



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

**"DIVERSIDAD GENÉTICA DE AISLAMIENTOS
DEL NUCLEOPOLIEDROVIRUS MÚLTIPLE DE *Spodoptera exigua*, SU
POTENCIAL INSECTICIDA Y ACTIVIDAD DE AZADIRACTINA CONTRA EL
GUSANO SOLDADO".**

TESIS

Para obtener el título de:

Maestra en ciencias

PRESENTA:

NORMA ZAMORA AVILÉS

Directora de Tesis:

DRA. ANA MABEL MARTÍNEZ CASTILLO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Co-Director de Tesis:

DR. MARCELO BERRETA

Instituto Nacional de Tecnología Agrícola

Morelia, Michoacán, México. Marzo de 2013.



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.

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.

A la Dra. Ana Mabel Martínez Castillo, al Dr. Marcelo Berretta por la seriedad, constancia con la que me asesoraron y sobre todo por la gran enseñanza que compartieron a lo largo de mi proyecto de tesis.

A mis sinodales el Dr. Ovidio Díaz, al Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa y al Dr. Samuel Pineda Guillermo por enriquecer enormemente este trabajo de investigación científica con sus ideas y conocimiento.

Al profesor José Luis Abrego Aranda del cuál no olvido esas grandes palabras que me impulsaron y me dieron aliento para seguir en este hermoso mundo de la ciencia.

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.

A mis sobrinos, Montserrat, Dillan, Mariana, Ximena, Juliana, Valeria, Christopher y Manuel 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 Víctor 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 amigos y primos que me enseñaron a no seguir buscando respuestas a algo que es tan simple: vivir.

A mis compañeros de laboratorio de Entomología Agrícola, con quienes compartí largos días de trabajo y de quienes recibí apoyo cuando lo solicité.

"Busqué en ti ciencia, y a la par de la desnudez de tus misterios me descubría en mí, sabía de mí el significado"

M. C. José Arroyo Cruz

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, CUÁDROS Y ANEXOS	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Los baculovirus.....	3
2.1.1 Generalidades y clasificación.....	3
2.1.2. Estructura de los baculovirus: nucleocápsidas, viriones y OB.	5
2.1.3. Ciclo de infección y sintomatología.....	7
2.1.4. Aspectos ecológicos de los baculovirus.....	9
2.1.4.1. Transmisión horizontal y vertical.....	10
2.1.5. Caracteres bioquímicos.....	12
2.1.5.1. Expresión genética de los NPV.....	12
2.1.5.2. Genoma de SeMNPV.....	14
2.2. Uso de los baculovirus como agentes de control.....	15
2.3. El SeMNPV.....	17
2.4. La azadiractina.....	18
2.5. El gusano soldado, <i>Spodoptera exigua</i>	20
2.5.1. Distribución, hábitos y biología.....	20
2.5.2. Importancia económica.....	21
2.5.3. Métodos de control.....	22
3. HIPÓTESIS	23

4. OBJETIVOS	24
4. 1. Objetivo general.....	24
4. 2. Objetivos específicos.....	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Cría del insecto	25
5.2. Caracterización genética de los aislamientos de SeMNPV.....	25
5.2.1. Procedencia y replicación.....	25
5.2.2. Extracción y precipitación del ADN.....	26
5.2.3. Cuantificación del ADN genómico.....	27
5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y purificación del producto.....	28
5.4. Restricción enzimática.....	30
5.5. Clonación de regiones homologas <i>hr3</i> y <i>hr5</i>	31
5.5.1. Reacción de ligación.....	31
5.5.2. Transformación de bacterias.....	31
5.5.3. Detección de clones recombinantes.....	32
5.5.4. Purificación de ADN plasmídico de <i>hr3</i> y <i>hr5</i>	33
5.6. Secuenciación de productos de PCR.....	33
5.7. Análisis de secuencias.....	34
5.8. Bioensayos.....	34
5.8.1. SeMNPV.....	34
5.8.2. Azadiractina.....	34
5.8.3. Análisis estadístico.....	35
6.RESULTADOS	36
6.1. Caracterización genética de los aislamientos de SeMNPV.....	36
6.1.1. Amplificación por PCR de secuencias específicas del SeMNPV a partir de muestras de ADN de OBs purificados.....	36

6.2. Análisis de los productos de PCR - “Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción” (RFLP).....	37
6.3. Clonación de los fragmentos de PCRs de las regiones homólogas <i>hr3</i> y <i>hr5</i>	39
6.4. Análisis de secuencias.....	41
6.4.1. Alineamiento de secuencias de SeMNPV del gen <i>lef-8</i>	41
6.4.2. Alineamiento de secuencias de SeMNPV del gen <i>polh</i>	41
6.4.3. Alineamiento de secuencias de SeMNPV de la región homóloga <i>hr3</i>	42
6.5. Actividad biológica de SeMNPV.....	45
6.6. Actividad biológica de azadiractina.....	47
7. DISCUSION	49
8. CONCLUSIONES	54
9. BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del proceso infeccioso de los baculovirus (Caballero <i>et al.</i> , 2009).....	8
Figura 2. Sintomatología de una larva de <i>S. frugiperda</i> previa a la muerte (A) y muerta (B) por la acción de su nucleopoliedrovirus (fotografías inéditas de Leandro, J. A. 2009).....	9
Figura 3. Mapa circular del ADN de SeMNPV mostrando la organización genómica (imagen tomada de Ijkel <i>et al.</i> , 1999).....	15
Figura 4. Estructura química de la azadiractina.....	18
Figura 5. Síntomas producidos por la azadiractina en larvas de <i>S. frugiperda</i> (fotografías inéditas de J. A. Leandro, 2009).....	19
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (TBE) a 65 volts, de la amplificación por PCR de un fragmento del gen <i>lef-8</i> de 775 pb (A) y de un fragmento del gen poliedrina (<i>polh</i>) de 564 pb de tamaño esperado (B).....	36
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (TBE) a 75 volts de la amplificación por PCR de la región <i>hr3</i> (tamaño esperado, 602 bp) (A) y de la región <i>hr5</i> (tamaño esperado, 851 bp) (B).....	37
Figura 8. Regiones homólogas <i>hr 3</i> (A) y <i>hr 5</i> (B) de SeMNPV (GenBank # NC_002169.1).....	38
Figura 9. Electroforesis de productos en gel de agarosa al 1.2% (TBE) a 75 volts. Productos de PCR a partir de ADN de <i>SeMNPV</i> digeridos con <i>Bgl</i> II.....	39
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (TBE) a 65 volts, de fragmentos <i>hr3</i> y <i>hr5</i> de PCRs obtenidos de clones.....	40

Figura 11. Comparación de secuencias para el gen <i>lef-8</i> de los aislamientos: SeMNPV_GB, SeMNPV_SIN6, SeMNPV_SIN8, SeMNPV_SLP6, SeMNPV_SLP8 y SeMNPV_SPX.....	43
Figura 12. Comparación de secuencias para el gen <i>polh</i> de los aislamientos: SeMNPV_GB, SeMNPV_SIN6, SeMNPV_SIN8, SeMNPV_SLP6, SeMNPV_SLP8 y SeMNPV_SPX.....	43
Figura 13. Comparación de secuencias para la región homóloga <i>hr3</i> de los aislamientos: SeMNPV_GB, SeMNPV_SIN6, SeMNPV_SIN8, SeMNPV_SLP6, SeMNPV_SLP8 y SeMNPV_SPX.....	44
Figura 14. Porcentaje de mortalidad acumulada en larvas de tercer estadio de <i>S. exigua</i> tratadas con el SeMNPV a través de la técnica de la ingestión de la gota. Los aislamientos evaluados fueron: SPX, Sinaloa 2006 (SIN6), Sinaloa 2008 (SIN8) y San Luis Potosí 2006 (SLP6).....	46
Figura 15. Porcentaje de mortalidad acumulada en larvas de tercer estadio de <i>S. exigua</i> causada por azadiractina a diferentes tiempos después de la aplicación.....	47

CUADROS

Cuadro 1. Especies de nucleopoliedrovirus asociadas a su hospedero principal. Basado en el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2009).....	4
Cuadro 2. Tipos de transmisión de los baculovirus en campo (Cory, 2010).....	11
Cuadro 3. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación parcial de los genes <i>polh</i> y <i>lef-8</i> y para la amplificación de las dos regiones homólogas (<i>hr3</i> y <i>hr5</i>).....	28
Cuadro 4. Mezcla de reactivos utilizados para la reacción de PCR.....	29
Cuadro 5. Condiciones de ciclado para la reacción de PCR.....	29
Cuadro 6. Mezcla de reactivos para la restricción.....	30
Cuadro 7. Reacción de ligación para los fragmentos amplificados.....	31

Cuadro 8. Mezcla de reactivos para la reacción de PCR colony de <i>hr3</i> y <i>hr5</i>	32
Cuadro 9. Cebadores universales para la detección del inserto (<i>hr3</i> y <i>hr5</i>).....	33
Cuadro 10. Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>S. exigua</i> tratadas con diferentes aislados del SeMNPV a través de la técnica de la ingestión de la gota.....	45
Cuadro 11. Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>S. exigua</i> después de la aplicación de azadiractina a través de la técnica de contaminación por superficie de dieta (seis días de exposición).....	48

ANEXOS

Anexo I. Soluciones para el análisis de ácidos nucleídos mediante electroforesis en geles de agarosa.....	67
Anexo II. Técnica de purificación de producto obtenido por PCR.....	68
Anexo III. QIA Spin Miniprep Kit: purificación de ADN plasmídico.....	69

RESUMEN

El gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), es un insecto que se distribuye en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Las larvas de esta plaga pueden alimentarse de varios vegetales incluyendo pimiento dulce, tomate, berenjena, melón y sandía en condiciones de invernadero y campo abierto. Para combatir esta plaga, los agricultores utilizan insecticidas orgánicos sintéticos, pero el control no ha sido exitoso debido a la alta capacidad que tiene este insecto para desarrollar resistencia hacia la mayoría de los compuestos convencionales. Los nucleopoliedrovirus (NPVs) (Baculoviridae) y la azadiractina son dos insecticidas biorracionales que se utilizan en diferentes partes del mundo para el control de insectos. En el presente trabajo se estudió la diversidad genética de un grupo de NPVs obtenidos de larvas de *S. exigua* colectadas en dos zonas agrícolas (Sinaloa y San Luis Potosí) de México en los años 2006 y 2008 (SIN6, SIN8, SLP6 y SLP8). Además, se estudió el potencial insecticida de estos aislamientos y la actividad biológica de azadiractina (AZA) en larvas de tercer estadio de *S. exigua*. Los estudios moleculares se realizaron mediante una combinación de las técnicas: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), PCR-Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y secuenciación de fragmentos específicos del genoma. En total se procesaron 80 larvas, de las cuales se tomó una muestra para cada aislamiento. También se analizaron como referencia larvas infectadas con el nucleopolihedrovirus múltiple de *S. exigua* (SeMNPV) procedente del producto comercial Spod-X® (SPX). Se analizaron secuencias parciales de los genes *lef-8*, *polh* y la secuencia completa de la región homóloga *hr3*, así mismo se realizó un PCR-RFLP usando la enzima *Bgl*III para *hr3* y *hr5*. Los resultados mostraron que los aislamientos que se obtuvieron de las larvas de *S. exigua* colectadas en Sinaloa y San Luis Potosí pertenecen al NPV de *S. exigua* (SeMNPV). Las secuencias obtenidas para *lef-8* y *polh* revelaron pocas diferencias (polimorfismo simple de nucleótidos, NSP) entre los aislamientos: SIN6, SIN8, SLP6, SLP8 y SPX. Estas diferencias no mostraron alteraciones en la traducción a proteína para estos genes. Para el caso de la *hr5*, no se logró obtener la secuenciación de los productos amplificados; sin embargo, un resultado relevante se observó para *hr3* en las secuencias obtenidas en el aislamiento SLP6, en donde hubo una delección de 80 pb al alinear las dos variantes

genotípicas (1SLP6 y 2SLP6). En el resto de los aislamientos, se detectaron cambios dentro de las regiones palindrómicas que permitieron diferenciar a los aislamientos colectados en México de SPX. Los bioensayos con los aislamientos del SeMNPV y AZA se realizaron mediante los métodos de inoculación por gota y contaminación de superficie de dieta, respectivamente. El aislamiento (SLP6), que presentó una delección en su genoma, provocó la mayor mortalidad larvaria (240 OBs/larva) comparado con todos los aislamientos. Los valores de las DL_{50} de los aislamientos SIN6 (1135 OBs/larva) y SIN8 (1728 OBs/larva) fueron menores comparados con SPX (3473 OBs/larva), aunque éstos no difirieron significativamente a las 216 horas posteriores al tratamiento (hpt). Para conocer con mayor profundidad la interacción de estos aislamientos con su huésped, se requieren validar otros factores que puedan estar relacionados con la variabilidad genética. Así mismo, es necesario explorar otras regiones homólogas (*hr1*) o genes poco conservados que puedan estar mayormente implicados en la diversidad de las poblaciones de NPVs. Por otro lado, se demostró que las larvas de *S. exigua* fueron altamente susceptibles a la AZA, cuyos valores de las LC_{50} estuvieron comprendidos en un rango de 9 a 3.2 mg L⁻¹ entre las 156 y 236 hpt, respectivamente. Debido a que tanto los NPVs como la AZA han adquirido relevancia como alternativas para el control de diferentes plagas, los resultados del presente estudio abren perspectivas de nuevas líneas de investigación que tengan como objetivo incorporar estas alternativas para el control del gusano soldado en México.

ABSTRACT

The beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), is an insect widely distributed in tropical and subtropical regions of the world. Larvae of this pest can feed on several vegetable crops including sweet pepper, tomato, aubergine, melon and watermelon in greenhouses and open field. To combat the pest, growers use synthetic organic insecticides, but the control achieved is not successful because of the insect's high capacity to develop resistance toward the majority of conventional compounds. The nucleopolyhedrovirus (NPVs) (Baculoviridae) and azadirachtin (AZA) are two biorational insecticides that are actually used in many different countries against several insect pests. In this work, the genetic diversity of NPVs isolates from infected *S. exigua* larvae collected in two different agricultural regions of Mexico (Sinaloa and San Luis Potosí) on 2006 and 2008 (SIN6, SIN8, SLP6, and SLP8) was studied. In addition, the potential insecticide of these isolates and the biological activity of AZA on third instar *S. exigua* was also studied. The molecular studies were made through the combination of following techniques: the polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and genome sequencing of specific fragments. Eighty infected *S. exigua* larvae were used, which only one was used from each NPV isolate. Larvae infected with the *S. exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV), from the commercial product Spod-X® (SPX), were also analyzed as reference. Partial sequences from *lef-8*, *polh* genes and the complete sequence from the *hr3* homologous region were analyzed. In addition, a PCR-RFLP with *Bgl*III was used for *hr1* and *hr3*. The results showed that NPVs isolates from *S. exigua* larvae collected at Sinaloa and San Luis Potosí on 2006 and 2008 belong to the SeMNPV. The sequences from *lef-8* and *polh* showed minor genetic differences (single-nucleotide polymorphism, SNP) among SIN6, SIN8, SLP6, SLP, and SPX isolates. The *hr5* sequencing was not obtained; however, an interesting deletion of 80 pb was observed in *hr3* to align two genotypic variants (1SLP6 and 2SLP6). Changes in the palindromes regions allowed to differentiate the isolates collected in Mexico with respect to SPX isolate. The insecticidal activity of SeMNPV isolates and AZA was determined using the droplet-feeding and the diet surface contamination techniques, respectively. The isolate that

showed a genomic deletion (SLP6) caused higher larval mortality (240 OBs/larva) than the remained isolates. The DL_{50} values of the SIN6 (1135 OBs/larva) and SIN8 (1728 OBs/larva) were lower than SPX (3473 OBs/larva), although no significant differences were observed at 216 h after treatment. For further knowledge about the interaction of these SeMNPV isolates with its host, other factors related with the genetic variability are required. In addition, it is important to know about other homologous regions (*hr1*) or no highly conserved genes that can be related with the genetic diversity of the NPVs populations. On the other hand, the *S. exigua* larvae were highly susceptible to AZA. The LC_{50} values of this compound ranged from 9 to 3.2 mg L⁻¹ between 156 and 236 hpt, respectively. Because of the high potential insecticide of both NPVs and AZA, results from this study open new perspectives for further studies to select a SfmNPV isolate for use against armyworm in a control program in México.

1. INTRODUCCIÓN

El gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), es una especie originaria del sureste asiático con distribución en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, pero con mayor abundancia en América Central y del Norte, África, Australia, el sur de Asia y Europa (CAB Internacional, 2000). Es una plaga que ataca a diversos cultivos de invernadero y campo abierto en muchas regiones del mundo (Belda, 1994; Caballero y Williams, 2008). 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 para su control (Moulton *et al.*, 2002; Smaghe *et al.*, 2003; Sayyed *et al.*, 2012; Lasa *et al.*, 2007a). 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.

Los baculovirus y la azadiractina son dos importantes insecticidas biorracionales que actualmente se utilizan en diferentes países para el control de insectos plaga (Adel y Shenhal, 2000; Cherry y Williams, 2001; Szewczyk *et al.*, 2006, Posee *et al.*, 2010). Por ejemplo, Moscardi (1999) y Caballero *et al.*, 2001 reportaron al menos 26 bioinsecticidas basados en baculovirus, los cuáles han sido utilizados para controlar algunas de las plagas más importantes en el ámbito mundial, incluyendo a *S. exigua*. Este insecto es susceptible a la infección por varios nucleopoliedrovirus (NPV), como el NPV 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 nucleopoliedrovirus homólogo (SeMNPV) es el más virulento y patogénico para los distintos estadios larvarios de *S. exigua* (Murillo *et al.*, 2003a). Un aislado del SeMNPV originario de Florida, USA, se ha desarrollado como un producto comercial registrado bajo el nombre de Spod-X® en Holanda, Estados Unidos y Tailandia.

El SeMNPV puede provocar epizootias naturales entre las poblaciones de sus huéspedes y ha sido aislado tanto de larvas como de muestras de suelos procedentes de distintas áreas geográficas (Murillo *et al.*, 2006). Con frecuencia se encuentra que 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.*, 2009). Al respecto, Caballero *et al.* (1992) demostraron que el SeMPNV que provoca epizootias naturales en España posee una naturaleza genética muy diversa, lo cual fue confirmado al identificar un importante número de variantes genotípicas que mostraron variabilidad en su actividad insecticida con respecto a los genotipos puros (Muñoz *et al.*, 1999). Por lo tanto, el conocimiento de la diversidad genética y fenotípica de los baculovirus son aspectos fundamentales al momento de desarrollar un bioinsecticida.

Por otro lado la azadiractina es un tetraterpenoide extraído del árbol del neem, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). Este compuesto actúa como repelente, inhibidor de la alimentación y regulador del crecimiento de los insectos (Schmutterer 1990). Varias investigaciones han demostrado que dicho compuesto es altamente efectivo solo (Iannacone y Lamas, 2003; Bhandari *et al.*, 2009,) y en conjunto con NPVs, Por ejemplo, para el control de *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (Senthil-Nathan *et al.*, 2005), *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) (Cook *et al.*, 1996), *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) (Senthil- Kumar *et al.*, 2008) entre otros. Cabe señalar que además del potencial que pueden ofrecer la azadiractina y los baculovirus para el control de plagas, recientes estudios resaltan que la interacción de ambos insecticidas puede incrementar la actividad de algunas especies de NPVs baculovirus, tal es el caso del SfMNPV (Zamora *et al.*, 2013), del NPV de *Spodoptera litura* (Senthil y Kalaivani, 2006), (SINPV) y del nucleopoliedrovirus de *H armigera* (Senthil *et al.*, 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1. Los baculovirus

2.1.1. Generalidades y clasificación

Los baculovirus han recibido una gran atención como herramientas para el manejo de plagas y estudios ecológicos. Se asocian y regulan a las poblaciones de algunas especies de insectos, lo que les hace importantes patógenos candidatos para el control de insectos plaga (Cory y Evans, 2007). Son un grupo de virus patógenos de artrópodos que deben su nombre a la forma de varilla o de bastón (*baculum* = bastón) de sus viriones. La clasificación de la familia *Baculoviridae* incluye a virus inmersos en una matriz de naturaleza proteica (Murphy *et al.*, 1995). Esta familia agrupa a virus de ADN de doble cadena que contienen de 100 a 200 genes (Szewczyk *et al.*, 2006) y con un tamaño de 90 a 180 Kb (Daimon *et al.*, 2007). El material genético de los virus queda empaquetado dentro de una cápsida baciliforme (nucleocápsida) rodeada de una envoltura de naturaleza lipoproteica.

La familia *Baculoviridae* consta de cuatro géneros: *Alphabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus específicos para lepidópteros, *Betabaculovirus*, que comprende los granulovirus específicos para lepidópteros, *Gammabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus específicos para himenópteros fitófagos y *Deltabaculovirus*, que comprende los nucleopoliedrovirus específicos para dípteros (Jehle *et al.*, 2006). El Comité internacional de Taxonomía de Virus - ICTV (2009) reporta 33 especies de nucleopoliedrovirus y aproximadamente 40 secuencias analizadas más detalladamente, que ahora están integradas en los grupos anteriormente mencionados (Cuadro 1). Los baculovirus han sido aislados de más de 600 especies de insectos, el 90% aislados del orden *Lepidoptera* seguido de *Hymenoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Thysanura* y *Trichoptera*. En el año 2006, se tenían registradas 24 secuencias completas de *Alphabaculovirus* y *Betabaculovirus*, así como dos *Gammabaculovirus* específicos de *Neodiprion sertifer* (Nese) y *N. lecontei* (Nele) (*Hymenoptera*) y un *Deltabaculovirus* específico de *Culex nigripalpus* (Cuni) (*Diptera*), (Jehle *et al.*, 2006).

Cuadro 1. Especies de nucleopoliedrovirus asociadas a su hospedero principal. Basado en el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2009).

GENERO	ESPECIE	ABREVIACION
Alphabaculovirus	<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	<i>Adho</i> NPV
	<i>Agrotis ipsilon</i> MNPV	<i>Agip</i> MNPV
	<i>Agrotis segutum</i> NPV	<i>Agse</i> NPV
	<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	<i>Ag</i> MNPV
	<i>Antherae pernyi</i> NPV	<i>Anpe</i> NPV
	<i>Autographa californica</i> MNPV	<i>Ac</i> MNPV
	<i>Anagrapha falcifera</i> MNPV	<i>Anfa</i> MNPV
	<i>Bombyx mori</i> NPV	<i>Bm</i> NPV
	<i>Buzura suppressaria</i> NPV	<i>Busu</i> NPV
	<i>Choristoneura fumiferana</i> DEF MNPV	<i>Cf</i> MNPV
	<i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV	<i>Cf</i> MNPV
	<i>Choristoneura rosaceana</i> NPV	<i>Chro</i> NPV
	<i>Chrysodeixis chalcites</i> NPV	<i>Chch</i> NPV
	<i>Clanis bilineata</i> NPV	<i>Clbi</i> NPV
	<i>Ectropis obliqua</i> NPV	<i>Ecob</i> NPV
	<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	<i>Eppo</i> NPV
	<i>Euproctis pseudoconspersa</i> NPV	<i>Eups</i> NPV
	<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	<i>Ha</i> NPV
	<i>Helicoverpa zea single</i> NPV	<i>Hz</i> SNPV
	<i>Hyphantria cunea</i> NPV	<i>Hycu</i> NPV
	<i>Leucania separata</i> NPV	<i>Lese</i> NPV
	<i>Lymantria dispar</i> MNPV	<i>Ld</i> MNPV
	<i>Mamestra brassicae</i> MNPV	<i>Mb</i> MNPV
	<i>Mamestra configurata</i> NPV A	<i>Maco</i> NPV-A
	<i>Mamestra configurata</i> NPV B	<i>Maco</i> NPV-B
	<i>Maruca vibrata</i> NPV	<i>Mavi</i> NPV
	<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	<i>Op</i> MNPV
	<i>Rachiplusia ou</i> MNPV	<i>Ro</i> MNPV
	<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	<i>Se</i> MNPV
	<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	<i>Sf</i> MNPV
	<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	<i>Spli</i> MNPV
	<i>Spodoptera litura</i> NPV	<i>Spli</i> MNPV
	<i>Spodoptera exempta</i> MNPV	<i>Spex</i> MNPV
	<i>Thysanoplusia orichalcea</i> NPV	<i>Thor</i> NPV
	<i>Trichoplusia ni single</i> NPV	<i>Tn</i> SNPV
	<i>Galleria mellonella</i> MNPV	<i>Gm</i> MNPV
	<i>Wiseana signata</i> NPV	<i>Wisi</i> NPV

Cuadro 1. Continuación.

Betabaculovirus	<i>Adoxophyes orana granulovirus</i>	<i>AdorGV</i>
	<i>Artogeia rapae granulovirus</i>	<i>ArGV</i>
	<i>Choristoneura fumiferana granulovirus</i>	<i>ChfuGV</i>
	<i>Cryptophlebia leucotreta granulovirus</i>	<i>CrleGV</i>
	<i>Cydia pomonella granulovirus</i>	<i>CpGV</i>
	<i>Harrisina brillians granulovirus</i>	<i>HbGV</i>
	<i>Helicoverpa armigera granulovirus</i>	<i>HaGV</i>
	<i>Lacanobia oleracea granulovirus</i>	<i>LoGV</i>
	<i>Phthorimaea operculella granulovirus</i>	<i>PhopGV</i>
	<i>Plodia interpunctella granulovirus</i>	<i>PiGV</i>
	<i>Plutella xylostella granulovirus</i>	<i>PxGV</i>
	<i>Pseudaletia unipuncta granulovirus</i>	<i>PsunGV</i>
	<i>Trichoplusia ni granulovirus</i>	<i>TnGV</i>
	<i>Xestia c-nigrum granulovirus</i>	<i>XnGV</i>
Deltabaculovirus	<i>Culex nigripalpus</i> NPV	<i>CuniNPV</i>
Gammabaculovirus	<i>Neodiprion lecontei</i> NPV	<i>NeleNPV</i>
	<i>Neodiprion sertifer</i> NPV	<i>NeseNPV</i>

Los caracteres más distinguibles para diferenciar especies de virus pueden ser el rango de hospederos, perfiles de restricción de ADN, secuencias de fragmentos del ADN y/o del genoma completo. El SeMNPV se diferencia de otros baculovirus por ser monoespecífico y altamente virulento para larvas de *S. exigua* (Muñoz *et al.*, 1999).

2.1.2. Estructura de los baculovirus: nucleocápsidas, viriones y OBs

La nucleocápsida es una estructura en forma de vaina o cápsida cilíndrica, tapada por ambos extremos (base y tapa) y que en su interior contiene el ADN genómico enrollado y altamente condensado. La función principal de la nucleocápsida es la de transportar la información genética del virus hasta la célula huésped (Federici, 1986). El diámetro de las nucleocápsidas varían entre 30 y 60 nm y tienen una longitud de entre 250 y 300 nm (Tanada y Hess, 1991).

Los viriones son las entidades infecciosas de los baculovirus y son los responsables de su dispersión en los órganos y tejidos (Caballero *et al.*, 2001). Existen dos tipos de viriones: los viriones derivados de los cuerpos de inclusión (ODVs) y los viriones brotados (BVs),

ambas abreviaciones por sus siglas en inglés. Los BVs inician las infecciones secundarias y dispersan la infección a través del hospedero (Chen *et al.*, 2007), mientras que los ODVs son los elementos infecciosos responsables de la transmisión horizontal entre los individuos susceptibles de la población (Granados y Williams, 1986). Muchos de los componentes estructurales de los BVS y ODVs son iguales, incluida la doble hebra de ADN circular, las diferencias para adecuar sus respectivas funciones en un ciclo de infección radican principalmente en los componentes de sus respectivas envolturas (Posse *et al.*, 2010).

Los ODVs se originan a partir de nucleocápsidas que permanecen en la misma célula. Estos viriones posteriormente quedan incluidos en cuerpos o matrices de proteínas codificados por el virus. 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 nucleocapsidas por virión denominados viriones múltiples (Caballero *et al.*, 2001). Los BVs se originan a partir de nucleocápsidas sintetizadas en el núcleo, después se mueven a otras células huésped y adquieren la membrana a partir de la membrana citoplasmática de la célula huésped donde se encuentra una glicoproteína (gp64) codificada por el virus. Los BVs contienen sólo una nucleocápsida y todos son morfológicamente iguales. Estos son los responsables de diseminar la infección entre los órganos y los tejidos del insecto. Los viriones contienen el mismo genoma, pero difieren en estructura y composición de lípidos, ácidos grasos y proteínas (Blissard y Rohrmann 1990).

Los OBs se originan al final del proceso infeccioso, donde se sintetizan grandes cantidades de proteínas llamadas poliedrina o granulina, según el género del virus. 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 huésped, 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). Los OBs en los NPVs varían entre 0.5 y 15 μm de diámetro, aunque el tamaño medio oscila entre 0.8 y 2 μm ; la forma de éstos 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).

2.1.3. 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, esto depende de su patogenicidad (capacidad del patógeno para provocar una enfermedad) y virulencia (grado de patogenicidad o daño fisiológico que el virus causa al huésped) (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 (Figura 1).

Debido a las condiciones de alta alcalinidad (pH 9.5-11) que prevalece en el intestino del insecto, se produce la solubilización de la proteína de los OBs (Granados y Williams, 1986). Una vez liberados los viriones, éstos atraviesan la membrana peritrófica del intestino y se unen por fusión a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio (Engelhard *et al.*, 1994). Producida la fusión, las nucleocápsidas penetran en el citoplasma de las células y se dirigen hacia el núcleo en donde quedan desnudas liberando así el ADN (Granados y Williams, 1986). El material genético contenido en las nucleocápsidas se replica en el núcleo de las células. Según Blissard y Rohrmann (1990), el núcleo de la célula se hipertrofia y los nucléolos se dirigen hacia la periferia nuclear y decrecen 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 huésped. La entrada de los BVs a las células es producida por endocitosis. Mientras que algunos virus son retenidos en el intestino medio, otros son liberados e infectan diferentes tejidos; entre ellos: hemocitos, traqueas, epidermis, tejido adiposo, muscular, nervioso, reproductivo, granular y células pericardiales (Passarelli, 2011). Durante el proceso de infección secundaria también se producen ODVs, éstos son gradualmente ocluidos dentro de una matriz proteica cristalina (poliedrina) para desarrollar los OBs, los cuales llenan el núcleo y son finalmente liberados tras la lisis celular (Cory 2010, Sciocco de Cap, 2001) (Figura 1).

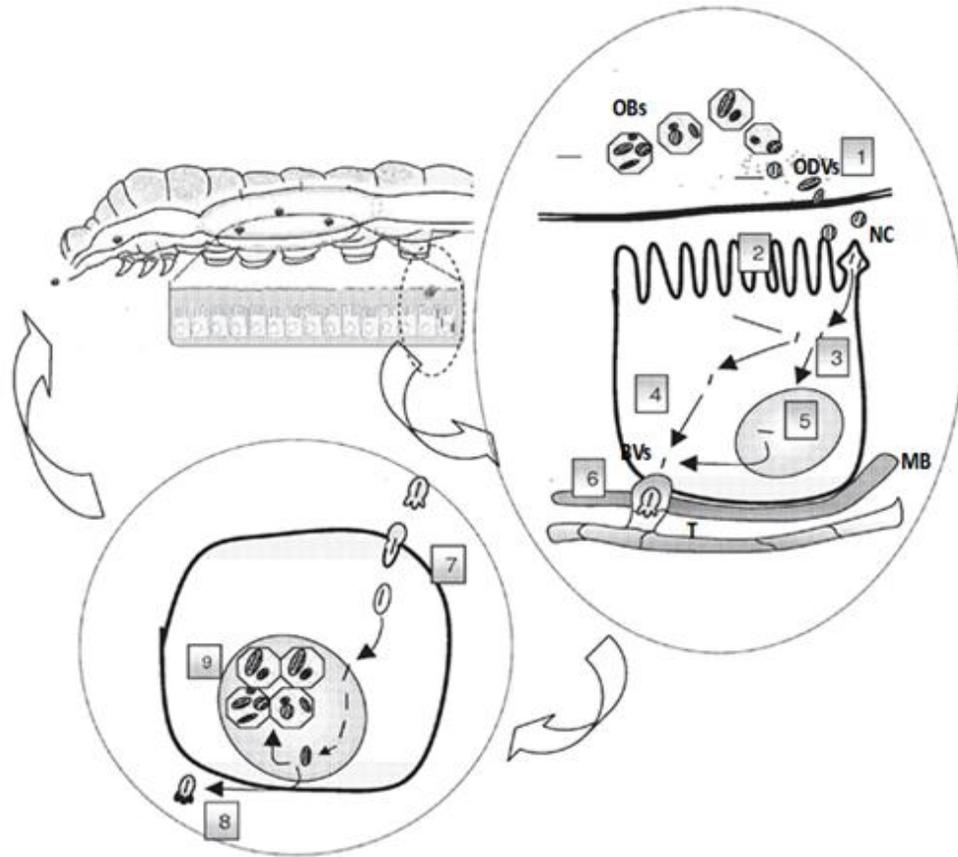


Figura 1. Representación esquemática del proceso infeccioso de los baculovirus (Caballero *et al.*, 2009). Los cuerpos de inclusión (OBs) ingeridos se solubilizan en el mesenterón de la larva liberando los viriones derivados de la inclusión (ODVs) (1). La membrana del virión se fusiona con la membrana 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. Las nucleocápsidas atraviesan la membrana celular formando los viriones brotados (BVs) (6) y pasan a la cavidad hemocélica a través de las traqueolas (T) evitando la membrana basal (MB). En el hemocele, los BVs llevan a cabo la segunda fase del proceso infeccioso infectando las células de los órganos y tejidos por endocitosis (7). Las nucleocápsidas forman nuevamente BVs favoreciendo la dispersión de la infección (8). Alternativamente forman viriones y OBs completos (9), en una fase más avanzada del proceso infeccioso, que se acumulan en la célula y finalmente producen su lisis liberando los OBs al medio.

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 o amarillento (Figura 2). Posteriormente, los insectos pierden movilidad y tienen un retraso en su desarrollo. La muerte en las larvas 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 seis días. Las larvas de los lepidópteros emigran hacia la parte superior de la planta, donde quedan colgadas de sus propatas (Sciocco de Cap, 2001). 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).

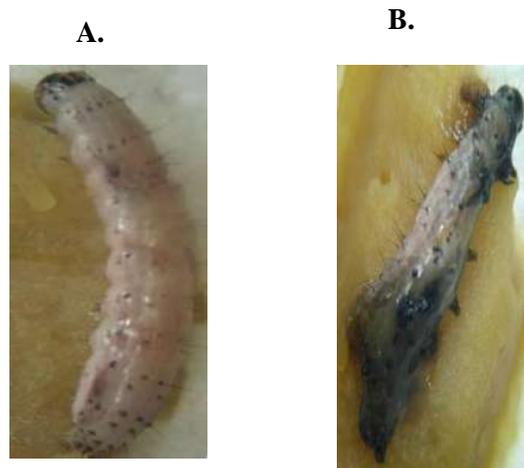


Figura 2. Sintomatología de una larva de *S. frugiperda* previa a la muerte (A) y muerta (B) por la acción de su nucleopoliedrovirus (fotografías inéditas de Leandro, J. A. 2009).

2.1.4. Aspectos ecológicos de los baculovirus

Los estudios de ecología de virus están hechos en relación a la sobrevivencia del hospedero o a la dinámica de población del mismo. Sin embargo, un conocimiento profundo de su biología y ecología podrían ser 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 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) señalan 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 pueden ser transportados abióticamente a insectos hospederos y a plantas (hojas y frutos) para iniciar epizootias. Los OBs que contienen viriones múltiples podrían ayudar 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 (Cuadro 2) (Cory y Myers, 2003).

2.1.4.1. Transmisión horizontal y vertical

La transmisión horizontal se define como la transferencia del patógeno entre individuos de una misma generación. La eficiencia de dicha transmisión depende tanto de la densidad de población del virus como del huésped. Cuanto mayor es la densidad de los insectos susceptibles, mayor es la probabilidad de contacto entre el virus y el huésped (Cuadro 2).

La transmisión horizontal de los OBs, junto con su persistencia en el medio, ha sido el modelo utilizado para el estudio de la ecología de baculovirus (Cory *et al.*, 1997). En varios sistemas huésped-baculovirus se han observado bajos porcentajes de mortalidad larvaria en ausencia de una exposición continua al virus, lo cual sugiere la presencia de infecciones persistentes de baculovirus en las poblaciones de sus huéspedes (Kukan, 1999). Las larvas de tentredínidos (Hymenoptera: Tenthredinidae), donde la replicación del NPV está limitada al intestino medio, el virus es comúnmente expulsado en heces o vómito de la larva infectada antes de su muerte, a través de esta estrategia la transmisión horizontal de la enfermedad puede ser más rápida (Hunter-Funjita *et al.*, 1998).

Cuadro 2. Tipos de transmisión de los baculovirus en campo (Cory, 2010).

Tipo		Estrategia
Horizontal	Dentro de una misma generación.	A través de la contaminación del follaje por organismos muertos continuando con la muerte de las larvas.
	Entre generaciones.	A través de contaminación del medio ambiente y la propagación de OBs en el follaje a través del tiempo.
Vertical	A través de progenitores y progenie.	Transmisión de la infección de un virus activo (o un virus de ADN viable) realizado sobre o dentro de los huevecillos.
	Dentro de progenitores y progenie.	Transmisión de la infección persistente dentro de los huevecillos.

La transmisión vertical ha sido sugerida como una estrategia de sobrevivencia para el virus durante periodos de baja densidad de hospederos y cuando las oportunidades para la transmisión horizontal es restringida (Cory y Myers, 2003). En algunos grupos de insectos, como Lepidoptera, dicha transmisión aparece como un fenómeno común (Kukan, 1999), aunque los mecanismos y factores que regulan estos procesos no son totalmente comprendidos. Al respecto, Fuxa (2004) señala que la transmisión vertical puede jugar un papel importante en relación con la resistencia que el huésped adquiere, ya que puede haber coevolucionado con la infectividad del baculovirus. Además, la transmisión vertical permite que el virus pueda ser transportado dentro del insecto infectado a larga distancia e iniciar nuevos focos de infección tal y como ha sido documentado para los NPVs de *S. frugiperda* y *A. gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Fuxa *et al.* (2007) señalan que la transmisión de la enfermedad puede incrementarse cuando los OBs que se encuentran en el suelo, son transportados nuevamente a la superficie de plantas y quedan expuestos a los insectos susceptibles.

2.1.5. Caracteres bioquímicos

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 (Zeddani *et al.*, 1999). 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 digestión con enzimas de restricción ha demostrado ser muy útil y confiable, ya que nos permite obtener patrones de bandas característicos de cada aislamiento y distinguir entre distintas cepas o genotipos. Esto se logra mediante el uso de distintas endonucleasas, las cuales son enzimas que reconocen secuencias específicas en las moléculas de ADN y las cortan produciendo fragmentos únicos de distintos tamaños (Lee y Miller, 1978).

Otro método utilizado para la identificación rápida de aislamientos de baculovirus, se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mediante este método se amplifica el ADN para producir fragmentos específicos *in vitro*. 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).

2.1.5.1. Expresión genética de los NPV

La expresión de los genes de los baculovirus se divide en tres fases temporales que se desencadena a manera de cascada, definidas en función de su relación con la replicación del ADN del virus: fases temprana, tardía y muy tardía. Los genes tempranos son transcritos antes de la replicación por la ARN polimerasa II celular y contienen elementos promotores con gran similitud a los promotores de los insectos. 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.

Fase Temprana: En esta etapa se expresan los genes tempranos inmediatos (ej., **IE-0**, IE-1, IE-2) (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 y helicasa) y los que participan en la fase de expresión tardía (LEFs) . Entre estos se incluyen, los genes Una serie de genes que modifican aspectos del medio ambiente intra y extracelular se expresan también en esta etapa (Chen *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2011). El factor de expresión *lef-8* es un gen altamente conservado (Rowley *et al.*, 2010; Harrison *et al.*, 2012).

Fase Tardía: Esta fase comienza aproximadamente a las 6 hpi conjuntamente con el inicio de la replicación del ADN viral y se extiende hasta las 24 hpi. El virus deja de usar la ARNpol de la célula huésped 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**.

Fase muy tardía: Esta fase es también conocida como fase de oclusión, ya que es necesaria para la formación de los OBs. En esta etapa se sintetiza la **poliedrina (o granulina, según el género)**, los ODVs se ocluyen en esta proteína que es la de mayor cantidad de las que conforman a los OBs. En esta etapa 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). El gen de *polh* es uno de los genes muy tardíos más conservados en los NPVs de lepidopteros y usado en varios estudios filogenéticos (Jahele *et al.*, 2006; Hewson *et al.*, 2011; Rowley *et al.*, 2010). Debido a ello los genes de poliedrina son usados con frecuencia para diferenciar especies de baculovirus (Lange *et al.*, 2004).

Regiones homologas “hr”

Existen otras secuencias 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 *hr* y se caracterizan por presentar de uno a ocho fragmentos

repetidos dentro de sus secuencias (Murillo, 2005). Las *hr* actúan como potenciadores (enhancers) de transcripción (Lin *et al.*, 2010) o como orígenes de replicación del ADN. También son reportados como grandes fuentes de variación y coevolución (Cory y Myers, 2003). Las *hr* han sido también identificadas en el genoma de un gran número de baculovirus tales como el NPV de *Orgyia pseudosugata* (OpMNPV) (Ahrens *et al.*, 1997), NPV de *Bombyx mori* (BmNPV) (Majima *et al.*, 1993), NPV de *L. dispar* (LdMNPV) (Pearson y Rohrmann, 1995), MNPV de *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV) (Xie *et al.*, 1995) y MNPV de *A. gemmatalis* (AgMNPV) (Garcia-Canedo *et al.*, 1996).

2.1.5.2. Genoma de SeMNPV

El genoma completo del SeMNPV consta de 135 611 pb y 139 **marcos de lectura abiertos** u ORFs, (por sus siglas **en ingles** *open reading frame*) Cada ORF se define como un segmento de ADN de 150 nt de largo como mínimo, que pueda ser potencialmente traducido a proteína de los ORFs de SeMNPV, 130 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 le dio a los genes (Figura 3), la parte central del genoma es altamente conservada, aunque el orden de los genes ha estado sujeto a continuas modificaciones (Ijkel *et al.*, 1999).

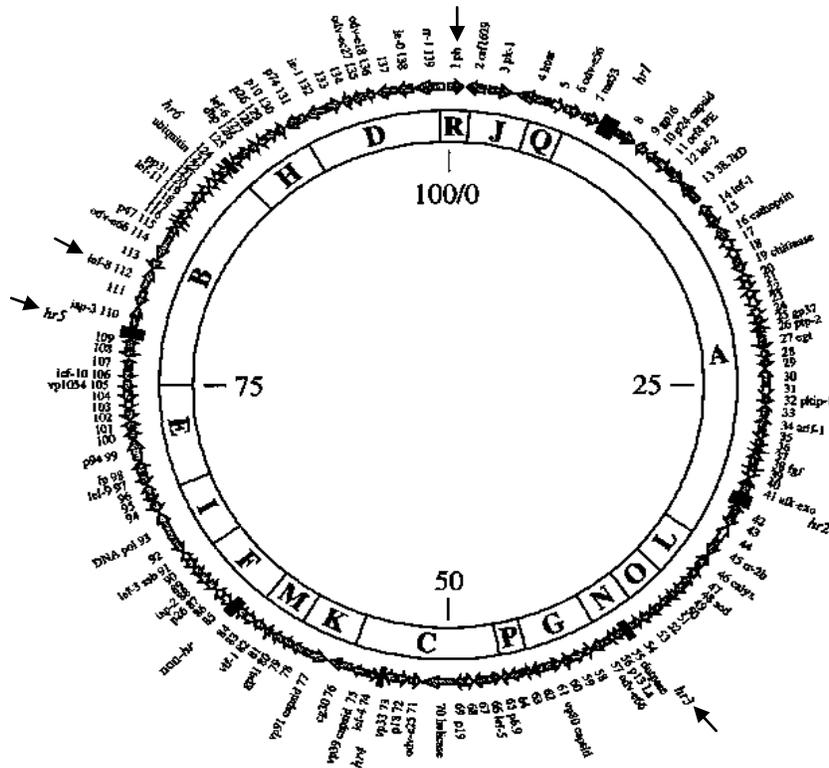


Figura 3. Mapa circular del ADN de SeMNPV mostrando la organización genómica. Muestran sitios de restricción con la enzima XbaI; fragmentos indicados de la letra A a la R de acuerdo a los fragmentos del más largo al más pequeño. La posición de los 139 ORFs identificados están indicadas con flechas que 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 las regiones homólogas (hr) están indicadas por cajas negras. La escala en el círculo interior está en unidades de mapa (imagen tomada de Ijkel *et al.*, 1999), flechas negras indican los genes que se caracterizaron en este estudio.

2.2. Uso de los baculovirus como agentes de control

El estudio de la patología y su aplicación en el control biológico de insectos plaga se inició a finales de la década de los años cuarenta, aunque los avances importantes con los baculovirus se produjeron durante la siguiente década. Los primeros programas de aplicación de baculovirus se dirigieron contra insectos forestales en Canadá, en donde se demostró su potencial como bioinsecticidas (Tanada y Kaya, 1993). En Alemania y Estados Unidos se

reporta su uso para el control de *Lymantria monacha* (L) y *Lymantria dispar* (L) (Lepidoptera: Lymantridae) (Szewczyk *et al.*, 2006), respectivamente. El primer insecticida viral (Elcar®) fue introducido al mercado por Sandoz Inc. en 1975. En la literatura se señalan cuatro estrategias básicas para el uso de los baculovirus para el control de plagas (Moscardi, 1999; Szewczyk, 2006): 1) introducción y establecimiento del virus en el ambiente, con la cual se pretende obtener un control permanente de la plaga, 2) colonización temporal del virus, la cual involucra la liberación del inóculo del baculovirus para controlar la plaga por más de una generación, 3) manipulación del ambiente, implicando cambios en el hábitat del huésped para favorecer la conservación y el aumento de los baculovirus en el sistema donde habitan naturalmente o han sido introducidos y 4) aplicación continua y sistemática de dosis letales de los insecticidas virales.

En Brasil, se tratan anualmente hasta 1,000,000 Ha de soya, *Glycine max* L. con un nucleopolihedrovirus (AgMNPV) para atacar al gusano peludo de la soya, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). La producción de este baculovirus constituye el mejor ejemplo documentado del uso de un bioinsecticida en un cultivo anual (Moscardi, 1999). De Oliveira. (1998) menciona que la virulencia del AgMNPV se ha mantenido alta después de 10 años de aplicación masiva por los productores. Otros ejemplos son el uso del NPV de *Helicoverpa zea* (Boddie) para controlar a *Helicoverpa sp.*, una de las plagas de mayor importancia agrícola del mundo en cultivos anuales tales como algodón, tabaco, leguminosas y hortalizas. La rosquilla negra, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) es una especie que ataca al algodón en Europa, este insecto tiene una distribución amplia en África, Medio Oriente y la región del Mediterráneo y con la cual también se utiliza un nucleopoliedrovirus (SINPV) para su control. El nucleopoliedrovirus de *S. exigua* (SeMNPV) es utilizado para el control de esta plaga en Estados Unidos y Europa (Williams, 2002).

2.3. El SeMNPV

Este virus es altamente específico y de alta patogenicidad para el huésped natural, además, observaciones en campo han indicado que puede ocasionar epizootias en las poblaciones naturales de *S. exigua* (Caballero *et al.*, 1992). Debido a tales características, el SeMNPV ha sido estudiado intensamente como bioinsecticida para uso bajo invernaderos y en cultivos en campo en Estados Unidos, Europa y en el sur y sureste de Asia y más recientemente, en el sur de España. La población del SeMNPV ha sido caracterizada genéticamente y se ha observado alta heterogeneidad (Cabodevilla *et al.*, 2011). Por ejemplo, en el sur de España se han podido identificar hasta nueve variantes genotípicas del virus, las cuales difieren en actividad con respecto a los genotipos puros (Muñoz *et al.*, 1999).

A partir de un aislado de Florida, EUA, se desarrolló un producto comercial bajo el nombre de SPOD-X, el cual es utilizado con éxito en varios países (Moscardi, 1999). El producto se utiliza en los invernaderos de los países bajos en cultivos de plantas ornamentales. SPOD-X fue originalmente desarrollado por la empresa Poder BROS en Florida y posteriormente a través de una colaboración entre Crop Genetics Internacional y DuPont. Actualmente, el virus es comercializado por Termo-Trilogy Corporation de los Estados Unidos. En ensayos de campo en Tailandia, se logró un excelente control de *S. exigua* en los cultivos de chícharo, *Pisum sativum* L. y uva, *Vitis vinífera* L. mediante aplicaciones de 3.1×10^{11} a 1.25×10^{12} OBS/ml (Cherry y Williams, 2001). En Tanzania se obtuvieron resultados promisorios en el control de *S. exigua* al aplicar 150 ha de un formulado elaborado a base del SeMNPV durante el año 2000 (Gryzwacz, 2005).

El SeMNPV es uno de los aproximadamente 60 baculovirus de los cuales se ha secuenciado el genoma por completo (Ijkel *et al.*, 1999); sin embargo, la literatura ofrece poca evidencia de la ingeniería genética del SeMNPV con el propósito de mejorar su actividad biológica (Cherry y Williams, 2001). Una de las alternativas para mejorar dicha actividad del virus es la búsqueda de productos que actúen como sustancias sinérgicas o potenciadoras. Por ejemplo, Murillo *et al.* (2005) observaron un incremento significativo de la actividad de SeMNPV entre 3-583 veces cuando las larvas L₂-L₅ de *S. exigua* se trataron con la mezcla del virus + el abrillantador óptico Tinopal LPW (1%).

2.4. La azadiractina

La azadiractina es un tetraterpenoide del tipo limonoide que ha sido aislado del árbol del nim, *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) (Figura 4). Su centro de origen es el sur y sureste de Asia, específicamente de Myanmar y la región de Assam en la India, aunque actualmente se encuentra distribuido en Pakistán, Sri Lanka, Tailandia, Malasia, Indonesia y América. *Azadirachta indica* se reconoce por sus propiedades como bioinsecticida, acaricida, nematicida, fungicida y bactericida. La azadiractina se aisló por primera vez en 1968, pero su estructura se elucidó varios años más tarde (Kraus *et al.*, 1987). La azadiractina es considerada el principio activo más importante en la semilla del nim. Sin embargo, la cantidad de este compuesto presente en la semilla pueden variar considerablemente debido a factores ambientales y posiblemente genéticos (Schmutterer, 1995).

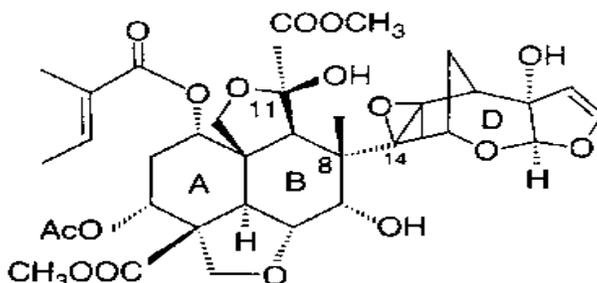


Figura 4. Estructura química de la azadiractina.

Zebtz (1987) señala que 413 especies de insectos son susceptibles a diferentes productos derivados de las hojas y semillas del nim, las cuales están incluidas en los siguientes órdenes: Blattaria, Dermaptera, Phasmida, Isoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Coleoptera, Diptera, Siphonaptera y Lepidoptera. Se estima que 200 especies de lepidópteros son susceptibles al compuesto, entre ellas *S. exigua* (Bahena, 2002). En relación a su modo de acción, varios estudios han señalado que la azadiractina interfiere con el sistema neuroendocrino del insecto al actuar como un regulador del crecimiento, aunque también actúa como una sustancia modificadora del comportamiento del insecto. La acción reguladora de azadiractina en el crecimiento se debe a que estructuralmente es similar a la

ecdisona y cualquier interrupción en su modo de acción causa un desarrollo inapropiado (Figura 5). Otra consecuencia de la acción anti-hormonal de azadiractina es que puede reducir la fecundidad del insecto después de su ingestión en dosis subletales. La azadiractina tiene su máximo efecto en el estado de larva entre cuatro y siete días posteriores a su ingestión, aunque el compuesto provoca un rápido cese en la alimentación (Isman, 1999).



Figura 5. Síntomas producidos por la azadiractina en larvas de *S. frugiperda*. (A) y (B) desprendimiento parcial de la cutícula en el proceso de muda (fotografías inéditas de J. A. Leandro, 2009).

Interesantemente, investigaciones realizadas por Shapiro (1994) con la palomilla gitana, *L. dispar*, señalan que la adición de extractos de azadiractina a una suspensión de su nucleopoliedrovirus (LdNPV) provocó una reducción del tiempo para lograr la mortalidad larvaria. Así mismo, Senthil *et al.* (2008) observaron que cuando las larvas de tercer estadio de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) se expusieron al HaNPV + azadiractina, la mortalidad se incrementó en comparación con el virus solo. Aunque se desconocen las razones por las cuales azadiractina provoca un incremento de la mortalidad larvaria, Senthil *et al.* (2005) observaron que la combinación del compuesto con el nucleopoliedrovirus de *S. litura* (SINPV) redujo de manera significativa la actividad de las enzimas ácido fosfatasas, alcalino fosfatasas, adenosin trifosfatasa y lactato deshidrogenada en larvas de *S. litura*.

2.5. El gusano soldado, *Spodoptera exigua*

2.5.1. Distribución, hábitos y biología

Spodoptera exigua es una especie nativa de la región Sur Oriental de Asia, pero actualmente tiene una amplia distribución en los cinco continentes: África (Costa del Mediterráneo y mitad sur del continente), América (México, Estados Unidos de América, islas Hawái y Canadá), Australia y Europa (Los Balcanes, Italia, sur de Francia y la península ibérica) (CAB International, 2000).

Es un insecto que presenta una metamorfosis completa u holometábola, ya que pasa por cuatro estados de desarrollo bien diferenciados: huevo, larva, pupa y adulto. Los huevecillos son colocados en masas recubiertas por escamas que proceden de las hembras y tienen la finalidad de protegerlos de sus enemigos naturales (Saunders *et al.*, 1998; Gastelúm, 2004). Los huevecillos son de forma esférica con estrías longitudinales y miden de 0.35 a 0.37 mm de diámetro. En relación a las larvas, éstas son de tipo eruciforme y miden de 25 a 35 mm de longitud en su máximo desarrollo. Atravesan por cinco estadios en un periodo de 10 a 16 días. En el primer y segundo estadio las larvas son de color verde oscuro o amarillo pálido. A partir del segundo estadio, las larvas presentan dos manchas negras en la región pleural del segundo segmento torácico (Pacheco, 1994)

Las pupas tienen forma de huso y miden aproximadamente de 12 a 18 mm. Recién formadas son de color verde, posteriormente toman una coloración rojiza y se tornan más oscuras en las horas cercanas a la emergencia de los adultos (Nuez *et al.*, 1996). Los adultos son palomillas de color café grisáceo que miden entre 15 mm de largo y 30 mm de envergadura alar. 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).

Las hembras ovipositan sobre las hojas, en verano pueden llegar a ovipositar hasta 1700 huevecillos, mientras que en el otoño ponen alrededor de 500. El tiempo de desarrollo embrionario varía según la temperatura, de 3 a 6 días a una temperatura de 20 a 23°C (Pacheco, 1994). Las larvas recién emergidas son gregarias y se alimentan del parénquima de las hojas cercanas al área de donde emergieron. A medida que se desarrollan, éstas se dirigen a las yemas y tallos más próximos. Las larvas más grandes se alimentan con mayor voracidad tanto de hojas como frutos. La etapa larvaria tiene una duración de 9 a 16 días dependiendo de

las condiciones climáticas (Saunders *et al.*, 1998). Durante el último estadio, las larvas se dirigen al suelo en donde construyen un habitáculo para pupar (Sannino *et al.*, 1987). Los adultos emergen aproximadamente después de 11 días de la pupación (Murillo, 2005). El ciclo de vida de *S. exigua* es por lo general de 25 días en temperaturas cercanas a los 23.8°C y se pueden presentar cuatro o más generaciones por año en las regiones más cálidas (Saunders *et al.*, 1998, Gastélum, 2004).

2.5.2. Importancia económica

El gusano solado es un insecto polífago que se alimenta de hojas y frutos. Actualmente, se considera como una de las plagas más perjudiciales a nivel mundial, puesto que ataca diferentes cultivos tanto en campo como en invernadero (Avilés, 2004); se han catalogado más de 60 plantas de 23 familias atacadas por esta especie. Algunos ejemplos de sus plantas hospederas son los siguientes: lechuga, *Cichorium endivia* L., calabaza, *Cucurbita pepo* L., papa, *Solanum tuberosum* L., chícharo, *P. sativum*, maíz, *Zea mays* L., trigo, *Triticum aestivum* L., sorgo, *Sorghum vulgare* L., frijol, *Phaseolus vulgaris* L., espinaca, *Spinacea oleracea* L., cebolla, *Allium cepa* L., chile pimiento, *Capsicum annuum* L. y tomate, *Lycopersicum esculentum* Mill. Frutas como: melón, *Cucumis melo* L., papaya, *Carica papaya* L., pera, *Pyrus communis* L., manzana, *Pirus malus* L., fresa, *Fragaria vesca* L. y uva, *V. vinífera* (Beutelspacher y Balcázar, 1999; Gastélum, 2004).

2.5.3. Métodos de control

Algunos de los productos utilizados para controlar las poblaciones de *S. exigua* pertenecen a los carbamatos, ciclodienos, organofosforados y piretroides. A pesar de que en un primer momento estos compuestos fueron de gran utilidad, las poblaciones de esta plaga generaron rápidamente resistencia hacia la mayoría de ellos (Brewer *et al.*, 1990; Van Laecke *et al.*, 1995; Smagghe y Degheele, 1998). Dada la situación referente a los daños ambientales y la generación de resistencia que provocan los insecticidas químicos, se ha incrementado la necesidad de estudiar alternativas ecológicamente aceptables para el control de insectos como parte de programas de manejo integrado de plagas. Tal es el caso de los denominados insecticidas biorracionales, entre los que se encuentran los reguladores de crecimiento de los insectos, aquellos derivados de metabolitos secundarios naturales como spinosad, avermectinas y diversos agentes entomopatógenos (Murillo *et al.*, 2005; Osorio *et al.*, 2008; Rodríguez-Enríquez *et al.*, 2

3. HIPÓTESIS

H₁. La composición genotípica de SeMNPV difiere entre aislamientos que proceden de distintas zonas geográficas.

H₂. La eficacia insecticida de distintos aislados de SeMNPV difiere en su mismo hospedero.

H₃. Las larvas de *S. exigua* son susceptibles a la azadiractina.

4. OBJETIVOS

4. 1. Objetivo general

Evaluar la actividad de SeMNPV y azadiractina para el control del gusano soldado y conocer la naturaleza genética de cuatro aislamientos de SeMNPV colectados en dos zonas agrícolas de México.

4. 2. Objetivos específicos

- 1.- Caracterizar genéticamente a cuatro aislamientos del SeMNPV mediante PCR, PCR-RFLP y secuenciación de fragmentos específicos del genoma.
- 2.- Evaluar la actividad biológica de aislamientos de SeMNPV en larvas de tercer estadio de *S. exigua* mediante el método de ingestión de la gota.
- 3.- Evaluar el efecto de la azadiractina en larvas de tercer estadio de *S. exigua* mediante un método de ingestión de dieta semisintética.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cría del insecto

Los individuos de *S. exigua* provinieron de una población proporcionada por la Dra. Patricia Tamez Guerra de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Estos insectos se transportaron al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) en Morelia, Michoacán. Las larvas se alimentaron con dieta artificial elaborada con harina de soya y germen de trigo (Patricia Tamez-Guerra, com. per.) y a los adultos se les suministró una solución con miel de abeja al 15 %. Como sustrato de oviposición se utilizó papel de estraza y encerado, los cuales se reemplazaron cada tercer día. Las condiciones ambientales de cría y de los bioensayos fueron las siguientes: $25 \pm 2^\circ \text{C}$, $75 \pm 5\%$ de HR y 16:8 h (L: O).

5.2. Caracterización genética de los aislamientos de SeMNPV

5.2.1. Procedencia y replicación

Los aislamientos de los baculovirus que se estudiaron en el presente trabajo provinieron de larvas de *S. exigua* que se colectaron en cultivos de jitomate y/o pimiento en el Ejido Bachigualato, Culiacán y de Villa de Arista, San Luis Potosí, México, en los años 2006 y 2008. Los aislamientos se designaron como SIN6, SIN8, SLP6 y SLP8 con base en el año y lugar de colecta. Las larvas se colectaron al azar y se colocaron individualmente en pequeños vasos de plásticos provistos de hojas de la planta hospedera. En el laboratorio de entomología del IIAF, las larvas se alimentaron con dieta semisintética y se mantuvieron bajo las condiciones ambientales mencionadas anteriormente. Las larvas que murieron por síntomas de infección por baculovirus se colocaron en microtubos y se conservaron a -20°C .

Por cada lote de larvas muertas por virus, se tomaron al azar aproximadamente 30 larvas para realizar un pase de replicación. Para ello, los OBs se purificaron por centrifugación diferencial y el material precipitado se resuspendió en agua destilada. Los OBs de las muestras purificadas se cuantificaron en una cámara de conteo Neubauer (0. 100 mm) a 40x con un microscopio con contraste de fases. Se aplicaron 40 μl de una concentración alta de cada

aislamiento de virus ($\sim 1 \times 10^9$ OBs/ml) sobre pequeños trozos de dieta, mismos que se depositaron individualmente en celdas para cultivos de tejidos. Se colocó una larva de *S. exigua* por celda y aquellas que consumieron la dieta en un lapso de 24 h, se transfirieron a celdas individuales provistas con dieta semisintética libre del virus. Las larvas se revisaron diariamente a partir del cuarto día post-inoculación. Las larvas que manifestaron síntomas de la infección, se colocaron en microtubos a -20 °C hasta su uso. Todo el proceso anteriormente descrito también se realizó con el virus derivado del producto comercial Spod-X (SPX), el cual procede de Florida, Estados Unidos de América y se utilizó como referencia en todos los experimentos.

5.2.2. Extracción y precipitación del ADN

Los OBs obtenidos del pase de replicación en larvas de *S. exigua* se utilizaron para la extracción del ADN. Estos se purificaron a través de tres centrifugaciones con agua destilada estéril, una centrifugación con SDS al 0.2% a 2000 rpm por 1 minuto y una centrifugación adicional a 14 000 rpm por 5 min con agua destilada estéril para eliminar el excedente de SDS. El ADN viral se obtuvo a partir de la suspensión obtenida en la purificación de OBs de cada muestra (una larva por muestra) con aproximadamente 10^8 OBs en 300 μ l de agua. Se procesaron 16 individuos de cada uno de los cuatro aislamientos (SIN6, SIN8, SLP6, SLP8). En total se procesaron 80 muestras, incluyendo individuos tratados con el producto comercial Spod-X de las cuales se tomó únicamente una muestra para cada zona para la caracterización a partir de regiones específicas del genoma amplificadas por PCR.

Los viriones se liberaron de los OBs mediante disolución alcalina de la matriz proteica. Para ello, se agregaron 55 μ l de Na_2CO_3 1M a la suspensión de OBs para llevar a una concentración final aproximada de 0.1 M. La preparación se dejó a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la disolución de los poliedros y liberar los viriones. Durante dicho proceso la preparación se tornó gradualmente traslúcida. Para neutralizar la solución, se agregaron 100 μ l de tris-HCl 1M pH 7.6 y después se centrifugó a 7000 rpm por 2 min para precipitar los OBs no disueltos y las impurezas. El sobrenadante obtenido se llevó a 10 mM Tris-HCl pH 7.6, 10 mM EDTA, 0.25 % SDS y 500 μ g/ml proteinasa K. Se incubó a 37-40 °C

durante 16 h con agitación suave para lograr la ruptura de los componentes proteicos de los viriones.

El ADN se extrajo por fenolización y para ello se hicieron tres extracciones sucesivas (fenol/ fenol-cloroformo-isomílico/cloroformo-isomílico) al tubo que contenía la muestra de ADN se le agregó 500 µl de solvente orgánico en cada caso. Después el tubo se agitó por inversión varias veces para formar una emulsión y luego se centrifugó a 14 000 rpm por 10 min. Durante este proceso, la mayoría de las proteínas quedan atrapadas o desnaturalizadas en la fase orgánica, mientras que el ADN queda en la fase acuosa y esta última fase se llevó a 0.2 M NaCl y se homogenizó. Finalmente, el ADN se precipitó con isopropanol frío, el cual se agregó suavemente para formar una fase superior y se mezcló por rotación e inversión suave para que el ADN formara un precipitado visible. El ADN se separó del líquido remanente y se le agregaron 500 µl de etanol al 70 % y el precipitado se lavó brevemente por ~10 segundos. Esta preparación se centrifugó a 14 000 rpm 5-10 min. El precipitado de ADN se dejó secar y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril. Típicamente se espera una concentración aproximada de 250 ng/µl.

5.2.3. Cuantificación del ADN genómico

Para cada muestra de los cinco aislamientos procesados se cuantificó la concentración del ADN en ng/µl y se evaluó la pureza (A260/A280) con un espectrofotómetro Nano Drop 1000 (Thermo scientific). Esta cuantificación se realizó con las 80 muestras procesadas y los valores obtenidos se tomaron en cuenta para la selección de los aislamientos para la caracterización genética.

5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y purificación del producto

Esta técnica se utilizó para llevar a cabo la amplificación parcial de los genes *lef-8* (2721 pb) y *polh* (741 pb). Adicionalmente, se amplificaron las regiones homologas *hr3* (527 pb) y *hr5* (852 pb). Para estudiar fragmentos de las secuencias correspondientes a los genes *lef-8*, *polh* y secuencias completas de *hr3* y *hr5* de ADN, se utilizaron los cebadores indicados en el cuadro 3. Las cantidades de los reactivos utilizados en la PCR se muestran en el cuadro 4. Una vez preparada la mezcla de reacción, los tubos se colocaron en un termociclador PTC 100TM (Programable Thermal Controller, MJ Reserch Inc.) bajo diferentes condiciones de ciclado para cada gen (Cuadro 5).

Cuadro 3. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación parcial de los genes *polh* y *lef-8* y para la amplificación de las dos regiones homólogas (*hr3* y *hr5*).

Secuencias de cebadores	Posición en genoma de GenBank # NC_002169.1 (pb)	Tm °C	Tamaño de fragmento esperado (pb)
Forward <i>lef-8</i>			
5'-TTCCACGGAGA A ATGACGGT-3'	109189..109209	55	775
Reverse <i>lef-8</i>			
5'CGCATCGGGTG CGAATTCC-3'	109945..109964	55	
Forward <i>polh</i>			
5'-CTAGAAAGGTA TGTCGTCGC-3'	150..171	60	564
Reverse <i>polh</i>			
5'CGCATCGGGTG CGAATTCC-3'	695..714	60	
Forward <i>hr3</i>			
5 TCATTATCATTG CAAAATATG-3'	52680..52705	55	602
Reverse <i>hr3</i>			
5'CGCCCAACGAAT TTATTGCA-3'	53261..53281	55	
Forward <i>hr5</i>			
5'ACGAACCTTTGA CAATTCA-3'	104853..104873	55	851
Reverse <i>hr5</i>			
5 TATCGACGTTCC ACACAAAC-3'	105682..105702	55	

Cuadro 4. Mezcla de reactivos utilizados para la reacción de PCR.

Componente	Volumen final (μ l)
Buffer 10X	1.0
MgCl ₂ (25 mM)	0.6
Mix dNTP (10mM de cada dNTP)	0.2
Cebador Forward 10 μ M	0.5
Cebador Reverse 10 μ M	0.5
Taq [®] ADN Polymerase (20 mg/ml)	0.2
Molde de ADN (15 ng/ μ l)	2.0
Agua libre de nucleasas	5.0
Volumen final	10.0

Cuadro 5. Condiciones de ciclado para la reacción de PCR.

Condiciones	<i>Polh</i>	<i>Lef-8</i>	<i>hr3</i>	<i>hr5</i>
Desnaturalización inicial	95°C /3min	95°C /3min	95°C /3min	95°C /3min
Desnaturalización	95°C /15 s	95°C /15 s	95°C /15 s	95°C /15 s
Hibridación	60°C/15 s	55°C/15 s	55°C/15 s	55°C/15 s
Extension	72°C /30 s	72°C /1 min	72°C /1min	72°C/1min
Elongación final	72°C/ 3min	72°C/ 3min	72°C/ 3min	72°C/ 3min

34 ciclos para genes y regiones homólogas

Finalizada la PCR, se analizó 1 µl de la reacción mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % en T.B.E. 1x (ANEXO 1) a 65 voltios durante 40 min. Se incluyó un marcador de peso molecular (100 pb ladder -Promega-) y el gel se tiñó con bromuro de etidio antes de la electroforesis (ANEXO 1). El gel se observó en un transiluminador UV y se documentaron las imágenes obtenidas. Una parte de las reacciones de PCR se almacenaron a -20 °C hasta su utilización, mientras que otras se utilizaron como molde para secuenciación y se purificaron con un kit comercial (QiaGen) (ANEXO 2). La purificación de productos de PCR con este kit se empleó solamente para los genes de *lef-8* y *polh*.

5.4. Restricción enzimática

Este método se empleó para el análisis de las regiones homólogas *hr3* y *hr5*. Los productos de PCR respectivos fueron digeridos con la enzima *Bgl*III (Fermentas). La reacción se mantuvo en una incubadora por 3 h a 37 °C. La mezcla y cantidades de la digestión enzimática se indican en la cuadro 6. Después de la digestión enzimática, la reacción se corrió sobre agarosa al 1.2 % por 2 h a 75 volts en T.B.E. 1x. Se incluyeron dos marcadores de peso molecular 1Kb (ladder Promega) y otro de 100 pb (ladder Promega), el gel se tiñó con bromuro de etidio antes de la electroforesis y se observó en un transiluminador UV para observar los patrones de restricción y documentar las imágenes obtenidas.

Cuadro 6. Mezcla de reactivos para la restricción enzimática de dos regiones homólogas *hr3* y *hr5*.

Componente	Volumen (µl)
Buffer (10x)	1.5
Enzima (10 U/ul)	0.5
Producto de PCR	8.0
Agua libre de nucleasas	5.0
Volumen final	15.0

5.5. Clonación de regiones homologas *hr3* y *hr5*

5.5.1. Reacción de ligación

Para realizar la reacción de ligación (Cuadro 7), se incubó la mezcla del inserto (producto de PCR de *hr3* y *hr5*) y vector pGEM®-T Easy (Promega) a 50 °C durante 5 min y luego se transfirió inmediatamente a agua-hielo. Después de agregar el resto de los componentes, la reacción se colocó en un baño de agua en recipiente de poliestireno a temperatura inicial de 25 °C y se mantuvo en refrigeración durante la noche hasta bajar la temperatura gradualmente a 4 °C y así favorecer la ligación.

Cuadro 7. Reacción de ligación para los fragmentos amplificados por PCR de *hr3* y *hr5*.

Componente	Volumen (µl)
pGEM®-T Vector (50 ng/ul)	1.0
Buffer T4 ADN ligasa (2X)	5.0
Producto de PCR (200 ng/µl)	1.0
T4 DNA ligasa (3 u/µl)	1.0
Agua	2.0
Volumen final	10.0

Inserto y Vector siguiendo la siguiente relación de cantidades:
(ng vector x pb inserto x 3) / (pb vector) = ng inserto. Buffer T4 (ANEXO 1).

5.5.2. Transformación de bacterias

Para la transformación de bacterias se usaron bacterias electrocompetentes de *E. coli* de la cepa DH 5α proporcionadas por el laboratorio de virus del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola-Instituto Nacional de Tecnología Agrícola (IMYZA-INTA). Todas las transformaciones se realizaron por electroporación, donde fueron sometidas a un campo eléctrico que les crea poros transitorios en la membrana y permite la entrada del ADN foráneo. Como primer paso, se mezclaron 40 µl de suspensión de bacterias descongeladas con 1 µl de la reacción de ligación. Este paso se realizó con incubación permanente en agua-hielo.

Posteriormente, la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación pre-enfriada y se la ubicó en el electroporador. Las condiciones de capacitancia, campo eléctrico y resistencia se ajustaron en 25µF, 2.5 kV y 200 Ohm, respectivamente, en el equipo GEN-PULSER (Bio-Rad). Después, las bacterias se resuspendieron en 960 µl de SOC y se incubaron a 37° durante una hora. Finalmente, diferentes alícuotas se sembraron (según eficiencia de la transformación) en placas de Petri conteniendo agar LB con ampicilina, IPTG y x-gal, y se incubaron a 37 °C durante la noche.

5.5.3. Detección de clones recombinantes

Las colonias resultantes de las diferentes transformaciones se puncionaron con palillos estériles y se transfirieron a una placa en forma ordenada (placa “master”), la cual se incubó a 37 °C durante la noche. Se analizaron tres colonias blancas de cada uno de los aislamientos clonados y para ello se transfirieron con un palillo estéril a microtubos con 20 µl de agua destilada estéril. Las muestras se homogenizaron, se tomaron 5 µl de cada una para ser usados como molde en reacciones de PCR colony para confirmar la incorporación de los fragmentos clonados (Cuadro 8). Se analizó el resultado de la amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, empleando buffer TBE 0.5 X.

Cuadro 8. Mezcla de reactivos para la reacción de PCR colony de *hr3* y *hr5*.

Componente	Volumen (µl)
Buffer 10X	2.0
MgCl ₂ (25 mM)	1.2
Mix dNTP (10mM de cada dNTP)	0.4
Cebador Forward 10µM	1
Cebador Reverse 10µM	1
Taq® ADN Polymerase (20 mg/ml)	0.4
Suspensión de Bacterias	5.0
Agua libre de nucleasas	9
Volumen final	20.0

5.5.4. Purificación de ADN plasmídico de *hr3* y *hr5*

Las colonias recombinantes se seleccionaron en base a la confirmación del tamaño esperado para el producto de PCR. Para su purificación se seleccionaron de una a tres colonias de un mismo aislamiento. A partir de cada colonia seleccionada, se realizó un cultivo en 2 ml de LB con ampicilina a 37 °C, con agitación durante toda la noche. Para conservar los clones, se tomaron 750 µl del cultivo y se agregó un volumen igual de glicerol 30% y se guardó en el congelador a -80 °C. El resto del cultivo se utilizó para la obtención de ADN plasmídico para los productos clonados de *hr3* y *hr5* contenidos en *E. coli*. Para ello, se utilizó el kit comercial QIA Spin Miniprep (ANEXO 3). El ADN plasmídico se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril y se conservó a -20 °C hasta su secuenciación.

5.6. Secuenciación de productos de PCR

Los fragmentos amplificados conseguidos mediante la reacción de PCR de *lef-8* y *polh* se secuenciaron con los primers específicos para cada gen (forward y reverse). Para la secuenciación, se usó el método de Sanger (1977) en un secuenciador de capilares y con protocolos optimizados de terminadores fluorescentes. La secuenciación se realizó en la Unidad de Genómica – Instituto de Biotecnología, Centro de investigaciones en Ciencias Veterinarias y Agronómicas-Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CICVyA – CNIA-INTA).

Los vectores plasmídicos que contenían el inserto de los productos de amplificación de las regiones homologas *hr3* y *hr5*, se secuenciaron con los cebadores universales SP6 y T7 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cebadores universales para la detección del inserto (*hr3* y *hr5*).

T7 Promotor:	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'
SP6:	5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-AA-3'

5.7. Análisis de secuencias

Las secuencias analizadas de las muestras de cada región: SIN6, SIN8, SLP6, SLP8, SPX y GB_SeMNPV [GenBank # NC_002169.1] fueron alineadas utilizando las herramientas proporcionadas por el programa VECTOR NTI Suite 10. El resultado del alineamiento se utilizó para un análisis de agrupamiento por similitud de las secuencias de ADN.

5.8. Bioensayos

5.8.1. SeMNPV

La actividad biológica de los virus procedentes de Sinaloa (SIN6, SIN8) y San Luís Potosí (SLP6) se evaluaron mediante el método de ingestión de la gota (Hughes y Wood, 1981). Para ello, se utilizaron larvas de tercer estadio de *S. exigua* (0-8 h después de la ecdisis) y se prepararon un rango de siete concentraciones (de 3 a 2187 OBs/larva). Las concentraciones de los virus se suspendieron en agua destilada y se les agregó 0.001% (p/v) de un colorante artificial azul (McCormick® & Company, Inc, Estados Unidos). El inóculo se dispersó separadamente en pequeñas gotas sobre cajas de Petri. Las larvas que ingirieron la concentración viral, en un lapso de ~10 min, se transfirieron a celdas individuales provistas con dieta semisintética libre del virus. Los bioensayos se mantuvieron bajo las mismas condiciones que en la cría del insecto. Se realizaron cuatro repeticiones de 12 individuos y 12 individuos control tratados sólo con agua más el colorante. La mortalidad larvaria se registró en periodos de 12 h durante nueve días.

5.8.2. Azadiractina

Para evaluar la actividad biológica de la azadiractina sobre larvas de tercer estadio de *S. exigua*, se utilizó un rango de ocho concentraciones del insecticida [0.025-50 mg de ingrediente activo (i.a.)/L]. Para la técnica de contaminación por superficie de dieta semi-

sintética, se colocaron discos de dieta (2 cm de diámetro) en celdas para cultivo de tejidos. Por cada disco se aplicó una alícuota de 50 µl de cada una de las concentraciones del insecticida, sobre la superficie del disco. Después del secado de los discos, se colocó una larva en cada celda. Las larvas se expusieron a los discos tratados por azadiractina durante cuatro días, posteriormente se transfirieron a celdas con dieta semi-sintética sin tratar. Las condiciones de incubación de los insectos fueron las mismas que las descritas en los ensayos anteriores. Las larvas del testigo se alimentaron con discos de dieta semisintética, tratadas sólo con agua destilada estéril.

5.8.3. Análisis estadístico

La mortalidad inducida por azadiractina se analizó mediante un análisis probit (Finney, 1972) con el programa POLO PC (LeOra Software, 1987). Mediante este programa se obtuvieron las líneas de regresión y el grado de heterogeneidad se calculó mediante la prueba de ji-cuadrada (χ^2) para un nivel de significancia de 95%. La mortalidad inducida por los baculovirus se analizó mediante un análisis logit con el programa GLIM (generalized linear interactive modeling, Oxford, UK).

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización genética de los aislamientos de SeMNPV

6.1.1. Amplificación por PCR de secuencias específicas del SeMNPV a partir de muestras de ADN de OBs purificados

Con el uso de los cebadores específicos se amplificaron fragmentos de los tamaños esperados en base a la secuencia del SeMNPV del GenBank, correspondientes a los genes *lef-8* y *polh* (Figuras 6A y 6B, respectivamente) y de las regiones homologas *hr3* y *hr5* (Figuras 7A y 7B, respectivamente) de las muestras de SIN6, SIN8, SLP6, SLP8 y SPX, lo cual confirma que el NPV analizado es el perteneciente a su hospedero homólogo, *S. exigua* (SeMNPV). Posteriormente, estos resultados se validaron por secuenciación. En las figuras 6A y B se observan las bandas amplificadas del gen *lef-8* (775 pb) y el gen *polh* (564 pb) de los cinco aislamientos estudiados, respectivamente.

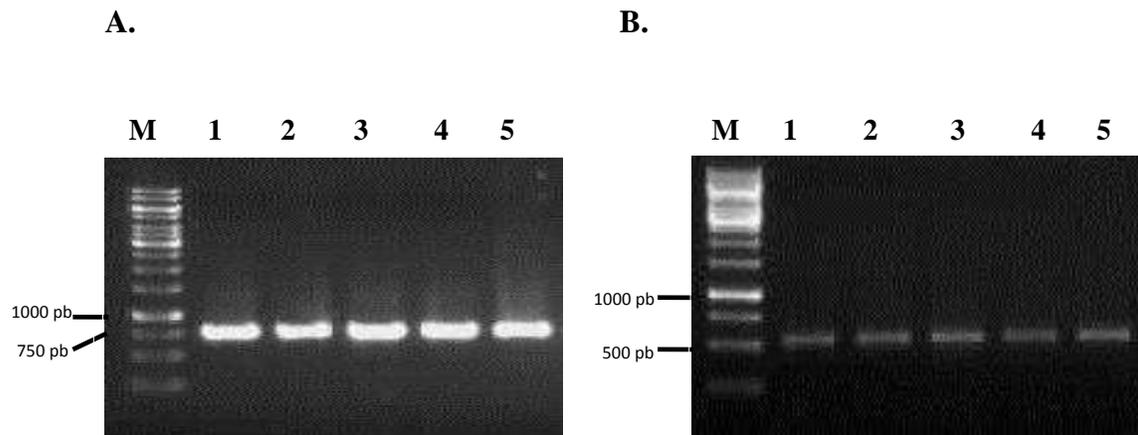


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (TBE) a 65 volts, de la amplificación por PCR de un fragmento del gen *lef-8* de 775 pb (A) y de un fragmento del gen poliedrina (*polh*) de 564 pb de tamaño esperado (B). Orden de las calles: marcador de peso molecular, 1 Kb ADN (M), calle 1. SIN8, calle 2. SPX, calle 3. SLP8, calle 4. SLP6, calle 5. SIN6.

La banda amplificada de la región homóloga *hr3*, del tamaño esperado de 602 pb, se observan en la figura 7A. Las bandas amplificadas de la región homóloga *hr5* se muestran en la figura 7B. Debido a que las bandas que se obtuvieron para *hr5* con tamaños ligeramente diferentes cercanos al valor esperado de 851 pb, se arreglaron artificialmente en tres grupos: la banda de SPX corresponde a la de menor tamaño (grupo I); mientras que SIN6, SIN8 y SLP8 (marcadas como grupo II) corresponden a las de tamaño intermedio y SLP6 presenta banda de tamaño mayor al resto de las bandas obtenidas para cada aislamiento (grupo III) (Figura 7B).

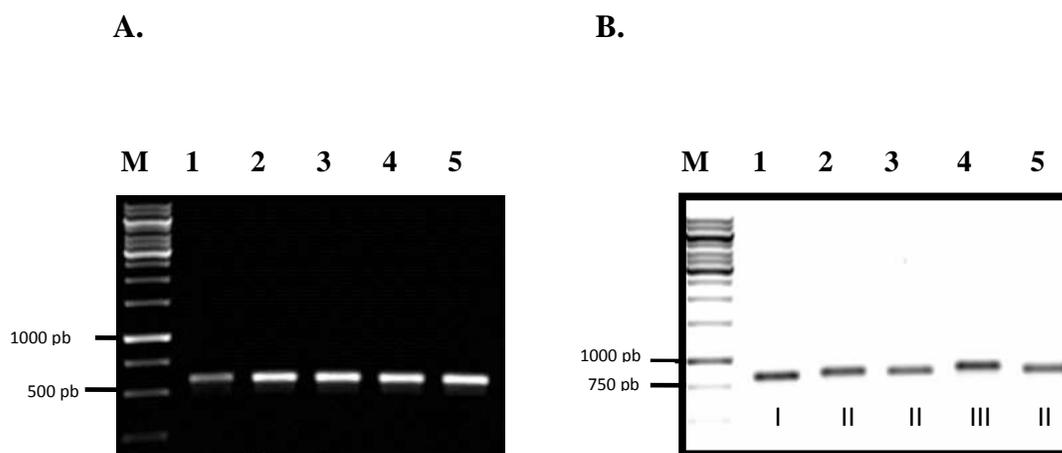


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (TBE) a 75 volts de la amplificación por PCR de la región *hr3* (tamaño esperado, 602 bp) (A) y de la región *hr5* (tamaño esperado, 851 bp) (B). Muestras de ADN de *SeMNPV*. Orden de las calles: marcador de peso molecular, 1 Kb ADN (M), SPX, calle 1. SIN6, calle 2. SIN8, calle 3. SLP6, calle 4. SLP8, calle 5.

6.2. Análisis de los productos de PCR - “Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción” (RFLP)

Los productos de amplificación por PCR de las regiones homólogas *hr3* (Figura 7A) y *hr5* (Figura 7B) se digirieron con la enzima *Bgl*III, ya que los palíndromes imperfectos en los *hrs* de *SeMNPV* presentan sitios de corte *Bgl*III (Figura 8).

A.

```

P1 1 TCATTATCAT TGCAAAATAT GCGCAATAA TAAATTTTAG TACACGATGT TTGCTTTCAT
61 CGAAGATCTT GGACGAAAGC AAAGATCATG TACTAGAATT ATGATGATGT CTTTTTAGG
P2 121 ATGATGTCAT TTTTAGGATG ATGTAATGCC GTGAAATCGGT ACACGATCTT TGCTTTCGTC
181 CAAGATCCTC GATGAAAGCA AAGATGGTGT ACTAAAATAA TGAAGACGAC AACGACAACG
P3 241 ACGATAATTA CGATTGTGAC GATAGTTACA ATTTTAGTAC ATCATCTTTG CTTTCATCCA
301 AGATCCTCGA TGAAAGCAAA GATTGAGTAT GAAAAGTCAA AACCCGTCGA AACAAGTCGA
P4 361 AACTTGATCA CATCAAAAAT ATGATGCAAT AAAAACAAAA TATTGCATCA TCATTCTAGT
421 ACATGATCTT TGCTTTCATC GACGATCTTG GACGAAAGCA AAGATCATGT ATTGAAATTT
P5 481 TCATCATTGA AAAATTCAGT ACATGATCTT TGCTTTCGTC GACGATCTTG GACGAAAGCA
541 AAGATCATGT ACTGAATTTT TTAAATAACG ATTTGTAAAT ATTGCAATAA ATTCGTTGGG
601 CG

```

B.

```

1 ACGAACCTTT GACAATTTCA ATACATGATC TTTGCTTTCG TCGACGATCT TGGACGAAAG
P1 61 CAAAGATTGA CTATGAAACG ATACATTTTA GTACATGATC TTTGCTTTCG TCGAAGATCT
121 TGGACGAAAG CAAAGATCGA GTAGGCTGAT GCAATATTAA AAACAAATTA CAATTAAAAT
P2 181 GACATCATCA TCATCATTTT ATAAGCTTCA GTACATGATC TTTGCTTTCG TCCAAAGATCT
241 TCGATGAAAG CAAAGATCAT GTGCGAAAAT GAGGATCTAA TAAAGTGATG ATATCATTTT
P3 301 TAAAAATAAA GATGCAATAA GTTGTTTGTG TGTCTTAAAT AAATTTTAGT ACACGATCTT
361 TGCTTTCATC GAAGATCCTC TACGAAAGCA AAGATCATGT ACTAGAGTTT TGTATTGCGT
P4 421 CAAATCTATT TTTAGCGATG ATGTGTTTAA TAAATTTTAA TACACGATCT TTGCTTTTGT
481 CCAAGATCGT CGACGAAAGC AAAGATCGTG TACTAAAGTT TTGTATTGCG TCAAATCTAT
P5 541 TTTTAGCGAT GATATCAGTA TTAATAAAAA TATAAAGTAC ACAATTTTGG CTTTCGTCCA
601 AGATCTTTGGA TGAAAGCAAA CATGATGTAC CGACATTTAT CAAAATAGAA TTGACGCAAC
P6 661 TTTAATACAC GATCTTTGCT TTCATCCAAAG ATCTTCGACG AAAGCAAAGA TTGTGTATGA
P7 721 AAAAATTGGCT GATGCAATAT TTTAAATCAA TCACAGTTACA CGATCTTTGC TTTTCGTCCAA
781 GATCTTTCGAT GAAAGCAAAG ATCGTGTATT ACAATTTTAA AACACGATTC GTTTGTGTGG
841 AACGTCGATA

```

Figura 8. Regiones homólogas *hr 3* (A) y *hr 5* (B) de SeMNPV (GenBank # NC_002169.1). Los palíndromos imperfectos en tándem sombreados en gris; la posición de las repeticiones palindrómicas P1-P5 para *hr3* y P1-P8 para *hr5* (Broer *et al.*, 1998), la posición de los cebadores resaltados en verde y los sitios de corte *Bgl*III indicados con flechas y letras rojas.

En la figura 9 se observan los fragmentos de restricción generados después de la digestión con la enzima *Bgl*III para *hr3* (A) y *hr5* (B). Debido al porcentaje de agarosa utilizado (1.2%), en ambos casos sólo se lograron resolver las bandas mayores a 200 pb. Para *hr3* (Figura 9A), se observó una banda de menor tamaño en SPX (~430 pb) comparado con el resto de los aislamientos (SIN6, SIN8, SLP6 y SLP8), en los cuales se observaron bandas de ~

538 pb (Figura 9A). Similarmente, para *hr5* (Figura 9B), en el aislamiento SPX se observó una banda de menor tamaño (~ 366 pb) comparado con el resto de los aislamientos (SIN6, SIN8, SLP6 y SLP8), en los cuales se observaron bandas de ~ 550 pb (Figura 9B).

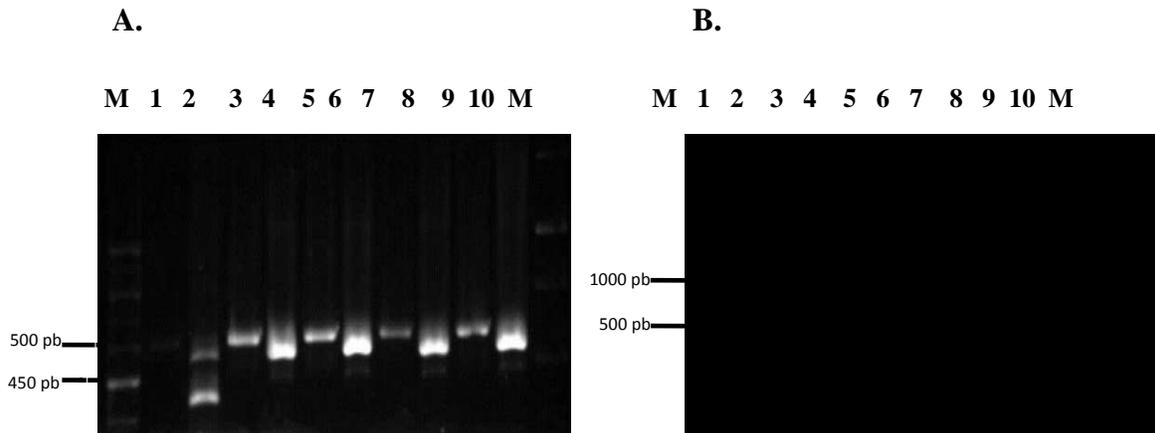


Figura 9: Electroforesis de productos en gel de agarosa al 1.2% (TBE) a 75 volts. Productos de PCR a partir de ADN de *SeMNPV* digeridos con *Bgl*III. La predicción del tamaño de los fragmentos digeridos se hizo en base a la secuencia de *SeMNPV* (GenBank # NC_002169.1), con el programa VECTOR NTI Suite 10. Orden de las calles: (A) *hr3*, marcador de peso molecular, 100 pb ADN (M), productos de PCR sin digerir y digeridos, calles 1 y 2 SPX, calles 3 y 4 SIN6, calles 5 y 6 SIN6, calles 7 y 8 SLP6, calles 9 y 10 SLP8 y marcador de peso molecular, 1 Kb ADN (M). **Bandas esperadas de 538 y 65 pb.** (B) *hr5* marcador de peso molecular, 100 pb ADN (M), calle 1 y 2 SPX, calle 3 y 4 SIN6, calle 5 y 6 SIN8, calle 7 y 8 SLP6, Calle 9 y 10 SLP8 y marcador de peso molecular, 1 Kb ADN (M). **Bandas esperadas de 366, 116, 120, 88, 91, 69 pb.**

6.3. Clonación de los fragmentos de PCRs de las regiones homólogas *hr3* y *hr5*

Se recuperaron de una a tres colonias de bacterias transformantes por cada producto clonado tanto de *hr3* como de *hr5*. Para detectar la presencia y tamaño del fragmento clonado, cada colonia se analizó por medio de PCR utilizando los cebadores SP6 y T7 (Figura 10). Las colonias transformantes correspondientes a la banda amplificada de 602 pb para *hr3* (calles 1, 2 y 3 para SIN8; calles 4, 5 y 6 para SLP6, calles 7 y 8 para SLP8) y la banda amplificada de 855 pb para *hr5* (calles 9 y 10 para SPX; calles 11, 12 y 13 para SIN8; calles 14, 15 y 16 para SLP6; calle 17 para SLP8) (Figura 10A). En la figura 10B se observan los fragmentos clonados de las regiones homologas *hr3* del aislamiento de SPX (calles 18 y 19), SIN6 (calles 20 y 21) y *hr5* del aislamiento SIN6 (calles 22, 23 y 24).

Se tomó una muestra representativa de cada uno de los aislamientos para su posterior secuenciación. En el caso donde se observaron bandas de diferentes tamaños de un mismo aislamiento, se tomaron las muestras que revelaron estas diferencias, las cuales fueron SLP6, donde se observaron bandas de diferente tamaño para *hr3* (~ 602 pb y ~ 450 pb) (calles 5 y 6, respectivamente) (Figura 10 A) y para la región homóloga *hr5* en los aislamientos de SLP6 se observaron bandas de ~ 855 y ~ 600 pb (Calles 14 y 15 respectivamente) y para SIN6 se observaron bandas de diferentes tamaños (calles 22, 23 y 24, entre los tamaños de ~ 855 pb, ~ 400 pb y ~ 855 pb respectivamente) (Figura 10B).

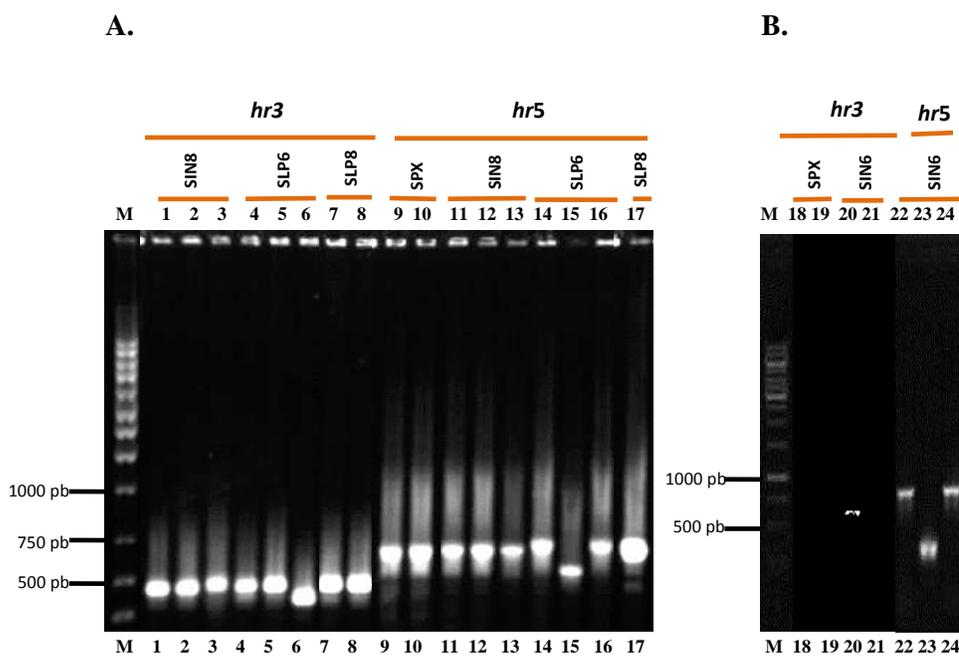


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (TBE) a 65 volts, de fragmentos *hr3* y *hr5* de PCRs obtenidos de clones. **(A)** Fragmentos de *hr3* de 602 pb y 855 pb para *hr5* de tamaño esperado. Orden de las calles: *hr3*; marcador de peso molecular, 1 Kb ADN (M). Calles 1, 2 y 3 muestras de SIN8. Calles 4, 5 y 6 muestras de SLP6. Calles 7 y 8 muestras de SLP8. *hr5*; Calles 9 y 10 muestras de SPX. Calles 11, 12 y 13 muestras de SIN8. Calles 14, 15 y 16 muestras de SLP6. Calle 17 muestras de SLP8. **(B)** Orden de las calles: marcador de peso molecular, 1 Kb ADN (M), *hr3*; Calles 18 y 19 muestras de SSPX. Calles 20 y 21 muestras de SIN6. *hr5*; Calles 22, 23 y 24 muestras de SIN6.

6.4. Análisis de secuencias

Se secuenciaron los productos de amplificación de *lef-8*, *polh* y *hr3*.

6.4.1. Alineamiento de secuencias de SeMNPV del gen *lef-8*.

La figura 11 muestra el alineamiento de las secuencias de los productos de amplificación del gen *lef-8*. Cuando se eliminaron los cebadores, la secuencia restante es de 697 nucleótidos. La posición nucleotídica 186 corresponde a una “T” para el aislado de SPX (Figura 11). Dicha variante no se traduce en un cambio de aminoácido en la proteína. En la posición nucleotídica 312 del alineamiento aparece una base adicional en el SeMNPV GB, el cual a su vez presenta una deleción de una base en la posición 337. Estas diferencias determinan un corrimiento del marco de lectura de la proteína en la región comprendida entre ambas posiciones para SeMNPV GB (Figura 11). Finalmente, en la posición nucleotídica 556 del alineamiento se observó una “T” para SeMNPV_GB nucleótido diferente al resto de los aislamientos los cuales cuentan con una “C” en la misma posición nucleotídica (Figura 11). Dichas variantes no se traducen en un cambio de aminoácido en la proteína.

6.4.2. Alineamiento de secuencias de SeMNPV del gen *polh*.

La posición nucleotídica 3 corresponde a una “A” para SeMNPV_GB (Figura 12), la cual fue diferente al resto de los aislamientos que cuentan con una “C” en la misma posición nucleotídica. Dichas variantes se traducen en un cambio de aminoácido (“K” y “Q”, respectivamente) (Figura 12). En la posición nucleotídica 257 se observó una “T” para el aislamiento SPX; en el resto de los aislamientos se observó un nucleótido diferente (C), al traducir tanto el codón para SPX como para el resto de los aislamientos, éstos codificaron para el aminoácido “P” (Figura 12).

6.4.3. Alineamiento de secuencias de SeMNPV de la región homóloga *hr3*

Al alinear las secuencias obtenidas para la región homóloga *hr3*, se observaron las siguientes diferencias dentro de las regiones palindrómicas (Figura 13): **i)** en el aislamiento SLP6 se observaron dos variantes genóticas (1SLP6 y 2SLP6), ya que en 2SLP6 se observó una clara delección desde la posición nucleotídica 445 hasta la posición 525 y una base “C” en la posición nucleotídica 543, en el resto de los aislamientos se observó una “G” en la misma posición, **ii)** en la posición nucleotídica 333 se observó una “C” para el aislamiento SPX, la cual no está presente en el resto de los aislamientos, éstos contienen una base “A” en la misma posición, **iii)** en la posición nucleotídica 460 se observó una “G” para el aislamiento SIN8, mientras que el resto de los aislamientos se observó una “A” en la misma posición y **iv)** en la posición nucleotídica 463 se observó una “G” para el aislamiento SeMNPV_GB, en el resto de los aislamientos se observó una “C” en la misma posición.

	151						C		200			
SeMNPV_GB_Lef8	ATTGCATTTA	ACAATCGTCC	GACCATCTTT	CAATGCGATC	GCAACAAGCT							
SeMNPV_SIN6_Lef8	ATTGCATTTA	ACAATCGTCC	GACCATCTTT	CAATGCGATC	GCAACAAGCT							
SeMNPV_SIN8_Lef8	ATTGCATTTA	ACAATCGTCC	GACCATCTTT	CAATGCGATC	GCAACAAGCT							
SeMNPV_SLP6_Lef8	ATTGCATTTA	ACAATCGTCC	GACCATCTTT	CAATGCGATC	GCAACAAGCT							
SeMNPV_SLP8_Lef8	ATTGCATTTA	ACAATCGTCC	GACCATCTTT	CAATGCGATC	GCAACAAGCT							
SeMNPV_SPX_Lef8	ATTGCATTTA	ACAATCGTCC	GACCATCTTT	CAATGCGATC	GCAACAAGCT							
							C					
	301	K	V	K	Y	P	Q	R	G	G	V	350
SeMNPV_GB_Lef8	ATCAAGAAAA	A	GTTAAATA	TCCGCAGCGA	GGCGGG	GTC						
SeMNPV_SIN6_Lef8	ATCAAGAAAA	A	GTTAAATA	TCCGCAGCGA	GGCGGG	CGTC						
SeMNPV_SIN8_Lef8	ATCAAGAAAA	A	GTTAAATA	TCCGCAGCGA	GGCGGG	CGTC						
SeMNPV_SLP6_Lef8	ATCAAGAAAA	A	GTTAAATA	TCCGCAGCGA	GGCGGG	CGTC						
SeMNPV_SLP8_Lef8	ATCAAGAAAA	A	GTTAAATA	TCCGCAGCGA	GGCGGG	CGTC						
SeMNPV_SPX_Lef8	ATCAAGAAAA	A	GTTAAATA	TCCGCAGCGA	GGCGGG	CGTC						
		K	L	N	I	R	S	E	A	G	V	
	551	P										600
SeMNPV_GB_Lef8	ATGCCCGTGC	TCACGTACGA	CGCTTCGAGC	GACGCGAACG	TGTTTCTCGA							
SeMNPV_SIN6_Lef8	ATGCCCGTGC	TCACGTACGA	CGCTTCGAGC	GACGCGAACG	TGTTTCTCGA							
SeMNPV_SIN8_Lef8	ATGCCCGTGC	TCACGTACGA	CGCTTCGAGC	GACGCGAACG	TGTTTCTCGA							
SeMNPV_SLP6_Lef8	ATGCCCGTGC	TCACGTACGA	CGCTTCGAGC	GACGCGAACG	TGTTTCTCGA							
SeMNPV_SLP8_Lef8	ATGCCCGTGC	TCACGTACGA	CGCTTCGAGC	GACGCGAACG	TGTTTCTCGA							
SeMNPV_SPX_Lef8	ATGCCCGTGC	TCACGTACGA	CGCTTCGAGC	GACGCGAACG	TGTTTCTCGA							

Figura 11. Comparación de secuencias para el gen *lef-8* de los aislamientos: SeMNPV_GB, SeMNPV_SIN6, SeMNPV_SIN8, SeMNPV_SLP6, SeMNPV_SLP8 y SeMNPV_SPX. Las áreas marcadas en gris indican el triplete que contienen las diferencias, las áreas marcadas de verde muestran diferencias observadas y los puntos en rojo muestran las deleciones.

	1	K							50
SeMNPV_GB_Polh	GC	AAAACCA	AAAGTTGACT	CTCTTCAAGG	AAATTCGTAT	CGTCAAACCG			
SeMNPV_SIN6_Polh	GG	AAAACCA	AAAGTTGACT	CTCTTCAAGG	AAATTCGTAT	CGTCAAACCG			
SeMNPV_SIN8_Polh	GG	AAAACCA	AAAGTTGACT	CTCTTCAAGG	AAATTCGTAT	CGTCAAACCG			
SeMNPV_SLP6_Polh	GG	AAAACCA	AAAGTTGACT	CTCTTCAAGG	AAATTCGTAT	CGTCAAACCG			
SeMNPV_SLP8_Polh	GG	AAAACCA	AAAGTTGACT	CTCTTCAAGG	AAATTCGTAT	CGTCAAACCG			
SeMNPV_SPX_Polh	GG	AAAACCA	AAAGTTGACT	CTCTTCAAGG	AAATTCGTAT	CGTCAAACCG			
		Q							
	250	P							300
SeMNPV_GB_Polh	CGTTCCCCAC	GAAGTCATCC	GCATCGTCGA	GCCCGTGTAC	GTCGGCACCA				
SeMNPV_SIN6_Polh	CGTTCCCCAC	GAAGTCATCC	GCATCGTCGA	GCCCGTGTAC	GTCGGCACCA				
SeMNPV_SIN8_Polh	CGTTCCCCAC	GAAGTCATCC	GCATCGTCGA	GCCCGTGTAC	GTCGGCACCA				
SeMNPV_SLP6_Polh	CGTTCCCCAC	GAAGTCATCC	GCATCGTCGA	GCCCGTGTAC	GTCGGCACCA				
SeMNPV_SLP8_Polh	CGTTCCCCAC	GAAGTCATCC	GCATCGTCGA	GCCCGTGTAC	GTCGGCACCA				
SeMNPV_SPX_Polh	CGTTCCCCAC	GAAGTCATCC	GCATCGTCGA	GCCCGTGTAC	GTCGGCACCA				

Figura 12. Comparación de secuencias para el gen *polh* de los aislamientos: SeMNPV_GB, SeMNPV_SIN6, SeMNPV_SIN8, SeMNPV_SLP6, SeMNPV_SLP8 y SeMNPV_SPX. Las áreas marcadas en gris indican el triplete que contienen las diferencias, las áreas marcadas de verde muestran diferencias observadas y los puntos en rojo muestran las deleciones.

	301				350
SeMNPV_GB.hr3	AGATCCTCGA	TGAAAGCAA	GATTGAGTAT	GAAAAGTCAA	AACCCGTCGA
SeMNPV_SPX.hr3	AGATCCTCGA	TGAAAGCAA	GATTGAGTAT	GAAGTCAA	AACCCGTCGA
SeMNPV_SIN6.hr3	AGATCCTCGA	TGAAAGCAA	GATTGAGTAT	GAAAAGTCAA	AACCCGTCGA
SeMNPV1SLP6.hr3	AGATCCTCGA	TGAAAGCAA	GATTGAGTAT	GAAAAGTCAA	AACCCGTCGA
SeMNPV_SLP8.hr3	AGATCCTCGA	TGAAAGCAA	GATTGAGTAT	GAAAAGTCAA	AACCCGTCGA
SeMNPV_SIN8.hr3	AGATCCTCGA	TGAAAGCAA	GATTGAGTAT	GAAAAGTCAA	AACCCGTCGA
SeMNPV2SLP6.hr3	AGATCCTCGA	TGAAAGCAA	GATTGAGTAT	GAAAAGTCAA	AACCCGTCGA
	401				450
SeMNPV_GB_hr3	TATTGCATCA	TCATTCTAGT	ACATGATCTT	TGCTTTCATC	GAC <u>CGATCT</u> TG
SeMNPV_SPX.hr3	TATTGCATCA	TCATTCTAGT	ACATGATCTT	TGCTTTCATC	GAC <u>CGATCT</u> TG
SeMNPV_SIN6.hr3	TATTGCATCA	TCATTCTAGT	ACATGATCTT	TGCTTTCATC	GAC <u>CGATCT</u> TG
SeMNPV1SLP6.hr3	TATTGCATCA	TCATTCTAGT	ACATGATCTT	TGCTTTCATC	GAC <u>CGATCT</u> TG
SeMNPV_SLP8.hr3	TATTGCATCA	TCATTCTAGT	ACATGATCTT	TGCTTTCATC	GAC <u>CGATCT</u> TG
SeMNPV_SIN8.hr3	TATTGCATCA	TCATTCTAGT	ACATGATCTT	TGCTTTCATC	GAC <u>CGATCT</u> TG
SeMNPV2SLP6.hr3	TATTGCATCA	TCATTCTAGT	ACATGATCTT	TGCTTTCATC	GAC <u>CGA</u>
	451				500
SeMNPV_GB.hr3	GACGAAAGCA	AAATCATGT	ATTGAAATTG	TCATCATTGA	AAAATTCAGT
SeMNPV_SPX.hr3	GACGAAAGCA	AACATCATGT	ATTGAAATTG	TCATCATTGA	AAAATTCAGT
SeMNPV_SIN6.hr3	GACGAAAGCA	AACATCATGT	ATTGAAATTG	TCATCATTGA	AAAATTCAGT
SeMNPV1SLP6.hr3	GACGAAAGCA	AACATCATGT	ATTGAAATTG	TCATCATTGA	AAAATTCAGT
SeMNPV_SLP8.hr3	GACGAAAGCA	AACATCATGT	ATTGAAATTG	TCATCATTGA	AAAATTCAGT
SeMNPV_SIN8.hr3	GACGAAAGCA	AACATCATGT	ATTGAAATTG	TCATCATTGA	AAAATTCAGT
SeMNPV2SLP6.hr3
	501				550
SeMNPV_GB.hr3	ACATGATCTT	TGCTTTCGTC	GAC <u>CGATCT</u> TG	GACGAAAGCA	AAGATCATGT
SeMNPV_SPX.hr3	ACATGATCTT	TGCTTTCGTC	GAC <u>CGATCT</u> TG	GACGAAAGCA	AAGATCATGT
SeMNPV_SIN6.hr3	ACATGATCTT	TGCTTTCGTC	GAC <u>CGATCT</u> TG	GACGAAAGCA	AAGATCATGT
SeMNPV1SLP6.hr3	ACATGATCTT	TGCTTTCGTC	GAC <u>CGATCT</u> TG	GACGAAAGCA	AAGATCATGT
SeMNPV_SLP8.hr3	ACATGATCTT	TGCTTTCGTC	GAC <u>CGATCT</u> TG	GACGAAAGCA	AAGATCATGT
SeMNPV_SIN8.hr3	ACATGATCTT	TGCTTTCGTC	GAC <u>CGATCT</u> TG	GACGAAAGCA	AAGATCATGT
SeMNPV2SLP6.hr3 <u>TCT</u> TG	GACGAAAGCA	AACATCATGT

Figura 13. Comparación de secuencias para la región homóloga *hr3* de los aislamientos: SeMNPV_GB, SeMNPV_SIN6, SeMNPV_SIN8, SeMNPV_SLP6, SeMNPV_SLP8 y SeMNPV_SPX. Las secuencias sombreadas muestran las regiones palindrómicas imperfectas. Las áreas marcadas en gris indican el triplete que contienen las diferencias, las áreas marcadas de verde muestran diferencias observadas y los puntos en rojo muestran mutaciones puntuales.

6.5. Actividad biológica de SeMNPV

Las larvas de tercer estadio de *S. exigua* fueron susceptibles a los aislamientos colectados en México y a SPX cuando estos virus se aplicaron en un rango de 3 a 2187 OBs/larva. La mortalidad larvaria acumulada fue positivamente proporcional a las dosis aplicadas, con algunas excepciones para los aislamientos SIN6 y SIN8 (Figura 14). Para todos los casos, la mortalidad larvaria inició entre las 84 y 96 h posteriores a la inoculación en la concentración más alta, aunque a través del tiempo se observó una mayor mortalidad para los virus SIN6 y SLP6.

El 50% de la mortalidad se logró obtener en la mayoría de los aislamientos a las 192 h posteriores a la inoculación, pero un mejor ajuste del modelo logit se logró a las 216 h (Cuadro 10). La DL_{50} del aislamiento SLP6 (240 OBs/larva) fue significativamente menor comparado con todos los aislamientos acuerdo a los límites de confianza al 95%. Aunque los valores de las DL_{50} de los aislamientos SIN6 (1135 OBs/larva) y SIN8 (1728 OBs/larva) fueron menores comparados con SPX, éstos no difirieron significativamente.

Cuadro 10. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *S. exigua* tratadas con diferentes aislados del SeMNPV a través de la técnica de la ingestión de la gota.

Aislamientos	DL_{50}^a (95% LC)	χ^2	gl
SPX	3473 (1337-37798)	4.1	3
SIN6	1135 (778-1953)	2.4	2
SIN8	1728 (698-8014)	1.7	4
SLP6	240 (142.4-444.5)	11.9	5

^a DL_{50} expresada en OBs/larva a las 216 h posteriores a la inoculación.

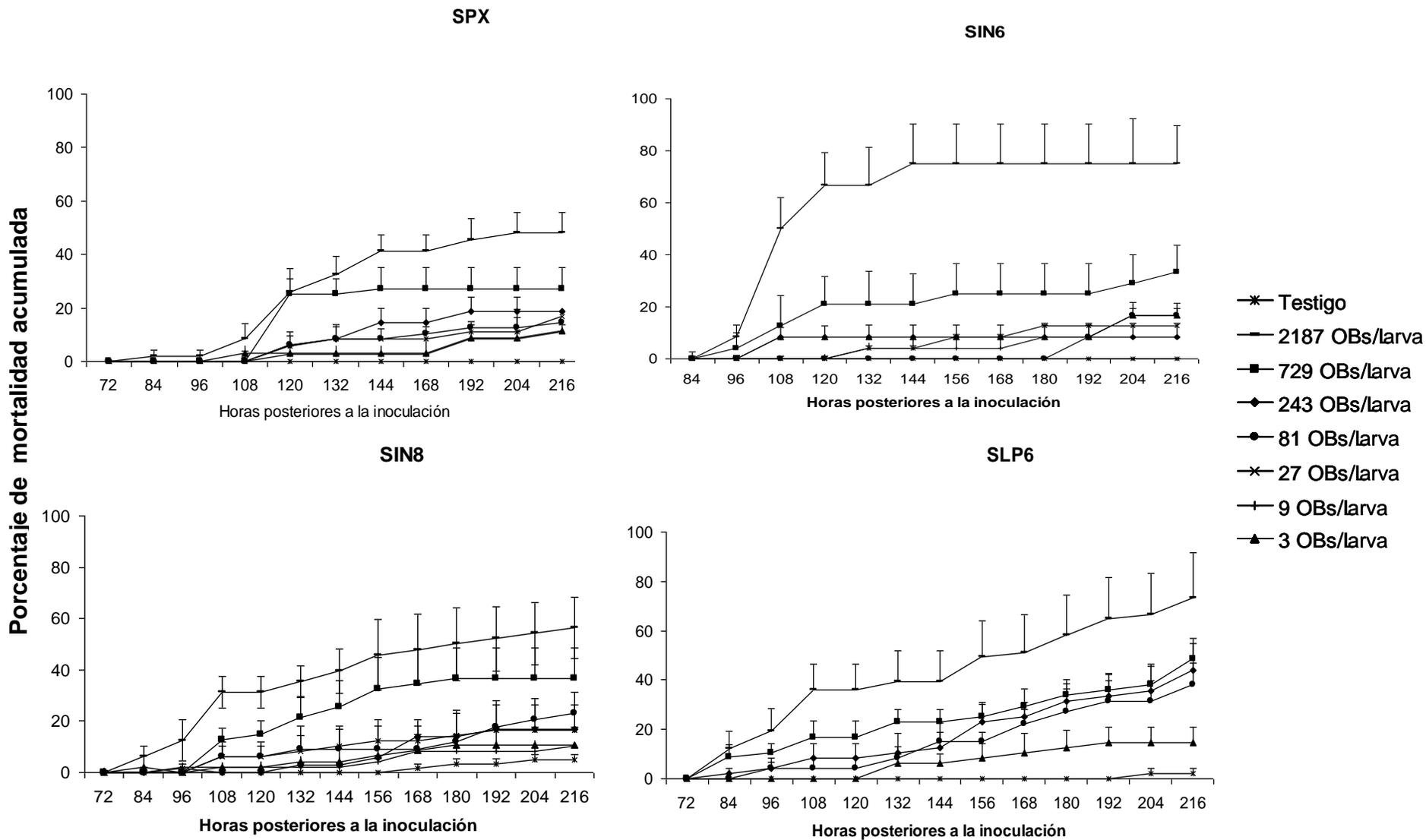


Figura 14. Porcentaje de mortalidad acumulada en larvas de tercer estadio de *S. exigua* tratadas con el SeMNPV a través de la técnica de la ingestión de la gota. Los aislamientos evaluados fueron: SPX, Sinaloa 2006 (SIN6), Sinaloa 2008 (SIN8) y San Luis Potosí 2006 (SLP6).

6.6. Actividad biológica de azadiractina

Las larvas de tercer estadio de *S. exigua* fueron altamente susceptibles a azadiractina, cuando este insecticida se aplicó sobre la superficie de la dieta en un rango de 0.025 y 50 mg i.a./L. La mortalidad larvaria acumulada fue positivamente proporcional a las dosis aplicadas, con excepción de las concentraciones de 0.1 mg i.a./L (Figura 15), cuyo valor estuvo por encima de la concentración que le antecedió. Aunque el 50% de la mortalidad larvaria se logró obtener a las 144 h posteriores al tratamiento (hpt); el ajuste del modelo probit se logró obtener 12 h después (156 hpt) (Cuadro 11). En este tiempo, el valor de la CL_{50} (8.9 mg i.a./L) no fue significativamente diferente comparado con los valores calculados a las 168, 180, 192 y 204 hpt con base a los límites de confianza a 95% (Cuadro 11). El valor de la CL_{50} para las 236 hpt (3.25 mg i.a./L) sí fue significativamente menor con respecto a las 156 y 168 hpt (Cuadro 11).

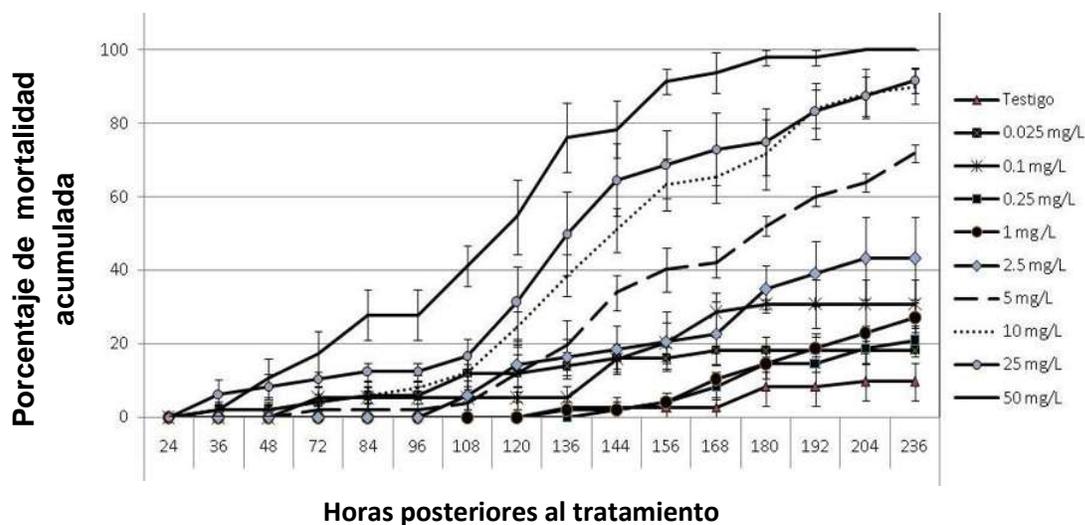


Figura 15. Porcentaje de mortalidad acumulada en larvas de tercer estadio de *S. exigua* causada por azadiractina a diferentes tiempos después de la aplicación.

Cuadro 11. Mortalidad de larvas de tercer estadio de *S. exigua* después de la aplicación de azadiractina a través de la técnica de contaminación por superficie de dieta (seis días de exposición).

Tiempo ^a	b ± EE	a	CL ₅₀ ^b (95% LC)	χ ²	gl
144	1.28±0.33	-1.44±0.33	13.30 (-----)	8.16	4
156	1.67±0.19	-1.58±0.20	8.88 (5.60-13.93)	5.61	4
168	1.64±0.21	-1.47±0.23	7.93 (5.29-15.19)	3.77	5
180	1.60±0.20	-1.24±0.21	5.99 (3.05-10.07)	6.41	4
192	1.64±0.21	-0.4±0.21	4.29 (2.35-6.53)	6.29	5
204	1.72±0.21	-1.00±0.21	3.84 (1.72-6.73)	7.30	4
236	1.89±0.27	-0.97±0.24	3.25 (1.63-4.93)	8.79	6

^aHoras posteriores a la aplicación de la azadiractina.

^bCL₅₀ expresada en mg i.a./L.

7. DISCUSION

Los baculovirus y la AZA son dos importantes insecticidas biorracionales actualmente utilizados en diferentes países contra varias especies de insectos plaga (Adel y Shenhal 2000; Szewczyk *et al.*, 2006, Posee *et al.*, 2010). El SeMNPV ha sido aislado en diferentes regiones del mundo incluyendo Estados Unidos, Tailandia, Países Bajos, Taiwán, Japón y España (Caballero *et al.*, 2009). En el presente estudio se llevó a cabo la caracterización molecular e insecticida de un grupo de NPV obtenidos de larvas de *S. exigua* colectadas en dos zonas agrícolas de México. Dicha caracterización se realizó mediante una combinación de las siguientes tres técnicas: PCR, PCR-RFLP y secuenciación de fragmentos específicos del genoma. En general, estas técnicas han sido exitosamente utilizadas para diferenciar aislamientos de baculovirus originarios de distintas zonas geográficas, aislamientos dentro de una sola localidad y aislamientos dentro de un solo hospedero (Garcia-Maruniak *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002; Murillo *et al.*, 2006; N'Guessan *et al.*, 2009; Barrera *et al.*, 2011; Simón *et al.*, 2011; Harrison *et al.*, 2012). Además, con el uso de la PCR-RFLP se puede lograr una diferenciación rápida y precisa de los diferentes genotipos, o la detección de posibles cambios que éstos puedan experimentar durante su replicación (Caballero *et al.*, 2009).

Los resultados del presente estudio mostraron que los aislamientos que se obtuvieron de las larvas de *S. exigua* pertenecen al SeMNPV, lo cual se determinó mediante el uso de cebadores específicos para esta especie de virus de los genes *lef-8* y *polh* y de dos regiones homólogas (*hr3* y *hr5*). Mediante la secuenciación de los productos obtenidos por PCR de fragmentos de los genes *lef-8* (subunidad de la ARN pol viral) y *polh* (proteína del poliedro) se encontraron pequeñas variaciones genéticas o polimorfismo simple de nucleótidos (SNP). Estas mínimas diferencias encontradas posiblemente se atribuyen a que los genes utilizados son altamente conservados dentro de su genoma (Lange *et al.*, 2004, Harrison *et al.*, 2011; Jehle *et al.*, 2006; Nahi *et al.*, 2009) y que mayoritariamente son genes utilizados para diferenciar especies de baculovirus (Lange *et al.*, 2004).

En contraste, las *hr* son loci menos conservados y por lo tanto pueden ser usados para conocer la variabilidad genética de los NPVs (Muñoz *et al.*, 1998; Hayakawa *et al.*, 2000 y Li *et al.*, 2002). En el presente estudio, la clonación de las secuencias para las *hr3* y *hr5* permitieron observar algunas diferencias dentro de las regiones palindrómicas. Para el caso de

la *hr5*, no se logró obtener la secuenciación de los productos amplificados; sin embargo, un resultado interesante para *hr3* se observó en las secuencias obtenidas en el aislamiento SLP6, en donde se observó una deleción de 80 pb al alinear las dos variantes genóticas (1SLP6 y 2SLP6). En un estudio similar, Murillo *et al.* (2006) observaron mediante PCR- RFLP que una región homóloga (*hr1*) mostró una gran variabilidad genética entre algunos de los seis aislamientos del SeMNPV colectados de muestras de suelos en el sureste de España. En general, dicha variabilidad se observó a nivel de la posición de los nucleótidos (10 pb), pequeñas deleciones (20 pb), palíndromos adicionales y desajustes en ciertas posiciones de los nucleótidos que provocaron pérdidas de sitios de restricción (*ClaI*). En tal estudio, la digestión de los fragmentos amplificados por PCR también se realizó con *BglIII*, puesto que los palíndromos imperfectos en las *hrs* de SeMNPV presentan sitios de corte para esta enzima. Así mismo, cuatro genotipos purificados de un aislamiento español del SeMNPV se distinguieron en el número de repeticiones que formaron parte de la *hr1* (Muñoz *et al.*, 1999).

Las *hrs* están implicadas en importantes funciones tales como orígenes de replicación de ADN y potenciadores, conocidos también como *enhancers* de la transcripción (Pearson y Rohrmann, 1999; Lin *et al.*, 2010). Debido a ello, los cambios observados en estas regiones podrían jugar un papel importante al conferir variabilidad dentro de su genoma, lo cual a su vez podría implicar interesantes mecanismos evolutivos dentro de las poblaciones de los baculovirus (com. Pers. Marcelo Berreta). La existencia de alteraciones genómicas del SeMNPV también ha quedado demostrada por la presencia de las variantes genóticas detectadas por análisis de restricción enzimática (REN). Al respecto, Murillo *et al.* (2007) identificaron mediante la enzima *BglIII* la existencia de al menos nueve variantes distintas del SeMNPV colectados de muestras de suelo en el suroeste de Almería. En este caso el pH del suelo fue el factor que influyó de un modo más importante en la composición genotípica de la población viral. Aislamientos del SeMNPV procedentes de Japón y Tailandia también mostraron perfiles de restricción con signos de deleción de genotipos, caracterizados por fragmentos submolares de *PstI-C* y *PstI-D* (Hara *et al.*, 1995; Serrano *et al.*, 2012). En general, los altos niveles de heterogeneidad genotípica de los NPVs puede ser el resultado de la recombinación entre diferentes genotipos mientras co-infectan una sola célula o de alteraciones durante la replicación viral. Al respecto, varios autores señalan que al coexistir

mezclas genotípicas de una misma especie, las variantes que presentan deleciones pueden tener una ventaja al momento de su replicación debido a que su genoma es más corto y al usar productos de los genes de genotipos completos, logran su correcta transmisión, comportamiento que denominaron trascomplementación (Frank, 2000, Simón *et al.*, 2004, López-Ferber *et al.*, 2003).

Otra importante ventaja de la heterogeneidad genotípica de los NPVs es su relación con los cambios en el fenotipo del virus. Por ejemplo, Caballero *et al.* (1992) compararon la patogenicidad de cuatro aislamientos del SeMNPV procedentes de Tailandia, California y España, en donde se determinó que el aislamiento originario de España fue ≈ 4 veces más infectivo. Muñoz *et al.* (1999) observaron diferencias significativas en la patogenicidad de cuatro variantes presentes en un aislamiento de campo designado como SP2. En el presente estudio, el virus que presentó las variantes genotípicas (SLP6) resultó ser el más patogénico comparado con los virus procedentes de Sinaloa y el SPX, lo que sugiere que este aislamiento podría ser un patógeno potencial para el control de *S. exigua* en México. Sin embargo, para complementar este interesante resultado es necesario conocer otros factores que pueden estar relacionados con la variabilidad genética (ej., velocidad de acción y la producción de OBs por larva) y que pueden influir fuertemente en la interacción virus-huésped (Murillo *et al.*, 2006, Caballero *et al.*, 2009).

Los valores de las DL_{50} calculados para los aislamientos colectados en México y SPX son mayores que el valor obtenido por Murillo *et al.* (2003) (52 OBs/larva), quienes evaluaron a un aislamiento silvestre del SeMNPV procedente de Florida, E.U.A, mediante el mismo método de inoculación en larvas de tercer estadio de *S. exigua*. Así mismo, los valores de las DL_{50} obtenidos por Lassa *et al.* (2007) (7.8 OBs/larva) y Serrano *et al.* (2012) (4.32 OBs/larva) para un aislamiento silvestre de Almería, España y el SeUS2, respectivamente, fueron drásticamente menores comparado con los resultados del presente estudio, aunque en dichos estudios los virus se evaluaron en larvas de segundo estadio de *S. exigua*. Es importante señalar que además de las posibles diferencias en las características genéticas y fenotípicas de estos virus, las distintas poblaciones del huésped, colectadas en distintas regiones, también difieren con frecuencia en su susceptibilidad al virus, (Fuxa, 2004). Un estudio reciente mostró que aislamientos del SfmNPV procedentes de Colombia y Nicaragua presentaron similares

valores de la CL_{50} cuando se evaluaron con huéspedes de una colonia de México; sin embargo, cuando el virus colombiano se evaluó con insectos de una colonia procedente del mismo país fue más patogénico que el aislamiento de Nicaragua (Barrera *et al.*, 2011).

Aunque a la fecha se sigue investigando la naturaleza y las consecuencias de la interacciones entre los diferentes genotipos (Simón *et al.*, 2005b, 2006, Serrano *et al.*, 2012) en términos de la patogenicidad, virulencia y transmisibilidad del SeMNPV, es claro que la diversidad e interacción entre éstos representa una importante contribución al conocimiento de la biología y ecología de los baculovirus (Muñoz y Caballero, 2001). En general, los resultados de la caracterización molecular del presente estudio son relevantes, ya que es la primera exploración que se realiza sobre estos aislamientos y que podrían considerarse como una alternativa para el control del gusano soldado en México. Para complementar dicha caracterización es necesario incrementar el número de muestras analizadas, complementar la clonación de la *hr5*, explorar otras regiones homólogas (*hr1*) implicadas mayormente en la diversidad en poblaciones de NPVs (Serrano *et al.*, 2012), explorar genes menos conservados (ejm., *ac86*) (Harrison *et al.*, 2012) y realizar un análisis de los perfiles de restricción en grupos de larvas muertas por los virus.

Respecto al efecto causado por la AZA en *S. exigua*, se observó que los valores de las CL_{50} para larvas de tercer instar estuvieron comprendidos un rango de 9 a 3.2 mg L⁻¹ entre las 156 y 236 hpt, respectivamente. Estos valores son menores a los observados por Zamora *et al.* (2008) (63.5 mg L⁻¹, 120 hpt) y Zamora *et al.* (2013) (17 mg L⁻¹, 216 hpt), quienes evaluaron el efecto de la azadiractina en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* mediante el mismo método de contaminación. Asimismo, Adel y Sehnal (2000) determinaron que para matar el 58% de la población de larvas de segundo estadio *S. litoralis* se necesitó aplicar una dosis de 100 mg L⁻¹. Lo anterior puede indicar que el efecto de la azadiractina es variable entre especies; sin embargo, otros factores inherentes que pueden influir en la respuesta del insecto hacia el tóxico, son el estado de desarrollo, los periodos de exposición y la técnica de bioensayo (Schmutterer, 1995). En otros estudios se determinó que el último estadio larval de *S. exigua* fue altamente susceptible a la AZA ($LC_{50} = 7.7$ mg L⁻¹) cuando el tóxico también se aplicó sobre dieta semisintética (Viñuela *et al.*, 2000). Similar a nuestro estudio (datos no mostrados), las larvas mostraron una clara inhibición en su desarrollo, presumiblemente

debido al potente efecto anti-alimenticio y a que AZA interfiere en la quimio-recepción y causa daño en los tejidos de los insectos tales como músculo, cuerpo graso e intestino (Capinera y Froeba 2007).

La mortalidad de *S. exigua* se incrementó positivamente a través del tiempo, lo cual puede ser esperado debido a que periodos extendidos de consumo de la AZA, pueden incrementar los niveles de mortalidad larvaria como consecuencia de su alta estabilidad metabólica en los tejidos del insecto (Schmutterer 1990). Aunque en el presente estudio no se evaluó el efecto de AZA sobre el desarrollo y la reproducción, se conoce que este compuesto puede provocar una disminución del peso, inducir malformación de inmaduros e imagos y/o reducir la fecundidad y la fertilidad de *S. exigua* por encima del 70% (Viñuela et al. 2000). Por todo lo anterior, se reconoce que AZA es un compuesto que ha adquirido relevancia como alternativa para el control de diferentes plagas, incluyendo *S. exigua* (Andreu et al., 2000; Adel y Sehnal 2000; Iannacone y Lamas, 2000; Martinez y Emden 2001). Un paso siguiente al presente estudio es evaluar la posible relación sinérgica entre los aislamientos del SeMNPV colectados en México y la AZA (Zamora et al., 2013), relación que ha sido explorada en otras especies y que podría mejorar substancialmente las formulaciones de los baculovirus.

8. CONCLUSIONES

- Los cuatro aislamientos colectados en Sinaloa y San Luís Potosí corresponden al SeMNPV.
- La amplificación de los genes conservados *polh* y *lef-8* mostraron pocas diferencias nucleotídicas, lo cual posiblemente indica que estos genes no son adecuados para observar la variabilidad genética entre los aislamientos del SeMNPV.
- Los aislamientos del SeMNPV colectados en México fueron diferentes al aislamiento procedente del producto comercial Spod-X® y al patrón obtenido del GenBank (SeMNPV_GB). Lo anterior indican que estos aislamientos son autóctonos de las poblaciones de *S. exigua* que infestan habitualmente los cultivos hortícolas de Sinaloa y San Luis Potosí.
- Las larvas de *S. exigua* fueron susceptibles a los aislamientos del SeMNPV especialmente al aislamiento que mostró una delección en las secuencias analizadas para *hr3* (SLP6).
- El alto potencial insecticida que mostró azadiractina confirma que este compuesto es un valioso componente para el manejo de *S. exigua*.

9. BIBLIOGRAFIA

- Adel, M. M. y F. Sehnal. 2000. Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid 356 agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology* (46): 267-274.
- 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.
- Avilés, G. M. C. 2004. Efectividad biológica de la feromona Checkmate Baw-F para el control del “Gusano soldado” *Spodoptera exigua* (Hübner), en el cultivo de tomate. En: Morales, M. A., G. M. Ibarra., R. G. A. Del Pilar y C. S. Stanford (eds.). *Entomología Mexicana. Sociedad Mexicana de Entomología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México* (3): 590-594.
- Barrera, G., O. Simón., L. Villamizar., T. Williams y P. Caballero. 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control* (58): 113-120.
- Bahena, F. 2002. El nim (*Azadiracta indica* A. Juss) (Meliaceae), insecticida vegetal para una agricultura sustentable en México. En: Agron G., J. López., M Tornero. (Eds.). *Método para la generación de tecnología agrícola de punta. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.* 105-123 pp.
- Belda, J. E., E. Mirasol, 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): 619-628.
- Beutelspacher, C. R. y M. A. Balcázar. 1999. Lepidoptera. En: Deloya, A. C. L. y G. J. E. Valenzuela (Eds.). *Catálogo de insectos y ácaros plaga de los cultivos agrícolas en México. Sociedad Mexicana de Entomología. Publicaciones Especiales* (1): 174.
- Bhandari, K., P. Sood, P. K. Mehta, A. Choudhary y C. S. Prahakar. 2009. Effect of botanical extracts on the biological activity of granulosis virus against *Pieris brassicae*. *Phytoparasitica* (37): 317-322.

- Blissard, G. W. y G. F. Rohrmann. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* (35): 286-605.
- Brewer, M. J., J. T. Trumble, B. Alvarado-Rodríguez y W. E. Chaney. 1990. Beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) adult and larval susceptibility to three insecticides in managed and relationship to laboratory selection for resistance. *Journal of Economic Entomology* (83): 2136-2146.
- Broer, R. J. G., M. Heldens, E. A. van Strien, D. Zuidema y J. M. Vlak. 1998. Specificity of multiple homologous genomic regions in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus DNA replication. *Journal of General Virology* (79):1563–1572.
- CAB International. 2000. Crop protection compendium CD. Global Module 2nd Edition. CAB Internacional, Wallingford, Reino Unido.
- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Alvarez y J. M. Vlak. 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology* (2): 145–157.
- Caballero, P., M. F. López y T. Williams. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma. S. A., Valencia, España.
- Caballero, P. y T. Williams. 2008. Virus entomopatógenos. En: Control biológico de plagas agrícolas, (Eds. J. A. Jacas y A. Urbaneja), Fascículo número 04, Phytoma, España, noviembre - diciembre de 2008. 121-136 pp.
- Caballero, P., R. Murillo, D. Muñoz y T. Williams. 2009. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: un análisis de avances recientes en España. *Revista Colombiana de Entomología* 35 (2): 105-115.
- Cabodevilla, O., I. Ibañez, O. Simón, R. Murillo, P. Caballer y T. Williams. 2011. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* (569): 84–192.
- Capinera, J. L. y J. G. Froeba. 2007. Behavioral response of *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae) to azadirachtin (neem)-treated host plants. *Journal Economic Entomology* (100): 117–122.
- 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 M. Vlak.

1999. Identification, sequence analysis and phylogeny of the *lef-2* gene of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid baculovirus. *Virus* (65): 21–32.
- Chen, X., J. W. Zhang., G. Wong., A. Chun., B.F. Lu., J. K. McCutchen., R. Presnail., M. Hrramann., S. Dolan., S. Tingey., Z. H. Hu y J. M. Vlack. 2002. Comparative analysis of the complete genome sequence of *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *Journal Genetic Virology* (83): 929-943.
- Cherry, A. y T. Williams. 2001. Control de insectos plaga mediante los baculovirus, En: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Caballero, P., López-Ferber, M. y Williams, T. (eds.). Phytoma S.A. Valencia, España. 389 – 450 pp.
- Cook, S., S. Cook, R. Webb y K. Thorpe. 1996. Potential enhancement of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus with triterpen azadirachtin. *Environmental Entomology* (25): 1209-1214.
- Cory, J. S., R. S. Hail y S. M. Sait. 1997. Baculovirus ecology. In the baculoviruses, L. K. Miller, (Eds.). New York: Plenum Press. 301-339 pp.
- 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 the techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Springer. 149-174 pp.
- Cory, J. S. 2010. *Insect Virology*. Caster Academic Press. Norfolk, UK. 419 p.
- Daimon T., S. Katsuma, W. K.Kang y T.Shimada. 2007. Functional characterization of chitinase from *Cydia pomonella* granulovirus. *Archives Virology* (152): 1655–1664.
- De Oliveria, M. R. 1998. World Survey: South America. En: F. R. Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans y N. E. Crook (eds.). *Insect viruses and pest management*. Wiley, Chichester, Reino Unido. 239-235 pp.
- Engelhard, E. K., L. N. W. Kam-Morgan, J. O. Washburn y L. E. Volkamn. 1994. The insect traqueal 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): 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. 61-88 pp.
- Finney, L. 1972. Probit analysis. Cambridge University Press, London/New York.
- Frank, S. A. 2000. Within-host spatial dynamics of viruses and defective interfering particles. *Journal of Theoretical Biology* (206): 279-290.
- Fuxa, J. R. 2004. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. *Agronomic Ecosystem Environmental* (103): 27-43.
- 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):60-70.
- García-Canedo, A., H. O. Pavan y J. E. Maruniak. 1996. A variable region of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences. *Virus Research* (41): 123-132.
- García-Maruniak, A., O. H. Pavan y J. E. Maruniak. 1996. A variable region of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences. *Virus Residente* (41)123-132.
- Gastélum, R. 2004. Gusano soldado en tomate y chile. En: Memoria Manejo de Plagas en Cultivo de Tomate, Chile y Pepino. Fundación PRODUCE Sinaloa y Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, México. 175-179.
- Granados, R. R. y K. A. Lawler. 1981. In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology* (108): 297-308.
- Granados, R. R. y K. A. Williams. 1986. In vivo infection and replication of baculoviruses, pp. 89-127. En: Granados, R. R.; Federici, B. A. (eds.). The biology of baculoviruses. Volumen I. CRC Press, Boca Raton, Florida. 275 p.
- Gryzwacz, D. 2005. Entomopathogenic baculoviruses for control of the African armyworm, *Spodoptera exempta*, in Tanzania. http://www.reserchintouse.com/nrk/RIUinfo/outputs/R6746_FTR.pdf. (Accesada en Agosto, 2012).
- Hara K., M. Funakoshi y T. Kawarabata. 1995. *In vivo* and *in vitro* characterization

- of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Acta Virologica* (39):215–222.
- Harrison, L. R., J. R. H. Popham, E. J. Breitenbach y L. D. Rowley. 2012. Genetic variation and virulence of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus and *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* (110): 33–47.
- Hayakawa, T., G. F. Rohrmann y Y. Hashimoto. 2000. Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses. *Virology* (278): 1-12.
- Hewson, I., M. J. Brown, A. S. Gitlin y D. F. Doud. 2011. Nucleopolyhedrovirus detection and distribution in terrestrial, freshwater, and marine habitats of appledore island, gulf of maine. *Microbiology Ecology* (62):48–57.
- Hughes, P. R. y H. A. Wood. 1981. A asynchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal on Invertebrate Patology* (37): 154-159.
- Hunter-Fujita, F. R., P. F. Entwistle, H. F. Evans y N. E. Crook. 1998. Insect viruses and pest management. Wiley, Chichester, Reino Unido.
- Iannacone. J. y G. Lamas. 2003. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica* 18(2): 95-105.
- 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): 3289-3304.
- ICTV. 2009. The universal virus database of the international committee on taxonomy of viruses. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1> (Accesada en Agosto del 2011).
- Isman, M. B. 1999. Neem and related natural products. En: Hall, F. R. y J. J. Menn. (eds.). *Biopesticides use and delivery*. Humana Press. New Jersey. 139-153 pp.
- 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. 285-360 pp.

- 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 Vlask, J. M. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of Virology* (151): 1257-1266.
- Kraus, W., M. Bokel, A. Bruhn, R. Cramer, I. Klaiber, A. Klenk, G. Nagl, H. Pohnl, H. Sadlo y B. Vogler. 1987. Structure determination by NMR of azadirachtin and related compounds from *Azadirachta indica* (Meliaceae). *Tetrahedron* (43): 2813-2830.
- Kukan, B. 1999. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *Journal of Invertebrate Pathology* (74): 103-111.
- Lange, M., W. Z. H Hualin y A. J. Jehle. 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. *Virology* (325): 36-47.
- Lasa, R., P. Caballero y T. Williams. 2007a. Juvenil hormone analogs greatly increase the production of a nucleopolyhedrosis. *Biological Control* (41): 389-396.
- Lee, H. y L. K. Miller. 1978. Isolation of genotypic variants of *Autographa caifornica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal virology* (27): 754-767.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC a user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, California.
- 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* (44): 747-751.
- Lin, X., Y.Chen, y Z. Z. Yi. 2010. Baculovirus immediately early 1, a mediator for homologous regions enhancer function in trans. *Virology* (7): 32.
- López-Ferber, M., O. Simón, T. Williams y P. Caballero. 2000. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings the Royal Society B, Biological sciences* (270): 2249-2255.
- Martínez, S. S. y H. F. Emden. 2001. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) caused by azadirachtin. *Neotropical Entomolgy* (30): 113-125.
- Majima, K., R. Kobara y S. Maeda. 1993. Divergence and evolution of homologous regions of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* (67): 7513-7521.

- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* (44): 257-289.
- 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): 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., Murillo, R., Krell, P. J., Vlak, J. M., Caballero, P. 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeSP2) are distinguishable by a hypervariable genomic región. *Virus Research* (59): 61-74.
- Muñoz, D., P. Caballero. 2001. Diversidad natural de los baculovirus, En: P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams. (eds.). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma-España, Valencia, España. 518 p.
- Murillo, R., D. Muñoz y P. Caballero. 2003a. 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): 147-153.
- Murillo, R., R. Lasa, D. Goulson, T. Williams, D. Moños y P. Caballero. 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 (6): 1668-1674.
- 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. 52 p.
- 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): 157-165.

- Murillo, R., D. Muñoz., C. Ruíz-Portero., M. D. Alcázar., J. E. Belda., T. Williams y P. Caballero. 2007. Abundance and genetic structure of nucleopolyhedrovirus populations in greenhouse substrate reservoirs. *Biological Control* (142): 216–225.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo y D. M. Summers. 1995. En: Sixth Report of International Committee on Taxonomy of viruses. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.* Springer-Verlag, Viena, Austria. 194-113 pp.
- N'Guessan, K. L., K. Tsuda., Ch. Goto., S. Mukawa., Y. Sakamaki y M. Nakamura. 2009. Biological activity and identification of nucleopolyhedroviruses isolated from *Mythimna separate* and *Spodoptera litura* in Japan. *Biological Control* (54):537–548.
- Numerical Algorithms Group. 1993. The GLIM system: release 4 manual. B. Francis, M. Green y C. Payne (eds.). Clarendon Press, Oxford, Reino Unido.
- 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.
- Osorio A., A. M. Martínez, M. I. Schneider, O. Díaz, J. L. Corrales, M. C. Avilés, G. Smaghe y S. Pineda. 2008. Monitoring of beet armyworm resistance to spinosad and methoxyfenozide in Mexico. *Pest Management Science* (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. 600 pp.
- Passarelli, A. L. 2011. Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology* (411): 383–392.
- 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): 213–221.
- 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): 156-165.
- Rodríguez-Enríquez, Ch. L., S. Pineda, J. I. Figueroa, M. I. Schneider y A. M. Martínez. 2010. Toxicity and sublethal effects of methoxyfenozide on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* (103): 662-667.
- Rowley, L. D., R. R. Farrar, B. M. Blackburn y L. R. Harrison. 2010. Genetic and biological variation among nucleopolyhedrovirus isolates from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Virus Genes* (40):458-468.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174). *Biochemistry* 74 (12): 5463-5467.
- 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.
- 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.
- Schmutterer, H. 1995. The Neem Tree: Sources of unique natural products for integrated pest management, and medicinal, industrial and other purposes. VCH, Weinheim, Germany. 691 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. 47-67 pp.
- Sayed, A. H., M. Naveed, M. Rafique y M. J. Arif. 2012. Detection of insecticides resistance in *spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) depends upon insect collection methods. *Pakistan Entomologist* 34(1): 7-15.

- Senthil, C., N. Sathiah y R. Rabindra. 2005. Optimizing the time of harvest of nucleopolyhedrovirus infected *Spodoptera litura* (Fabricius) larvae under *in vivo* production systems. *Current Science* 88(10): 1682-1683.
- Senthil, S. y K. Kalaivani. 2006. Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) on *Spodoptera litura* Frabicius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Biological Control* 39 (1): 96-104.
- Senthil, K. N., Murugan K. y W. Zhang. 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and azadirachtin. *Journal of Economic Entomology* (53): 69- 80.
- Senthil-Kumar, N., K. Murugan y W. Zhang. 2008. Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus and azadirachtin. *BioControl* (53): 869-880.
- Senthil-Nathan, S., K. Kalaivani y P.G. Chung. 2005. The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae). *Pesticides Biochemistry and Physiology* (83): 46-57.
- Serrano A., T. Williams, O. Simón, M. López-Ferber, P. Caballero y D. Muñoz. 2012. Analagous population structures for two alphabaculoviruses highlight a functional role for deletion mutants. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (4): 1118-1125.
- Simón, O., T. Williams., M. López Ferber y P. Caballero. 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* (70): 5579-5588.
- Simón, O., T. Williams, M. López-Ferber y P. caballero. 2005a. Gnetic structure of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* (70): 5579-5588.
- Simón, O., L. Palma., I. Beperet., D. Muñoz., M. López-Ferber., P. Caballero y T. Williams. 2012. Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus islotes: Detecting positively selected genes. *Journal of Invertebrate Pathology* (107): 33-42.
- Smaghe, G. y D. Degheele. 1998. Ecdysone agonists: mechanism and biological activity. En: Ishaaya, I. y D. Degheele (eds.). *Insecticides with novel modes of action. Mechanism and application*. Springer, Berlín, Germany. 25-39 pp.

- 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 Management Science* (59): 1203-1209.
- Schmutterer, H. 1990. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadiracta indica*. *Annual Review of Entomology* (35): 271-297.
- Schmutterer, H. 1995. The neem tree: Source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes. (ed.). VCH, Weinheim. 696p.
- Shapiro, M., L. J. Robertson y E. R. Webb. 1994. effect of neem seed extract upon the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and its nuclear polyhedrosis. *Journal Economic Entomology* 87(2): 356-360.
- Su, J., O. Lung y G. W. Blissard. 2011. The *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus lef-5 gene is required for productive infection. *Virology* (416) 54-64.
- Szewczyk, B., L. Hoyos-Carvajal, M. Paluszek, W. Skrzecz, y M. L. de Souza. 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances* (24): 143-160.
- Tanada, Y. y H. K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic Press. San Diego, California.
- Tanada, Y. y R. T. Hess. 1991. Baculoviridae. Granulosis viruses. En: Adams, J. R. y J. R. Bonami (eds.). *Atlas of invertebrate viruses*. Academic Press, San Diego. 227-257 pp.
- Van Laecke, K., G. Smagghe y D. Degheele. 1995. Detoxifying enzymes in greenhouse and laboratory strain of beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* (88): 777-781.
- Vargas L. J. A., G. S. Pineda, J. I. Figueroa y A. M. C. Matínez. 2010. Uso de un baculovirus con azadiractina para el control del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (j.e. smith) (lepidoptera: noctuidae) En el XXXIII Congreso. Cuba, del 10 al 12 de Noviembre de 2010. 373-376 pp.
- 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.

- 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): 409-419.
- Zamora, M. C., A. M. Martínez., M.S.Nieto., M.I. Schneider, J.I. Figueroa y S. Pineda. 2008. Actividad de algunos insecticidas biorracionales contra el gusano cogollero. *Revista Fitotecnia Mexicana* (31): 351-357.
- Zamora, A. N., J. A. Vargas., S. Pineda, J. I. Figueroa., P. Lobit y A. M. C. Martínez. 2013. Effects of a nucleopolyhedrovirus in mixtures with azadirachtin on *spodoptera frugiperda* (j. e. smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and viral occlusion body production. *Biocontrol Science and Technology* (En prensa).
- Zebtz, C. P. W. 1987. Potential of neem seed kernel extracts in mosquito control. Proc. 3rd International neem conference. Nairobi, Kenia. 555-573 pp.
- Zeddam J. L., A. Pollet, S. Manggoendiharjo, T. H. Ramaadhan y M. López- Ferber. 1999. Occurrence and virulence of a granulosis virus *Phthorimeae opercuella* (Lepidoptera: Gelechiidae) population in Indonesia. *Journal Invertebrate pathology* (74): 48-54.

Anexo I

Soluciones para el análisis de ácidos nucleídos mediante electroforesis en geles de agarosa

Buffer de corrida TBE 1X

Tris 100 mM

Ac.Bórico 90 mM

EDTA 1 mM

El TBE se prepara a partir de una solución concentrada 5 X: 54 g de Tris base; 27,5 g de ácido bórico y 20 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0.

A cada uno de los *buffers* se le adicionan 20 µl de la solución stock 20 mg/ml de bromuro de etidio.

Bromuro de etidio

Se prepara una solución concentrada hasta 20 mg / ml de bromuro de etidio en H₂O y se mantiene a temperatura ambiente protegiéndola de la luz. Esta solución se debe manejar con precaución extrema debido al alto poder mutagénico del BrEt.

Buffer T4

ADN ligasa 10X: 50 Mm Tris pH7.5,

10 Mm Cl₂Mg, 10 Mm DTT,

1 Mm, ATP, 25 µg/ml BSA.

Anexo II

Técnica de purificación de producto obtenido por PCR

Se utilizó en Kit QIAquick®PCR

- 1.- En cada muestra se agregaron 5 volúmenes de buffer PB por cada volumen de reacción de PCR y se mezclaron. Si el color de la mezcla se torna naranja o violeta, agregar 10 l de acetato de sodio al 3M, pH de 5.0, y mezclar. El color de la mezcla debería tornarse amarilla.
- 2.- Colocar una columna QIAquick en el tubo.
- 3.- Para obtener el ADN, poner la muestra en la columna QIAquick y centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto. Descartar el sobrenadante de la columna QIAquick y poner la misma columna en el tubo.
- 4.- Para lavar el producto de PCR 750 µl de buffer PE en la columna QIAquick, centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto, descartar el sobrenadante y regresar la columna QIAquick al mismo tubo eppendorf.
- 5.- Centrifugar la columna una vez más a 14 000 rpm/1 min para remover los residuos del buffer de lavado PE.
- 6.- Poner cada columna en un tubo eppendorf limpio de 1.5 ml.
- 7.- Para diluir en ADN, agregar 50 µl de Buffer EB (10 mM Tris.Cl, pH 8.5) o agua (pH 7.0 - 8.5) en el centro de la membrana QIAquick y centrifugar la columna por un minuto a 14 000. Para incrementar la concentración de ADN, agregar 30 µl del buffer de dilución EB en el centro de la membrana QIAquick, deja la columna parada por un minuto y después centrifuga.

Anexo III

QIA Spin Miniprep Kit: purificación de ADN plasmídico

- 1.- Obtener el pellet de los 2.5 ml de cultivo bacteriano. Poner 1.5 ml de cultivo e un tubo eppendorf y centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto, Obtener el pellet y adicionar al mismo el cultivo restante, centrifugar a velocidad máxima (14 000 rpm) por un minuto.
- 2.- Resuspender el pellet bacterial en 250 µl de baffle P1 y trasferir a un tubo eppendorf nuevo.
- 3.- Agregar 250 µl de buffer P2 y mezclar por inmersión de 4 a 6 veces.
- 4.- Centrifugar por 10 min. A 14 000 rpm.
- 5.- obtener el sobrenadante y depositarlo en una columna QIAprep por decantamiento o por pipeteo.
- 6.- Centrifugar un minuto a 14 000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- 7.- Realizar un lavado a la columna QIAprep agregando 750 µl de buffer PE y centrifugar por un minuto a 14 000 rpm.
- 8.- Descartar el sobrenadante y centrifugar por un minuto adicional para remover los residuos del buffer de lado.
- 9.- Diluir el ADN, poner la columna QIAprep en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Agregar 50 µl de agua estéril y centrifugar por un minuto a 14 000 rpm.