

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Aislamiento y Caracterización de Baculovirus Obtenidos de Muestra de Suelo
Agrícola

Por:

DOMINGO MÉNDEZ ÁLVAREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre de 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Aislamiento y Caracterización de Baculovirus Obtenidos de Muestra de Suelo
Agrícola

Por:

DOMINGO MÉNDEZ ÁLVAREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



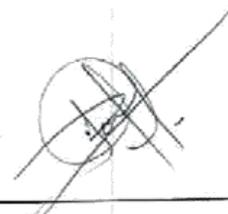
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor Principal



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador

Coasesor



Dr. Valentín Robledo Torres

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Noviembre de 2018



Agradecimientos

A la UAAAN por la gran oportunidad de estar entre sus filas, por permitirme forjar en el campo de la agronomía y además por el intercambio internacional.

A todos mis profesores que han influido en mi preparación académica y personal, de manera especial al cuerpo académico del departamento de Botánica.

Al MVZ. Cristóbal Hernández Jiménez por haberme alentado a seguir estudiando y por su peculiar forma de aconsejar.

A la Dra. Silvia Yudith Martínez Amador por haber sido mi tutora durante toda la carrera universitaria, por sus consejos y en gran parte por ayudarme a realizar el intercambio académico.

A mi asesor principal el Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez por compartir sus conocimientos, por la dedicación y la paciencia en la revisión del trabajo.

A mis compañeros de generación y amigos: Erick de León Ortiz, Isaí Granados López, Tomás Moreno Gómez, Fernando Elías Navarro Campos, Camilo Basurto Manera y Sahara Cristina Andrade Navarrete.

A las de servicio social que colaboraron en el mantenimiento del insecto, *Spodoptera exigua*, Xóchitl Gaspar Pablo, Amisadaí Catalina Vásquez López y Briseida Chávez Isidro.

A Erika López Serna por haberme orientado durante mi intercambio en la UNALMED.

A Gustavo Hernández Pérez y Estefani Nohemí Espejo Carrillo por haberme apoyado en todo momento y que han sido como una familia.

Dedicatoria

A mis padres: el Sr. Francisco Méndez Gutiérrez y la Sra. María Álvarez Gómez por haberme enseñado y brindado todo lo que estuvo en sus manos, por toda la educación y los valores que me enseñaron, que han hecho de mí la persona que soy.

A mi abuela la Sra. Petrona Hernández Gutiérrez que fue una persona de total admiración, por su arduo trabajo en criarme, que sin duda despertó en mí tratar de ser mejor una mejor persona.

A mis tíos: el Sr. Gerardo Álvarez Gómez, el Sr. Diego Méndez Gutiérrez y el Sr. Francisco Méndez Gutiérrez por haberme enseñado que la unidad familiar es posible, a mi primo el Sr. Diego Méndez López que siempre ha estado para motivarme y por preocuparse por mí.

Índice

Agradecimientos.....	i
Dedicatoria.....	ii
Índice.....	iii
Índice de cuadros.....	iv
Índice de figuras.....	v
1 Introducción.....	1
2 Justificación.....	3
3 Objetivos.....	3
3.1 Objetivo general.....	3
3.2 Objetivo específicos.....	3
4 Hipótesis.....	3
5 Revisión de literatura.....	4
5.1 Taxonomía de los baculovirus.....	4
5.2 Estructura de los Baculovirus.....	5
5.3 Ciclo biológico de baculovirus.....	6
5.4 Los baculovirus como bioinsecticidas.....	11
5.5 Gusano soldado (<i>S. exigua</i> (Hübner)).....	14
5.6 Caracterización con enzimas de restricción.....	16
6 Metodología.....	18
6.1 Ubicación del experimento.....	18
6.2 Cría de <i>S. exigua</i>	18
6.3 Infección de larvas con baculovirus de muestra de suelo.....	19
6.4 Aislamiento y amplificación de baculovirus.....	19
6.5 Bioensayo con larvas de <i>S. exigua</i>	20

6.6	Análisis estadístico.....	20
6.7	Protocolo de extracción de ADN viral.....	20
6.8	Digestión del ADN viral	21
6.9	Electroforesis del ADN viral digerido	22
7	Resultados.....	23
7.1	Actividad biológica.....	23
7.2	Evaluación de la concentración letal media (CL ₅₀).....	24
7.3	Evaluación del tiempo letal medio (TL ₅₀).....	25
7.4	Restricción con endonucleasas.....	26
8	Discusión	27
8.1	Aislamiento de baculovirus a partir de muestras de suelo	27
8.2	Bioensayos.....	29
8.2.1	Concentración letal media	29
8.2.2	Tiempo letal medio	29
8.2.3	Caracterización molecular del baculovirus aislado	30
9	Conclusiones	30
10	Bibliografía.....	31

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ejemplos de productos de baculovirus comercializados en América latina.	12
Cuadro 2. Mezcla para la restricción de ADN viral.....	21
Cuadro 3. Concentración letal media de AcMNPV y Vjal en larvas de segundo instar de <i>S. exigua</i>	24
Cuadro 4. Tiempo letal medio de AcMNPV y Vjal en larvas de segundo instar de <i>S. exigua</i>	25

Índice de figuras

Figura 1. Formas de CO del baculovirus..	6
Figura 2. Ciclo de las relaciones de Baculovirus con el insecto huésped.....	7
Figura 3. Mecanismo de infección primaria, representado por un MNPV.....	9
Figura 4. Mecanismo de infección secundaria por VB.....	10
Figura 5. Infección de <i>S. exigua</i> por nucleopoliedrovirus	11
Figura 6. Adulto de <i>S. exigua</i>	14
Figura 7. Huevecillos de <i>S. exigua</i>	15
Figura 8. Larvas de <i>S. exigua</i>	15
Figura 9. Pupa de <i>S. exigua</i>	16
Figura 10. Cuidado de <i>S. exigua</i>	19
Figura 11. Columna de extracción de ADN genómico.....	21
Figura 12. Electroforesis de la digestión de ADN de AcMNP y Vjal.	22
Figura 13. Síntomas observados en las larvas infectadas por baculovirus.	23
Figura 14. Cuerpos de oclusión observados a 100x.....	23
Figura 15. Concentración letal medio de AcMNPV (a) y Vjal (b).	24
Figura 16. Tiempo letal medio de AcMNPV (a) y Vjal (b).	25
Figura 17. Resultado de la restricción del ADN genómico viral.....	26
Figura 18. NPV reportados de <i>S. exigua</i>	28

1 Introducción

La agricultura tiene un impacto en el ámbito social, ambiental y económico ya que es una de las actividades esenciales para la producción de los alimentos (Dethier y Effenberger, 2012). En México se cuenta con diversos climas que permiten el aprovechamiento de una variedad extensa de cultivos (SAGARPA, 2016), uno de los problemas que se presenta durante la producción es el daño por plagas, en el caso de *S. exigua* un insecto plaga del orden lepidóptera, las larvas atacan principalmente a hortalizas consumiendo las hojas (masticador), los frutos y contaminando el cultivo, que se controla mediante el uso de insecticidas químicos (Barrientos-Gutiérrez, 2013; IRAC, 2018), sin embargo, la desventaja principal de estos productos es la presión de selección que ocasionan sobre la plaga debido al uso prolongado y frecuente, generan resistencia (IRAC, 2018). Frente a ello los agentes de control biológico se presentan como una alternativa de control dentro del manejo integrado de plagas, tal como los baculovirus de la familia Baculoviridae (Murillo *et al.*, 2003) de los que se tiene una fuerte evidencia de su especificidad en los artrópodos (Boughton *et al.*, 1999; Burges *et al.*, 1980; ICTV, 2018b; Ikeda *et al.*, 2015; Thiem y Cheng, 2009), fueron aislados por primera vez en el gusano de seda (*Bombix mori*) (Rohrmann, 2011), dicha familia está dividida en cuatro géneros siendo alfabaculovirus el género que ataca específicamente a lepidópteros (ICTV, 2018b; Jehle *et al.*, 2006).

Este virus genera cuerpos de oclusión mismos que debe ser ingerido por el insecto para desarrollar su patogenicidad causando síntomas como: fragilidad, palidez, flacidez y ruptura del tegumento, provocando la liberación de los cuerpos de oclusión al ambiente (Williams *et al.*, 2017).

La mayoría de los baculovirus aislados han sido a partir de larvas infectadas de *S. exigua* recolectados del campo, caracterizados como múltiple nucleopoliedrovirus y denominado como SeMNPV (Caballero *et al.*, 1992a; Caballero *et al.*, 1992b; Lasa *et al.*, 2007; Murillo *et al.*, 2001).

El suelo es el reservorio natural de baculovirus más abundante en el ambiente (Infante-Rodríguez *et al.*, 2016) por lo que se puede aislar baculovirus.

El aislamiento de cepas de baculovirus aporta datos sobre su actividad entomopatogénica que es de especial importancia para el desarrollo de

bioinsecticidas. Por ello el objetivo de este trabajo es aislar baculovirus contra *S. exigua* a partir del suelo y evaluar su actividad bioinsecticida.

Palabras clave: Aislamiento, *S. exigua*, Caracterización, Baculovirus, Control biológico.

2 Justificación

S. exigua es un insecto plaga polífaga que se presenta de manera cíclica dañando a cultivos como la alfalfa, brócoli, cebolla, cilantro, col, coliflor espinaca, tomate, lechuga, rábano y zanahoria. La forma más común de controlar esta plaga es el uso de insecticidas químicos, que puede generar resistencia. Por ello el desarrollo de agentes de control biológico contra *S. exigua* es de gran importancia para un adecuado manejo integrado de plagas. Los baculovirus se presentan como una alternativa de control biológico por la especificidad en el hospedero, que lo hace ecológicamente deseable, por esta razón es de interés el aislamiento de baculovirus a partir de *S. exigua*.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Aislar baculovirus del suelo mediante la infección en larvas de *S. exigua*.

3.2 Objetivo específicos

Infectar en larvas de *S. exigua* con dieta contaminada de suelo.

Extraer y amplificar los baculovirus de los cadáveres de larvas muertas

Caracterización toxicológica y molecular de los baculovirus obtenidos

4 Hipótesis

Se puede aislar cepas de baculovirus del suelo patogénicas a *S. exigua*.

5 Revisión de literatura

5.1 Taxonomía de los baculovirus

La familia *Baculoviridae* es la más numerosa y ampliamente estudiada de todos los grupos de virus patógenos de insectos. Afectan a más de 600 especies de insectos. Esta familia agrupa virus de ADN de doble cadena cuyos viriones están característicamente incluidos en una matriz proteínica llamado poliedro o cuerpo de oclusión (Berretta *et al.*, 2013; Caballero *et al.*, 2009). El nombre de baculovirus se debe a la forma de varilla de sus viriones, que se deriva del latín báculo – bastón (Rohrmann, 2011).

Los baculovirus comprenden dos tipos de virus: nucleopoliedrovirus (NPV) y granulovirus (GV) que se distinguen principalmente por la morfología de los cuerpos de oclusión (CO) (Ikeda *et al.*, 2015).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2018b; Jehle *et al.*, 2006), la familia *Baculoviridae*, no pertenece a ningún orden, se divide en cuatro géneros, *Alfabaculovirus* específico de lepidóptera cuenta con 40 especies de NPV, *Betabaculovirus* que únicamente infecta a lepidópteros con 25 especies reconocidas de GV, *Deltabaculovirus* cuenta con 1 especie de NPV específico para díptera y *Gammabaculovirus* documentan 2 especies de NPV que afecta solamente a himenóptera.

Tradicionalmente las especies de los baculovirus son nombrados a partir de las especies de donde fueron aislados por primera vez seguidos de NPV o GV, dependiendo de la morfología del virus (Ikeda *et al.*, 2015). Como en el caso de *Agrotis segetum* NPV (AgseNPV) que fue aislado de tres distintos lugares: Inglaterra, Francia y Polonia, que dos de estos aislados el de Inglaterra y Francia son el mismo virus (Allaway y Payne, 1983). Posteriormente el aislado de Polonia se nombró como AgseNPV-A (Jakubowska *et al.*, 2006) ya que fue el primero en ser secuenciado su genoma completo por lo que los aislados de Inglaterra y Francia se nombró como AgseNPV-B. También las larvas de *Agrotis segetum* son infectados por *Agrotis ípsilon* NPV (AgipNPV) que difieren de los dos baculovirus que infecta *Agrotis segetum* (ICTV, 2018a), sin embargo, AgipNPV también puede infectar *Heliothis virescens*,

Helicoverpa zea, *Pseudaletia unipuncta* y *Spodoptera frugiperda* (Boughton *et al.*, 1999). De acuerdo a esto, el hospedero puede ser infectado por varias especies de baculovirus, con la ayuda de estudios moleculares se determina la cercanía de estos virus por lo cual se le puede nombrar de la misma manera (AgseNPV-A y AgseNPV-B), de igual forma, los baculovirus aislados de la misma especie de hospedero pueden representar diferentes especies de baculovirus siendo el caso de AgipNPV.

5.2 Estructura de los Baculovirus

Los nucleopoliedrovirus (NPV) se caracterizan por la producción de CO al final del ciclo viral. Los CO están constituidos por una matriz proteica cristalina cuyo componente principal es la polihedrina, con un peso molecular entre 25-33 kDa (Muñoz *et al.*, 2000). Los CO que poseen forma poliédrica, pertenecientes al género *Alfabaculovirus*, *Gammabaculovirus*, *Deltabaculovirus* típicamente tienen un tamaño de 0.5 a 5 µm que contienen varios viriones derivados de oclusión (VDO) al interior de la estructura, mientras que el género *Betabaculovirus* es ovocilíndrico (granulovirus, GV) con un tamaño de aproximado de 0.3 x 0.5 µm que usualmente solo lleva un virion dentro, aunque raramente se ha observado con dos viriones. Los viriones protegen a una o varias nucleocapsides (NC) en forma de varilla de 30-60 nm de diámetro y 250-300 nm de largo envueltas dentro de una membrana. La NC contiene una molécula de ADN bicatenaria circular con un tamaño de 80-180 kilo pares de bases (kpb) (King *et al.*, 2011).

Morfológicamente existen dos subgrupos en los NPV (Figura 1): los nucleopoliedrovirus simples (SNPV), que cuentan con una NC por un virus derivado de oclusión (VDO) y los nucleopoliedrovirus múltiples (MNPV) los cuales pueden tener más de una NC por VDO (Ibarra *et al.*, 2006).

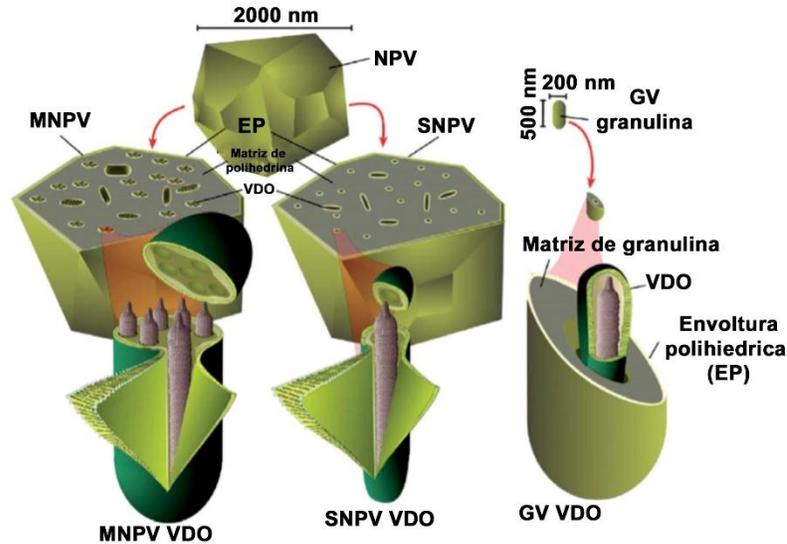


Figura 1. Formas de CO del baculovirus. Tomado de (Slack y Arif, 2006). Se muestran tres tipos de CO, la primera de un NPV, que a la vez se presentan en dos tipos: MNPV donde los VDO en su interior tienen varias NC o una NC, SNPV, los VDO solo protegen a una NC. La tercera un GV que resguarda un solo VDO con una NC.

5.3 Ciclo biológico de baculovirus

Los baculovirus poseen la capacidad de multiplicarse y dispersarse en el ambiente a través de individuos de la población (Figura 2). De los focos primarios de la enfermedad, resultan focos secundarios, así mismo, de una generación a otra, los patógenos pueden permanecer en el área, en el suelo, o en los cadáveres (Suárez-Gómez, 2012).

En la Figura 2 se ilustra la interacción del baculovirus en el ambiente, donde una vez que las larvas comen las hojas contaminadas por los CO, son infectadas llevándolos a la muerte y liberan los CO en la planta que puede ser transmitido de nuevo a un huésped susceptible (flechas rojas), estos CO son lavados por la lluvia al suelo, de igual manera puede ser transportado de regreso a la planta por factores bióticos y abióticos (flechas negras). Aquellas larvas que son infectadas pero que no mueren pueden llegar a emerger como adultos infectados silenciosamente (flecha azul), que a la vez también pueden migrar, antes de ovipositar, y de esta manera transmiten el virus a la siguiente generación, esta transmisión vertical puede permanecer varias

generaciones hasta que algún factor elicitor o de estrés (flecha naranja) pueda provocar la activación del virus retornando al ciclo de transmisión horizontal (flecha roja).

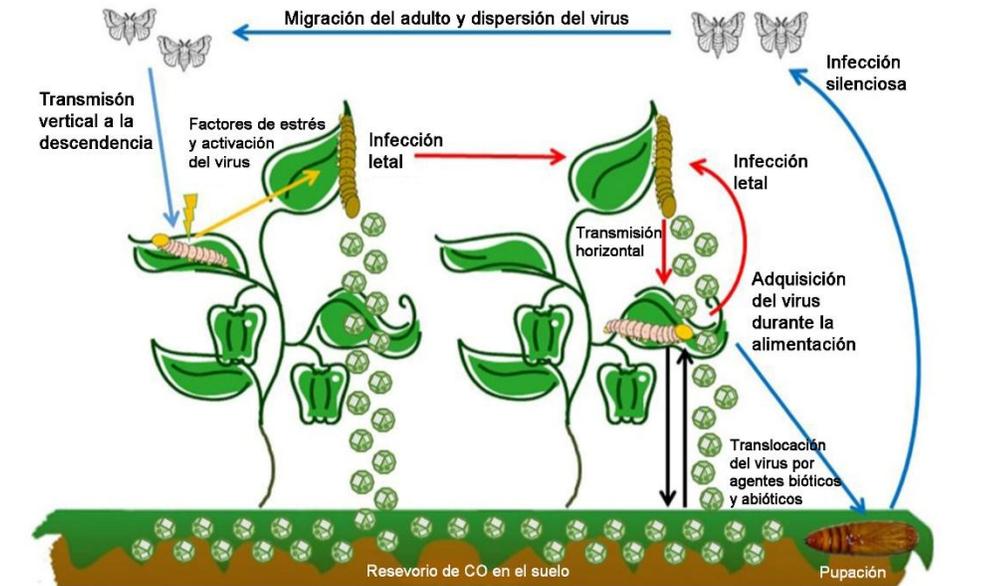


Figura 2. Ciclo de las relaciones de Baculovirus con el insecto huésped. Tomado de (Williams *et al.*, 2017).

La diseminación de manera natural de los CO en el medio ambiente, por transmisión horizontal sucede por la contaminación de la alimentación o los huevecillos del huésped, la transmisión vertical puede ocurrir cuando son infectadas las polillas, infectando a los huevecillos. Experimentalmente sucede por el contacto de huéspedes intactos con VB y por la infección o transfección de cultivos celulares (King *et al.*, 2011). Los baculovirus inciden en las poblaciones naturales de los insectos como un factor de mortalidad que contribuye a regular su densidad. El estado susceptible es la larva que es infectada al alimentarse de un sustrato vegetal contaminado con CO (Caballero *et al.*, 2009). De esta manera no afecta a la fauna benéfica, puesto que tienen que ser ingeridos para entrar en acción (Gaxiola-Castro, 2012).

La infección, transmisión y replicación de los baculovirus ocurre únicamente en la etapa larvaria de los insectos (Slack y Arif, 2006).

El ciclo infeccioso comúnmente implica dos fenotipos de viriones, a la cual se le denominan: infección primaria, en donde participa los VDO, e infección secundaria, en el cual sucede la producción de virus brotados (VB) responsables de la infección sistemática (Berretta *et al.*, 2013).

La infección primaria inicia cuando las larvas ingieren CO penetrando de esta manera en el cuerpo del hospedero, donde las partículas poliédricas son disueltas en el medio alcalino del intestino (pH 8-11), liberando los VDO (Caballero *et al.*, 2009) varias proteínas han sido identificados en la envoltura de los VDO, seis de estas proteínas son esenciales para la infección que incluye P74, PIF-1, PIF-2, PIF-3, AC96 (PIF-4) y E56 (PIF-5) (King *et al.*, 2011) que se fusionan a las microvellosidades de las células columnares del epitelio en el mesenterón, que resulta en la liberación de las NC dentro del citosol (Monique y Just, 2007), mediante la ayuda de los filamentos de actina son transportados al núcleo de la célula, donde es liberado el ADN viral para ser expresado, llevando a la síntesis de nuevas NC (Ohkawa *et al.*, 2002) y a la producción de la proteína del CO.

La infección primaria se detalla en la Figura 3, donde en el intestino medio de la larva el CO se disuelve en medio alcalino, provocando la liberación del VDO (1). Los VDO se mueven a través de la matriz peritrófica (amarilla) que recubre el epitelio del intestino medio (2). Los VDO se une a las microvellosidades de las células epiteliales columnares, y las NC entran mediante la fusión de la envoltura del VDO y la membrana citoplásmica de la microvellosidad (3). Las NC se mueven mediante la polimerización de la actina (línea roja) algunas se traslocan al núcleo (4). La NC libera el ADN y expresan los genes tempranos, incluidos los genes que codifican la glicoproteína de la envoltura principal del VB (GP64 o proteína F). Otras NC se traslocan al dominio basolateral de la célula y brotan a través de la membrana plasmática (5). Se forma los VB con las glicoproteínas expresadas a partir de la subpoblación de NC que ingresaron al núcleo de la célula (6).

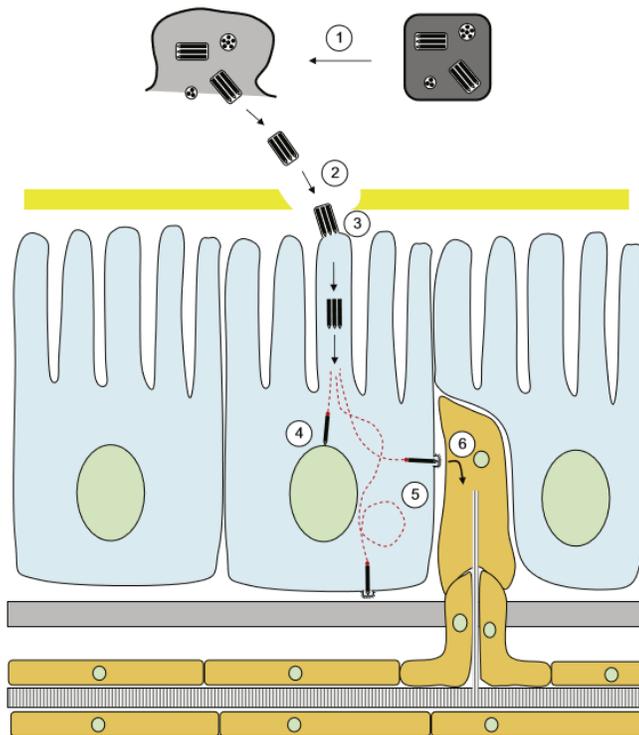


Figura 3. Mecanismo de infección primaria, representado por un MNPV. Tomado de (Harrison y Hoover, 2012).

Al llegar al final de la fase se empieza a producir un nuevo tipo de virus, que representa la infección secundaria, conocida como VB (Berretta *et al.*, 2013). Para ello se necesita de la expresión de la glucoproteína 64 (GP64), que se acumula en la membrana celular de las microvellosidades, que envuelve a la NC cuando brota fuera de la célula (punto número 6 en la Figura 3) y posteriormente, se ha sugerido, que la GP64 se une a la clatrina, dinamina, colesterol o entra por macropinocitosis en la membrana plasmática. Una vez que hacen contacto con la membrana celular, el VB es endocitado en una vesícula (endosoma) y durante el transporte se acidifica provocando la fusión del endosoma con la envoltura del VB, liberando la NC hacia núcleo de la célula, iniciando de esta manera la formación de nuevas partículas virales. La falta de especificidad de la GP64 en la unión a los receptores y la afinidad a la membrana plasmática puede explicar cómo es que los VB poseen la habilidad de infectar varios tipos celulares. En *S. exigua* la infección secundaria comienza en los traqueoblastos y otros tejidos como

el músculo del intestino medio y los hemocitos (Rohrmann, 2011). Permitiendo así la diseminación de la enfermedad en todo el cuerpo del insecto hospedero o la infección sistémica, tal y como se presenta en la Figura 4, el VB se une al receptor de la célula y es endocitado (1). El endosoma que contiene el VB se acidifica y libera la NC (2). La NC es traslocada mediante la ayuda de la polimerización de actina (línea roja) (3). Se libera el ADN en el núcleo, iniciando la expresión de genes tempranos, el núcleo crece y se forma el estroma virogénico (4). Las NC formadas salen del núcleo y brotan de la membrana plasmática convirtiéndose en VB (5). Posteriormente las NC son envueltas en la región peristromal para formar VDO (6). La polihedrina se cristaliza alrededor de los VDO para formar CO (7).

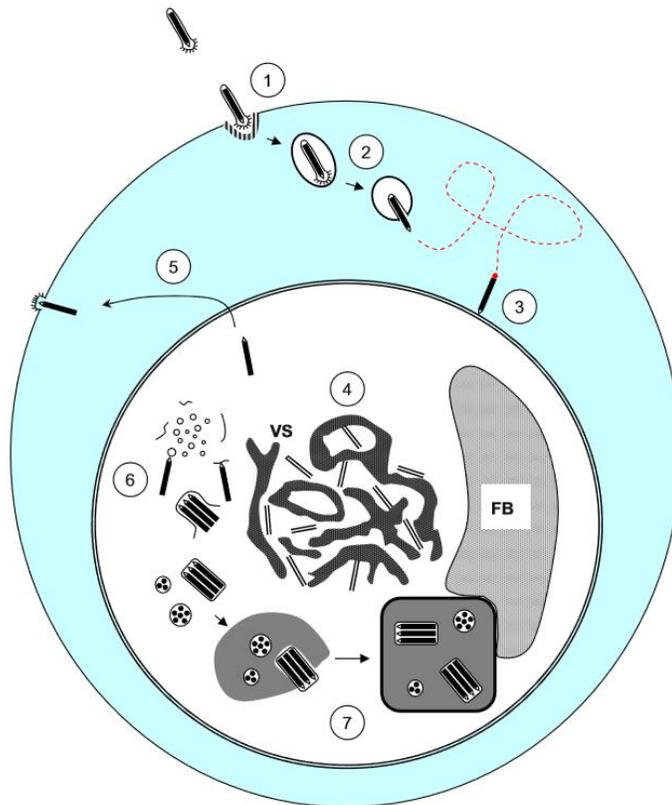


Figura 4. Mecanismo de infección secundaria por VB. Tomado de (Harrison y Hoover, 2012).

Cuando las larvas son infectadas por los baculovirus en su interior se producen millones de partículas de virales. Luego otras enzimas como la quitinasa y catepsina, causan la lisis del cadáver de la larva y esto provoca, que poco antes de la muerte, el tegumento de los insectos infectados se vuelva muy frágil, pálido, flácido y se rompa con facilidad, frecuentemente suben a las partes apicales de las ramas, y mueren colgados de sus pseudópatas en forma de V invertida (Figura 5), esparciendo de esta manera los CO en las hojas de las plantas (Bullock *et al.*, 2002; Williams, 2006).



Figura 5. Infección de *S. exigua* por nucleopoliedrovirus. Tomado de (Williams, 2006).

5.4 Los baculovirus como bioinsecticidas

Algunos NPV son específicos para un huésped, aunque un mismo tipo de baculovirus puede infectar a varios huéspedes dentro de los organismos de invertebrados, por ejemplo como el NPV de *Heliothis* que afecta a 7 especies del género *Heliothis*, se ha realizado varias pruebas de toxicidad en mamíferos, aves, roedores confirmando la ausencia de síntomas de infección por el virus (Burges *et al.*, 1980). Además, estos tipos de virus se encuentran de manera natural en el medio ambiente tanto NPV como GV, así que, los diversos organismos están en contacto con los baculovirus y hasta ahora no se tiene ningún registro de afectaciones en especies de vertebrados (véase ICTV, 2018).

Debido a esta razón se pueden utilizar como agentes de control biológico contra plagas, como principal ventaja la alta especificidad en los huéspedes.

Hay una gran cantidad de virus aislados a partir de la orden lepidóptera por lo que se presenta como una opción de control entomopatógeno, para su uso en campo se debe

de considerar la temperatura, siendo como óptima de 20 a 32°C (Cory y Bishop, 1997), otro factor que puede influir es la alcalinidad, ya que bajo estas condiciones se disuelven los CO, sin embargo, la presencia de la alcalinidad se da en suelos salinos por lo que su uso en la agricultura se ve limitado debido a la falta de nutrientes y disponibilidad de agua (Badia-Villas, 1992).

En Almería, España se experimentó con una cepa autóctona del virus de la poliedrosis nuclear de *S. exigua* (VPNSe-SP2), con un preparado comercial de dicho nucleopoliedrovirus con una cepa de Florida, EUA (SPOD-X®). Se aplicó en todos los estadios larvarios con un nivel de infestación muy alto (>15 larvas por planta). Teniendo una mortalidad a los 6 días de la aplicación (Escribano *et al.*, 2000).

En América Latina se han implementado controles de varias especies de baculovirus contra las plagas, donde se puede notar que en México se tiene registro de la utilización de *S. exigua* NPV (Cuadro 1).

Cuadro 1. Ejemplos de productos de baculovirus comercializados en América latina. (Haase *et al.*, 2015).

Virus	Huésped	Cultivos	Producto	País	Compañía productora
<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Soya	Baculo-soja, Baculovirus Nitral, Coopervirus SC, protégé, Multigen	Brazil	Nova Era Biotecnología Agrícola, Nitral Urbana, COODETEC, Milenia, EMBRAPA
<i>Autographa californica</i> MNPV + <i>Spodoptera albula</i> NPV	<i>Autographa californica</i> , <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Pseudoplusia includens</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>S. exigua</i> , <i>Estigmene acrea</i> , <i>Plutella xylostella</i>	Alfalfa, vegetales	VPN-ULTRA	Guatemala	Agricola El Sol

<i>Spodoptera sunia</i> NPV	<i>Spodoptera spp.</i>	Vegetales	VPN 82	Guatemala	Agricola El Sol
<i>Cydia pomonella</i> GV	<i>Cydia pomonella</i> , <i>Grapholita molesta</i>	Manzana, pera, nuez, durazno	Carpovirus Plus Madex Carpovirusine Madex Twin	Argentina Chile Uruguay	NPP-Arysta Life Science, Andermatt Biocontrol
<i>Erinnyis ello</i> GV	<i>Erinnyis ello</i>	Yuca (tapioca), arboles de caucho	Baculovirus erinnyis	Brazil Colombia	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. BioCaribe SA, CORPOICA
<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	<i>Heliothis</i> y <i>Helicoverpa</i> spp.	Maíz, tomate, algodón y tabaco	Gemstar, HzNPV CCAB	México Brazil	Certis USA, AgBiTech Australia
<i>Helicoverpa armigera</i> NPV	<i>Heliothis</i> y <i>Helicoverpa</i> spp.	Tomate, pimienta dulce, soya, tabaco y vegetales	Diplomata, Helicovex	Brazil	Koppert, Andermatt Biocontrol
<i>Phthorimaea operculella</i> GV	<i>Phthorimaea operculella</i> y <i>Tecia solanivora</i>	Papa	Baculovirus Corpoica, PTM baculovirus	Colombia, Perú, Costa Rica	CORPOICA, SENASA Peru e INTA Costa Rica
<i>Phthorimaea operculella</i> GV + <i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Phthorimaea operculella</i> <i>Tecia solanivora</i> <i>Symmetrische ma tangolias</i>	Papa	Matapol Plus, Bacu-Turin	Bolivia, Ecuador	PROINPA Foundation. INIAP, Ecuador
<i>S. exigua</i> NPV	<i>S. exigua</i>	Tomate, chile, berenjena	SPOD-X LC	México	Certis USA— SUMMIT AGRO México
<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Spodoptera frugiperda	Maíz, sorgo	-----	Brasil

5.5 Gusano soldado (*S. exigua* (Hübner))

En México, *S. exigua* se considera una plaga de importancia económica que se presenta de manera cíclica, afectando a gran cantidad de cultivos como la acelga, alfalfa, apio, betabel, brócoli, cebolla, cilantro, col, coliflor espinaca, flor de alhelí, pimienta, tomate, lechuga, rábano y zanahoria. Se ha reportado que esta especie es ahora una plaga inducida o secundaria debido al exceso de productos químicos utilizados para su control (Barrientos-Gutiérrez, 2013).

Se encuentra en zonas templadas y áreas tropicales, ocupa un hábitat que va desde los campos de cultivo, pastizales, hasta los bosques templados y tropicales (Hua, 2013).

El gusano soldado presenta cuatro fases de desarrollo conocidas como: huevo, larva, pupa y adulto (Garza-Urbina, 2007). En forma adulta es una polilla de unos 2,5 a 3 cm (Figura 6), de color marrón grisáceo, con dos manchas circulares características más claras, generalmente para esta etapa tiene una duración de 9-10 días (Aomidori, 2012; Azidah y Sofian-Azirun, 2006).



Figura 6. Adulto de *S. exigua*. Tomado de (IRAC, 2018).

Huevos. La hembra los deposita en el envés de las hojas en grupos de 50 a 150 huevos (Figura 7), y los recubre con pequeñas escamas blancas. Los huevos son blancos, con costillas radiales, y se tornan marrones durante la maduración. La producción normal por hembra es de 300 a 600 huevos (Aomidori, 2012; Capinera, 2014).



Figura 7. Huevecillos de *S. exigua*.

Larvas. Cuando eclosionan son de color variable, de verde brillante a purpúreo o de verde a negro, generalmente verde cuando están en fase solitaria. Presentan un reticulado blanquecino y presentan franjas oscuras en posición dorso lateral sumamente distintivas para la especie. Pasan, generalmente, por cinco estadios, estas se encuentran desprovistas de pelos durante toda esta etapa, con una duración de 11 a 27 días. Tienen 3 pares de patas torácicas y 5 pares de patas falsas en el abdomen (Figura 8). Cuando se la toca tiende a enrollarse circularmente. Cuando la larva alcanza su máximo desarrollo (30 a 40 mm), baja al suelo para pupar (Aomidori, 2012; Azidah y Sofian-Azirun, 2006; Barrientos-Gutiérrez, 2013; Mau, 2007).



Figura 8. Larvas de *S. exigua*.

Pupas. Casi al final del quinto instar las larvas reducen su longitud entrando al estadio de pupa. Construye un capullo terroso de color café brillante y mide aproximadamente de 15-20 mm de longitud de donde emergerá el adulto tras la metamorfosis (Figura 9). La duración de esta etapa es de 6-7 días en condiciones cálidas, pero también puede extenderse a 9-10 días (Azidah y Sofian-Azirun, 2006; CESAVEG, 2005).



Figura 9. Pupa de *S. exigua*.

El ciclo de vida depende de las condiciones tanto ambientales como de las especies hospederas, que se ve reflejado en el desarrollo del gusano soldado, en condiciones de temperatura de 20°C-35 °C en dieta artificial, se da un lento crecimiento a 20 °C con 37 días por generación mientras que a 35 °C el desarrollo completo por generación es de 13 días, sin embargo, cuando la temperatura es superior a esta, la especie tiene problemas de crecimiento, especialmente en la formación de la pupa, por lo que bajo esas condiciones no sobrevive. En cuanto a los cultivos hospederos en *Raphanus sativus L.*, *Allium fistulosum*, *Lactuca sativa* y *Lactuca Sativa L.*, a 27 °C muestra variaciones en el ciclo de vida siendo el más corto en *Lactuca Sativa L.* en 19 días y alimentándose de *Raphanus sativus L.*, *Allium fistulosum* casi 23 días (Dai *et al.*, 2017).

5.6 Caracterización con enzimas de restricción

Las arqueas y las bacterias han desarrollado mecanismos para protegerse a sí mismos de infecciones virales, mediante el uso de endonucleasas de restricción para degradar el ADN viral cuando es ingresado al interior de la célula. Estas enzimas reconocen secuencias específicas, llamadas sitios de reconocimiento o secuencias de reconocimiento, para evitar degradar su propio ADN producen metilasas que metilan las adeninas, es decir, por cada endonucleasa de restricción es producido una metilasa, en conjunto se le llama: sistema de modificación-restricción. La reacción de restricción está dada por la hidrólisis del enlace fosfodiéster, de manera detallada entre el átomo del oxígeno 3' y el átomo del fósforo, el producto de esta reacción da fragmentos con terminal 5' (Berg *et al.*, 2002; EMBL-EBI, 2018).

Las enzimas de restricción son nombradas de acuerdo a la taxonomía del organismo de donde es descubierto. La primera letra se refiere al género del organismo, la segunda y tercera a la especie. Si esta lleva letras es de la cepa y el número romano especifica si hay más enzimas aisladas del mismo organismo. Las enzimas de restricción tipo II son un conjunto de proteínas que, por definición, tienen la habilidad común de escindir en una posición fija la doble hélice de ADN, dentro o cercano, al sitio de reconocimiento. Los fragmentos generados de ADN son reproducibles y patrones predecibles en electroforesis, propiedades que hacen de estas enzimas indispensables en la manipulación e investigación del ADN (Pingoud *et al.*, 2014).

Una característica notable de las endonucleasas de restricción tipo II, son los sitios de corte ya que casi siempre poseen simetría rotacional binaria (secuencia palindrómica o repetición invertida) y además la mayoría utiliza como cofactor el magnesio (EMBL-EBI, 2018). Las enzimas de restricción se utilizan para cortar ADN en fragmentos específicos que permiten analizarlo, como si fuera la huella dactilar del ADN, es decir, con un patrón de banda específico, por ende es posible detectar pequeñas diferencias entre moléculas de ADN similares mediante la separación por medio de la electroforesis en gel de poliacrilamida (para 1 kb) o en gel de agarosa (hasta 20 kb) (Berg *et al.*, 2007). Las endonucleasas que se utilizaran en este trabajo es HindIII (*Haemophilus influenzae*), EC: 3.1.21.4, reconoce la secuencia palíndromo AAGCTT y rompe el enlace fosfodiéster después de A, usa como cofactor dos iones de Mg^{2+} (UniProt, 2018b) y EcoRI (*Escherichia coli*), EC: 3.1.21.4, reconoce la secuencia de doble cadena GAATTC y rompe el enlace fosfodiéster después de G, ocupa dos iones de Mg^{2+} por subunidad (UniProt, 2018a).

6 Metodología

6.1 Ubicación del experimento

Se llevó a cabo en el laboratorio de Ecología General del Área de Fisiología y en el Laboratorio de Zoología del Departamento de Botánica, que pertenece a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro se localiza en Buenavista, Saltillo, Coahuila de Zaragoza con una latitud de 25°21'19.95"N y longitud de 101° 1'53.06"O, altitud de 1742 msnm.

6.2 Cría de *S. exigua*

Las larvas de *S. exigua* fueron obtenidas de una colonia previamente establecida en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politecnico Nacional. La colonia fue establecida en el Laboratorio de Ecología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en una cámara bioclimática (Plant Growth Chamber-MGC-300B) bajo condiciones de temperatura de 26 °C, 14/10 Luz/oscuridad y 80% de humedad relativa.

Las larvas fueron alimentadas con dieta artificial específica para noctuidos (Frontier Agricultural Sciences™), para la preparación se adicionó 19.8 g/litro de agar en agua esterilizada luego se calentó hasta que se disolvió, después se agregó 161.6 g/litro de la dieta artificial, se mezcló hasta obtener un producto homogéneo y se sirvieron en frascos de plástico de 2 onzas.

Los adultos fueron alimentados con una solución de agua y miel al 10 % y mantenidos en cajas plásticas con las paredes forradas con tiras de papel absorbente para la ovipostura, en las mismas condiciones ambientales que las larvas. Las plastas de huevesillos eran colectadas diariamente y colocadas en bolsas de papel donde eclosionaban las larvas.

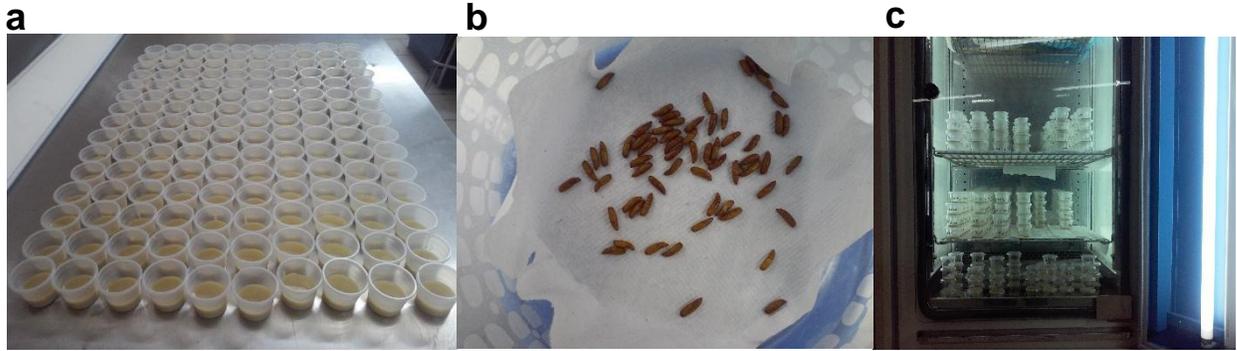


Figura 10. Cuidado de *S. exigua*. Dieta artificial para las larvas (a), pupas en cajas de plástico (b) y las larvas en la cámara bioclimática (c).

6.3 Infección de larvas con baculovirus de muestra de suelo

La muestra de suelo se obtuvo de un campo agrícola de Usmajac, Sayula, Jalisco, para lo cual se removió 5 cm del suelo más superficial, se recolectaron 500 g de suelo hasta una profundidad de 10 cm (Murillo *et al.*, 2007).

Cada muestra de suelo fue tamizada usando una malla de tela (0.2 mm), se utilizó 25 g de suelo tamizado para ser incorporado en la preparación de 100 ml de dieta artificial (Frontier Agricultural Sciences™) (Richards y Christian, 1999). Se sirvieron 10 ml de dieta con suelo incorporado en frascos de plástico de 2 onzas de capacidad y en cada frasco se colocaron 10 larvas de segundo instar. Las larvas que resultaron muertas fueron recolectadas y temporalmente conservadas a -20 °C.

6.4 Aislamiento y amplificación de baculovirus

Para aislar los virus, los cadáveres fueron macerados en frío con agua destilada posteriormente, el macerado fue filtrado con una malla de tela (0.2 mm) y la solución filtrada fue centrifugada por 3 minutos a 5000 rpm (centrifuga SOLBAT J-600), tras lo cual el sedimento fue descartado y el sobrenadante fue conservado a -20 °C. Cada una de las muestras filtradas fue observada en microscopio a 40 y 100 x.

Para amplificar el stock viral, cada solución filtrada fue diluida 10 veces y se tomaron 20 µl para infección superficial de dieta en frascos de 1 onza. En cada frasco se colocaron 5 larvas de *S. exigua* de segundo instar. Los cadáveres fueron recolectados y se llevó a cabo el mismo procedimiento que en el paso anterior.

6.5 Bioensayo con larvas de *S. exigua*

La actividad insecticida de los baculovirus aislados (Vjal) se determinó mediante la Concentración letal media y el tiempo letal medio (CL₅₀ y el TL₅₀, respectivamente) para ello se trabajó con tres concentraciones diferentes 500 CO/cm², 5000 CO/cm² y 50000 CO/cm² con sus respectivas tres repeticiones, se utilizaron 30 larvas del segundo instar por repetición. como control positivo se usó un baculovirus de referencia tipo silvestre (AcMNPV).

Se adicionó cada concentración del virus por contaminación en la superficie de la dieta artificial en frascos de 1 onza, después se agregó dos larvas de segundo instar por frasco. El registro de la mortalidad de las larvas se llevo a cabo diariamente.

6.6 Análisis estadístico

Los datos de mortalidad fueron analizados con el programa PoloPlus Version 1.0, para determinar la CL₅₀ y el TL₅₀.

6.7 Protocolo de extracción de ADN viral

La extracción del ADN viral se realizó con el estuche comercial Bioselec Multisource™, para lo cual se utilizaron 300 µl de muestra de baculovirus en un microtubo de 1.5 ml que se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, se descartó el sobrenadante, inmediatamente se le agregó 350 µl de tampón de fosfatos y 0.9 µl de RNasa para agitar vigorosamente, después se adicionó 20 µl de proteinasa K y 150 µl de tampón de lisis de tejido A, posteriormente se agitó por un minuto, se incubó por 15 minutos a 56 °C. Posteriormente se le agregó 350 µl de tampón de lisis de tejido B (provisto por el fabricante del estuche) y se agitó por vortex por 30 segundos, seguido de una centrifugación por 10 minutos a 12000 rpm, el sobrenadante se transfirió a una columna de ADNg (incluido en el estuche, Figura 11) en un tubo de recolección de 2 ml que se centrifugó a 12000 rpm durante un minuto, se descartó el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, se adicionó 500 µl de tampón de lavado A y se centrifugó por un minuto a 12000 rpm, se descartó el filtrado y se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección de 2 ml, se añadió 700 µl de tampón de lavado B que se centrifugo a 12000 rpm durante un minuto (se repitió dos veces este

paso), se descartó el filtrado y la columna se transfirió a un tubo de recolección de 1.5 ml nuevo, se agregó 100 μ l de tampón de elución (previamente calentado a 65 °C), después de un minuto de reposo se centrifugó a 12000 rpm durante un minuto. El ADN recuperado del filtro de la columna se guardó a 4 °C para su uso posterior.



Figura 11. Columna de extracción de ADN genómico.

6.8 Digestión del ADN viral

Se utilizaron dos enzimas de restricción EcoRI y HindIII. La mezcla se preparó en un microtubo de centrifuga de 1.5 ml (Cuadro 2) y se incubó a 37 °C por 3 horas.

Cuadro 2. Mezcla para la restricción de ADN viral.

Componentes	Volumen
Agua desionizada	16.3 μ l
Tampón de enzima de restricción 10X	2 μ l
Acetilado ASB, 10 μ g/ μ l	0.2 μ l
ADN, 1 μ g/ μ l	1.0 μ l
Enzima de restricción, 10u/ μ l	0.5 μ l
Volumen final	20 μ l

6.9 Electroforesis del ADN viral digerido

Se preparó un gel de agarosa a 0.5% de concentración usando solución tampón TAE1X (Tris-acetate-EDTA), las muestras fueron cargadas en los pocillos con un tampón de carga (5X Green GoTaq® Flexi Buffer), se corrió en un voltaje constante de 20 V por 12 horas (Figura 12).



Figura 12. Electroforesis de la digestión de ADN de AcMNP y Vjal.

7 Resultados

7.1 Actividad biológica

El virus aislado provocó en las larvas aletargamiento o ausencia de movimiento y alimentación, licuefacción de tejidos internos y varias larvas murieron colgadas de sus pseudopatas traseras (Figura 13), se observó la presencia de un aspecto blanquecino, en los fluidos corporales de los cadáveres.

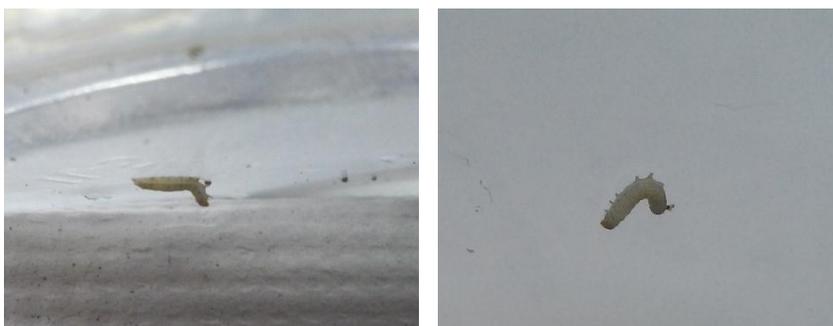


Figura 13. Síntomas observados en las larvas infectadas por baculovirus.

Las observaciones microscópicas demostraron la presencia de partículas morfológicamente similares a cuerpos de oclusión (Figura 14), tanto en los fluidos corporales de los cadáveres como en la solución resultante del proceso de aislamiento viral. Cabe mencionar que la misma observación se llevó a cabo en larvas infectadas con el control positivo (AcMNPV) resultando morfológicamente similares en ambos casos.

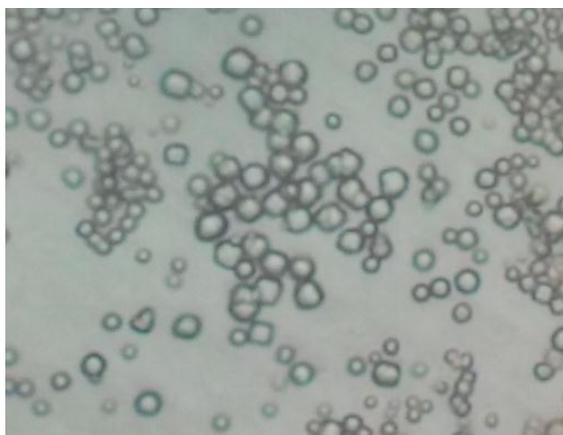


Figura 14. Cuerpos de oclusión observados a 100x.

7.2 Evaluación de la concentración letal media (CL₅₀)

La CL₅₀ fue calculada a partir del análisis de los datos obtenidos del bioensayo, se presenta en el Cuadro 3, además de las gráficas de AcMNPV y Vjal, donde se muestra un comportamiento de mayor efectividad a mayor concentración y un menor valor CL₅₀ para Vjal (Figura 15).

Cuadro 3. Concentración letal media de AcMNPV y Vjal en larvas de segundo instar de *S. exigua*.

		CL ₉₅ (CO/ cm ²)				
Huésped	Virus	Slope ± SE	CL ₅₀		CL ₉₅	
			(CO/cm ²)	(CO/cm ²)	Inferior	Superior
<i>S. exigua</i>	AcMNPV	1.266 ± 0.202	1.38 x 10 ⁵	2.7 x 10 ⁶	1.1 x 10 ⁶	1.4 x 10 ⁷
	Vjal	1.530 ± 0.319	2.49 x 10 ²	2.9 x 10 ³	1.7 x 10 ³	8.3 x 10 ³

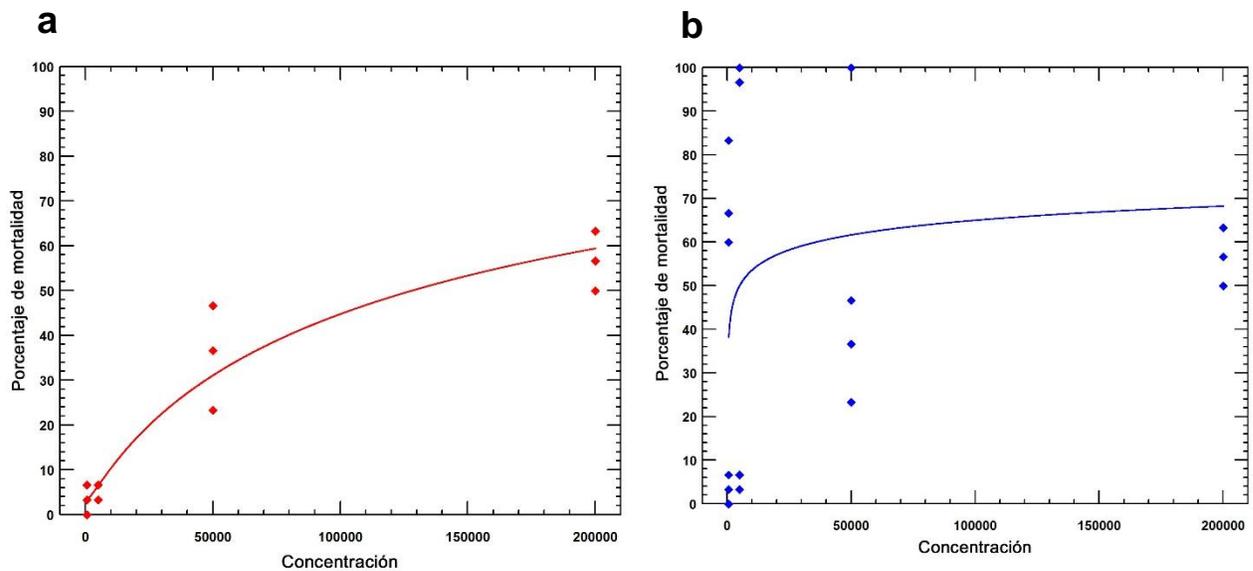


Figura 15. Concentración letal media de AcMNPV (a) y Vjal (b).

7.3 Evaluación del tiempo letal medio (TL₅₀)

La medición de la velocidad de la muerte de las larvas de *S. exigua* del segundo instar se evidencia en la Cuadro 4, resultando que el baculovirus presenta un menor TL₅₀ que el AcMNPV. El porcentaje de mortalidad aumenta conforme transcurre un mayor número de días, tanto en AcMNPV como en Vjal (Figura 16).

Cuadro 4. Tiempo letal medio de AcMNPV y Vjal en larvas de segundo instar de *S. exigua*.

Huésped	Virus	Slope ± SE	TL ₉₅ (días)			
			TL ₅₀ (días)	TL ₉₅ (días)	Inferior	Superior
<i>S. exigua</i>	AcMNPV	5.363 ± 0.358	9.2	18.6	16.8	21.3
	Vjal	11.458 ± 0.913	4.6	6.5	6.2	6.9

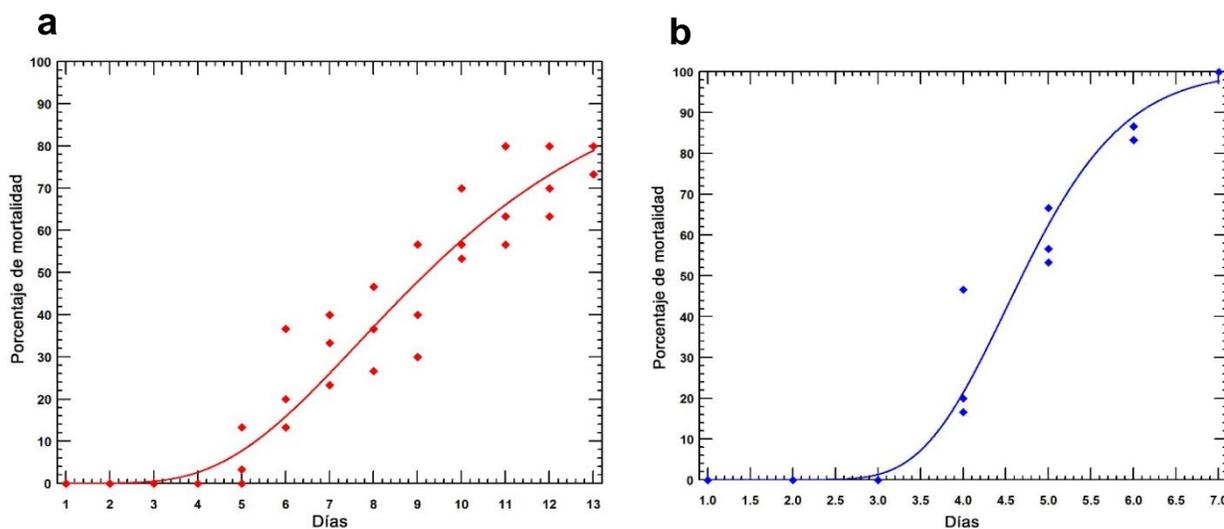


Figura 16. Tiempo letal medio de AcMNPV (a) y Vjal (b).

7.4 Restricción con endonucleasas

La restricción realizada con las endonucleasas EcoRI y HindIII (Figura 17) se visualizó en un fotodocumentador (Axygen™) y se pudo observar que el aislado difiere genómicamente de AcMNP, tanto en la restricción con EcoRI y HindIII.

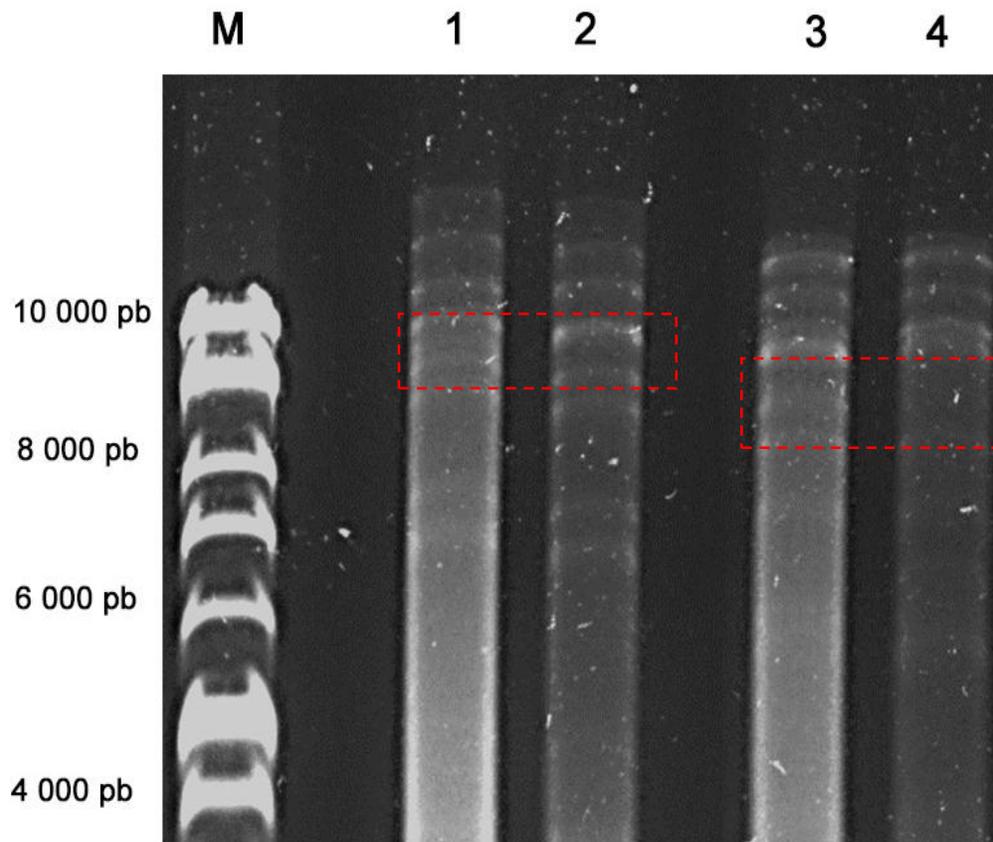


Figura 17. Resultado de la restricción del ADN genómico viral. De AcMNPV con HindIII y EcoRI (carril 1 y 3) y de Vjal con HindIII y EcoRI (carril 2 y 4), se señalan los fragmentos diferenciales.

8 Discusión

8.1 Aislamiento de baculovirus a partir de muestras de suelo

La metodología utilizada permitió aislar baculovirus a partir de la muestra de suelo, la presencia de los baculovirus fue corroborada por medio de microscopia, donde se pudo verificar la presencia de partículas que son morfológicamente similares a cuerpos de oclusión en los fluidos derivados de larvas muertas, la estructura y morfología de los cuerpos de oclusión ha sido ampliamente reportado por microscopia electrónica (Gelernter y Federici, 1986) y por microscopio electrónico de barrido (Serrano *et al.*, 2015) que puede tener una morfología cuboidal o poliédrica (Kondo *et al.*, 1994) (Figura 18), en nuestro caso, se puede inferir que el virus aislado es MNPV ya que tanto el registrado en el ICTV y los reportados son MNPV y presenta una morfología poliédrica como se muestra en la Figura 14 (Gelernter y Federici, 1986; ICTV, 2018b; IJkel *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2015).

Se tiene evidencia previa que en el suelo se encuentran CO dispersos (Williams *et al.*, 2017), por lo que significa que hay una posibilidad de aislar tipos silvestres o nativos, como ha sido reportado, los baculovirus son patógenos específicos o con un estrecho rango de hospederos (Thiem y Cheng, 2009), y en nuestro caso los virus aislados fueron a partir de *S. exigua* lo cual nos permite hacer la inferencia que la especie de virus hemos aislado se trata de SeMNPV, y los datos obtenidos a partir de la restricción enzimática (Figura 17) verifican que se trata de una especie de baculovirus que es genéticamente diferente a la cepa de referencia utilizada en este estudio (AcMNPV).

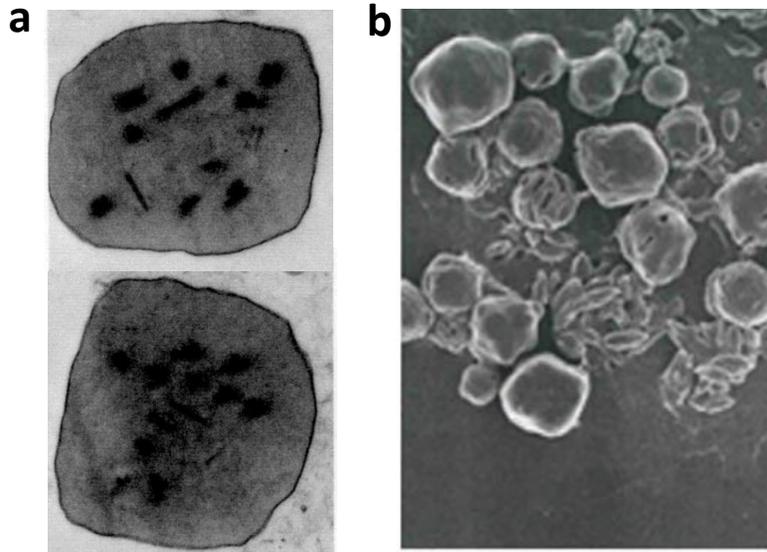


Figura 18. NPV reportados de *S. exigua*. Vista por microscopía electrónica (a) y por microscopio electrónico de barrido (b). Tomado de (Gelernter y Federici, 1986; Serrano *et al.*, 2015).

El baculovirus aislado demostró tener capacidad de enfermar y provocar la muerte de larvas del segundo instar de *S. exigua*, las larvas infectadas con el aislado mostraron los síntomas típicos de la infección por baculovirus previamente documentados, como la licuefacción (Bullock *et al.*, 2002) de las larvas esto debido a la infección sistémica ya que después de la producción de los CO su liberación implica la lisis celular y precisamente esto a nivel organismo lleva a la flacidez y la ruptura del tegumento de las larvas. Además se observó un comportamiento típico (Figura 13), el colgarse de las pseudopatas, en forma de V invertida (Williams, 2006). Cabe mencionar que también hubo canibalismo entre las larvas de neonatas al tercer instar.

8.2 Bioensayos

8.2.1 Concentración letal media

La patogenicidad, que se refiere a la capacidad o la habilidad de producir una enfermedad (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005) se puede determinar mediante un bioensayo, con la mortalidad de la población en prueba, mismas que se puede relacionar con la DL_{50} (Hunter y Hall, 1968; Serrano *et al.*, 2015) o con la CL_{50} (Shepard *et al.*, 2016). Se entiende CL_{50} como la concentración viral a la que el 50% de la población muere por la infección (Murillo *et al.*, 2003). La CL_{50} para AcMNPV fue de 1.38×10^5 CO/cm² (aproximadamente 1.8×10^6 CO/ml) y para Vjal se documentó 2.49×10^2 CO/cm² (aproximadamente 3.3×10^3 CO/ml), siendo Vjal el que tuvo mejor efectividad, en un bioensayo hecho con SeMNPV la CL_{50} fue de 1.21×10^5 CO/ml (Murillo *et al.*, 2003), con lo cual se observa una mejor actividad de Vjal. En otra prueba de aislamientos de SeMNPV a partir de larvas de *S. exigua* en el campo mostraron los siguientes resultados de CL_{50} : SLP-2008 3.92×10^6 CO/ml, SLP-2006 1.07×10^6 CO/ml, SIN-2006 9.75×10^4 CO/ml, SpoD-X[®] 3.82×10^4 CO/ml, SIN-2008 4.11×10^3 CO/ml (Álvarez-Antúnez, 2011), dos de los aislados requirieron una alta concentración SLP-2008 y SLP-2006 mientras que SIN-2008 fue el más patogénico que es similar con la actividad registrada por Vjal, además Vjal, respecto a SpoD-X[®], un baculovirus comercial, muestra una mejor efectividad en la mortalidad de las larvas. Por tal motivo el baculovirus aislado es prometedor para ser utilizado como control biológico.

8.2.2 Tiempo letal medio

La virulencia es el grado de enfermedad producida en un organismo (Shapiro-Ilan *et al.*, 2005) que se puede determinar con la velocidad a la que mata SeMNPV, en este caso, el TL_{50} (Serrano *et al.*, 2015). AcMNPV tuvo un TL_{50} de 9.2 días y Vjal de 4.6 días. Siendo más virulento el aislado y es congruente con otros TL_{50} reportados, como el de cuatro aislados con valores similares en TL_{50} con 3.1 días (Caballero *et al.*, 1992b), otro TL_{50} de 2.4 días (Kondo *et al.*, 1994) y un TL_{50} de 3.3 días (Murillo *et al.*, 2003). De la misma manera Bianchi obtuvo parámetros similares donde realizó bioensayos con AcMNPV y SeMNPV donde a grandes rasgos tuvo la dosis letal media

más baja (DL₅₀) con SeMNPV así como la velocidad de acción más alta (TL₅₀) de 3 días y para AcMNPV de 3.9 días (Bianchi *et al.*, 2000).

Las diferencias en los valores tanto de la CL₅₀ como del TL₅₀ probablemente se deba a la patogenicidad donde el pH alcalino del intestino medio de las larvas juega un papel importante, ya que influye en la liberación de los VDO.

8.2.3 Caracterización molecular del baculovirus aislado

En cuanto a la caracterización genética con enzimas de restricción, la evidencia sugiere que se trata de un baculovirus diferente al AcMNPV, debido a la presencia de bandas diferenciales en los patrones de restricción, presumiblemente se trate de SeMNPV, sin embargo, para poder definir la identidad del virus aislado es necesario llevar a cabo estudios adicionales como secuenciación del ADN.

9 Conclusiones

El suelo es reservorio de baculovirus por ende se puede aislar tipos silvestres.

El aislado Vjal, mostró una CL₅₀ de 2.49×10^2 CO/cm², es decir, menor que la mostrada por el control (AcMNPV).

El aislado Vjal, mostró un TL₅₀ de 4.6 días, por lo que es prometedor en el uso de agente de control biológico.

La restricción enzimática del ADN de los baculovirus (Vjal y AcMNPV) con HindIII y EcoRI muestran diferencias en los patrones de restricción, por tal motivo se considera que Vjal es un virus diferente al AcMNPV.

10 Bibliografía

Álvarez-Antúnez, F., 2011. Actividad biológica de baculovirus procedentes de regiones hortícolas de México sobre larvas de *Spodoptera exigua* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae).

Allaway, G., Payne, C., 1983. A biochemical and biological comparison of three European isolates of nuclear polyhedrosis viruses from *Agrotis segetum*. Archives of virology 75, 43-54.

Aomidori, 2012. Ficha de control de plagas. *Spodoptera exigua*. Aomidori biocontrol. Consultado el 31 de octubre de 2016. Disponible en: http://www.aomidoribiocontrol.com/AoM25/files/FichasPDF_ES/FCP_Spodoptera%20exigua_ES_Rev00.pdf

Azidah, A., Sofian-Azirun, M., 2006. Life history of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) on various host plants. Bulletin of Entomological Research 96, 613-618.

Badia-Villas, D., 1992. Suelos afectados por sales. Butlletí de les Societats Catalanes de Física, Química, Matemàtiques i Tecnologia, 609-629.

Barrientos-Gutiérrez, J.E., 2013. Manejo del gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner) en Los Reyes de Juárez, Puebla y evaluación de la actividad de extractos vegetales. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Puebla, México., Pagina 2, 31.

Berg, J.M., Stryer, L., Tymoczko, J.L., 2007. Bioquímica. https://books.google.com.mx/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA135&lpg=PA135&dq=uso+de+las+enzimas+de+restriccion+en+caracterizacion&source=bl&ots=LVtDK5um7B&sig=4iH_TR9SUh40VsEw9lqp_bbt_nw&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiYrY-jj6feAhVPQq0KHQwjDbw4ChDoATALegQIABAB#v=onepage&q=uso%20de%20las%20enzimas%20de%20restriccion%20en%20caracterizacion&f=false. Consultado 29.10.18. Reverté.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Stryer, L., 2002. Biochemistry. 5th edit. WH Freeman and Company New York.

Berretta, M.F., Ferrelli, M.L., Salvador, R., Sciocco, A., Romanowski, V., 2013. Baculovirus Gene Expression, Current Issues in Molecular Virology-Viral Genetics and Biotechnological Applications. InTech.

Bianchi, F.J., Snoeiijing, I., van der Werf, W., Mans, R.M., Smits, P.H., Vlak, J.M., 2000. Biological activity of SeMNPV, AcMNPV, and three AcMNPV deletion mutants against *Spodoptera exigua* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of invertebrate pathology* 75, 28-35.

Boughton, A.J., Harrison, R.L., Lewis, L.C., Bonning, B.C., 1999. Characterization of a nucleopolyhedrovirus from the black cutworm, *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of invertebrate pathology* 74, 289-294.

Bullock, J.M., Kenward, R.E., Hails, R.S., 2002. Dispersal ecology: 42nd symposium of the British ecological society. Pag 175.

<https://books.google.com.mx/books?id=DY6mDiLw4RkC&pg=PA175&lpg=PA175&dq=Dispersal+Ecology+42nd+Symposium+of+the+British+Ecological+Society+baculovir+uses+lisy&source=bl&ots=FiXBOWkqW->

[&sig=N5SWPIC1hFeqDPU1VcxyoF6KbB0&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjC4v2is4jeAhUJC6wKHZtIDnsQ6AEwA3oEAcQAQ#v=onepage&q=Dispersal%20Ecology%2042nd%20Symposium%20of%20the%20British%20Ecological%20Society%20baculovir+uses%20lisy&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=DY6mDiLw4RkC&pg=PA175&lpg=PA175&dq=Dispersal+Ecology+42nd+Symposium+of+the+British+Ecological+Society+baculovir+uses+lisy&source=bl&ots=FiXBOWkqW-&sig=N5SWPIC1hFeqDPU1VcxyoF6KbB0&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjC4v2is4jeAhUJC6wKHZtIDnsQ6AEwA3oEAcQAQ#v=onepage&q=Dispersal%20Ecology%2042nd%20Symposium%20of%20the%20British%20Ecological%20Society%20baculovir+uses%20lisy&f=false). Cambridge University Press.

Burges, H., Croizier, G., Huber, J., 1980. A review of safety tests on baculoviruses. *Entomophaga* 25, 329-339.

Caballero, P., Aldebis, H., Vargas-Osuna, E., Santiago-Alvarez, C., 1992a. Epizootics caused by a nuclear polyhedrosis virus in populations of *Spodoptera exigua* in southern Spain. *Biocontrol Science and Technology* 2, 35-38.

Caballero, P., Murillo, R., Muñoz, D., Williams, T., 2009. The nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) as a biopesticide: analysis of recent advances in Spain. *Revista Colombiana de Entomología* 35, 105-115.

Caballero, P., Zuidema, D., Santiago-Alvarez, C., Vlak, J., 1992b. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology* 2, 145-157.

Capinera, J., 2014. Introduction and Distribution - Description and Life Cycle - Host Plants - Damage - Sampling - Natural Enemies - Insecticides - Biological Control - Selected References. University of Florida. Consultado el 05 de noviembre 2016.

Disponible en: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/veg/leaf/beet_armyworm.htm.

CESAVEG, 2005. Ficha tecnica *Spodoptera exigua*. Consultado el 08 de abril de 2018. Disponible en: <http://www.cesaveg.org.mx/html/fichastecnicas/fichatecnicaspodopteraexigua.pdf>.

Cory, J.S., Bishop, D.H., 1997. Use of baculoviruses as biological insecticides. *Molecular biotechnology* 7, 303.

Dai, H., Zhang, G., Zhang, W., 2017. Temperature dependent development parameters and population life table of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). *Arthropods* 6, 117-125.

Dethier, J.-J., Effenberger, A., 2012. Agriculture and development: A brief review of the literature. *Economic Systems* 36, 175-205.

EMBL-EBI, 2018. Restriction endonuclease, type II, EcoRI. <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR004221>. Consultado el 05.10.18.

Escribano, A., Belda, J.E., Caballero, P., Rapallo, S., Carmona, E.M., 2000. Eficacia de nucleopoliedrovirus (VPNSE) en el control de "*Spodoptera exigua*"(Hübner, 1808)(Lepidoptera: Noctuidae) en pimiento de invernadero. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas* 26, 619-628.

Garza-Urbina, E.T.-V., Antonio, 2007. El gusano soldado *Spodoptera exigua* y su manejo en la planicie huasteca. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Sitio Esperimental Ébano. Primera edicion. Folleto número 15. San Luis Potosí, México.

Gaxiola-Castro, L.A., 2012. Evaluación de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control del gusano del fruto *Heliothis virescens* (Fabricius 1771) en el cultivo de tomate *Solanum lycopersicum* (Mill) en Guasave, Sinaloa. Tesis de maestria. Instituto Politecnico Nacional. Sinaloa, México. Consultado el 15 de octubre de 2016. Disponible en: <http://itzamna.bnct.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/13060/Luis%20Alberto%20Gaxiola%20Castro.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gelernter, W.D., Federici, B.A., 1986. Isolation, identification, and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 15, 240-245.

- Haase, S., Sciocco-Cap, A., Romanowski, V., 2015. Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses* 7, 2230-2267.
- Harrison, R., Hoover, K., 2012. Baculoviruses and other occluded insect viruses, *Insect Pathology* (Second Edition). Elsevier, pp. 73-131.
- Hua, W.Z., Serge ; Wason, Elizabeth 2013. *Spodoptera exigua*. Animal Diversity Web. Consultado el 06 de noviembre 2016. Disponible en: http://animaldiversity.org/accounts/Spodoptera_exigua/.
- Hunter, D., Hall, I., 1968. Pathogenicity of a nuclear-polyhedrosis virus of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Journal of Invertebrate Pathology* 12, 83-85.
- Ibarra, J.E., Del Rincón-Castro MaC, G.E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Carrillo, J., Pereyra-Alfárez, B., Alcázar-Pizaña, A., Luna-Olvera, H., Galán-Wong, L., 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48, 113-120.
- ICTV, 2018a. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus B, https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20172660. Consultado el 25.04.18.
- ICTV, I.C.o.T.o.V., 2018b. Taxonomía de Virus. <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>. Consultado 24.09.18.
- IJkel, W.F., Van Strien, E.A., Heldens, J.G., Broer, R., Zuidema, D., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., 1999. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 80, 3289-3304.
- Ikeda, M., Hamajima, R., Kobayashi, M., 2015. Baculoviruses: diversity, evolution and manipulation of insects. *Entomological science* 18, 1-20.
- Infante-Rodríguez, D.A., Berber, J.J., Mercado, G., Valenzuela-González, J., Muñoz, D., Williams, T., 2016. Earthworm mediated dispersal of baculovirus occlusion bodies: Experimental evidence from a model system. *Biological control* 100, 18-24.
- IRAC, 2018. Insecticide Resistance Action Committee, <http://www.irc-online.org/pests/spodoptera-exigua/posters/>. Consultado 25.04.18.

Jakubowska, A.K., Peters, S.A., Ziemnicka, J., Vlak, J.M., van Oers, M.M., 2006. Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV. *Journal of general virology* 87, 537-551.

Jehle, J.A., Blissard, G., Bonning, B., Cory, J., Herniou, E., Rohrmann, G., Theilmann, D., Thiem, S., Vlak, J., 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of virology* 151, 1257-1266.

King, A.M., Lefkowitz, E., Adams, M.J., Carstens, E.B., 2011. *Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier.

Kondo, A., YAMAMOTO, M., TAKASHI, S., MAEDA, S., 1994. Isolation and characterization of nuclear polyhedrosis viruses from the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) found in Shiga, Japan. *Applied Entomology and Zoology* 29, 105-111.

Lasa, R., Pagola, I., Ibanez, I., Belda, J.E., Williams, T., Caballero, P., 2007. Efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in greenhouses of southern Spain. *Biocontrol Science and Technology* 17, 221-232.

Mau, R.K., Jayma Martin 2007. *Spodoptera exigua* (Hubner) Department of Entomology. Honolulu, Hawaii. Consultado el 05 de noviembre 2016. Disponible en: <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/spodopte.htm>.

Monique, M.v.O., Just, M.V., 2007. Baculovirus Genomics. *Current Drug Targets* 8, 1051-1068.

Muñoz, D., Amate, J., Lipa, J., Caballero, P., García, T.C., Vega, P.B., Murillo, R., 2000. Caracterización bioquímica de un nucleopoliedrovirus de "*Chrysodeixis chalcites*" autóctono de España. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas* 26, 637-644.

Murillo, R., Munoz, D., Caballero, P., 2003. Host range and biological activity of three *Spodoptera* nucleopolyhedrovirus genotypic variants and the effect of Tinopal LPW on the most active variant. *International journal of pest management* 49, 147-153.

Murillo, R., Munoz, D., Ruíz-Portero, M.C., Alcázar, M.D., Belda, J.E., Williams, T., Caballero, P., 2007. Abundance and genetic structure of nucleopolyhedrovirus populations in greenhouse substrate reservoirs. *Biological control* 42, 216-225.

Murillo, R., Muñoz, D., Lipa, J., Caballero, P., 2001. Biochemical characterization of three nucleopolyhedrovirus isolates of *Spodoptera exigua* and *Mamestra brassicae*. Journal of applied entomology 125, 267-270.

Ohkawa, T., Rowe, A.R., Volkman, L.E., 2002. Identification of six Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus early genes that mediate nuclear localization of G-actin. Journal of virology 76, 12281-12289.

Pingoud, A., Wilson, G.G., Wende, W., 2014. Type II restriction endonucleases—a historical perspective and more. Nucleic acids research 42, 7489-7527.

Richards, A.R., Christian, P.D., 1999. A rapid bioassay screen for quantifying nucleopolyhedroviruses (Baculoviridae) in the environment. Journal of virological methods 82, 63-75.

Rohrmann, G., 2011. Baculovirus molecular biology. 3rd edition. Department of Microbiology, Oregon State University, Corvallis. 2011. Consultado el 2 de octubre de 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114593/>.

SAGARPA, 2016. Cuarto informe de labores SAGARPA. Consultado el 01 junio de 2018. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx/Transparencia/POT_2016/Informe/CuartoInformeDeLabores_SAGARPA.pdf.

Serrano, A., Pijlman, G.P., Vlak, J.M., Muñoz, D., Williams, T., Caballero, P., 2015. Identification of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus genes involved in pathogenicity and virulence. Journal of invertebrate pathology 126, 43-50.

Shapiro-Ilan, D.I., Fuxa, J.R., Lacey, L.A., Onstad, D.W., Kaya, H.K., 2005. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. Journal of invertebrate pathology 88, 1-7.

Shepard, B.M., Shapiro, M., Jackson, D.M., Carner, G.R., 2016. Comparative infectivity of homologous and heterologous nucleopolyhedroviruses against beet armyworm larvae. Journal of Agricultural and Urban Entomology 32, 13-24.

Slack, J., Arif, B.M., 2006. The Baculoviruses Occlusion-Derived Virus: Virion Structure and Function. Advances in virus research 69, 99-165.

Suárez-Gómez, H.D., 2012. Control microbiológico de insectos. Universidad Popular del Cesar. Ciencias de la salud. Microbiología. Entomología.

Thiem, S.M., Cheng, X.-W., 2009. Baculovirus host-range. *Virologica Sinica* 24, 436.

UniProt, 2018a. UniProtKB - P00642 (T2E1_ECOLX).
<https://www.uniprot.org/uniprot/P00642>. Consultado el 05.10.18.

UniProt, 2018b. UniProtKB - P43870 (T2D3_HAEIN).
<https://www.uniprot.org/uniprot/P00642>. Consultado el 05.10.18.

Williams, T., 2006. Biología y ecología de los Baculovirus. Consultado el 2 de octubre de 2016. Disponible en: http://trevorwilliams.info/Ecol_baculo_es.htm.

Williams, T., Virto, C., Murillo, R., Caballero, P., 2017. Covert Infection of Insects by Baculoviruses. *Frontiers in microbiology* 8, 1337.