera individual por el cultivo incrementando el daño (Cayrol 1972). Además de tener un color variable, que puede ser gris-verdoso a verde-olivo y eventualmente casi negras, presentan una banda delgada de color claro en el dorso y otra más oscura a la altura de los espiráculos (Fig. 13f). Las larvas son de tipo

eruciforme y pueden medir de 25 a 35 mm de longitud en su máximo desarrollo (Pacheco 1994). El mayor daño causado por el gusano soldado ocurre en los últimos estadios larvarios al alimentarse de una gran superficie de área foliar (Trumble y Baker 1994, Saunder 1998, Greenberg *et al.*, 2001). Incluso en el último estadio larvario, pueden causar un daño directo sobre frutos de pimiento y sandía (Belda 1994) y su movilidad puede variar dependiendo del tipo de planta hospedera (Berdegué *et al.*, 1998). Otro estudio señaló que las larvas de los primeros estadios se localizan preferentemente sobre flores ( $L_1$  y  $L_2$ ) y frutos ( $L_1$  y  $L_3$ ) de pimiento en comparación con las larvas más desarrolladas ( $L_4$  y  $L_5$ ) que se encuentran mayoritariamente en el dosel y en algunos frutos (Belda *et al.*, 1994).

**Larva.** Aunque comúnmente tienen cinco estadios larvarios, algunos trabajos reportan que pueden tener hasta ocho estadios cuando se alimentan con diferentes plantas hospederas tales como repollo morado (*Brassica oleracea* var. *Capitata* L.), chile, frijol caupí (*Vigna unguiculata* L.), quimbombó (*Abelmoschus esculenta* Moench) y cebolla (Azidah y Sofian 2006) (Cuadro 14). También el tipo de cultivo parece influir en la supervivencia y tamaño de pupa, encontrándose valores significativamente más bajos en algodón que en amaranto (Ali y Gaylor 1992).

Con base en lo previamente publicado, se puede indicar que la duración del estado de larva está influenciada, en parte, por la temperatura y tipo de cultivo, pudiendo incrementarse de 10 hasta 27 días (Pacheco 1994, Greenberg *et al.*, 2001, Showler *et al.*, 2001, Vickerman *et al.*, 2002, Farahani *et al.*, 2011) (Cuadro 14).

**Pupa.** Durante el último estadio, las larvas de *S. exigua* buscan el suelo para formar una cámara de pupación (Cayrol 1972, Sannino *et al.*, 1987). En cultivos de pimiento en invernadero se ha observado que la formación de pupas puede llevarse a cabo también dentro de los frutos (Belda 1994). Las pupas recién formadas son de color verde-blancuzco y posteriormente, una vez quitinizado el tegumento, se tornan marrón-rojizas (Fig. 13h-i). El color marrón tiende a ser más oscuro e intenso en las horas cercanas a la emergencia de los adultos (Nuez *et al.*, 1996). La duración del estado de pupa es variable debido a los factores climáticos y tipo de alimentación de la larva. Por ejemplo, Azidah y Sofian (2006) observaron que, cuando las larvas se alimentaron con hojas de *A. esculentus*, la duración de esta etapa de vida fue mayor comparado con pupas que procedían de larvas alimentadas con frijol caupí, repollo morado y cebolla. En promedio, las pupas tienen una duración de entre 9 y 14 días (Cuadro 14).



**Figura 13.** Ciclo de vida de *S. exigua*. A) adulto, b) masa de huevos cubiertos con escamas, c) huevo, d) larvas neonatas, e) mancha pleural en larva de quinto estadio, f) larva de quinto estadio, g) pre pupa, h) pupa de macho e i) pupa de hembra.

**Cuadro 14.** Tiempo de desarrollo de diferentes estadios de *S. exigua* criada en dieta semisintética y diferentes plantas hospederas.

Fuente de alimento	Días de cada estadio					Condiciones de laboratorio	Referencia
	Huevo	Larva	Pupa	Adulto	Total		
Dieta semisintética	3-6	10-16	11	-	25	-----	Pacheco (1994)
<i>Brassica oleracea</i> L. var. Capitata	-	17	-	-	26.4	26 ± 6° C y 12:12 (L:0) h.	Greenberg et al. (2001)
<i>Gossypium hirsutum</i> L.	-	14.3	-	-	22.5	"	"
<i>Brassica oleracea</i> var. Capitata L.	3	16	9.4	9.8	38.2	25.7±0.12° C y 70.4±2.27% HR.	Azidah et al. (2006)
<i>Vigna unguiculata</i> L.	3	12.5	9.3	12.3	34.4	25.7+0.12° C y 70.4+2.27% HR.	Azidah et al. (2006)
<i>Abelmoschus esculenta</i> L.	3	25	10.2	10.2	48.4	"	"
<i>Allium cepa</i> L. var. Indian	3	27	9.0	11.3	51.3	25.7+0.12° C y 70.4+2.27% RH.	Azidah et al. (2006)
<i>Medicago sativa</i> L.	-	-	11.8 - 14.3	17.2 - 20.3	-	28±2° C y a 16:8 (L:O) h.	Vickerman et al. (2002)
<i>Capsicum annuum</i> L.	-	18	-	-	26.6	"	"
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	-	12.4	-	-	20.2	26 ± 6° C y 12:12 (L:0) h.	Vickerman et al. (2002)
<i>Helianthus annuus</i> L.	-	16.3	-	-	25.2	"	Vickerman et al. (2002)

<i>G. hirsutum</i> (Var. Varamin) L.	4	16	9	12	27	26±1° C, 60±5% HR y 16:8 (L:0) h.	Farahani et al. (2011)
<i>B. napus</i> (Var. RGS) L.	3	12	7	13	22	"	"
<i>Glicine max</i> (Var. Sahar) (L.)	4	13	7	13	23	26±1° C, 60±5% HR y 16:8 (L:0) h.	Farahani et al. (2011)
<i>Chenopodium álbum</i> L.	3	13	7	14	23	"	
<i>Zea mays</i> L. Var. 704	4	15	7	14	25	26±1°C, 60±5% HR y 16:8 (L: O) h.	Farahani et al. (2011)
<i>Ch. murale</i> L.	-	21	8	-	-	28 ± 2° C y 14:10(L: O) h.	Berdaguee et al. (1998)
<i>Apium graveolens</i> L.		17	8	-	-	"	
<i>Z. mays</i> hibrido KSC260 L.	3	14	11	-	29	25±1 °C, 65±5% RH, y 16:8 (L: D) h)	Mardani et al. (2012)

### **Control de *S. exigua***

Las estrategias de control dirigidas hacia esta plaga son necesarias debido a las pérdidas que causa en diversos cultivos de importancia económica. Por ejemplo, en zonas productoras de tomate en California, EUA., *S. exigua*, *Heliothis zea* Bodie y otros lepidópteros plaga han provocado pérdidas mayores a 10 millones de dólares (Zalom *et al.*, 1986). En México, Trumble y Alvarado-Rodríguez (1993) observaron que en plantaciones de tomate de las localidades de Guasave y Los Mochis, Sinaloa, *S. exigua* y otros gusanos del fruto como *H. zea* y *Heliothis virescens* F., pueden provocar pérdidas de producción de entre 11 y 17% cuando no se realiza ningún método de control. En el mismo estado de Sinaloa, se reportaron daños causados por *S. exigua* en frutos de tomate de entre 21 y 25% (Gastélum *et al.*, 1999, Alvarado y Trumble 1992). En la Huasteca Potosina, los cultivos de algodón pueden soportar hasta 50% de defoliación durante la etapa vegetativa sin afectar el rendimiento; aunque en el periodo de fructificación una defoliación del 20-25% puede ocasionar pérdidas económicas importantes (Garza y Terán 2001).

En EUA el límite de tolerancia por la presencia o daño de plagas como *S. exigua* en tomate, es de 2% por peso del fruto, por encima de este valor los productores no logran comercializar el producto (Zalom *et al.*, 1986, Wilson *et al.* 1983). Un umbral de tratamiento de 0.3 larvas/planta es utilizado en cultivos de col en el sureste de Texas, EUA (Capinera 1999). Mascarenhas *et al.* (1999) determinaron que entre ~ 60-80 larvas de *S. exigua* pueden provocar una defoliación de entre 8 a 14% en plantas de algodón. Sin embargo, este nivel de infestación no siempre se relaciona con un incremento significativo en la proporción de frutos dañados.

Los umbrales de tratamiento o de daño en fruto son difícilmente extrapolables a otros cultivos o regiones agrícolas. En México, se recomienda aplicar medidas de control al observar 20% de plantas con presencia del insecto en cultivos de tomate (SAGARPA, 2012). Alvarado-Rodríguez (1987) señala que un adecuado monitoreo de la plaga incluye su inspección desde la plántula hasta la maduración del fruto, tanto las hojas medias como altas, flores y frutos. Asimismo, el monitoreo en campo se puede realizar en forma diagonal, como lo recomienda Lange *et al.* (1985) y Weakly *et al.* (1986) (ambos citados por Alvarado-Rodríguez 1987). A partir de la formación de los primeros frutos de tomate,

se recomienda inspeccionar 100 plantas al azar en distintos surcos y realizar una acción de control si se observa en promedio 0.25 larvas/planta (Alvarado y Trumble 1999). En cultivos de chile serrano, en la Huasteca Potosina, se recomienda la aplicación de insecticidas cuando se observa el 10% de plantas con presencia del insecto desde el trasplante hasta la floración, y de 16 a 20% desde la floración hasta la cosecha (Córdova 2003). Sin embargo, en ambos casos estos umbrales son definidos sin especificar densidad de plantas por superficie. En general, el muestreo sistemático y estratificado de las plantas puede incrementar la eficiencia y viabilidad económica de los programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) (Alvarado y Trumble 1999).

El uso de los insecticidas convencionales de amplio espectro ha sido, y la principal herramienta en el combate de plagas agrícolas en México. No obstante, la resistencia generada en los insectos es una limitante para la producción de alimentos, especialmente en países como México, que son dependientes de nuevos productos insecticidas desarrollados por empresas transnacionales (Lagunes *et al.*, 2009). Sayyed *et al.* (2012) observaron que poblaciones de campo de *S. exigua* procedentes de la región de Multan, Pakistan, mostraron resistencia a 12 insecticidas distintos pertenecientes a los grupos de los piretroides, organofosforado y de nueva generación (análogos de hormona juvenil, inhibidores de la formación de cutícula etc.). Los niveles de resistencia de este insecto se observaron en un rango de 1 a 360 veces al probar un piretroide (ethophenprox) en cultivo de papa y de 1219 veces al probar el bloqueador de canales de sodio, indoxacarb en cultivos de col (Sayyed *et al.*, 2012). Posteriormente, Wyckhuys *et al.* (2013) señalaron que de acuerdo con una exploración realizada en la base de datos de resistencias en artrópodos (APRD, por sus siglas en inglés; *Arthropod Pesticide Resistance Database*), *S. exigua* es resistente a 322 insecticidas de diferentes grupos toxicológicos, lo que la ubica en el sexto lugar de la lista de insectos plaga resistentes a insecticidas orgánicos de síntesis.

Existen otros ejemplos que reiteran la alta capacidad de generación de resistencia de las poblaciones de *S. exigua* a diferentes insecticidas químicos (Brewer y Trumble 1989, Brewer *et al.*, 1990, Pérez *et al.*, 2000, Osorio *et al.*, 2008, Jia *et al.*, 2009). Ante esta situación, y por la repercusión de la utilización de los insecticidas químicos sobre los ecosistemas, el estudio de alternativas ecológicamente aceptables como parte de programas de MIP, es una necesidad actual para su control. En México se han realizado varios



estudios enfocados al desarrollo de estrategias biorracionales para el control de *S. exigua*, pero sólo algunas se han implementado dentro de esquemas de MIP, especialmente en el manejo de cultivos de alto valor comercial como el tomate (Trumble y Alvarado-Rodríguez 1993, Alvarado y Trumble 1999). A continuación se mencionan algunas de estas estrategias.

**Insecticidas convencionales.** Los productos más utilizados y autorizados por la Dirección General de Sanidad Vegetal de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en México y la agencia de protección del medio ambiente en EUA (EPA, por sus siglas en inglés) para controlar a las poblaciones de *S. exigua* son productos insecticidas de amplio espectro como el fenvalerato, permetrina, clorpirifos, metamidofos y metomilo (Alvarado-Rodríguez 1985, Gastelum 2004). En el estado de Sinaloa, estos compuestos se han utilizado en un amplio rango de entre 10 y 40 aplicaciones por ciclo de cultivo para el control del complejo de plagas del tomate entre ellas *S. exigua* (Alvarado-Rodríguez 1985, Brewer *et al.*, 1990). Trumble y Alvarado-Rodríguez (1993) reportaron que el uso de los insecticidas metamidofos ( $1.0 \text{ L/ha}^{-1}$ ) (Tamaron®, Bayerwerk, Alemania) y permetrina ( $0.5 \text{ L/ha}^{-1}$ ) (Pounce®, FMC, Filadelfia, EUA) para el control de *S. exigua*, *H. zea* y *H. virescens* produjeron una reducción de la producción de tomate durante los ciclos de primavera e invierno ( $\sim 10 \text{ kg de fruta/10 m del surco}$ ) en comparación al uso de estrategias de MIP que incluyeron el uso de avermectina (Agrimec®; Merck & Co., Rahway, NJ., EUA) (producto derivado de la fermentación de *Streptomyces avermitilis* Kim y Goodfellow, feromonas, el parasitoide *Trichogramma pretiosum* Riley y la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) ( $\sim 30 \text{ kg de fruta/10 m del surco}$ ). En el valle de Culiacán, Sinaloa, se observó que la rotación de los compuestos endosulfan, permetrina, clorpirifos, esfenvalerato, metamidofos y deltametrina, redujo el daño causado por la plaga a 1.3% comparado con el 21% en plantas no tratadas (Gastelum *et al.*, 2004).

**Reguladores de crecimiento de los insectos y spinosad.** Tebufenocida y metoxifenocida son compuestos agonistas o análogos de la hormona de muda (AHM), una

clase de reguladores de crecimiento de los insectos. Los AHM se desarrollaron por la extinta compañía Rohm & Haas (Spring House, PA, EUA) bajo la idea de obtener productos no persistentes en el ambiente, biodegradables, selectivos y menos tóxicos que los insecticidas convencionales. Ambos compuestos mimetizan la función biológica de la hormona de la muda induciendo una muda prematura y letal debido a que sus molécula se ensamblan a los receptores ecdisteroidales (Smaghe *et al.*, 2003).

Por otra parte, spinosad es la materia activa derivada del proceso de fermentación natural del actinomiceto del suelo *Saccharopolyspora spinosa* Mertz y Yao (Moulton *et al.*, 2000). La molécula de spinosad está compuesta principalmente por dos lactonas macrocíclicas: las spinosinas A y D, las cuales son responsables de su actividad insecticida (Mertz y Yao 1990). Este compuesto presenta dos únicos modos de acción; actúa sobre el sistema nervioso central en el receptor acetilcolina nicotínico y presenta actividad en el receptor GABA (Watson 2001).

En México, spinosad, tebufenocida y metoxifenocida se registraron para su uso en 1997, 1998 y 2000, respectivamente, principalmente contra lepidópteros plaga, entre ellos *S. exigua*. Estos compuestos se han considerado como alternativas seguras para el medio ambiente y no tóxicos para mamíferos, aves, peces y varios insectos benéficos (Williams *et al.*, 2003, Schneider *et al.*, 2004,). Osorio *et al.* (2008) evaluaron el efecto de metoxifenocida y spinosad en larvas de tercer estadio de *S. exigua* y determinaron que concentraciones de 21.4 y 0.58 mg i.a/L dieta de estos insecticidas, respectivamente, provocaron una mortalidad de hasta 90%. Concentraciones de 75 y 150 mg i.a./L de metoxifenocida redujeron la fecundidad de *S. exigua* hasta en un 60% cuando las larvas de tercer estadio se trataron por ingestión con dieta contaminada (Luna *et al.*, 2011). Por otra parte, ambos compuestos redujeron, entre 84 y 92%, la tasa de consumo de las larvas de tercer estadio de *S. exigua* en plantas de chile pimiento y fueron muy persistentes bajo condiciones de invernadero (Santis *et al.*, 2011, Aguirre *et al.*, 2013).

Actualmente, los esfuerzos de mejorar la eficacia de spinosinas mediante modificaciones a su estructura dieron como resultado el desarrollo de un análogo semisintético derivado de los spinosinas J y L llamado Spiretoram. La actividad insecticida de este análogo es mayor que spinosad para diversas especies de lepidópteros plaga y esta reportado entre 48 y 58 veces más efectivo en el control de *S. exigua* (Schirmer *et al.*, 2012). Además, este

producto tiene mejores resultados de residualidad en campo a pesar de tener un perfil toxicológico similar al de spinosad para especies no diana por lo que tiene un importante potencial de uso en el país. Aunque dicho producto ya se utiliza en zonas productoras de Chile en Sinaloa, México (J.L. Corrales com, pers.), su eficacia y extensión de uso no está documentada.

A pesar de la alta actividad de los compuestos anteriormente citados, *S. exigua* desarrolló rápidamente resistencia debido su uso intensivo en algunas zonas agrícolas (Osorio *et al.*, 2008, Smagghe *et al.*, 2003, Moulton *et al.*, 2001). Osorio *et al.* (2008) observaron que cinco poblaciones de campo procedentes de Sinaloa y San Luis Potosí, respectivamente, tuvieron un rango de resistencia de 2 a 37 veces cuando se trataron con spinosad, mientras que una población presentó un nivel de resistencia de 13 veces a metoxifenocida. Sayyed *et al.* (2012), señalaron que *S. exigua* ha generado importantes niveles de resistencia a spinosad (702 veces). Ante esta perspectiva, los autores recomendaron establecer programas de manejo de plagas con incidencia de resistencia, en particular en áreas donde se presente este fenómeno (Osorio *et al.*, 2008, Pineda *et al.*, 2007).

**Diamidas antranílicas.** Las diamidas antranílicas son un grupo de insecticidas catalogados como ligeramente tóxicos con acción ovicida y larvicida para un importante grupo de plagas aunque su principal uso está relacionado con el control de los lepidópteros plaga. Son catalogados como insecticidas de nueva generación y una de sus ventajas es su prolongado y particular modo de acción sistémico (~40 días) que permite controlar insectos plaga resistentes a otros insecticidas. Actúan sobre los canales de calcio, al acoplarse a un receptor distinto al receptor de rianodina, lo cual provoca una liberación irregular del  $Ca^{++}$  interno con una consecuente reducción de este elemento, cese de la alimentación, letargo, parálisis muscular y muerte del insecto (Lahm *et al.*, 2007, Smith 2013).

Este grupo de compuestos forma parte de los insecticidas utilizados para el control de plagas en hortalizas en otros países. En EUA son utilizados para el control de *S. exigua* en cultivos de lechuga y tomate en los estados de Arizona y Florida, respectivamente (Smith 2013, Palumbo 2014). En Europa, el clornatranilipol se utiliza para el control de plagas en hortalizas, vid, papa, maíz y frutales (Astor *et al.*, 2014). Sin embargo, ya existe

registro de resistencia de *S. exigua* a estos compuestos en Indonesia en donde se llevan a cabo múltiples aplicaciones de varios insecticidas (IRAC 2014). El uso de este nuevo grupo de insecticidas en México está enfocado al control de plagas en hortalizas, caña de azúcar, frutillas y cultivos básicos. En el estado de Sinaloa, estos compuestos son utilizados en periodos de crecimiento y fructificación de los cultivos de tomate y chile para el control de lepidópteros, incluyendo *S. exigua* (J. L. Corrales com. pers.). Así mismo, el uso de las diamidas antranílicas se ha extendido a otras zonas agrícolas importantes como el estado de Guanajuato para controlar lepidópteros plaga (F. Tamayo com. pers.). Si bien el uso de estos compuestos se ha extendido en México, no existen trabajos publicados sobre su impacto en las poblaciones del gusano soldado y sus enemigos naturales.

**Feromonas.** Las trampas con feromonas sexuales se han utilizado como un método de control y como herramienta para estimar la abundancia estacional de los adultos de diferentes insectos (Campion 1984, González *et al.*, 2012). Las feromonas de *S. exigua* se han estudiado en diferentes lugares del mundo (Mitchell *et al.*, 1997, Mitchell y Tumlinson 1994, Tumlinson *et al.*, 1990, Persoons *et al.*, 1981, Brady y Ganyard 1972). En esos trabajos se han observado las diferencias en la composición química de las feromonas y las proporciones relativas de los compuestos, así como su eficiencia entre las distintas poblaciones. La especificidad de este tipo de compuestos para los machos adultos ha permitido su uso eficiente para el monitoreo (Adamczyk *et al.* 2002, Roberson *et al.* 1995, Thrumble y Baker 1984); trampeo masivo (Kim *et al.* 1995) y confusión sexual de diversas plagas (Wakamura *et al.*, 1990, Mitchell *et al.*, 1997, Shorey *et al.* 1994).

Actualmente, las feromonas se utilizan en México para el control de lepidópteros plaga y otros insectos. En el estado de Sinaloa, la feromonas son utilizadas en programas de manejo de plagas en los cultivos de tomate y chile (Gastelum 2004, Navarro *et al.*, 2004). De igual forma, en el estado de Sinaloa, en cultivos básicos y hortícolas el uso de las trampas CheckMate® (Suterra LLC., Oregon, E.U.A) que contienen feromonas de lepidópteros es una práctica habitual para el control y monitoreo de *S. exigua* y el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Al intercalarse con atrayentes alimenticios (ej. melaza), estas trampas reducen significativamente las poblaciones de adultos de estas plagas (J. L. Corrales, com. pers.). Navarro *et al.* (2004) señalaron que el uso de la feromona de *S. exigua* (CheckMate BAW®), con dosis entre 117 y 188 cm<sup>3</sup>/ha, puede

reducir ~50% la población de adultos de *S. exigua* a los 22 días después de su aplicación en cultivos de tomate en el Valle de Culiacán, Sinaloa.

En la planicie de la Huasteca, San Luis Potosí, México, se cuenta con un paquete tecnológico que incluye el uso de trampas con feromonas sintéticas (sin especificar nombre comercial) en dispositivos de liberación lenta para atraer a los machos de *S. exigua* en áreas grandes. Para el monitoreo de esta plaga, se recomienda el uso de 2 a 3 trampas por cada 10 ha, mientras que como método de control se recomienda utilizar de 10 a 15 trampas por ha (Garza y Terán, 2007). A pesar de estas recomendaciones, el uso de feromonas en el país no está muy extendido debido a la disponibilidad limitada de feromonas sintéticas y a su alto costo. Otros factores que han limitado su expansión es el rezago de tecnología eficientes de aplicación y el bajo costo de insecticidas convencionales en grandes áreas (González *et al.*, 2012).

**Entomopatógenos.** Uno de los entomopatógenos con mayor empleo contra lepidópteros en México es la bacteria entomopatógena *B. thuringiensis*, (Bt). Reportes del año 2001 señalan que este patógeno se usa en alrededor de 100,000 ha. de maíz, 174,000 en algodón, y otras 200,000 ha. en hortalizas y otros cultivos (Támez *et al.*, 2001). En los estados de Sinaloa y Baja California, los daños ocasionados por *S. exigua* en los frutos de tomate se redujeron a menos del 3% por el uso de este entomopatógeno, con una consecuente disminución de los costos de control contra este insecto (Trumble y White 1994). Rosas *et al.* (2009) demostraron que formulaciones de Bt elaboradas a partir de los fagoestimulantes almidón, gnetina y elote incrementaron la ingestión del producto por parte de *S. exigua* en comparación a productos comerciales usados en el campo. Ornelas *et al.* (2013) reportaron 29 cepas de Bt aisladas de suelo en diversas localidades de Yucatán; sin embargo, sólo el 14% fueron altamente efectivas y causaron hasta un 99% de mortalidad larvaria en condiciones de laboratorio. Cabe señalar que en algunos casos el uso inapropiado de Bt ha generado problemas de resistencia en otros países (Moar *et al.* 1995, Zheng *et al.*, 2005). Sin embargo, en México continua el interés por desarrollar investigaciones en torno a la exploración de nuevas cepas y formulados con mejores características insecticidas para las poblaciones del país (Rosas *et al.*, 2009).

Otro de los productos entomopatógenos con éxito en el control del gusano soldado, es el nucleopoliedrovirus múltiple de *S. exigua* (SeMNPV). Este virus, perteneciente a la familia

baculoviridae, se ha usado para el control de *S. exigua* en cultivos hortícolas y ornamentales en diferentes lugares del mundo (Caballero *et al.*, 2009, Murillo *et al.*, 2006, Moscardi 1999). Por ejemplo, en Almería, España, surgió una fuerte demanda para su uso en invernaderos para el control de este insecto plaga como consecuencia de su eficacia y las restricciones impuestas a los productores para la exportación de sus productos al resto de Europa (Lasa *et al.*, 2007). Actualmente, México cuenta con el registro de comercialización de una cepa comercial llamada SPOD-X<sup>®</sup> (Thermo Trilogy, E.U.A), pero no hay evidencias de que este producto esté siendo utilizado como alternativa al control químico, y sólo existen referencias de su uso a nivel experimental y a nivel de laboratorio en las regiones del norte y el Bajío (Cruz 2005, Támez *et al.*, 2001). En la localidad de El Potrero, municipio de Salvatierra, Guanajuato, se realizaron aplicaciones del SeMNPV en contra de *S. exigua* en cultivos de chile en un rango de concentraciones de  $1 \times 10^{12}$  a  $1 \times 10^{14}$  OBs cuerpos de inclusión (OBs, por sus siglas en inglés)/ha y se obtuvieron mortalidades de entre 11 y 83% después de nueve días de la aplicación (Cruz 2005). Otro dato documentado, se tiene en el Valle de Guasave, Sinaloa, en donde tasas de  $2.5 \times 10^{11}$  y  $12.5 \times 10^{11}$  OBs/ha del mismo virus provocaron una disminución significativa de las poblaciones del fitófago (Kolodny-Hirsch *et al.*, 1993). Garza y Trerán (2007), reportan el uso de un complejo del Baculovirus con la adición de dos especies de baculovirus (nucleopoliedrovirus de *Autographa californica*, AcNPV y el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera sunia*) para el control de *S. exigua*, los cuales han causado la mortalidad del insecto hasta un 90% a dosis de  $1.2 \times 10^{10}$  OBs/ha. Además, existen antecedentes de la presencia natural de este patógeno en campo, cuyas tasas de mortalidad sobre *S. exigua* se observaron entre 9.6 y 80.0% en cinco localidades de Guasave y Valle de Fuerte, Sinaloa (Alvarado-Rodríguez 1987). Zamora-Avilés *et al.* (2017) reportan los primeros registros de aislamientos de SeMNPV encontrados en larvas de *S. exigua* colectadas en cultivos agrícolas de chile o tomate en dos localidades de México (Ejido Bachigualato, Culiacán, Sinaloa y Villa de Arista, San Luis Potosí). Tras la realización de ensayos de actividad biológica, se observó una alta patogenicidad en la mayoría de los aislados cuando fue comparado con el aislado de virus procedente del producto SPOD-X<sup>®</sup>, lo cual abre una interesante perspectiva sobre el uso de aislamientos nativos para el control de esta especie.

**Entomófagos.** Al igual que otros insectos plaga, *S. exigua* es susceptible de ser atacado por un amplio rango de enemigos naturales. En México se han identificado un importante grupo de enemigos naturales que inciden sobre las poblaciones de *este* insecto. La mayoría de la literatura publicada menciona frecuentemente a parasitoides pertenecientes a las familias Braconidae, Ichneumonidae y Taquinidae (García *et al.*, 21012). Los géneros asociados con mayor frecuencia a *S. exigua* son, *Apanteles* (Bruner), *Chelonus* (Cresson), *Cotesia* Cameron, *Meteorus* Haliday (Braconidae), *Euplectrus* Westwood (Eulophidae), *Eiphosoma* Cresson, *Microcharops* Román, *Toxophoroides* Cresson (Ichneumonidae) y *Lespesia* Robineau-Desvoidy, *Gonia* Meigen (Tachinidae) (King y Saunders 1984; Pacheco, 1994).

Cross *et al.* (1977) determinaron que las especies *Lespesia archippivora* (Riley) (Tachinidae) y *Rogas gossypii* Muesebeck (Braconidae) han incidido sobre poblaciones de *S. exigua* en la región de Soconusco, Chiapas. En los Valles de Guasave y Del Fuerte, estado de Sinaloa, se tienen registros sobre la abundancia relativa de parasitoides de *S. exigua* en cultivos de tomate. El braconídeo *Cotesia marginiventris* (Cresson) causó mayor nivel de parasitismo (17.9%), seguido de *Pristomerus spinatus* Fabricius (Ichneumonidae) (9.2%), *Meteorus laphygmae* (Viereck) (9.0%), *Chelonus insularis* Cresson (5.8%), *Campoletis flavicincta* (Ashmead) (Ichneumonidae) (5.6%) y *Lespesia* sp. Wood (Tachinidae) (3.2%) (Alvarado-Rodríguez 1987). Además, los autores señalaron que la interacción de estos parasitoides con un NPV incrementó sustancialmente (100%) la mortalidad larvaria natural de *S. exigua*, sobre todo en etapas tempranas del cultivo. Otro ejemplo del uso de parasitoides en México, es el control biológico por liberación aumentativa, a través de las liberaciones del parasitoide *Trichogramma* spp. Westwood (Trichogrammatidae) las cuales están resultando actualmente en una importante alternativa fitosanitaria tanto en cultivos básicos como hortalizas (Williams *et al.*, 2013). Específicamente, las liberaciones de *T. pretiosum* Riley en el estado de Sinaloa han impactado sustancialmente en la reducción de la densidad de las plagas en tomate al utilizarlo con otras estrategias de control como la disrupción de apareamiento o la aplicación de Bt (Trumble y Alvarado-Rodríguez 1993, 1998).

Con respecto a los depredadores, los insectos de las familias, Coccinellidae, Chysopidae, Anthocoridae, Nabidae, Reduvidae, y Lygaeidae han sido los más destacados en la

bibliografía (Apablaza y Vaughan 1990). Sin embargo, no existe evidencia del uso de los mismos en programas para el control biológico de *S. exigua*, pero si están mencionados como una fuente natural de mortalidad. En la Planicie Huasteca se han identificado a los depredadores *Orius* spp. Wolff (Hemiptera: Anthocoridae), *Geocoris* Fallén (Hemiptera: Geocoridae); *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville (Coleoptera: Coccinellidae); *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) y a las chinches de la familia Reduviidae (Hemiptera: Reduviidae) (Garza y Terán 2007). En Villa Arista, San Luis Potosí, se han observado diversos depredadores en los cultivos de chile y tomate, entre los que destacan *Chrysoperla* spp., *H. convergens*, *Olla v-nigrum* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae) (Díaz *et al.*, 2009). Algunos de estos depredadores coinciden con los enemigos naturales observados en cultivos de chile en la localidad del Potrero, en el municipio de Salvatierra, Guanajuato [(*H. convergens*, *Ch. carnea*, *Orius* spp. y *Collops* spp. (Coleoptera: Melyridae)] (Cruz 2005).

**Otros sistemas de control.** Algunos compuestos derivados de plantas con propiedades insecticidas también han sido evaluados para el control de *S. exigua*. Entre ellos se encuentran *Azadirachta indica* Juss, (azadiractina) y extractos de las especies *Piper auritum* Kunth y *Petiveria alliacea* L. (piperamidas). Delgado *et al.* (2012) mostraron que el extracto de *A. indica* provocó el mayor efecto insecticida, comparado con los extractos de *P. auritum* y *P. alliacea* bajo condiciones de laboratorio. Cuando estos mismos extractos se probaron en campo mostraron la misma tendencia en relación a la mortalidad provocada por cada compuesto. Otros extractos vegetales de plantas como *Psacaliopsis purpusii* (Asteraceae), *Croton ciliatoglanduliferus* (Euphorbiaceae) y *Trichilia havanensis* (Meliaceae) han sido evaluados por su actividad anti alimentaria en larvas de último estadio de *S. exigua* con resultados de hasta un 60% de disuasión (Escobar-Valencia *et al.*, 2007). No obstante estos productos experimentales no han sido evaluados en condiciones de campo.

El control cultural también tiene su importancia dentro de las estrategias de manejo de esta plaga. La eliminación de plantas silvestres en el interior del cultivo o el control de las mismas en la periferia, permite reducir el impacto de esta plaga. En México, es común que *S. exigua* oviposite sobre varios tipos de quelites silvestres (*Amaranthus* spp.). Otra práctica preventiva que reduce el riesgo de infestación de esta plaga es el uso de mallas o sistemas



de doble puerta en invernaderos. Finalmente, también se han utilizado cebos atrayentes a base de melaza fermentada con cáscara de piña (cuatro trampas para monitoreo y al menos 20 para trapeo masivo) como un sistema de monitoreo o trapeo masivo de adultos a bajo costo (Garza y Terán 2007).

## Conclusiones y Perspectivas

- La recopilación y análisis de la información incluida en este documento presenta la primera revisión bibliográfica sobre *S. exigua* realizada en México. Aunque mucha información está sustentada en manuales técnicos y artículos de difusión nacional, este documento muestra claramente la realidad de la investigación realizada y publicada con esta plaga en los últimos años en el país. Es importante destacar la gran cantidad de trabajos realizados sobre diferentes estrategias de control sobre esta plaga a nivel de laboratorio, semi campo y en zonas de alta producción de hortalizas, aunque pocos trabajos se han publicado sobre la continuidad de las estrategias de control evaluadas. Mucha de la información está sustentada en evaluaciones puntuales de la plaga, sobre todo en el ámbito de su control; sin embargo, no se encontraron trabajos publicados que hayan incidido en el entendimiento global de la ecología y dinámica poblacional del insecto en el país en las diferentes regiones o zonas productivas.
- La gran cantidad de estudios demuestran que *S. exigua* es una especie ampliamente distribuida en México y genera daños económicos en una amplia diversidad de cultivos del país como tomate, pimiento, algodón y chile verde. Otros cultivos afectados como el amaranto se están expandiendo de manera muy importante en este país y cada vez son más los estudios que registran la presencia de esta plaga. Aunque muchos estados se han esforzado por implementar medidas fitosanitarias para minimizar sus daños en los cultivos, pocas estrategias están contempladas dentro de esquemas de manejo integrado para esta plaga. Existe una necesidad de definir mejor los niveles económicos de esta especie para los diferentes cultivos en varias de las regiones del país.
- Una combinación de factores que incluyen la falta de información sobre las dinámicas poblacionales, los factores que generan incrementos de la población en determinadas épocas (muchas veces intermitentes y cíclicas), los posibles movimientos migratorios de las poblaciones y la preferencia y los daños generados en los diferentes cultivos, están dificultando la implementación de estrategias

biorracionales que sean efectivas para su control a nivel global. Ante estas deficiencias, muchas de las estrategias se basan en la aplicación de productos químicos en detrimento de otras estrategias de control que, en su conjunto, pudieran ser muy efectivas para su control como son el uso del control biológico y disrupción sexual, entre otras.

- Ante la amplia utilización de productos químicos y la rápida generación de resistencia de esta plaga frente a muchas materias activas en diferentes países, incluido México, se considera pertinente que en las diferentes regiones productoras se monitoree de manera continua la susceptibilidad de las poblaciones de *S. exigua* a las diferentes materias activas con la finalidad de desarrollar secuencias de rotación de productos fitosanitarios que resulten en un control más efectivo. Sin duda alguna, la selección de estas materias activas deberán priorizarse por su efectividad y bajo impacto sobre el ambiente, disponiendo actualmente entre muchas sustancias de nueva generación como el spinetoram y las diamidas antralíticas, las cuales son poco residuales y pueden ser eficaces sobre lepidópteros. Aunque en México estas sustancias ya se están utilizando en cultivos como chile y tomate, es importante que sean integradas dentro de esquemas de manejo más complejos donde tengan cabida otros sistemas de control biorracional que han demostrado ser efectivos en otros países y que ya han sido abordadas por varios grupos de investigación en México.
- Entre las alternativas prometedoras para el control de esta plaga podemos destacar el uso de productos entomopatógenos basados en baculovirus (SeMNPV), los cuales han demostrado ser efectivos en cultivos en invernadero y campo, y que son actualmente una realidad para controlar esta y otras plagas en varios países del mundo. En México, los baculovirus sólo se han evaluado a nivel experimental; sin embargo, los resultados de los estudios publicados muestran importantes niveles de control sobre *S. exigua* en cultivos de tomate y chile. Sin duda, otro importantes entomopatógeno la bacteria BT, la cual es utilizada como el bioinsecticida de mayor aceptación y empleo en México principalmente para el control de plagas en maíz, algodón y hortalizas. Si bien, el uso de Bt se ha basado en productos elaborados por compañías transnacionales, es importante resaltar que las cepas nativas que se han aislado y probado en laboratorio contra *S. exigua* han tenido resultados exitosos. Por

lo que sería conveniente realizar pruebas tanto en cultivos de campo abierto como brócoli, pimiento y algodón, cuya producción se realiza extensivamente, así como los producidos bajo invernadero (ej. tomate).

- En relación a los enemigos naturales, es claro el impacto que éstos podrían tener sobre el control de *S. exigua*, ya que se tiene documentada a una decena de géneros de parasitoides y varias especies de depredadores con alto potencial en los sistemas agrícolas, además de las especies comerciales de *Trichogramma* spp., que ya son una realidad para México y de las cuales ha quedado demostrada su efectividad en un esquema de MIP. De igual forma, la presencia natural de los entomófagos y patógenos puede contribuir sustancialmente en la mortalidad larvaria del insecto plaga, aun en zonas con un manejo intensivo de producción agrícola.
- Para un control efectivo de la plaga en el país, sería fundamental que se potencien mecanismos que permitan la implantación de muchos de estos sistemas mediante una interacción efectiva de las dependencias de gobierno encargadas del control fitosanitario, los centros de investigación y el sector productor. Un esfuerzo conjunto, que genere paquetes tecnológicos de control eficientes, con un entendimiento básico de la ecología del insecto en las diferentes regiones del país, podría permitir un control eficiente y un cambio en la mentalidad de los productores que reduzca su dependencia en el uso de insecticidas químicos de amplio espectro.

### **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada al primer autor de este artículo. A F. Tamayo, J. L. Corrales y P. Támez por las aportaciones para el desarrollo de esta investigación bibliográfica.

## Referencias

- Adamczyk, J. J., M. R. Williams., J. T. Reed., D. W. Hubbard y D. D. Hardee. 2002. **Spatial and temporal occurrence of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) moths in Mississippi.** Fla. Entomol. 86: 229-232.
- Aguirre, O. U., A. M. Martínez., J. Campos., L. A. Hernández., J. I. Figueroa., P. Lobit., E. Viñuela., J. M. Chavarrieta., G. Smagghe y S. Pineda. 2013. **Foliar persistence and residual activity of Methoxyfenozide against beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae).** Insect Sci. 20: 734-742.
- Ali, A. M., y M. J. Gaylor. 1992. **Effects of temperature and larval diet on development of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae).** Environ. Entomol. 21: 780-786.
- Alvarado-Rodriguez, B. 1987. **Parasites and diseases associated with larvae of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) infesting processing tomatoes in Sinaloa, Mexico.** Florida Entomologic. 70: 444-449.
- Alvarado, R. B. y J. T. Trumble. 1999. **El manejo integrado de plagas: un ejemplo en el cultivo de tomate en Sinaloa.** Pp 435-449. En: S. R. Anaya, and J. N. Romero. Eds. Hortalizas, plagas y enfermedades. Trillas. México, D. F.
- Anaya, R. S. y J. N. Romero. 1999. **Hortalizas, plagas y enfermedades** (Eds). Trillas, México. 529 pp.
- Andrew B. S. y J. S. King. 1984. **Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central.** Administración de desarrollo extranjero, Londres. 182 p.
- Apablaza, J. U., y M. A. Vaughan. 1990. **Plagas de las hortalizas. Manual de manejo integrado.** Ed. Bernardo A. Latorre. Eds. Asociados: Mario A. Vaughan, Pedro, G. Aguilar Santiago. ONU-FAO. 521 p.
- Aragón, G. A., M. A. Tapia y T. M. I. S. Huerta. 1997. **Insectos asociados con el cultivo de amaranto *Amaranthus hypocondriacus* L. (Amaranthaceae) en el Valle de Tehuacán Puebla, México.** Folia Entomol. Mex. Xalapa, Veracruz, México. 100: 33-43.

- Astro, E., T. Márquez., A. Huber., D. De Scals y M. Goñi. 2014. **Clorantraniliprol: un insecticidas innovador perteneciente a la nueva familia de las diamidas antranílicas**. Phytoma. p.212.
- Azidah, A. A., y A. M. Sofian. 2006. **Life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants**. Bull. Entomol. Res. 96: 613–618.
- Barrientos, G. E. J., P. A. Huerta., G. S. J. Escobedo y G. F. López-Olguín. 2013. **Conventional management of *Spodoptera exigua* in crops of the municipality of Los Reyes de Juárez, Puebla**. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 8: 1197-1208.
- Belda, J. E., E. Mirasol, A. Escribano, S. Rapallo y P. Caballero. 1994. **Eficacia de Nucleopoliedrovirus (VPNSe) en el control de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) en pimiento de invernadero**. Bol. Sanid. Veg. Plagas. 26: 619-628.
- Berdegúe, M., Reitz, R. S. y J. T. Trumble. 1998. **Host plant selection and development in *Spodoptera exigua*: do mother and offspring know best?**. Entomol. Exp. Appl. 89: 57-64.
- Brady, U.E., y Jr. C. M. Ganyard. 1972. **Identification of a sex pheromone of the female beet armyworm, *Spodoptera exigua***. Ann. Entomol. Soc. Am. 65: 898-899.
- Brewer, J. M., J. T. Trumble., R. B. Alvarado y E. W. Chaney. 1990. **Beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) adult and larval susceptibility to three insecticides in managed habitats and relationship to laboratory selection of resistance**. J. Econ. Entomol. 83: 2136-2146.
- Brewer, J. M., y J. T. Trumble. 1989. **Field monitoring for insecticide resistance in beet armyworm (Lepidoptera. Noctuidae)**. J. Econ. Entomol. 82: 1520-1426.
- Brown, E. S., y C. F. Dewhurst 1975. **The genus *Spodoptera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Africa and the Near East**. Bull. Entomol. Res. 65: 221-262.
- Burris, E., J. B. Graves, B. R. Leonard y C. A. White. 1994. **Beet armyworms (Lepidoptera: Noctuidae) in Northeast Louisiana: observations on an uncommon insect pest**. Fla. Entomol. 77: 454-459.

- 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.** Rev. Colomb Entomol. 35: 105-115.
- CAB International. 2000. **Crop protection compendium CD.** Global Module 2nd Edition. CAB Internacional, Wallingford, UK.
- Campion, D. G. 1983. **Pheromones for the control of insect pest in Mediterranean countries.** Crop Protection 2: 3-16.
- Capinera, J. L. 1999. **Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).** University of Florida. 105: 1-5.
- Cayrol, R.A. 1972. **Famille des Noctuidae. Sous-famille des Melicleptriinae. *Helicoverpa armigera*.** pp. 1431-1444. In: Entomologie appliquée à l'agriculture Volumen II. Ed. by Balachowsky, A.S. Masson et Cie, Paris, France.
- CESAVEG. 2001. Comité Estatal de Sanidad Vegetal. **Manual de plagas y efermedades en maíz.** Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato, A.C. 20 Pp.
- Clement, L. S., H. C. Sharma, F. J. Muehlbauer, L. R. Elberson, D. S. Mattinson y J. K. Fellman. 2010. **Resistance to beet armyworm in a chickpea recombinant inbred line population.** J. Appl. Entomol. 134: 1-8.
- CONABIO. 2008. **Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad.** [http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion\\_internacional/doctos/db\\_mexico.html](http://www.conabio.gob.mx/institucion/cooperacion_internacional/doctos/db_mexico.html) (Accesada Octubre, 2015)
- Córdova, A. R. 2003. **El Cultivo de chile serrano en zona media de San Luis Potosí.** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto técnico 37: 26 pp.
- Cross, F. M. E., P. R. V. Bodegas y R. G. Flores. 1977. **Parásitos localizados para las diferentes especies plagas de algodonoero en la zona del Socunusco, Chiapas, México.** CIES, OEA, CONACYT. Bol. Inf. 1: 11 p.
- Cruz, C. L. R. 2005. **Efectividad biológica del virus de la poliedrosis nuclear contra gusano soldado *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo de chile en El Potrero, Salvatierra, Guanajuato.** (Tesis de Licenciatura). Instituto Tecnológico de los Mochis. Los Mochis, Sinaloa, México. 62 pp.

- Danks H. V., 2004. **The roles of insect cocoons in cold conditions.** Eur. J. Entomol. 101: 433-437.
- Delgado, B. E., Ma. Del R. M. García, Ma. Del C. M. Ybarra, C. M. Luna, y Ma. T. D. Matínez. 2012. **Propiedades entomotóxicas de los extractos vegetales de *Azadirachta indica*, *Piper auritum* y *Petiveria alliacea* para el control de *Spodoptera exigua* Hübner.** Revista Chapingo Serie Horticultura. 18: 55-69.
- Diawara, M. M., J. T. Trumble, K. K. White, W. G. Carson, and L. A. Martínez. 1993. **Toxicity of linear Furanocoumarins to *Spodoptera exigua*: Evidence for antagonistic interactions.** J. Chem. Ecol. 19: 2473- 2484.
- Díaz, G. O., E. N. Rodríguez, S. G. Pineda, S. F. Casas, M. A. F. Silva, C. T. V. Monreal y S. A. A. Patiño. 2009. **Insectos y microorganismos benéficos y perjudiciales asociados a cultivos hortícolas en San Luís Potosí.** XXXII Congreso Nacional de Control Biológico, Memorias. Villahermosa, Tabasco. México. 344-337 pp.
- Douglas, M., K. Hirsch, D. L. Warkentin, B. R. Alvarado y R. Kirkland. 1993. ***Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral insecticide for the beet armyworm.** J. Econ. Entomol. 88: 314-321.
- Escobar, V. C., B. C. Hernández, M. T. P. Zayas, A. G. Aragón, L. E. G. Pérez, R. M. Hernández y J. F. O. López. 2007. **Actividad antialimentaria de extractos vegetales en el gusano Soldado *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** Agricultura sostenible. 1: 11-18.
- Farahani, S., B. Naseri y A. A. Talebi. 2011. **Comparative life table parameters of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on five host plants.** J. Entomol. Res. Sci. 13: 91-101.
- Feng, H. Q., M. K. Wu., F. D. Cheng y Y. Y. Guo. 2006. **Radar observation of the autumn migration of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, and other moths in Northern China.** Bull. Entomol. Res. 93: 115-124.
- Financiera Rural. 2008. **La producción de hortalizas en México.** Folleto informativo. 47 pp.
- French, R. A. 1969. **Migration of *Laphygma exigua* to the British isles in relation to large-scale weather system.** J. Anim. Ecol. 38: 199-210.



- García, G. C., M. B. M. González y E. M. Cortez. 2012. **Use of natural enemies and biorational pest control of corn.** Ra-Ximhai. 8: 57-70.
- Garza, U. E., y A. P. V. Terán. 2007. **El Gusano Soldado *Spodoptera exigua* y su manejo en la planicie huasteca. San Luís Potosí, México.** Folleto técnico. 15-18 pp.
- Garza, U. E., y A. P. V. Terán. 2001. **Manejo integrado del algodonero en la planicie Huasteca.** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto técnico. 8: 62 pp
- Gastélum, L. R. 2004. **Gusano soldado en tomate y chile. En: Memorias de manejo de plagas en cultivo de chile y pepino.** Fundación Produce Sinaloa, A. C. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. 175-178 pp.
- Gastélum, L., M. H. Bravo, V. L. Leyva, R. C. Hernández y G. A. Martínez. 1999. **Evaluación de sistemas de manejo de “gusano soldado” *Spodoptera exigua* Hübner Y “gusano del fruto” *Heliothis* spp (Léidoptera: Noctuidae) en tomate de Culiacánn, Sinaloa.** Memorias del XXXIV Congreso Nacional de Entomología. S. M. E. 4-6 pp.
- González A., P. Altesor, C. Sellanes y C. Rossini. 2012. **Aplicación de feromonas en el manejo de lepidópteros plaga en cultivos agrícolas.** pp. 343-360. En: J. C. E. Rojas, and E. A. Malo (eds). Temas selectos en ecología química de insectos. ECOSUR, México.
- Greenberg, M. S., T. W. Sappington, B. C. Legaspi., T. X. Liu y M. Sétamou. 2001. **Feeding and life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on different host plants.** Ann. Entomol. Soc. Am. 94: 566-575.
- Harvey, L. F. 1876. **New California and Texas moths.** J. Can. Entomol. 8: 54.
- Hill, D. S. 1987. **Mayor temperate crops pests,** pp. 441-443. In: D. S. Hill. 1987. **Agricultural insect pests of temperate regions and their control.** Cambridge University Press. 659 pp.
- Jia, B., Y. Liu, Y. Z. Cheng, X. Liu, C. Gaob y J. Shenb. 2009. **Inheritance, fitness cost and mechanism of resistance to Tebufenozide in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae).** Pest Manag. Sci. 65: 996-1002.

- Kim, K. C., Park, J. D. y Choi, D. S. 1995. **Seasonal occurrence of *Spodoptera exigua* in Chonnan province and a possibility of their control in vinyl house with pheromone traps.** Korea J. Appl. Entomol. 34:106–111.
- Kim, Y., y N. Kim N. 1997. **Cold hardiness in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** Environ. Entomol. 26: 1117-1123.
- Kimura, S. 1991. **Immigration of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* Hübner, to Northern coastal area of Akita prefecture, 1990, in relation to atmospheric conditions.** Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan. 42: 148-151.
- Kings, A. B. S., y J. L. Saunders. 1984. **Las plagas invertebradas de cultivos alimenticios en América Central.** TDRI. CATIE. 181 pp.
- Kolodny-Hirsch, D. M., D. L. Warkentin, B. Alvarez-Rodriguez y R. Kirkland. 1993. ***Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral Insecticide for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae).** J. Econ. Entomol. 86: 314-321.
- Lagunes, T. A., J. C. Rodríguez y J. C. B. De Loera. **Susceptibilidad a insecticidas en poblaciones de artrópodos de México.** Agrociencia. 43: 173-196.
- Lahm, G. P., T. M. Stevenson, T. P. Selby, J. H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C. A. Bellin, C. M. Dubas, B. K. Smith, K. A. Hughes, J. G. Hollingshaus, C. E. Clark y E. A. Benner. 2007. **Rynaxypyr: A new insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator.** Bioorg. ed. Chem. Lett. 17: 6274-6279.
- Lange, M. W., E. R. Oatman, P. A. Phillips, J. Studdert, N. C. Toscano, J. Trumble, R. A. Van Steenwyk, C. V. Weakley, L. T. Wilson y F. G. Zalom 1985. **Integrated pest management for tomatoes.** Univ. California Div. Agri. Nat. Res. Publ. 3274: 33-37.
- Lasa, R., C. P. Ruiz, M. D. Alcázar, J. E. Belda, P. Caballero y T. Williams. 2007. **Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in Southern Spain.** Biol. Control. 40: 89-96.

- Leon E, F. 1974. **Evaluation of insecticides for the control of *Spodoptera exigua* (Hübner) and *prodenia* sp. In cotton in the región of Soconusco, Chiapas (Mexico).** Folia entomol. Mexicana.
- Luna, C. J., V. A. Robinson, A. M. Martínez, M. Schneider, J. I. Figueroa, G. Smagghe, M. Viñuela, F. Budia y S. Pineda. 2011. **Long-term effects of Methoxyfenozide on the adult reproductive processes and longevity of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** J. Econ. Entomol. 104: 1229-1235.
- Luo, L. Z., Z. Y. Cao y X. F. Jiang. 2000. **Occurrence Characteristics and analysis on trend of *Spodoptera exigua* Hübner.** J. Plant Prot. 26: 37-39.
- Mardani, T. M., G. G. Nouri, N. Bahram y M. Hssanpour. 2012. **History studies of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on 10 corn hybrids.** J. Entomol. Res. Soc. 14: 09-18.
- Martínez, C. J., y E. C. Moreno. 2009. **Manejo de chiles en campo abierto.** Manual técnico. 21 pp.
- Mascarenhas, J. V., D. Cook, B. R. Leonard, E. Burris y J. B. Graves. 1999. **Late season beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation on cotton: defoliation, fruit damage, and yield loss.** Fla. Enomol. 82: 218-229.
- Medina, G. G., J. C. Mena y Y. Z. C. Ramírez. 2009. **Red de monitoreo agroclimático del estado de Zacatecas.** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto técnico. 64: 34 pp
- Merkx-Jacques, M., E. Despland y J. C. Bede. 2008. **Nutrient utilization by caterpillars of the generalist beet armyworm, *Spodoptera exigua*.** Physiol. Entomology. 33: 51-61.
- Mertz, F. P., y C. R. Yao. 1990. *Saccharopolyspora spinosa* sp. nov. isolated from soil collected in a sugar mill rum still. J. Syst. Bacteriol. 40: 34-39.
- Metcalf, C. L., W. P. Flint y R. L. Metcalf. 1962. **Destructive and Useful Insects.** Fifth ed. McGraw-Hill, New York.
- Mikkola, K. 1970. **The Interpretation of long-range migrations of *Spodoptera exigua*.** J. Anim. Ecol. 39: 593-598.

- Mitchell, R. E., y J. H. Tumlinson. 1994. **Response of *Spodoptera exigua* and *S. eridina* (Lepidoptera: Noctuidae) males to synthetic pheromone and *S. exigua* females.** Fla. Entomol. 77: 273-247.
- Mitchell, E. R., M. Kehat., C. F. Tingle y J. R. McLaughlin. 1997. **Suppression of mating by beet armyworm (Noctuidae: Lepidoptera) in cotton with pheromone.** J. Agric. Entomol. 14:17-28.
- Moar, J. W., M. C. Pusztai, H. F. Van., D. Bosch y R. C. Frutos. 1995. **Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC (Lepidoptera: Noctuidae) resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner).** Appl. Environ. Microbiol. 61 (6): 2086-2092.
- Moscardi, F. 1999. **Assessment of the application of baculoviruses for control on Lepidoptera.** Ann. Rev. Entomol. 44: 257-289.
- Moulton, J. K., A. D. Pepper y T. J. Dennehy. 2000. **Beet armyworm (*Spodoptera exigua*) resistance to spinosad.** *Pest Manag Sci* 56:842–848.
- Murillo, R., S. Elvira, D. Muñoz, T. Williams y P. Caballero. 2006. **Genetic and Phenotypic Variability in *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus Islets From Greenhouse Soils in Southern Spain.** Biol. Control. 38: 157-165.
- Navarro, S. L., M. C. G. Avilés y J. A. L. Regalado. 2004. **Las feromonas como herramientas para el control del gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hübner) en tomate y chile.** En: Memorias de manejo de plagas en cultivo de chile y pepino. Fundación Produce Sinaloa, A. C. Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. 41-49 pp.
- Norma Oficial Mexicana. 2002. **NOM-085-FITO-2001 “Manejo y eliminación de focos de infestación de plagas, mediante el establecimiento o reordenamiento de fechas de siembra, cosecha y destrucción de residuos”.** Diario Oficial de la Federación. México: SEGOB.  
[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=720889&fecha=18/09/2002](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=720889&fecha=18/09/2002).  
 (Accesada en Noviembre, 2013).
- Nuez, V. F., R. G. Ortega y G. J. Costa. 1996. **El cultivo de pimientos, chiles y ajíes.** Ed. Grupo Mundi-Prensa. Madrid, España. 607 pp.
- Ornelas, P. F. J., M. G. B. Maldonado, O. G. Pérez, M. S. Elías, M. G. C. Lozano y C. F. C. Sandoval. 2013. **Evaluación de la actividad tóxica de las cepas nuevas de**

- Bacillus thuringiensis* aisladas de Yucatán contra *Spodoptera exigua* . XXXV**  
Congreso Nacional de Control Biológico, Memorias. Oaxaca de Juárez, Oaxaca.  
México. 310-313 pp.
- Osorio, A., A. M. Martínez, M. I. Schneider, O. Díaz., J. L. Corrales y M. C. Avilés. 2008.  
**Monitoring of beet armyworm resistance to Spinosad and Methoxyfenozide in Mexico.** Pest Manag. Sci. 64: 1001–1007.
- Pacheco, F. 1994. **Plagas de los cultivos oleaginosos en México.** Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) e Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Centro de Investigación Regional del Noroeste. Sonora, México. 60 pp.
- Palumbo J. C. 2014. **Insecticide resistance management for beet armyworm in lettuce. University of Arizona.**  
[https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/resources/082014%20IRM%20Recommendations\\_BAW%20in%20Western%20Lettuce%20August%202014\\_II.pdf](https://extension.arizona.edu/sites/extension.arizona.edu/files/resources/082014%20IRM%20Recommendations_BAW%20in%20Western%20Lettuce%20August%202014_II.pdf) (Accesada en octubre de 2015)
- Persoons, J. C., C. Van der Kraan, J. W. Nooijen, J. F. Ritter, S. Voerman y C. T. Baker. 1981. **Sex pheromone of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*: isolation, identification and preliminary field evaluation.** Entomol. Exp. Appl. 30: 98-99.
- Pérez, T. C. B., G. A. Aragón, R. A. Pérez, L. R. Hernández y J. F. O. López. 2011. **Entomofaunistic study in of the cultivation of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) in Puebla, México.** Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2: 359-371.
- Pérez, T. C. E., A. G. Aragón, N. B. Martínez, A. M. R. Tapia y J. F. O. López. 2009. **associated entomofauna with the Jamaica cultivation (*Hibiscus sabdariffa* L.) in the municipality of chiautla de tapia, Puebla.** Acta zool. Mex. 25: 239-247.
- Pérez, J. C., P. Alvarado, C. Narvaéz, F. Miranda, L. R. Hernández, E. Vanegas, A. Hruska y A. M. Shelton. 2000. **Assessment of insecticide resistance in five insect pests attacking field and vegetable crops in Nicaragua.** J. Econ. Entomol. 93: 1779-1787.
- Pineda, S., M. I. Schneider, G. Smagghe, A. M. Martínez, P. Del Estal, E. Viñuela, J. Valle y F. Budia. 2007. **Lethal and sublethal effects of Methoxyfenozide and**

- Spinosad on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae).** J. Econ. Entomol. 100: 773-780.
- Rosas, G. M. N., J. M. M. Villegas y J. A. O. Torres. 2009. **Diseño de una formulación a base de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Spodoptera exigua*.** XXXII Congreso Nacional de Control Biológico, Memorias. Villahermosa, Tabasco. México. 28-31 pp.
- Saeed, S., A. H. Sayyed y I. Ahmad .2010. **Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** J. Pest Sci. 83:165–172.
- SAGARPA. 2012. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Problemas fitosanitarios.** [http://20062012.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/potencialproductivo/especificos/problemas\\_fitosanitarios.pdf](http://20062012.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/potencialproductivo/especificos/problemas_fitosanitarios.pdf). (Accesada en Noviembre, 2014).
- SAGARPA-SIAP. 2014. **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación - Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Atlas agroalimentario de México, Primera Edición.** 193 pp.
- Salas-Araíza, M. D. y A. Baradonenko. 2006. **Insectos asociados al amaranto (Amaranthaceae) en Irapuato, Guanajuato, México.** Universidad de Guanajuato. Guanajuato, México. Acta Universitaria. 16:50-56.
- Sannino, L., A. Balbiani y B. Espinosa. 1987. **Osservazioni morfobiologiche su alcune specie del genere *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae) e rapporti di parassitismo con la coltura del tabaco in Italia.** Informatore Fitopatologico. 87: 29-40.
- Sántis, E. L., L. A. Hernández, A. M. Martínez, J. Campos, J. I. Figueroa, P. Lobit, J. M. Chavarrieta., E. Viñuela, G. Smaghe y S. Pineda. 2012. **Long-term foliar persistence and efficacy of Spinosad against beet armyworm under greenhouse conditions.** Pest Man. Sci. 68: 914-921.
- Saunders, L. J., T. D. Coto y A. B. King. 1998. **Plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. Serie Técnica. Manual Técnico.** CATIE. Turrialba, Costa Rica. 22: 305.

- Sayyed, H. A., M. Naveed., M. Rafique y J. M. Arif. 2012. **Detection of insecticides resistance in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: noctuidae) depends upon insect collection methods.** Pakistan Entomol. 34: 7-15.
- Schneider, M., G. Smagghe, S. Pineda y E. Viñuela. 2004. **Action of insect growth regulator insecticides and Spinosad on life history parameters and absorption in third instar larvae of the endoparasitoid *Hyposoter didymator*.** Biol. Control. 31:189-198.
- Schirmer, U., P. Jeschke Y M. Witschel. 2012. **Modern crop protection.** Wiley-VCH Verlag CmbH & Co. Wheinheim, Alemania.
- SENASICA. 2010. **Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.** Información técnica de melón Mexicano para exportación. Folleto técnico. 38 pp.
- Sertkaja, E., A. Bayram y S. Kornosor. 2004. **Egg and Larval parasitoids of the beet armyworm *Spodoptera exigua* on mize in Turkey.** J. Phytoparasitica. 32: 305-312.
- Shorey, H. H., G. C. Summers, B. C. Sisk y G. R. Gerber. 1994. **Disruption of pheromone communication in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in alfalfa and cotton.** Environ. Entomol. 23:1529-1533.
- Showler, T. A. 2001. ***Spodoptera exigua* Oviposition and larval feeding preferences for pigweed, *Amaranthus hybridus*, over squaring cotton, *Gossypium hirsutum*, and a comparison of free amino acids in each host plant.** J. Chem. Ecol. 27:2013-2028.
- Smagghe, G., S. Pineda, B. Carton, P. Del Estal, F. Budia y E. Viñuela. 2003. **Toxicity and Kinetics of Methoxyfenozide in Greenhouse-selected *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** Pest Manag. Sci. 59: 1203-1209.
- Smith, A. H. 2013. **Managing diamide resistance in Florida tomato.** University of Florida, IFSA Extension. Publication #ENY-867.  
<http://edis.ifas.ufl.edu/in978>(Accesada en Octubre, 2015).
- Smits, P. H., M. C. Van Velden, M. Van deVrie y J. M. Vlak. 1987. **Feeding and dispersion of *Spodoptera exigua* larvae and its relevance for control with a nuclear polyhedrosis virus.** Entomol. Exp. et Appl. 43: 67-72.

- Steward, D, S. L. C. Graham, M. J. Gayrol y L. A. Vanderberg. 2000. **Combining exclusion techniques and larval death-rate analyses to evaluate mortality factors of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) in cotton.** *The Florida Entomologist* 84: 7-22.
- Támez, G. P., L. J. W. Galán, H. R. Medrano, G. García, C. P Rodríguez, M. A. F. Gómez y S. Reyes. 2001. **Bioinsecticidas: Su empleo, producción y comercialización en México.** *Ciencia UANL*. 2: 143-152.
- Teran-Vargas, P. A., E. Garza-Urbina, C.A. Blanco-Montero, G. Pérez-Carmona y J.M. Pellegaud-Rabago. 1997. **Efficacy of new insecticides to control beet armyworm in North Eastern Mexico.** Proc. Beltwide Cotton Conferece, National Cotton Council, Memphis. 1030-1031 pp.
- IRAC. 2014. **The Insecticide Resistance Action Committee Diamide Insecticide resistance update: IRAC NEWSLETTER.** 33.
- Thumble, T. J., y T. C. Baker. 1984. **Flight phenology and pheromone trapping of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern coastal California.** *Environ. Entomol.* (13): 1278-1282.
- Trumble, J., y B. Alvarado-Rodríguez. 1993. **Development and economic evaluation of a IPM program for fresh market tomato production in Mexico.** *Agricul. Ecosist. Environment.* (43): 267-284.
- Trumble, J., y B. Alvarado-Rodriguez. 1998. **Trichogrammatid egg parasitoids as a component in the management of vegetable-crop insect pests,** pp. 158-184. In: Ridgway, R. L., M. P. Hoffmann, N. N. Inscoe, and C. Glenister Eds. *Mass-reared natural enemies: application, regulation, and needs.* Thomas say publications in entomology: Proceedings. Entomological Society of America, Lanham, Maryland, USA.
- Trumble, W. C., y K. White. 1994. **Economic analysis of a *Bacillus thuringiensis*-based integrated pest management program in fresh market tomatoes.** *J. Econ. Entomol.* 87: 1463-1469.



- Tumlinson J. H., E. R. Mitchell, y H. S. Yu. 1990. **Analysis and field evaluation of volatile blend emitted by calling virgin females of beet armyworm moth, *Spodoptera exigua* (Hübner)**. J. Chem. Ecol. 6: 3411-3423.
- Vargas, E. U. M., U. C. Nava, M. G. Ramírez, y M. D. Ramírez. Ubalda. 2004. **Desarrollo, crecimiento y sobrevivencia del gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) en algodón transgénico y convencional de la Comarca Lagunera**. Revista Chapingo Serie Zonas áridas 3: 81-87.
- Vickerman, B. D., J. K. Young, y J. T. Trumble. 2002. **Effect of selenium-treated alfalfa on development, survival, feeding, and oviposition preferences of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Environ. Entomol. 31: 953-959.
- Wakamura, S., M. Takai, A. Yamamoto, H. Inoue, y M. Kawamura. 1990. **Control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), using synthetic sex pheromone. IV, Effect of communication disruption in Welsh onion fields in 1988**. Appl. Entomol. Zool. 25: 320-323.
- Watson, G. B. 2001. **Actions of insecticidal spinosyns on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors from small-diameter cockroach neurones**. Pestic. Biochem. Physiol. 71:20-28.
- Weakley, C. V., F. Zalom, y L. T. Wilson. 1986. **Worm sampling methods for processing tomatoes**. California Tomato Growers. 29: 4-8.
- Wilson, L. T., F. G. Zalom, R. Smith, y M. P. Hoffmann. 1983. **Monitoring for fruit damage in processing tomatoes: Use of a dynamic sequential sampling plan**. Environ. Entomol. 12: 835-839.
- Wilson, W. J. 1932. **Notes on the biology *Laohygma exigua* Hübner**. Fla. Entomol. 16: 3p.
- Wilson, J. W. 1934. **The asparagus caterpillar: its life history and control**. Florida Agricultural Experiment Station Bulletin. 271:1-26.
- Williams, T., J. Valle, y E. Viñuela. 2003. **Is the naturally-derived insecticide Spinosad compatible with insect natural enemies?**. Biocontrol Sci. Technol. 13:459-475.
- Williams, T., H. C. B. Arredondo, y L. A. B. Rodríguez. 2013. **Biological pest control in México**. Ann. Rev. Entomol. 58: 40-119.

- Wyckhuys, G. A. K., K. Lu, H. Morales, L. L. Vazquez., J. C. Legaspi., P. A. Eliopoulos y L. M. Hernández. 2013. **Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing World.** Biol. Control 65: 152-167.
- Zalom, F. G., T. I. Wilson, y R. Smith. 1983. **Oviposition patterns by Lepidopterous pests on processing tomatoes in California.** Environ. Entomol. 12: 1133-1137.
- Zalom, F. G., L. T. Wilson, y M. P. Hoffmann. 1986. **Impact of feeding by tomato fruitworm, *Heliothis zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), and beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on processing tomato fruit quality.** J. Econ. Entomol. 79: 822-826.
- Zamora-Avilés, N., R. Murillo, R. Lasa, S. Pineda, J. I. Figueroa, A. Bravo-Patiño, O. Díaz, J. L. Corrales y A. M. Martínez. 2017. **Genetic and biological characterization of four nucleopolyhedrovirus solates collected in Mexico for the control of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** J Econ. Entomol. 110 (4): 1465-1475.
- Zheng, L. X., X. P. Cong, X. P. Wang, y L. C. Lei. 2011. **A review of geographic distribution, overwintering and migration in *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).** J. Entomol. Res. Soc. 13: 39-48.
- Zheng, J., B. Henken, A. R. s. de Maagd, A. Purwito, F. A. Krens, y Ch. Kik. 2005. **Two different *Bacillus thuringiensis* toxin genes confer resistance to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner) in transgenic Bt-shallots (*Allium cepa* L.).** Transgenic Res. 14: 261-272.

## VII. DISCUSIÓN GENERAL

Una parte importante de los problemas fitosanitarios son causados por los insectos, los cuales reducen la calidad y el rendimiento de los productos agrícolas. La excesiva dependencia de productos químicos de amplio espectro para su control, está provocando problemas generalizados de salud ambiental y toxicidad en humanos. Además, su uso desmedido ha ocasionado severos problemas de selección de organismos resistentes y una baja eficiencia en el control de un número importante de especies plaga (Wyckhuys *et al.*, 2013). No obstante, el uso de diferentes estrategias de control biorracional dentro de sistemas de control integrado de plagas, junto con adecuados sistemas de monitoreo, pueden mantener las plagas por debajo de los umbrales económicos de daño (Capinera, 1999; Mascarenhas *et al.*, 1999; Córdova, 2003).

En la exploración de estrategias alternativas a los insecticidas químicos para la implementación en programas de manejo integrado de plagas, los entomopatógenos, y especialmente el grupo de los baculovirus (BVs), juegan un papel importante sobre todo para el control de lepidópteros e himenópteros plaga (Moscardi, 1999, Cory y Evans, 2007; Haase *et al.*, 2015). Estos virus son altamente específicos, no tóxicos para los humanos y el medio ambiente y compatibles con la mayoría de los sistemas de control, incluyendo el control biológico con parasitoides y predadores (Gelernter y Federici 1990). Un aspecto fundamental para el uso de los BVs como bioinsecticidas (principalmente nucleopoliedrovirus, NPVs) es la determinación de la actividad biológica de aislados que puedan ser los más promisorios y que estén adaptados a las poblaciones locales del insecto hospedero. Otros aspectos importantes incluyen la exploración de estrategias que permitan hacer más eficientes sus sistemas de producción y que incrementen la estabilidad de sus formulados. Este trabajo de tesis profundiza en aspectos relacionados con esta temática utilizando como base de estudio el nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua* (SeMNPV).

El SeMNPV posee una alta actividad insecticida y total especificidad, características que lo hacen idóneo para ser explorado como un bioinsecticida para el control del gusano soldado, una plaga de impacto económico sobre distintos cultivos hortícolas de México y otros países del mundo (CAB Internacional, 2000; Lasa *et al.*, 2008; Zamora-Avilés *et al.*,

2017). Bajo esta premisa, esta tesis se centró en: i) amplia revisión sobre la biología y ecología de *S. exigua*, así como los mecanismos de control (Capítulo V), ii) la caracterización genotípica y fenotípica de aislados del SeMNPV colectados en México (Capítulo II), iii) la exploración de una dieta texturizada en frío como un método sencillo para la producción masiva del virus (Capítulo III) y iv) la evaluación de un compuesto antioxidante (ácido gálico) como estabilizador de un formulado líquido del SeMNPV (Capítulo IV).

El conocimiento de la diversidad genotípica de los NPVs es un recurso valioso para el desarrollo de bioplaguicidas (Cory y Myers 2003; Serrano *et al.*, 2015; Murillo *et al.*, 2007). Biológicamente, no todos los NPVs se comportan de la misma manera entre las distintas poblaciones de una determinada especie (Fuxa, 1987). La exploración genética de los virus mediante el uso de técnicas moleculares, como la utilizada en el presente estudio (PCR-RFLP), han confirmado la variación genética del material infectivo entre distintas especies y entre la misma especie de BVs (Cory *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; Cory y Myres, 2003; Murillo *et al.*, 2006; Barrera *et al.*, 2011). En general, la diversidad genética ofrece ventajas para la selección natural, puesto que pequeños cambios en el genoma pueden originar modificaciones significativas en las características del virus y que pueden favorecer la adaptación a la población hospedero o a las condiciones ambientales (Cory *et al.*, 1997; Cooper *et al.*, 2003). En el presente estudio, la diferencias genéticas que se observaron entre los NPVs Mexicanos y los NPVs de referencia (SeSP2 procedente de Almería, España y SeUS2, procedente de Florida, EUA) no siempre reflejaron diferencias en su actividad biológica, o tuvieron un patrón específico entre las dos colonias de laboratorio evaluadas (Mexicana y Suiza), incluyendo patogenicidad, virulencia y productividad (Capítulo II). En contraste, en otros estudios los cambios que se observaron en la región homóloga *hrI* de varios aislados del SeMNPV, región con la cual se trabajó en el presente estudio, se vieron reflejados en las diferencias en sus concentraciones letales (Muñoz *et al.*, 1999; Murillo *et al.*, 2006). En nuestro estudio, la variabilidad de los aislados pudo estar reaccionada tanto con los cambios genéticos como por la variación de la respuesta del hospedero (Cory *et al.*, 1997; Cabodevilla *et al.*, 2011).

Una de las condiciones que se deben de tomar en cuenta para seleccionar un determinado aislado de NPVs como un agente de control, es que éste debe ser evaluado

contra la población de su hospedero local y en el entorno agroecológico donde se desea liberar (Escribano *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2011). Este trabajo muestra que la actividad biológica (patogenicidad y virulencia) de los distintos aislados fue menor en una población Mexicana comparada con una colonia Suiza, lo cual puede estar relacionado con algunas teorías que indican que la asociación del hospedero con sus enemigos naturales puede dar como resultado el desarrollo de resistencias (Hokkanen y Pimentel, 1984). Sin embargo, esta asociación también pudiera estar influenciada por factores que incluyen el nivel de adaptación local por cambios ecológicos y genéticos (Adiba *et al.*, 2010) o el funcionamiento del sistema inmune del hospedero (Cory y Franklin, 2012; Fleming-Davies *et al.*, 2015), entre otros. Todo esto confirma que la adaptación local de un NPVs forma parte fundamental de los criterios que se deben tomar en cuenta en la selección de un aislado que pueda ser utilizado como un bioinsecticida.

La producción masiva de los Bvs representa uno de los componentes de mayor costo en el proceso de obtención de un producto bioinsecticida (Claus y Sciocco de Cap, 2001). Actualmente, los sistemas de producción sólo pueden llevarse a cabo a escala comercial mediante el uso de insectos vivos (Grzywacz *et al.*, 2013). La tecnología de producción masiva de NPVs conlleva la adaptación de los problemas inherentes de la producción de OBs, tomando en cuenta la biología y ecología del insecto y los BVs, no sólo para mejorar costes de producción sino también para mejorar la eficiencia de los sistemas de producción y la calidad final del producto.

Un aspecto relevante sobre el uso de los BVs como bioinsecticidas, es la estandarización de los parámetros necesarios para su producción masiva y formulación (Ignoffo, 1973; Granados y Federici, 1986; Shieh, 1989; Elvira *et al.*, 2010). Aunque son muchos los factores estudiados en detalle dentro de estos sistemas de producción (ver Capítulo III), hay algunos que todavía son susceptibles de mejora. En la actualidad, existen dos métodos para la incorporación de los OBs en la dieta del insecto hospedero, uno por contaminación de superficie en dieta y otro por inclusión (Shapiro *et al.*, 1981). Aunque este último método es el más usado, presenta alta heterogeneidad en la adquisición de la infección, considerándose que este efecto es principalmente debido al efecto negativo que tiene la temperatura ( $> 55^{\circ}\text{C}$ ) sobre los OBs, al momento de la preparación de una dieta elaborada con agar. Además, este tipo de dieta puede ser más costosa y requiere un mayor

tiempo para su preparación. Con el fin de tener una opción económica y de fácil manejo se realizó un estudio que comparó el efecto de una dieta texturizada en frío, elaborada con fibra de soja la cual fue comparada con una dieta estándar sobre la adquisición de la infección y producción del SeMNPV (Capítulo III). La elaboración de la dieta se basó en la adición de proteína de fibra de soja como sustitutivo de agar (Harris, 1989), pero con una visión de uso en un sistema de producción masiva de BVs. En términos de productividad del virus por contenedor, y con el uso de una dosis óptima (36 OBs/mg), no se observaron diferencias entre la dieta texturizada en frío y la dieta estándar con base en agar; sin embargo, la dieta texturizada en frío mostró algunas ventajas importantes, tales como menor costo (~ 32%) y una mayor facilidad y menor tiempo de preparación (~ 63%).

La producción semi-masiva de OBs obtenida en este estudio fue comparable a la obtenida en otras investigaciones que emplearon larvas de *S. exigua* del mismo estadio e infectadas con el SeMNPV (Elvira *et al.* 2010; Murillo *et al.*, 2003). En general, nuestro estudio proporciona información sobre el efecto del tipo de dieta sobre un sistema de producción semi-masiva de BVs, un sistema que podría ser útil en otros sistemas de producción *in vivo* de plaguicidas microbianos. Además, este sistema puede tener la perspectiva de mejorar aún más los costos y de utilizar insumos que sean de fácil acceso y de uso local.

Una de las principales limitantes para el proceso de elaboración y almacenaje de los formulados de BVs, es la presencia de microorganismos, restos celulares y grasas derivadas del insecto hospedero (Peng *et al.*, 1999; Williams y Cisneros, 2001; Young 2001). Estos contaminantes son los principales factores determinantes de la calidad de un producto final. Si bien, los microorganismos no tienen un impacto directo sobre la viabilidad de los BVs (Cherry *et al.*, 1996; Lasa *et al.*, 2008), los ácidos grasos no saturados son altamente propensos a deteriorarse por reacciones de oxígeno y pueden producir radicales libres (RLs). Esta reacción de autooxidación puede tener un efecto negativo sobre los ácidos nucleídos de los virus, especialmente durante periodos prolongados de almacenamiento (Ignoffo y García, 1994; Burges y Jones, 1998; De Toro, 2006). Ante esta problemática, se evaluó el efecto de un compuesto antioxidante (ácido gálico) como estabilizador de un formulado líquido del SeMNPV. Con la técnica de ABTS (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) se determinaron los niveles de la capacidad antioxidante

del compuesto (CAO) y, mediante bioensayos y observación del ADN viral, se observó la actividad y la integridad del virus. A diferencia de otros estudios que han determinado que los antioxidantes pueden neutralizar a los RLs y proteger a las suspensiones virales (Ignoffo y García, 1994; Hoover *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2002), el ácido gálico no incrementó la persistencia de la actividad a una temperatura de almacenamiento de 25°C. Este resultado puede relacionarse con una serie de factores que posiblemente inactivaron al antioxidante y que se cree se desencadenan desde la elaboración de los formulados. La explicación de algunos de estos factores se discutió en el Capítulo IV de esta tesis; sin embargo, posiblemente uno de los más importantes es el pH (Paixão *et al.*, 2007), ya que cambios en éste, especialmente a niveles alcalinos, puede cambiar la estructura y reducir su estabilidad de los antioxidantes (Friedman y Jürgens, 2002). Posiblemente, este escenario se relacione con la pérdida de la CAO del ácido gálico en los formulados; sin embargo, es necesario realizar futuros estudios que lo validen.

Aunque parece claro que el almacenamiento de los productos a temperaturas bajas es la clave para prolongar la viabilidad de los BVs, esto es muy costoso y se dificulta en muchas zonas rurales donde la cadena de frío no está disponible hasta los productores (Williams y Cisneros, 2001). La exploración de alternativas que puedan retrasar la inactividad del virus aún tienen muchos retos por enfrentar, entre los cuales se incluyen: i) la identificación de antioxidantes u otros estabilizadores que puedan conservar su estructura en el transcurso del tiempo y ii) la caracterización de los compuestos que pueden acelerar la inactivación, tales como enzimas, ácidos grasos y otras moléculas que se desencadenan en el formulado por la presencia de distintos microorganismos (bacterias y levaduras).

En México se han realizado valiosos esfuerzos por identificar alternativas para el control de plagas, incluyendo parasitoides, depredadores y patógenos (Trumble y Alvarado-Rodríguez, 1993; Támez *et al.*, 2001; Gastelum, 2004; García *et al.*, 2012, Williams *et al.*, 2013). Entre éstos, algunos aislados exóticos de NPVs han sido evaluados con buenos resultados para controlar al gusano terciopelo de la soya, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lauda *et al.*, 1993; Williams y Cory, 1993) en Tamaulipas y a *S. exigua* en cultivos de tomate en Sinaloa (Kolodny-Hirsch *et al.* 1993; Garza y Trerán, 2007). Hasta nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero que aporta perspectivas sobre el uso de

NPVs nativos para el control de *S. exigua*; sin embargo, aún se requieren estudios que determinen su eficacia en condiciones de invernadero o de campo.

En general, el mercado de los bioinsecticidas está creciendo en los últimos años como consecuencia del desarrollo de resistencia a insecticidas sintéticos y por la mayor demanda social de productos menos tóxicos para los humanos, el agua y el medio ambiente. Pese al crecimiento, estos insecticidas representan menos del 5% del mercado de los insecticidas sintéticos (Menn y Hall, 1999; Támez *et al.*, 2001). Entre los bioinsecticidas, los BVs sólo representan un porcentaje de mercado inferior al 6% (Haase *et al.*, 2015). Pese a las evidencias de su buena actividad insecticida de este tipo de productos en programas de manejo integrado en varios lugares del mundo, la baja velocidad de acción (con mortalidad larvaria en torno a los 5-6 días) sigue siendo el factor más limitante para la rápida aceptación por los productores. El hecho de que los productos sean tan específicos y que una cepa de BVs puedan funcionar de manera diferente ante distintas poblaciones en diferentes regiones del mundo, también son factores que desalientan a la industria productora. El mercado de venta de muchos de estos productos suele ser local, por lo que las compañías privadas tienden a descartarlos en su cartera de productos, ya que los costos de registro son excesivamente elevados. Sin embargo, las bondades de este tipo de insecticidas pueden ser aprovechadas de manera apropiada por los sectores productores locales con el apoyo de cooperativas e instituciones gubernamentales y de investigación. Por lo tanto es necesario seguir investigando con este tipo de bioplaguicidas y focalizar más esfuerzo para enseñar y convencer a los productores y el público en general sobre las importantes ventajas del uso de este tipo de productos para el control biorracional de plagas. De manera general esta tesis aporta más conocimiento al entendimiento del uso, producción y formulación de este tipo de productos bioinsecticidas.



## Referencias

- Adiba, S., M. Huet y O. Kaltz. 2010. **Experimental evolution of local parasite maladaptation.** Journal of Evolutionary Biology 23:1195-1205.
- 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(2): 113-120.
- Burges, H., D., y K. A. Jones. 1998. **Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects.** En: H. D. Burges (ed.). Formulation of microbial pesticides: beneficial microorganisms, nematodes, and seed treatments. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands. pp. 33-127.
- CAB International. 2000. **Crop protection compendium CD.** Global Module 2nd Edition. CAB Internacional, Wallingford, Reino Unido. 100: 117-122.
- Cabodevilla, O., I. Ibañez, O. Simón, R. Murillo, P. Caballero y T. Williams. 2011. **Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus.** Biological Control 56: 184-192.
- Capinera, J. L. 1999. **Beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae).** University of Florida. 105: 1-5.
- Cherry, A., M. A. Parnell, D. Grzywacz, M. Brown y K. A. Jones. 1996. **Long-term storage of baculovirus preparations.** En: Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. pp. 1-7.
- Claus, D. J., y A. Sciocco de Cap. 2001. **Producción masiva de baculovirus.** En: P. Caballero, M. López, and T. Williams (eds.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Spain. pp. 260-312.
- Córdova, A. R. 2003. **El Cultivo de chile serrano en zona media de San Luis Potosí.** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Folleto técnico 37: 26 pp.
- Cory, J. S., R. S. Hails y S. M. Sait. 1997. **Baculovirus ecology.** En: L. K Miller (ed.), The baculoviruses. Plenum Press, NY. pp. 301-339.

- Cory, J. S., y J. H. Myers. 2003. **The ecology and evolution of insect baculoviruses.** Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 34: 239-272.
- Cory, J. S., y H. F. Evans. 2007. **Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests.** L. Lacey, and H.K. Kaya, (eds.). Springer. 149-174 pp.
- Cory, J. S., y M. T. Franklin. 2012. **Evolution and the microbial control of insects.** Evolutionary Applications 5: 455-469.
- Cooper, D., J. S. Cory, D. A. Theilmann y J. H. Myers. 2003. **Nucleopolyhedroviruses of forest and western tent caterpillars: cross-infectivity and evidence for activation of latent virus in high-density field populations.** Ecological Entomology 28(1): 41-50.
- De Toro, G. 2006. **Muerte celular programada. Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular.** Actas Hispanoamericanas de patología 1: 1-6.
- Elvira, S., N. Gorría, D. Muñoz, T. Williams y P. Caballero. 2010. **A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production.** Journal of Economic Entomology 103(1): 17-24.
- 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: 1079-1085.
- Fleming-Davies, A. E., V. Dukic, V. Andreasen, y G. Dwyer. 2015. **Effects of host heterogeneity on pathogen diversity and Evolution.** Ecology Letters 18: 1252-1261.
- Friedman, M., y H. S. Jürgens. 2000. **Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds.** Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 2101-2110.

- Fuxa, J. R. 1987. ***Spodoptera frugiperda* susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration.** Environmental Entomology 16: 218-223.
- García, G. C., M. B. M. Gonzáles y E. M. Cortez. 2012. **Use of natural enemies and biorational pest control of corn.** Ra-Ximhai 8: 57-70.
- Garza, U. E., y A. P. V. Terán. 2007. **El Gusano Soldado *Spodoptera exigua* y su manejo en la planicie huasteca. San Luis Potosí, México.** Folleto técnico. 15-18 pp.
- Gastelum, L. R 2004. **El papel de los reguladores de crecimiento en el manejo de plagas que atacan tomate y chile.** En: Manejo de Plagas en Cultivo de Tomate, Chile y Pepino. Fundación Produce, Sinaloa A.C., Sinaloa, Mexico. pp. 113-116.
- Gelernter, W. D., y B. A. Federici. 1986. **Isolation, identification and determination of virulence of a *Nucleopolyhedrovirus* from the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** Environmental Entomology 15: 240-245.
- Granados, R. R., y B. A. Federici. 1986. **The biology of baculoviruses.** Vol. II. En: R. R. Granados (Ed.). Practical application for insect control. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 31-62.
- Grzywacz, D., D. Moor y J. R. Rabindra. 2013. **Mass production of entomopathogens in less industrialized countries.** En: J. A. Morales-Ramos, G. M. Rojas, & I. D. Shapiro-Ilan (Eds.), Mass production of beneficial organisms. London. UK. Academic Press, pp. 519-553
- Haase, S., A. Sciocco-Cap y V. Romanowski. 2015. **Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives.** Viruses 7(5): 2230-2267.
- Harris, R. L. 1989. **U.S. Patent No. 4,840,800.** Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Hokkanen, H., y D. Pimentel. 1984. **New approach for selecting biological control agents.** Canadian Entomologist 116: 1109-1121.
- Hoover, K., J. L. Yee, C. M. Schultz, D. M. Rocke, B. D. Hammock y S. S. Duffey. 1998. **Effects of plant identity and chemical constituents on the efficacy of a baculovirus against *Heliothis virescens*.** Journal of Chemical Ecology 24(2): 221-252.

- Ignoffo, C. M. 1973. **Development of a viral insecticide: concept to commercialization.** Experimental Parasitology 33: 380-460.
- Ignoffo, C. M., y C. García. 1994. **Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the *Heliothis* baculovirus by simulated sunlight-UV.** Environmental Entomology 24(4):1025-1029.
- Kolodny-Hirsch, D. M., D. L. Warkentin, B. Alvarado-Rodríguez y R. Kirland. 1993. ***Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral insecticide for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economical Entomology 86: 314-321.
- Labuda, M., L. D. Jones, T. Williams y P. A. Nuttall. 1993. **Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts.** Medical and veterinary entomology 7(2): 193-196.
- Lasa, R., T. Williams y P. Caballero. 2008. **Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV, Baculoviridae) formulation stored at different temperatures.** Journal of Economic Entomology 101: 42-49.
- Mascarenhas, J. V., D. Cook, B. R. Leonard, E. Burris y J. B. Graves. 1999. **Late season beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation on cotton: defoliation, fruit damage, and yield loss.** Florida Entomological 82: 218-229.
- Menn, J. J. y F. R. Hall. 1999. Biopesticides: present status and future prospects. In: Biopesticides: Use and Deliver. Ed. F. R. Hall and J. J. Menn. Humana Press. Totowa, NJ. pp 301-320.
- Moscardi, F. 1999. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** Annual Review Entomology 44: 257-289.
- Muñoz, D., R. Murillo, P. J. Krell, J. M. Vlak, y P. Caballero. 1999. **Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeSP2) are distinguishable by a hypervariable genomic región.** Virus Research 59(1): 61-74.
- Murillo, R., D. Muñoz y P. Caballero. 2003. **Host range and biological activity of three *Spodoptera* nucleopolyhedrovirus genotypic variance and the effect of Tinopal LPW on the most active variant.** International Journal of Pest Management 49(2): 147-153.

- Murillo, R., S. Elvira, D. Muñoz, T. Williams y P. Caballero. 2006. **Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus islots from greenhouse soils in southern Spain.** Biological Control 38(2): 157-165.
- Murillo, R., D. Muñoz, C. Ruíz-Portero, D. M. Alcázar, E. J. Belda, T. Williams, y P. Caballero, 2007. **Abundance and genetic structure of nucleopolyhedrovirus populations in greenhouse substrate reservoirs.** Biological Control 42: 216-225.
- Peng, J., J. Zhong y R. R. Granados. 1999. **A baculovirus enhancin alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae.** Journal of Insect Physiology 45(2): 159-166.
- Paixão, N., R. Perestrelo, J. C. Marqués y J. S. Câmara. 2007. **Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines.** Food Chemistry 105(1): 204-214.
- 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 Invertebrate Pathology 126: 43-50.
- Shapiro, M., D. C. Owens, A. R. Bell y A. H. Woo. 1981. **Simplified, efficient system for *in vivo* mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus.** Journal of Economic Entomology 74(3): 341-343.
- Shieh, T. R. 1989. **Industrial production of viral pesticides.** Advances in Virus Research 36: 315-343.
- Támez, G. P., L. J. W. Galán, H. R. Medrano, G. García, C. P Rodríguez, M. A. F. Gómez y S. Reyes. 2001. **Bioinsecticidas: Su empleo, producción y comercialización en México.** Ciencia UANL 2: 143-152.
- Trumble, J., y B. Alvarado-Rodríguez. 1993. **Development and economic evaluation of a IPM program for fresh market tomato production in Mexico.** Agriculture, Ecosystems & Environment 43: 267-284.
- Williams, T., y J. Cisneros. 2001. **Formulación y aplicación de los baculovirus bioinsecticidas.** En: P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams (eds.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas, Phytoma S. A., Valencia, España. pp. 313-372.

- Williams, T. y J. S. Cory. 1993. **DNA restriction fragment length polymorphisms in iridovirus isolates from individual black flies (diptera simuliidae)**. Medical and veterinary entomology 7: 199-201
- Williams, T., H. C. Arredondo-Bernal y L. A. Rodríguez-del-Bosque. 2013. **Biological pest control in Mexico**. Annual review of entomology, 58.
- Wyckhuys, G. A. K., K. Lu, H. Morales, L. L. Vazquez., J. C. Legaspi., P. A. Eliopoulos y L. M. Hernández. 2013. **Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing World**. Biol. Control 65: 152-167.
- Young, S. 2001. **Persistence of virus in the environment**. En: Baur, M.E., Fuxa, J.R., (eds.), Factors affecting the survival of entomopathogens. Southern Cooperative Series Bulletin s-301/s-265. pp. 35-69.
- Zamora-Avilés, N., R. Murillo, R. Lasa, S. Pineda, J. I. Figueroa, A. Bravo-Patiño, O. Díaz, J. L. Corrales y A. M. Martínez. 2017. **Genetic and biological characterization of four nucleopolyhedrovirus isolates collected in Mexico for the control of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Journal of Economic Entomology 110 (4): 1465-1475.
- Zhou, M., X. Sun, Z. Hu y X. Sun. 2002. **SOD Enhances Infectivity of *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus against *H. armigera* larvae**. Virologica Sinica 18(5): 506-507.

## VIII. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- ✓ Mediante la técnica PCR-RFLP se caracterizaron cuatro aislados del nucleopoliedrovirus de *S. exigua* (SeMNPV) colectados en México, dos de ellos (SeSIN6 y SeSLP6) se identificaron como variantes genotípicas y se consideran promisorias para ser utilizadas como agentes de control de *S. exigua*.
- ✓ Las diferencias en la actividad biológica de los cuatro aislados mexicanos, y los tres exóticos usados como referencia, no siempre se relacionaron con algún cambio genético, pero sí con el origen del insecto hospedero.
- ✓ La producción semi-masiva de un aislado del SeMNPV mediante el uso de una dieta texturizada en frío, fue similar a la obtenida con el uso de una dieta estándar elaboradora con agar. Sin embargo, el uso innovador de la dieta texturizada en frío ofreció importantes beneficios para la producción de los BVs, principalmente en términos de sus costos y tiempo de elaboración. Además, el uso de la dieta texturizada en frío puede ofrecer la posibilidad de ser utilizada en la producción *in vivo* de otros entomopatógenos.
- ✓ El uso de la clorofila y el colorante verde en distintas dietas semi-sintéticas, no mostró un efecto fagoestimulante o de atracción visual, respectivamente, para las larvas de *S. exigua*. Por lo tanto, se requiere continuar con la búsqueda de sustancias que, incorporadas en las dietas, estimulen una más rápida y homogénea ingestión del patógeno por parte del hospedero.
- ✓ La actividad insecticida de los formulados líquidos elaborados con el SeMNPV almacenados a 25 °C, disminuyó substancialmente a través del tiempo. Sin embargo, mediante la técnica ABTS se logró determinar la presencia de radicales libres (RLs) desde el inicio del experimento, los cuales pueden ser uno de los posibles factores que contribuyen a la pérdida de efectividad biológica de los SeMNPV.
- ✓ La incorporación de un antioxidante (ácido gálico) en un formulados del SeMNPV no tuvo un efecto positivo sobre la estabilidad del virus durante 15 meses de almacenamiento. No obstante, se considera que posiblemente algunos factores

relacionados con la concentración y/o el incremento de pH limitaron la actividad del compuesto.

- ✓ La técnica ABTS fue muy efectiva para determinar la capacidad antioxidante de distintos compuestos que pueden ser utilizados como estabilizadores de formulados líquidos de BVs.
- ✓ Ante la demanda generalizada sobre el uso de alternativas para el control de plagas, la identificación de aislados nativos de BVs para el control de plagas, la evaluación de sistemas que optimicen producción y la vida de anaquel de sus formulados, forman parte de los principales campos de estudio.



