

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGENTES DE CONTROL
BIOLÓGICO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

CLAUDIO RIOS VELASCO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Marzo de 2011.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGENTES DE CONTROL
BIOLÓGICO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

TESIS

PRESENTADA POR:

CLAUDIO RIOS VELASCO

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada como
requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal


DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES

Asesor


DR. SERGIO RENÉ SÁNCHEZ PEÑA

Asesor


DR. ERNESTO CERNA CHÁVEZ

Asesor


DRA. MARIA CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

Asesor


DR. MELCHOR CEPEDA SILLER


DR. FERNANDO RUÍZ ZARATE
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Marzo de 2011

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por ser mi segundo hogar y haberme brindado la oportunidad de seguir formándome como profesionista.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado el apoyo económico durante mi estancia doctoral.

Al Departamento de Parasitología Agrícola en general por haberme acogido tres años más durante mi formación doctoral. En especial a los maestros que integran el cuerpo docente de este gran Departamento, de los que me llevo un gran cúmulo de conocimientos y enseñanzas.

A mi cuerpo de asesores

Un profundo agradecimiento al Dr. Gabriel Gallegos Morales por haber confiado en mí, por la paciencia, dedicación y tiempo invertido en la elaboración de artículos y revisión de esta tesis. De quien me llevo un gran aprendizaje.

Al Dr. Sergio René Sánchez Peña. Por su gran apoyo en la realización de esta tesis, así como, por su contribución en la revisión y elaboración de los artículos científicos.

*Con admiración y respeto a la **Dra. María Cristina del Rincón Castro**, por su amistad, por su gran disponibilidad e interés hacia este trabajo de investigación y por sus excelentes aportaciones en la culminación de la presente tesis.*

*Al **Dr. Ernesto Cerna Chávez**, por sus enseñanzas, aportaciones y sobre todo por sus comentarios muy acertados en el desarrollo de este trabajo de investigación.*

*Al **Dr. Melchior Cepeda Siller**, por su disponibilidad, confianza y por sus grandes aportaciones hechas a este trabajo de investigación.*

*Al **Dr. Alejandro González Hernández**, por su valiosa colaboración en la confirmación e identificación de los parasitoides.*

*Al **Dr. Jorge E. Ibarra Rendón**, por su asesoría en el procesamiento de mis muestras de baculovirus y sobre todo por su gran disposición y apoyo para desarrollar parte de esta investigación.*

Al personal del laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV Campus Irapuato, en especial a Magui, Lizzette, Dulce, Regis, Caty, Aby, Oscar Gerardo, Oscar Jesus, Xavier y, a Erendida y Viridiana de la Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. Gracias por su amistad y por su gran apoyo durante mi estancia en Irapuato, Gto.

A mis compañeros y amigos del Postgrado de Parasitología Agrícola por todos los momentos felices que pasamos juntos, en especial a mis amigas Ivonne Torres Acosta y Carolina Núñez Vásquez.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Sr. Leopoldo Rjos San Nicolás

Sra. Flora Velasco Tolentino

Papas no me equivoco al decir que son los mejores padres del mundo, gracias por todo su esfuerzo, apoyo incondicional y por la confianza que siempre han tenido en mí. Gracias por que aunque lejos, siempre han estado a mi lado.

Por eso les brindo este trabajo en premio a su gran esfuerzo, paciencia, amor y confianza, porque este logro quiero compartirlo con ustedes.

A MI HERMOSA HIJA:

Claudia Jesenia Rjos Mata

A ti mi princesa, por hacerme la vida más amena y brindarme grandes momentos de alegría, con esas sonrisas y esos abrazos tan calurosos. Te amo mi pequeña traviesa.

A MIS HERMANOS:

Jaime, Rosalba, Fredy (†), Froylan, Tania, Leopoldo Yahir, Jhonathan Cambero, Leonel Gómez, Oton Bravo y Salvador Ordaz.

Gracias por compartir muchos momentos de alegría conmigo y sobre todo por todas las experiencias que hemos pasado juntos.

A MIS SOBRINAS PRECIOSAS:

Vanessa, Sherlyn, Aylín, Wendy, Ayelen, Azul y Hansel Yisel

A ustedes mis queridas sobrinas, por brindarme grandes momentos de alegría y de felicidad. Disfruto mucho sus travesuras. Con mucho cariño de su tío que las quiere mucho.

Son muchas las personas a los que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunos están aquí conmigo y otras en mis recuerdos y en mi corazón. Sin importar en dónde estén quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han dado y por todas sus bendiciones.

Claus

COMPENDIO

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AGENTES DE CONTROL
BIOLÓGICO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

POR:

CLAUDIO RIOS VELASCO

DOCTORADO EN CIENCIAS

PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA. MARZO 2011.

Dr. Gabriel Gallegos Morales -Asesor-

Palabras clave: Cogollero del maíz, Entomopatógenos, Virus, Hongos, Parasitoides
Baculovirus, Nucleopoliedrovirus, Enzimas de restricción.

Parcelas del cultivo del maíz fueron muestreadas de 2008 a 2009 en diversas etapas de desarrollo y crecimiento antes de floración para la búsqueda de enemigos naturales de *Spodoptera frugiperda*.

Para la búsqueda de parasitoides, se realizaron muestreos semanales de larvas durante los meses de julio – septiembre del 2009, en el campo experimental “El Bajío”, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). En cada muestreo se recolectaron 100 larvas al azar de los tres primeros estadios. Los parasitoides fueron recuperados, etiquetados y conservados en alcohol al 70 % para su posterior montaje e identificación. Los entomopatógenos recuperados fueron purificados e identificados acorde a sus características microscópicas y macroscópicas. De 12 muestreos, se recolectaron 1200 larvas, de ellas se obtuvieron 325 muertas por enemigos naturales como Hymenoptera (Ichneumonidae, Braconidae, Eulophidae) y Díptera (Tachinidae), así como por entomopatógenos (Baculovirus, *Nomuraea rileyi* y *Beauveria bassiana*).

Para el aislamiento de baculovirus, se tomaron muestras de suelo, de 2008 a 2009 en parcelas infestadas con el cogollero del maíz, en Nuevo León, Nayarit y Coahuila, México. Se lograron obtener diez aislados de suelo en los tres estados. Los aislados de SfNPV y SfGV fueron evaluados en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* para seleccionar el más efectivo, empleando la técnica de contaminación de superficie de la dieta con cuerpos de oclusión (COs) en concentraciones conocidas.

La cepa de virus aislado de Coahuila SfMNPV-AN₂ fue muy virulenta, por lo que se realizaron bioensayos adicionales de este aislado en todos los instares para determinar la actividad, así como, el número de COs producidos por larva infectada. También se trató a masas de huevecillos de *S. frugiperda* por el método de inmersión, en concentraciones de NPV expresadas como COs/ml. Se observó que la CL₅₀ se incrementó conforme se incrementaba el tamaño del insecto. Un patrón similar ocurrió

con el tiempo letal medio (TL₅₀). Las mortalidades más altas fueron registradas en el estado larval, principalmente en los primeros tres instares, con la mayor mortalidad en el primer instar. Esto demostró que los aislados de suelo de SfMNPV, fueron altamente virulentos. Para el caso de huevecillos, la inmersión de masas fue eficiente. La mayor mortalidad se detectó en los tres primeros estadios larvales y los COs producidos (rendimiento de COs/mg de peso), fueron mayores en los últimos estadios.

Se detectaron epizootias naturales del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, en larvas de *S. frugiperda* infectadas en parcelas de maíz establecidas en el campo experimental el “Bajío”, durante los meses de julio a septiembre del año 2007, 2008 y 2009. Se registró el número de larvas infectadas por metro lineal, observándose que las poblaciones naturales de *S. frugiperda* decrecen inmediatamente después de la presencia del hongo. Las condiciones ambientales presentes en ese año fueron favorables para infectar naturalmente a *S. frugiperda* dado que la temperatura y la humedad relativa fueron las óptimas para el crecimiento del hongo. Adicionalmente, la interacción hongo-hospedero se vio favorecida por el desarrollo fenológico de la planta.

ÍNDICE GENERAL

	Pagina
ÍNDICE GENERAL	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia del cogollero del maíz	4
Biología y comportamiento de <i>Spodoptera frugiperda</i>	4
Control biológico de <i>Spodoptera frugiperda</i>	5
Parasitoides	6
Entomopatógenos	7
Hongos	7
Virus	8
Familia Baculoviridae	9
Estructura y composición de los baculovirus	10
Nucleocápside	10
Matriz proteica	11
Viriones	11
Los viriones ocluidos (ODV).....	12
Los viriones gemados (BV).....	12
Cuerpos de oclusión	13
Ciclo de infección del baculovirus en el hospedero	13
Sintomatología de baculovirus	15
Porcentaje y tiempo de mortalidad	16

Factores relacionados con el hospedero.....	17
Biología y hábitos del insecto hospedero	17
Canibalismo, oviposición y movilidad	18
Susceptibilidad del hospedero.....	19
Factores relacionados con el patógeno	20
Patogenicidad, virulencia y variabilidad.....	20
Persistencia y diseminación de baculovirus.....	21
Potencial de los baculovirus como bioinsecticidas	22
Virus como agentes de control de plagas.....	22
Ventajas del uso de baculovirus	23
Evaluación de la actividad bioinsecticida de baculovirus	24
Técnicas de bioensayo o métodos de inoculación	24
Determinación de la productividad y peso de las larvas	26
Prerrequisitos y requisitos de los bioensayos	27
Diversidad natural de los baculovirus.....	28
Diversidad genética.....	28
Diversidad fenotípica.....	30
Variación genotípica.....	30
Variación entre especies de virus.....	31
Variación dentro de las especies.....	32
Variación fenotípica.....	32
Patogenicidad.....	33
Biología molecular de los baculovirus.....	34
Métodos para la identificación de baculovirus.....	35
Enzimas de restricción (REN).....	36
PCR en tiempo real.....	37
Purificación de genotipos de baculovirus.....	37
Establecimiento de un sistema de producción de baculovirus....	39
Cría de insectos hospederos.....	40
Preparación de dieta artificial.....	40
Producción de virus entomopatógenos.....	41

ARTICULO CIENTIFICO I	
NATURAL ENEMIES OF THE FALL ARMYWORM <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN COAHUILA, MÉXICO.....	44
ARTICULO CIENTIFICO II	
INSECTICIDAL ACTIVITY OF NATIVE ISOLATES OF <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> MULTIPLE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS FROM SOIL SAMPLES IN MEXICO	60
ARTICULO CIENTIFICO III	
MORTALITY AND OCCLUSION BODY'S PRODUCTION IN <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> LARVAE J. E. SMITH (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) INOCULATED WITH NUCLEOPOLYHEDROVIRUS	80
ARTICULO CIENTIFICO IV	
NATURAL OCCURRENCE OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI <i>NOMURAEA RILEYI</i> (FARLOW) SAMSON INFECTING <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN COAHUILA MÉXICO	92
ARTICULO CIENTIFICO V	
CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE SUELO DE BACULOVIRUS DE <i>SPODOPTERA FRUGIPERDA</i> MEDIANTE PATRONES DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN.....	99
CONCLUSIONES GENERALES	115
LITERATURA CITADA	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de las características morfológicas de los géneros de la familia Baculoviridae.....	10
2	Ciclo de infección de un baculovirus.....	15
3	Esquema de producción de baculovirus bajo condiciones de laboratorio.....	43

INTRODUCCIÓN

El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. Este cultivo, enfrenta una gran problemática fitosanitaria con el cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), plaga de importancia económica que en cultivos infestados, puede repercutir en una baja en la producción que fluctúa de 15 a 73 % (Carnevalli y Florcovski, 1995; Hruska y Gould, 1997), debido a que las larvas de *S. frugiperda* se alimentan de hojas y tallos tiernos en formación, causando severos daños en todos los estados de desarrollo de la planta (Villa-Castoreña y Catalán-Valencia, 2004); además de ser una plaga cosmopolita que tiene una gran adaptación y hábitos polífagos. Esta plaga se encuentra distribuida en todas las regiones agrícolas del continente Americano. En México se localiza prácticamente en todas las regiones en donde se cultiva maíz (Hernández-Mendoza *et al.*, 2008).

Las medidas de control de esta plaga han sido a base de insecticidas químicos, requiriendo de 2 a 4 aplicaciones, durante el ciclo de cultivo del maíz (Hruska y Gladstone, 1987). Desafortunadamente los insecticidas han provocado resistencia en el insecto, contaminación ambiental e intoxicaciones crónicas en agricultores en México debido a su uso incorrecto (Tinoco y Halperin, 1998). Esto ha motivado la búsqueda de

enemigos naturales como una alternativa para el manejo de *S. frugiperda*, reportándose a la fecha 22 especies de enemigos naturales de esta plaga (Molina-Ochoa *et al.*, 2004).

La integración de métodos de control biológico que involucren enemigos naturales, específicamente parasitoides y entomopatógenos, los cuales afectan a los estadios juveniles principalmente, pueden representar una alternativa importante para el control de *S. frugiperda*. De hecho, se ha reportado que existen enemigos naturales muy eficientes, los cuales son específicos y seguros para el hombre y otros animales (Molina-Ochoa *et al.*, 2003).

OBJETIVO GENERAL

Aislar, identificar y caracterizar agentes de control biológico potenciales para el manejo del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Identificar los enemigos naturales del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* y su nivel de parasitismo en el área de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

- 2) Aislar cepas de baculovirus nativos de suelos cultivados con maíz y evaluarlos sobre larvas de *Spodoptera frugiperda*.
- 3) Evaluar la actividad biológica de baculovirus en huevecillos de *Spodoptera frugiperda*.
- 4) Establecer un sistema de producción de cuerpos de oclusión de baculovirus en larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con dieta artificial.
- 5) Caracterizar los aislamientos de baculovirus mediante enzimas de restricción.
- 6) Evaluar la presencia natural del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* sobre larvas de *Spodoptera frugiperda* en parcelas de maíz de Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia del cogollero del maíz

Spodoptera frugiperda, es considerado una plaga importante del maíz, provocando pérdidas que oscilan entre 30 y 40 % en México (Rodríguez y De León, 2008). Al respecto Nagoshi y Meagher (2008), mencionan, que esta plaga tiene una amplia gama de hospederos, registrándose más de 80 especies prefiriendo alimentarse de gramíneas.

Biología y comportamiento de *Spodoptera frugiperda*

Las larvas se localizan en el cogollo de las plantas, donde se alimentan de las hojas en formación, las que al desarrollarse quedan perforadas y rasgadas, el ataque temprano del insecto, puede causar la muerte de la planta o un retraso en su desarrollo (Rodríguez y De León, 2008).

Las hembras de *S. frugiperda* depositan los huevos durante la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas, en masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo. Una hembra oviposita en promedio 1000 huevos en masas de 10 a 350 en cada postura, y las larvas nacen a los tres días o menos cuando la temperatura es elevada ($> 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Metcalf y Flint, 1965). Las larvas al nacer se alimentan de la hoja, destruyendo el mesófilo y la epidermis (Chávez, 1990), se trasladan a diferentes partes de la planta, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo. En algunos casos donde las infestaciones son elevadas se encuentran de 2 a 3 larvas en el cogollo de la planta. En sus tres primeros estadios, las larvas se desplazan a grandes distancias; debido a que secretan hilos de seda que les permite colgarse y caer con facilidad al suelo, siendo de mayor importancia para su control, los dos primeros, ya que a partir del tercer estadio se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones, donde permanecen hasta completar su desarrollo (5 a 6 estadios). Cuando la larva completa su desarrollo, cesa su alimentación, abandona el cogollo y baja al suelo donde construye una cavidad, y se transforma en pupa, para luego emerger como adulto a la superficie del suelo (Fernández, 1991).

Control biológico de cogollero del maíz

El control biológico es el uso de organismos vivos para mantener a una población de una plaga específica u organismo, en un nivel menos abundante o menos perjudicial. El uso del control biológico ha crecido debido a la necesidad de encontrar una solución al control de determinadas plagas, debido a que los insecticidas causan efectos

secundarios negativos, como la eliminación de la fauna benéfica, generación de resistencia, irrupción de nuevas plagas, entre otros; lo cual afecta a la salud humana y a la preservación del medio ambiente (Hajek, 2004).

Entre los organismos usados como agentes de control biológico de *S. frugiperda* se incluyen: parasitoides, depredadores y patógenos.

Parasitoides

En nuestro país se han hecho varios estudios sobre la diversidad de parasitoides en el cultivo de maíz. Martínez y López (2009), reportan para el estado de Oaxaca 21 familias de himenópteros parasitoides, encontrados en cultivos de maíz y frijol. Para los estados de Colima, Jalisco y Michoacán Molina-Ochoa *et al.* (2004), mencionan a 11 especies de parasitoides atacando a larvas de *S. frugiperda* representados en tres familias: Ichneumonidae, Braconidae y Eulophidae. En Centroamérica, *Chelonus insularis* (Cresson) (Braconidae), es el parasitoide más prevalente, y en la región Sudamericana fueron *Archytas incertus* (Macq.), *A. marmoratus* (Townsend) (Tachinidae), *C. insularis* y *Meteorus laphygmae* (Viereck) (Braconidae). *Diapetimorpha introita* (Cresson) (Ichneumonidae) fue el parasitoide de pupas más importante principalmente en Norteamérica (Molina-Ochoa *et al.*, 2003). Los dípteros de la familia Tachinidae constituyen un grupo taxonómico de moscas parasíticas muy numeroso, que controlan plagas agrícolas, hortícolas, forestales y de frutales.

Entomopatógenos

Varios tipos de microorganismos han sido usados en el control biológico, como: bacterias, virus, hongos y protozoarios, además de nematodos que atacan artrópodos se consideran dentro de este grupo. Sin embargo dentro de los más usados para el control biológico de plagas destacan los tres primeros.

Hongos

Las micosis son comunes y ampliamente distribuidas en poblaciones de insectos; pueden regular o causar alta mortalidad en poblaciones de insectos hospederos mediante epizootias. Lezama (1993), evaluó la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces fumosoroseus* y *P. javanicus* aislados de diferentes estados del país. Al respecto Sánchez-Peña (2000), reporta a *N. rileyi*, actuando y causando epizootias de forma natural en el gusano cogollero, en parcelas de maíz.

N. rileyi (Ascomycota) es un excelente agente de control biológico con gran potencial para ser utilizado dentro de estrategias de manejo integrado de plagas (León y Pulido, 1991) y se encuentra distribuido en diferentes agroecosistemas y zonas geográficas en donde frecuentemente ocasiona epizootias naturales sobre *S. frugiperda* y otros lepidópteros de importancia económica. Sin embargo, a la fecha no existe ningún bioinsecticida registrado a base de este microorganismo (Villamizar *et al.*, 2004). Otro

hongo entomopatógeno que afecta a diferentes grupos de insectos, es *B. bassiana* (Ascomycota) con hifas septadas y estructuras reproductivas en conidióforos, donde se encuentran las conidias (Tanada y Kaya, 1993; Rosas, 2002), el micelio se ramifica para formar los conidióforos simples e irregulares que terminan en vértices en forma de racimos.

Virus

Aproximadamente de 650 a 700 virus de insectos, han sido aislados de Lepidópteros (83 %), cerca del 14 % de Himenópteros y 3 % de Ortópteros, Coleópteros y Dípteros (Kathleen *et al.*, 1981; Allen y Ball 1992; Herniöu *et al.*, 2003). Los virus de mayor potencial son los Baculovirus (*Nucleopoliedrovirus* o NPVs y *Granulovirus* o GVs), virus de poliedrosis citoplásmica o Reovirus, Entomopoxvirus e Iridovirus (Gallegos *et al.*, 2003). De los virus que infectan insectos, los baculovirus han sido los más utilizados para su empleo en campo dentro de programas de manejo integrado de plagas (Moscardi, 1999; Herniöu *et al.*, 2003). Un gran número de estudios han demostrado la seguridad y la eficiencia de los NPVs y GVs contra sus hospederos (Escribano *et al.*, 1999; Armenta *et al.*, 2003; Arthurs y Lacey, 2004).

Familia Baculoviridae

Esta familia es la más numerosa y ampliamente estudiada de todos los virus patógenos de insectos. Los baculovirus son específicos de invertebrados y recientemente han sido desarrollados como bioinsecticidas para el control de insectos plaga, particularmente de especies del orden Lepidoptera. Estos virus contienen DNA de doble cadena, circular y covalentemente encerrado dentro de nucleocápsides. Los viriones tienen forma de bastón, bacilar o de varilla, están incluidos en cuerpos de oclusión (COs) (Volkman *et al.*, 1995) (Fig. 1).

La familia Baculoviridae está compuesta por dos géneros: Los *Nucleopoliedrovirus* (NPVs) y los *Granulovirus* (GVs). Los primeros se caracterizan porque se replican en el núcleo de las células infectadas, los poliedros están compuestos principalmente por la proteína poliedrina, tienen forma de poliedros de aproximadamente 1 a 15 μm de diámetro, por lo que se denominan Nucleopoliedrovirus. De acuerdo al número de nucleocápsides que envuelven los viriones de NPVs, pueden ser distinguidos como SNPV (cuando tiene una sola nucleocápside) o MNPV cuando tiene múltiples nucleocápsides. Los Granulovirus, se replican tanto en el núcleo como en el citoplasma, presentan un solo CO de forma granular de aproximadamente 0.2 a 0.5 μm , y están compuestos por una proteína denominada granulina (Murphy *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1999; Moscardi, 1999; Herniöu *et al.*, 2003).

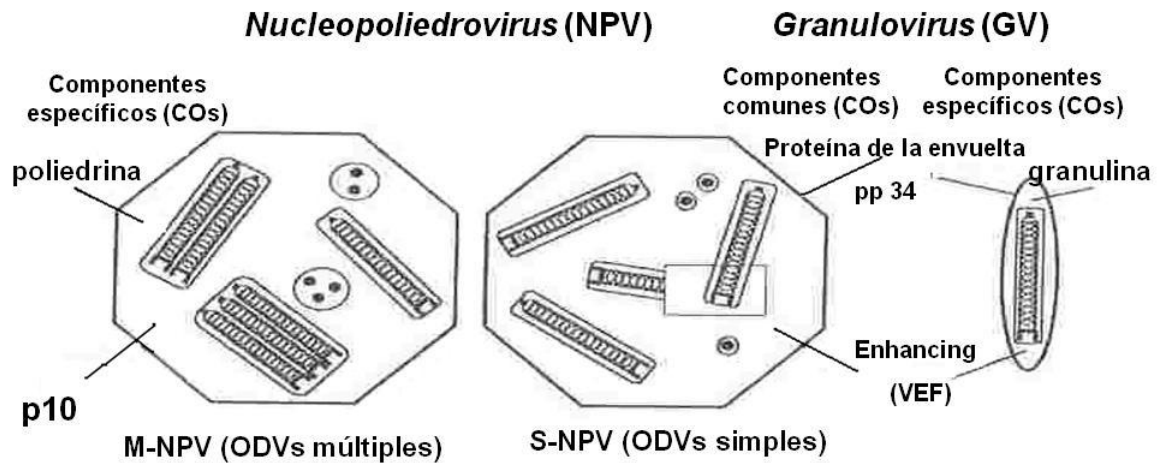


Figura 1. Representación esquemática de las características morfológicas de los géneros de la familia Baculoviridae. Caballero *et al.* (2001).

Estructura y composición de los baculovirus

Nucleocápside

La nucleocápside tiene la función de transportar la información genética del virus hasta la célula hospedera (Federici, 1986). Esta estructura consiste en una cápside cilíndrica, tapada en ambos extremos, cuyo interior es el núcleo donde se encuentra el DNA genómico enrollado. Según Tanada y Hess (1991), esta estructura tiene un diámetro aproximado de 30 y 60 nm y una longitud de entre 250 y 300 nm. La longitud de la cápside varía entre los diferentes virus y es proporcional al tamaño de sus genomas. El genoma de los baculovirus puede oscilar entre 80 y 180 kb y está

organizada en una sola molécula circular de DNA de doble cadena que puede contener entre 100 y 200 genes (Kuzio *et al.*, 1999).

Matriz proteica

La matriz proteica es sintetizada y depositada alrededor de los viriones durante la replicación del virus, lo que contribuye a la estabilidad de los virus en el medio ambiente fuera del hospedero. Cabe mencionar que los COs se encuentran cubiertos por una capa de la fosfoproteína (PP34) (Bjornson y Rohrmann, 1992); además de la proteína p10 formando parte principal de la envoltura de los COs, cuya importancia radica en la estabilidad de los COs y en su liberación de las células infectadas (Quaant-Russell *et al.*, 1987).

Viriones

Los viriones son los principales elementos infecciosos de los baculovirus ya sea entre los individuos de una población como entre los distintos órganos y tejidos dentro de un mismo hospedero. El virión maduro se forma cuando la nucleocápside adquiere una envoltura o membrana compuesta por una capa de lípidos entre dos capas de proteínas (Federici, 1986). Los viriones al atravesar la membrana basal adquieren unas estructuras en forma de espinas denominadas peplómeros, y estas formas inician nuevos

ciclos de infección en las células susceptibles (Whittaker *et al.*, 2000; Herniöu *et al.*, 2003).

Los viriones ocluidos (ODV)

Son los elementos infecciosos responsables de la transmisión horizontal del virus entre los individuos susceptibles de una población, así como de iniciar la infección primaria en las células epiteliales del mesenterón (Granados y Williams, 1986).

Los viriones gemados (BV)

Los BVs contienen una sola nucleocápside. Estos viriones a diferencia de lo que ocurre con los ODV, son elementos infecciosos que sólo se producen en los baculovirus poliorganotróficos (los que infectan tanto a células epiteliales del mesenterón como a las de la cavidad hemocélica) (Federici, 1997). Los BVs son los responsables de la infección de nuevos órganos y tejidos del mismo hospedero individual (Monsma *et al.*, 1996), entrando a las células por endocitosis (Volkman y Goldsmith, 1985).

Cuerpos de oclusión

Los baculovirus al final del proceso infeccioso sintetizan grandes cantidades de poliedrina o granulina, ambas proteínas cristalizan formando COs con forma de poliedro, de forma irregular o de gránulos según el género de baculovirus. Los COs son insolubles en agua y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos (Benz, 1986), así como tratamientos físicos como congelación, desecación o liofilización (Jaques, 1985), características que les confieren persistencia en el medio ambiente. Sin embargo, los COs son solubles en soluciones alcalinas, como las del tracto digestivo de algunos insectos, lo que facilita la liberación de viriones de los COs para que puedan iniciar la infección (Granados y Williams, 1986). Las células infectadas producen COs, por lo que las larvas hospederas se convierten en un saco de COs, que son liberados después del rompimiento de la cutícula para infectar nuevos hospederos (Volkman y Keddie, 1990).

Ciclo de infección del baculovirus en el hospedero

El ciclo de infección de los baculovirus en la naturaleza comienza con la ingestión de los COs (poliedros o gránulos), por las larvas, los cuales están presentes en la dieta contaminada y los insectos hospederos los adquieren al alimentarse (Kikhno *et al.*, 2002); sin embargo, también puede transmitirse de forma transoval y transováricamente, a través de los espiráculos y por medio de parasitoides y depredadores (Granados y Federici, 1986; Whittaker *et al.*, 2000; Herniöu *et al.*, 2003).

Después de ser ingeridos, los COs son disueltos en el lumen del intestino medio a través de la acción del jugo digestivo alcalino (pH 9-11), y por la degradación enzimática, y liberan los viriones envueltos (ODVs) en el poliedro o gránulo (Fig. 2). Estos viriones atraviesan la membrana peritrófica y se fusionan a las microvellosidades de las células intestinales (células columnares del intestino medio). La fusión de las microvellosidades parece depender de los fosfolípidos y las cargas iónicas de la cubierta de los virus (Herniöu *et al.*, 2003). Los viriones se replican en las células columnares, dando como resultado la infección primaria y la progenie viral. El resultado de esta infección son denominados virus gemados (BVs), que brotan de la membrana plasmática; éstos poseen una envoltura que adquieren de las células columnares al gemarse, y tienen peplómeros (Harrison y Bonning, 2000; Whittaker *et al.*, 2000; Toprak *et al.*, 2005). Posteriormente los viriones se diseminan por todos los tejidos del insecto hospedero vía hemolinfa, y en el núcleo de estos se replican nuevamente, resultando en una infección secundaria. La progenie resultante de esta segunda replicación sintetiza sus envolturas nuevamente, pero ya no por gemación, y están rodeados por una matriz proteica, a estos se les denomina virus derivados de los cuerpos de oclusión (ODVs), que se acumulan en las células como COs. Estos son los que finalmente son liberados del insecto y son los responsables de la infección de nuevos hospederos.

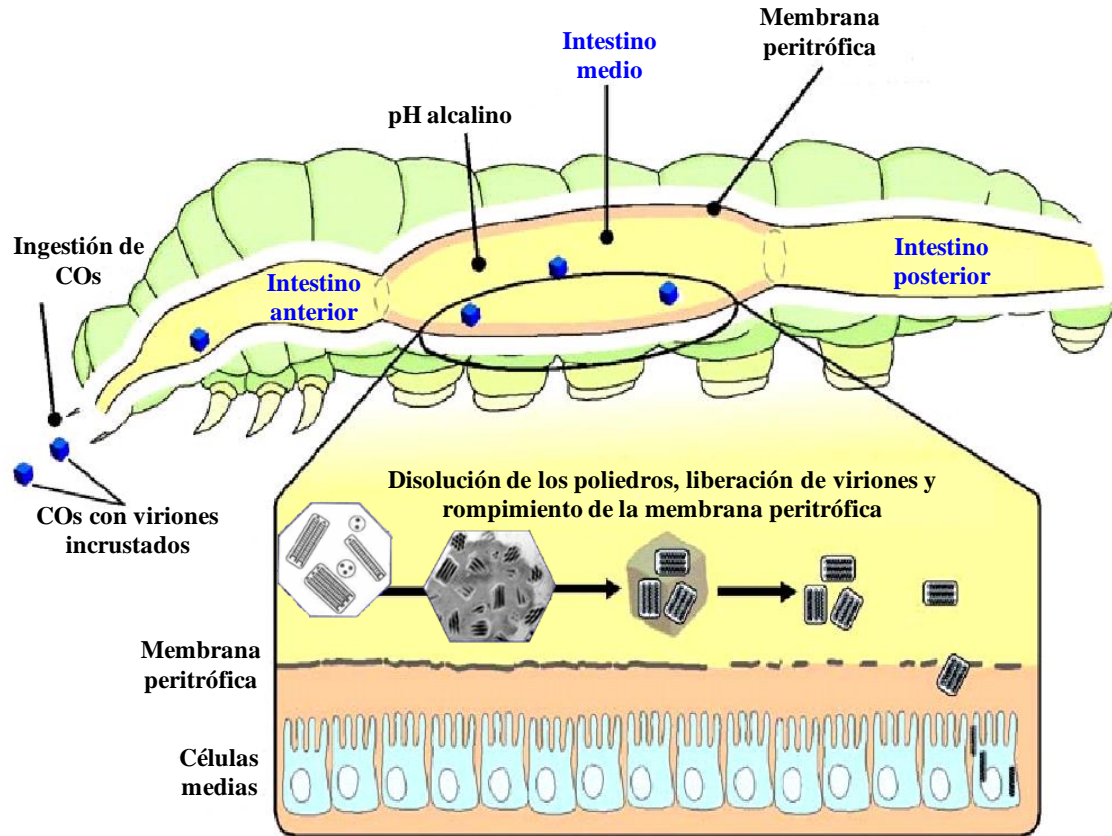


Figura 2. Ciclo de infección de un baculovirus. Tomado de Kalmakoff y Ward (2003).

Sintomatología de baculovirus

Las larvas infectadas por baculovirus exhiben un conjunto de síntomas característicos que empiezan a manifestarse uno o varios días después de haberse iniciado la infección (Sciocco, 2001). Al respecto Mazzone (1985), menciona que en una infección causada por baculovirus, las larvas afectadas no presentan síntomas durante los primeros días. Lo primero que se observa en las larvas postinfección, son cambios en la coloración del tegumento, debido a la acumulación de COs en los tejidos

afectados, siendo más notoria, en especies que presentan una cutícula muy transparente o levemente pigmentada, tornándose las larvas de color blanquecino o amarillento, presentando un comportamiento atípico (Vasconcelos *et al.*, 1996), pérdida de apetito y poco después dejan de alimentarse por lo que crecen más lentamente y la muerte del hospedero se produce por la ruptura de la cutícula y la licuefacción de los órganos internos (Tanada y Kaya, 1993; Federici, 1997; Toprak y Görkan, 2004). En las larvas muertas o moribundas el tegumento es generalmente muy frágil y se rompe con facilidad, liberando los COs infectivos (Granados y Williams, 1986). En lepidópteros, se observa que las larvas tienden a alejarse de su fuente de alimentación, emigrando hacia la parte superior de la planta donde mueren colgando de sus falsas patas, adheridas a la planta en la forma de una “V” invertida (Lynn, 2002; Herniöu *et al.*, 2003; Toprak *et al.*, 2005).

Porcentaje y tiempo de mortalidad

El tiempo para que ocurra la muerte del insecto depende de la especie, pero generalmente es de 3 a 7 días aunque puede ser de 3 a 4 semanas, dependiendo de las interacciones entre el virus, el insecto y la planta (Starnes *et al.*, 1993; Moscardi, 1999). Al respecto Sciocco (2001), menciona que el porcentaje de mortalidad es variable dependiendo de las dosis y el tiempo de exposición. Por lo que la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad y el tiempo letal dependerán de la virulencia del aislamiento, dosis ingerida, edad larval, temperatura y estado nutricional de la larva.

Factores relacionados con el hospedero

Biología y hábitos del insecto hospedero

Las larvas terrestres y fitófagas, son las más propensas de adquirir una infección viral, debido a que los COs virales tienden a permanecer en la superficie de hojas y frutos, y en la capa superficial del suelo después de la muerte y licuefacción del insecto hospedero infectado. Sin embargo los insectos que hacen galerías en tallos de plantas, granos almacenados o frutos, pasan parte de su ciclo de vida protegidos y, así, el contacto virus-hospedero se limita a un menor tiempo de exposición del estadio susceptible del hospedero. Este es el caso de *Diatraea saccharalis*, que puede esconderse en las galerías que hace en el tallo de la caña de azúcar. Otro caso es el de la palomilla de la manzana *Cydia pomonella*, ya que las larvas de primer estadio están expuestas solo por un periodo reducido de tiempo (24 h), ya que inmediatamente después de emerger las larvas, inician su galería en dirección de los lóculos de las semillas de los frutos de manzano, permaneciendo ahí durante su etapa larval (Gallegos *et al.*, 2009), por lo que su control mediante el granulovirus de *Cydia pomonella* (CpGV) se hace difícil. Los insectos que viven en el suelo puede acelerar el desarrollo de epizootias debido a la proximidad de los hospederos con el virus, ya que el suelo constituye un eficiente reservorio de virus (Cory y Myers, 2003; Christian *et al.*, 2006).

El número de generaciones del hospedero en un año, también afecta la disponibilidad y la persistencia de los baculovirus en campo, es decir, insectos con varias generaciones en el año (multivoltinos) permiten el aumento y disponibilidad del

inóculo en un tiempo relativamente corto (ejemplo el género *Spodoptera*), mientras que en insectos univoltinos, el virus tiende a amplificarse en periodos más largos, por lo que se reduce su disponibilidad (Entwistle y Evans, 1985). Esto ligado a la estrategia reproductiva del hospedero también influye en el mantenimiento y amplificación de los baculovirus, ya que insectos con estrategias de vida tipo “r” en general colonizan ambientes temporales, tienen un ciclo de vida corto, son polívoros, tienen un tamaño corporal relativamente pequeño y una alta tasa de reproducción. Los insectos con estrategias de vida tipo “K” aprovechan nichos específicos, tienen un ciclo de vida largo y tasas reproductivas menores; su tamaño corporal es relativamente mayor y presentan adaptaciones más específicas a su ambiente. De acuerdo a Fuxa (1995), para el control de plagas “r” se debe realizar una introducción anticipada de los baculovirus, además de realizar aplicaciones subsecuentes; mientras que en especies “K” la aplicación de baculovirus, debe hacerse en intervalos de tiempo más largos.

Canibalismo, oviposición y movilidad

El canibalismo tiene dos consecuencias directas en la ecología de los baculovirus, una es la reducción de la densidad poblacional de hospederos susceptibles, y la otra es que constituye una forma de adquisición del patógeno (Chapman *et al.*, 1999). La oviposición de huevecillos, es muy importante, ya que la mayoría de los lepidópteros ovipositan en las partes altas de las plantas, siendo difícil la infección de estas por baculovirus; sin embargo un caso en particular es la palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* que oviposita directamente sobre los tubérculos de papa

expuestos en campo. Por otra parte los cambios de comportamiento a lo largo del ciclo pueden afectar la tasa de transmisión entre larvas que habitan diferentes ambientes en el sistema suelo-planta; por ejemplo, las larvas de *S. frugiperda* migran hacia el cogollo de la planta de maíz a partir del 2° estadio, donde completan su etapa larval prácticamente aisladas y protegidas de cualquier acción de control, debido a su conducta caníbal, lo que reduce la infección de las mismas y por ende disminuye la cantidad de inóculo disponible para generar epizootias.

Susceptibilidad del hospedero

Las diferencias en las condiciones fisiológicas del hospedero, son las que hacen que la respuesta a la infección viral varíe, incluso entre individuos de la misma especie provenientes de crías de laboratorio. Esta variación es común entre poblaciones de regiones geográficas distintas, debido posiblemente a diferencias genéticas intrínsecas. Los parámetros más utilizados para estimar la susceptibilidad de un insecto hospedero a un baculovirus son la dosis letal media (DL_{50}), la concentración letal media (CL_{50}) y el tiempo letal medio (TL_{50}). La DL_{50} y CL_{50} se refieren al número de COs necesarios para matar el 50 % de la población experimental en un bioensayo. La primera se emplea cuando se conoce el número exacto de poliedros o gránulos ingerido por el insecto hospedero, según sea el caso, y la segunda, cuando se conoce la cantidad suministrada, pero no la ingerida exactamente por el hospedero. El TL_{50} se refiere al tiempo en el cual se observa la mortalidad del 50 % de la población experimental. Al respecto Sciocco (2001) menciona que tanto la DL_{50} y CL_{50} como el TL_{50} varían con la especie, estadio,

condiciones fisiológicas, sexo y estado nutricional de la larva, cepa del virus, condiciones de temperatura y dieta suministrada al hospedero, etc.

La disminución de la susceptibilidad en el hospedero, es medida por el mayor número de COs y/o por el mayor tiempo necesarios para matar al hospedero, esto ocurre a medida que la larva crece y a este fenómeno se le conoce como “inmunidad por maduración” (Tanada y Kaya, 1993). El insecto hospedero presenta distintas líneas de defensa en contra de la infección por baculovirus para no infectarse, esto ha sido descrito recientemente por Schmid-Hempel y Ebert (2003), como "Modelo de defensa componente".

Factores relacionados con el patógeno

Patogenicidad, virulencia y variabilidad

Según Tanada y Kaya (1993), la patogenicidad es la capacidad de un organismo para provocar una enfermedad, y es una característica genética. La virulencia es una característica biológica alterable y muestra la intensidad o el grado con que el patógeno causa la enfermedad. En general los baculovirus presentan una alta virulencia, ya que las infecciones frecuentemente terminan en la muerte del insecto hospedero.

Persistencia y diseminación de baculovirus

La persistencia y capacidad de diseminación de los baculovirus, son dos características muy importantes, ya que permanecen activos durante largos periodos de tiempo en diversos ambientes, especialmente en el suelo y son diseminados por el viento, la lluvia y por el mismo insecto hospedero, así como por parasitoides y depredadores (Moscardi, 1999). Al respecto Biever y Wilkinson (1978), afirman que los baculovirus también pueden permanecer en poblaciones de sus hospederos sin causar efecto (infecciones latentes) o pueden causar algún efecto perjudicial al individuo o a su progenie (infecciones subletales). La latencia consiste en una infección en la cual el hospedero no muestra síntomas de la enfermedad. Sin embargo, el virus latente puede ser activado a su forma virulenta por estrés, la superpoblación, baja temperatura o por el tipo de alimento suministrado al insecto hospedero (Burden *et al.*, 2002; Vilaplana *et al.*, 2010).

El suelo es el principal reservorio de los baculovirus, siendo el suelo el destino final de los insectos por la acción viral una vez que ocurre la lisis. Adicionalmente, las hojas contaminadas con restos de insectos infectados y la acción de la lluvia lavando los COs, son otros fenómenos que propician que los baculovirus persistan en el suelo (Cory y Myers, 2003; Christian *et al.*, 2006). Las plantas son ambientes extremadamente complejos para la supervivencia de entomopatógenos. Sin embargo, el virus también puede acumularse en hojas, ramas y troncos de los árboles (Evans y Harrap, 1982).

Potencialidad de los baculovirus como bioinsecticidas

Los insecticidas microbianos en general, y en particular los baculovirus, poseen un gran potencial para utilizarse como agentes de control de insectos plaga (Gallegos *et al.*, 2003). Los baculovirus más efectivos para el manejo de plagas deben contar con algunas características pertinentes, tales como, un buen comportamiento en campo (transmisión, dispersión y persistencia con sus característicos COs, lo que los hace estables durante largos periodos de tiempo), una alta especificidad (estrecho rango de hospederos), agresividad (elevada patogenicidad y virulencia) y una buena facilidad de producción masiva (Moscardi, 1999; Herniöu *et al.*, 2003). Adicionalmente son seguros por su infectividad restringida a artrópodos y no generar residuos en el medio ambiente ni efectos perjudiciales, y son compatibles con otros métodos de control incluyendo depredadores, parasitoides e incluso insecticidas químicos (Caballero *et al.*, 2001). Los virus causan epizootias naturales, debido a su persistencia y a su facilidad de diseminación en las poblaciones de insectos tanto en forma vertical (de generación a generación), como horizontal (de un hospedero susceptible a otro), así como la diseminación por agentes bióticos y abióticos (Moscardi, 1999; Lynn, 2002).

Virus como agentes de control de plagas

Pocos insecticidas virales han sido desarrollados comercialmente. En los Estados Unidos, la EPA (Environmental Protection Agency) ha registrado NPVs para controlar a *Heliothis zea*, *Autographa californica*, *Neodiprion sertifer* y un GV que infecta a *Cydia*

pomonella. Algunos productos comerciales son: VPN-80 para el control de *Autographa californica*, *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua*, y VPN-82 para controlar *S. exigua* y *S. sunia*. El insecticida viral más exitoso en cuanto al número de hectáreas tratadas es el NPV de *Anticarsia gemmatalis* (Moscardi, 1983). En México, Certis México S. A. de C. V. comercializa Spod-X un virus de origen natural de *S. exigua*, formulado como líquido concentrado, se usa en hortalizas, ornamentales y alfalfa. Otro producto es GemStar, virus de *H. zea*, aislado del gusano bellotero, formulado como líquido.

Ventajas del uso de baculovirus

El uso de baculovirus constituye una alternativa para controlar plagas insectiles con las ventajas de: a) ser específicos de invertebrados, b) no presentan propiedades físicas, químicas o biológicas en común con virus de vertebrados (Moscardi, 1999), c) presentan una alta especificidad de hospederos, por lo tanto no dañan directamente a parasitoides y depredadores (Armenta *et al.*, 2003), d) no contaminan el medio ambiente debido a que no causan problemas residuales, ya que son degradados por los rayos UV (Carruthers *et al.*, 1988), e) se producen exclusivamente en el interior del insecto hospedero; f) no generan resistencia y, g) se pueden aplicar con la tecnología propia de los insecticidas químicos e inclusive se pueden aplicar en combinación con estos últimos.

Evaluación de la actividad bioinsecticida de baculovirus

La capacidad bioinsecticida de los baculovirus se puede evaluar mediante bioensayos, los cuales se pueden definir como cualquier método que mide alguna propiedad de un agente, en términos de respuesta biológica. En los bioensayos, se toma a los insectos como aparatos de medición, y se establece el parámetro biológico a utilizar (mortalidad, longevidad, fertilidad, fecundidad, crecimiento, atracción, etc.), dentro de estos parámetros, el más estimado en las pruebas de actividad de bioinsecticidas, ha sido la mortalidad. En los bioensayos se considera la dosis o concentración del baculovirus, técnica o método de bioensayo y el registro de la respuesta en un tiempo determinado para relacionar el fenómeno con el efecto sobre el organismo y determinar la relación dosis-mortalidad o concentración-mortalidad, según sea el caso (Robertson y Preslier, 1992).

Técnicas de bioensayo o métodos de inoculación

Existe una gran diversidad de técnicas utilizadas en la cuantificación de la actividad biológica de los baculovirus. Una de ellas y la más usada, es la de contaminación de superficie de la dieta artificial con diferentes concentraciones de baculovirus debido a que es relativamente fácil y rápida y que se puede aplicar a cualquier estadio larval. Esta técnica tiene dos modalidades, en la primera los insectos en estudio permanecen en la dieta contaminada durante el periodo de evaluación del bioensayo; en la segunda, los insectos se exponen al inóculo viral solo por un periodo

determinado de tiempo, generalmente algunas horas al inicio del bioensayo y posteriormente se transfieren a dieta artificial no contaminada. La contaminación de la superficie de la dieta se efectúa mediante la adición de una suspensión viral previamente cuantificada, sobre los recipientes (cajas De Petri, vasos de plástico, etc.) que contengan la dieta artificial de los insectos, distribuida de manera homogénea con una varilla de vidrio modificada (Milks, 1997). Los contenedores pueden ser múltiples o individuales, dependiendo de los hábitos caníbales del insecto (por ejemplo larvas de *S. frugiperda* y *S. exigua*). Algunas limitantes de emplear esta técnica es la variabilidad de la dosis ingerida por los insectos, además de la dispersión heterogénea de los COs en la superficie de la dieta. Además con esta técnica se debe considerar el hábito de los insectos a evaluar, ya que por ejemplo, las larvas de *S. frugiperda* se alimentan de una pequeña cantidad de la dieta superficial y realizan una galería, hacia la parte inferior, evitando así, ingerir los COs inoculados sobre la superficie de la dieta. Para estos casos, está la modalidad de incorporación de los COs en la dieta artificial, una técnica poco utilizada debido a su dificultad y por el mayor tiempo requerido. Sin embargo Ignoffo (1964), menciona que con ésta técnica se obtienen resultados altamente reproducibles. En esta técnica se debe tomar en cuenta la temperatura de la mezcla, para evitar la inactivación de los COs, los cuales no soportan temperaturas por arriba de 50 °C.

Otra técnica es el suministro oral directo del virus al insecto hospedero o la inyección intrahemocélica de la dosis o concentración a evaluar. El suministro directo, presenta varias modalidades, entre las que se encuentran a) la inyección *per os* de las dosis, b) la alimentación por gotas para larvas de estadios avanzados, c) la alimentación por gotas para larvas neonatas, un método eficiente y reproducible, d) inmersión de

huevecillos, e) tratamiento superficial de larvas y f) el de inyección intrahemocélica (Paschke *et al.*, 1968; Hughes y Wood, 1987).

Para el caso del tratamiento superficial de larvas, se aprovecha el hábito de los insectos hospederos al alimentarse de su propia exuvia después de la muda. Para el empleo de esta técnica es muy importante conocer el hábito de los organismos a tratar, y con la inmersión de los huevecillos en suspensiones virales previamente tituladas, se aprovecha el hábito de los insectos que se alimentan del corion de sus huevecillos al eclosionar.

El método de inyección intrahemocélica, consiste en introducir una dosis conocida de una suspensión viral en el hemocele de larvas de estadios tardíos. Cabe señalar que con este método se invierte mucho tiempo, además de causar daños físicos a los insectos tratados, por lo que no se recomienda en larvas neonatas o pequeñas. Otra limitante y más importante es que se emplean viriones liberados de los cuerpos de oclusión (ODV) o viriones gemados (BV).

Determinación de la productividad y peso de las larvas

La productividad o cantidad de progenie viral que es capaz de generar un baculovirus, expresada en COs/larva, y la incidencia del proceso infeccioso en el peso del insecto son parámetros que también pueden medirse mediante bioensayos. La productividad de una cepa de baculovirus está en relación directa con su capacidad para

originar una epizootia en campo, una característica muy importante al momento de diseñar el proceso de producción de un bioinsecticida. En este tipo de bioensayo, previo a la inoculación de las larvas a evaluar, se registra su peso (de preferencia del mismo estadio). Como testigo se debe tomar un grupo de larvas tratadas con una suspensión de agua destilada más un detergente aniónico por ejemplo Tween 20.

Prerrequisitos y requisitos de los bioensayos

Dentro de los aspectos necesarios para asegurar un bioensayo correcto y reproducible son: 1) asegurarse de que el patógeno no haya perdido su virulencia, 2) que el inóculo sea viable, 3) que el método de aplicación sea el adecuado, 4) el insecto blanco debe estar sano, 5) si el insecto presenta canibalismo debe aislarse como es el caso de *Spodoptera* spp., 6) la cámara de bioensayo debe permitir la sobrevivencia del insecto control, 7) no contener sustancias dañinas tales como formaldehído en la dieta y, 8) todos los bioensayos deben tener un tamaño de muestra representativo y suficientes repeticiones o tratamientos para que el resultado sea significativo, 9) deben ser repetidos al menos tres veces, 10) las condiciones ambientales deben ser las óptimas (tales como la humedad relativa, temperatura y fotoperíodo), entre otros.

Diversidad natural de los baculovirus

La gran diversidad entre las especies de baculovirus les permite poder ser empleados contra un gran número de insectos plaga (Muñoz y Caballero, 2001). La diversidad interespecífica se define por el hospedero de origen de un determinado baculovirus. A la fecha los nucleopoliedrovirus (NPVs) y granulovirus (GV), se han aislado de más de 600 especies, de los cuales, más de 80 % han sido de lepidópteros, también existen cepas aisladas de otros insectos (Muñoz y Caballero, 2001). La diversidad intraespecífica es una característica de los aislados geográficos de un mismo virus, y sobre todo distintas variantes genotípicas presentes en un mismo aislado.

Diversidad genética

En el proceso de replicación de los genomas de DNA, se producen continuamente variaciones en su secuencia de nucleótidos. Pero debido a la recombinación existe una gran probabilidad de variabilidad genómica en cada ciclo de replicación, manifestándose en el DNA viral con deleciones, reagrupaciones, inversiones, repeticiones y adquisición de DNA del hospedero o de organismos que se encuentren en el. La existencia de estas alteraciones genómicas entre los baculovirus ha quedado demostrada por la presencia de variantes genotípicas detectadas por análisis mediante enzimas de restricción (REN) en muchos aislados de baculovirus (Muñoz y Caballero, 2001). La caracterización genotípica de las distintas especies o de los

distintos genotipos de un baculovirus se ha realizado tradicionalmente mediante el análisis de DNA genómico viral con REN.

Del DNA obtenido a partir de un genotipo purificado, durante la replicación del genoma viral se producen mutaciones en su secuencia, obteniéndose siempre una progenie que no es genéticamente idéntica a su DNA parental. Las regiones homólogas (*hrs*) sufren reorganizaciones, debido a que se producen mutaciones frecuentemente. Estas regiones están formadas por secuencias de DNA, repetidas un cierto número de veces, lo que facilita la recombinación interna, dando lugar a nuevos genotipos con distinto número de repeticiones (Majima *et al.*, 1993). Garcia-Maruniak y colaboradores (1996) fueron los primeros en observar variaciones en el número de repeticiones de una de las *hrs* del genoma de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), entre dos genotipos pertenecientes a dos aislados de este virus. Las *hrs* juegan un importante papel en la regulación de la transcripción viral, y probablemente también en la replicación del DNA (Muñoz y Caballero, 2001). Por otra parte, en el SNPV de *Helicoverpa zea* HzSNPV se ha detectado una región repetida con tripletes ricos en **A** y **T** dentro del marco de lectura abierta (ORF, open reading frame). Esta región podría constituir otra zona de variabilidad, como pudo observarse en el análisis de cuatro aislados de *Helicoverpa* sp., ya que en éstos, se confirmó la presencia de mutaciones en esta región (Le *et al.*, 1997).

Diversidad fenotípica

Algunos cambios genómicos que se producen en el DNA viral al parecer no les confieren ninguna ventaja ni desventaja selectiva (Andrews *et al.*, 1980). Sin embargo, si hay consecuencias en la actividad biológica derivadas de la heterogeneidad genética, demostrada por los genes que codifican la enzima ecdisteroide glucosil transferasa (EGT), asociada a la velocidad de acción de los baculovirus (O'Reilly y Miller, 1991), la helicasa (Croizier *et al.*, 1994) o el host range factor (HRF-1) (Thiemm *et al.*, 1996), asociados al espectro de hospederos, y a la catepsina y quitinasa que son componentes esenciales para la ruptura del tegumento de los hospederos (Hawtin *et al.*, 1995). Sin embargo los factores que más influyen en la interacción virus-hospedero en campo son la patogenicidad, la cual puede expresarse como la cantidad de inóculo viral letal para el insecto, la velocidad de acción, el espectro de hospederos y la producción de COs por larva.

Variación genotípica

Numerosos estudios han demostrado que los baculovirus pueden presentar altos niveles de variación genética. Los baculovirus pueden variar a diferentes escalas espaciales según Cory y Myers (2003), ya que aislados recuperados de la misma especie en diferentes lugares geográficos son a menudo diferentes. Los aislados de larvas individuales son genéticamente diferentes y con frecuencia también se ha demostrado que una larva individual puede contener hasta 24 variantes genotípicas de NPV (Cory y

Myers, 2003; Cory *et al.*, 2005). Estudios han demostrado que las variantes individuales, clonados *in vitro* o *in vivo*, presentan diferencias importantes en la patogenicidad y la velocidad de matar (Ribeiro *et al.*, 1997; Hodgson *et al.*, 2001).

Un estudio reciente realizado por Hodgson y colaboradores (2004), con el NPV de *Panola flammea* han demostrado que el inóculo que contenga más de una variante, es más patogénica que el que tiene una sola. Por otra parte las mezclas de las poblaciones de baculovirus, también es probable que sean capaces de retener un conjunto de características biológicas y tener la capacidad de adaptarse más rápidamente a condiciones ambientales cambiantes, ya que se ha demostrado que las diferentes variantes de baculovirus se diferencian en su patogenicidad sobre hospederos de diferentes especies y en su interacción con las diferentes plantas hospederas (Cory y Myers, 2004; Hitchman *et al.*, 2007a). Los aislamientos de NPV a partir de larvas individuales rara vez contienen un solo genotipo o variante. Las variantes pueden ser separadas *in vitro* (Stiles y Himmerich, 1998) o con las técnicas de clonación *in vivo* (Smith y Crook, 1988; Muñoz *et al.*, 1998).

Variación entre especies de virus

Los baculovirus son identificados inicialmente por su morfología y sintomatología característica en sus hospederos. Sin embargo ahora es posible caracterizarlos rutinariamente con enzimas de restricción de su DNA (Cory y Myers, 2003).

Variación dentro de las especies

Los perfiles de DNA de los baculovirus mediante REN, han demostrado que los baculovirus son extremadamente variables. Aislamientos de la misma especie hospedera en diferentes regiones geográficas con frecuencia muestran diferencias en los patrones REN, tal es el caso de los NPV aislados de lepidópteros (Takatsuka *et al.*, 2003).

Variación fenotípica

Los baculovirus aislados de la misma especie en diferentes sitios con frecuencia varían en su patogenicidad y en su velocidad de acción ((Allaway y Payne, 1983; Hughes *et al.*, 1983). Al respecto Lynn y colaboradores (1993), y Ribeiro y colaboradores (1997), han obtenido *in vitro* variantes individuales dentro de una población del virus, y Hodgson y colaboradores (2001) por clonación *in vivo*. Los clones de *Anticarsia gemmatalis* NPV, aislados por purificación en placa, diferían en su DL₅₀ por más de cien veces (Ribeiro *et al.*, 1997). La comparación de cuatro genotipos de NPV de una sola larva de *Panolis flammea* diferían en la DL₅₀ por un factor de siete, y con diferencias significativas en la duración de la infección y el rendimiento de la progenie viral (Hodgson *et al.*, 2001). La patología del virus y la formación de COs también pueden variar. Al respecto, variantes purificadas en placa de SfNPV difieren en el tiempo de la lisis de las larvas infectadas al momento de la muerte, así como en el tamaño de los COs resultantes. Cory y Myers (2003), mencionan que tanto la lisis del

hospedero, como el tamaño de los COs, es probable que influyan en la transmisión y persistencia de los baculovirus en el medio ambiente natural.

Patogenicidad

La mayoría de los estudios de actividad biológica se han llevado a cabo con aislados de campo, formados por mezclas de genotipos. En los últimos años, la tendencia es evaluar la actividad biológica de genotipos purificados con el fin de seleccionar aquellos con mejor potencial bioinsecticida. Sin embargo, parece ser que la heterogeneidad es importante para la supervivencia de los baculovirus (Muñoz y Caballero, 2001).

La adquisición de una dosis o concentración efectiva para iniciar una infección sistémica, es un proceso afectado por factores externos (entre ellos, la radiación UV), que afectan la estabilidad de los baculovirus, pero sobre todo por factores intrínsecos a la interacción virus-insecto (Black *et al.*, 1997). Uno de los aspectos muy importantes a considerar, en susceptibilidad del hospedero a infecciones virales, es el estado de desarrollo del insecto, ya que conforme avanza el estado de desarrollo larvario, se incrementa la dosis o concentración efectiva (Escribano *et al.*, 1999). Sin embargo, las comparaciones de la inoculación oral intrahemocélica ha demostrado que esta resistencia no se produce cuando el virus es inyectado (Teakle *et al.*, 1986), lo que implica que la resistencia del desarrollo está relacionado con el proceso de infección en el intestino medio. Investigaciones detalladas sobre el desarrollo de la resistencia entre estadios en

Trichoplusia ni a AcMNPV, mostraron que las larvas de cuarto estadio son más susceptibles inmediatamente después de la muda (Engelhard y Volkman, 1995). Además se ha demostrado que las larvas pueden eliminar la infección de baculovirus por desprendimiento de células infectadas que recubren el intestino medio, reduciendo así, la oportunidad del virus para establecer la infección (Washburn *et al.*, 1996; Hoover *et al.*, 2000).

Los insectos poseen dos mecanismos celulares y humorales de la inmunidad y los dos han sido implicados en la resistencia a baculovirus (Cory y Myers, 2003). Goulson y Cory (1995), han demostrado que la respuesta de los insectos a la infección por baculovirus puede variar con la densidad de cría de los insectos hospederos, afirmando que los insectos criados en densidades más altas son menos susceptibles a la infección. Por otra parte Reeson y colaboradores (1998), mencionan que los insectos criados gregariamente son más resistentes a la infección que los criados de manera individual.

Biología molecular de los baculovirus

Uno de los problemas principales al usar baculovirus como insecticidas ha sido su identificación y cuantificación. Los medios clásicos de diferenciación de baculovirus consisten en nombrar a un virus por el insecto hospedero de él cual fue aislado originalmente. Sin embargo, ciertos baculovirus pueden replicarse en más de una especie de insectos (Cory y Myers, 2003). Para superar las insuficiencias de este sistema de identificación, los investigadores han utilizado una diversidad de técnicas bioquímicas

para caracterizar y determinar relaciones entre aislados virales. Dentro de éstas técnicas se incluyen el análisis electroforético en gel de poliacrilamida de proteínas estructurales de virus, la digestión REN de DNA viral, y la serología (Harrap y Payne, 1979). Con estos procedimientos, la información sobre las características físicas, químicas, y biológicas de los baculovirus ha permitido la comprensión de las técnicas más útiles para identificar y monitorear estos virus. Esta información también se está utilizando en el desarrollo de pruebas sensibles para (i) estudiar los efectos de baculovirus en especies no blanco a nivel celular, (ii) supervisión de la calidad de virus comercialmente producidos y de la actividad biológica de residuos virales, y (iii) la detección de mutaciones virales de cepas y el posible incremento (espectro) del rango de hospederos que pueden desarrollarse durante el uso de baculovirus como bioinsecticidas (Cory y Myers, 2003).

Los patrones de fragmentos de restricción se han utilizado para identificar aislados virales de varios hospederos (Miller y Dawes, 1978) y para distinguir variantes genómicas entre especies relacionadas (Lee y Miller, 1978).

Métodos para la identificación de baculovirus

Estudios de la biología de poblaciones de NPV se han basado en métodos tales como polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Arends *et al.*, 2005; Cory *et al.*, 2005; Erlandson *et al.*, 2007), en el Southern Blot (Bull *et al.*, 2003) o un PCR semi-cuantitativo competitivo (López-Ferber *et al.*, 2003). Sin embargo, el PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) no sólo tiene el potencial para ser más exacto, sino

que también permite el desarrollo de un ensayo de mayor rendimiento. El qPCR se convierte así en la técnica de elección para la cuantificación absoluta y relativa de los niveles de DNA templado (Mackay *et al.*, 2002). Para baculovirus, los métodos de PCR cuantitativo se han utilizado para valorar los niveles de BV (Budded virus) (Hitchman *et al.*, 2007b; Lo y Chao, 2004), pero sólo los métodos de PCR semi-cuantitativo se han utilizado para determinar las frecuencias genotípicas a la fecha (López-Ferber *et al.*, 2003). Un ensayo basado en qPCR, permite una cuantificación más precisa de las relaciones genotípicas entre especies, en un rango mucho más amplio de poblaciones. Los resultados demuestran que un ensayo qPCR se puede utilizar convenientemente para cuantificar con precisión las relaciones de los genotipos mixtos de las poblaciones en una amplia gama de proporciones (Simon *et al.*, 2006).

Enzimas de restricción (REN)

El análisis mediante REN es un método eficiente y relativamente simple para la identificación de baculovirus y es considerada como una herramienta importante para distinguir aislados de NPV (Lee y Miller, 1978). Este método ha demostrado que las diferencias genéticas pueden detectarse entre aislados del MNPV de diferentes regiones o países, entre aislados dentro de una sola localidad (Shapiro *et al.*, 1991), y aun entre cepas de un solo hospedero (Garcia-Maruniak *et al.*, 1996). Las variaciones fenotípicas entre diferentes aislados también han sido reportados para muchos NPVs en términos de tiempo de sobrevivencia, patogenicidad y rango de hospederos (Caballero *et al.*, 1992).

PCR en tiempo real

El PCR en tiempo real es un método rápido de diagnóstico para la identificación y diferenciación de nucleopoliedrovirus (NPVs). El método se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utiliza junto con los análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Estos procedimientos fueron modificados de las técnicas estándar que se utilizan usualmente para la purificación y la disolución de los poliedros de NPV y proporciona un alto porcentaje de confiabilidad de PCR del 95 % (n = 60), con un diseño de varios juegos de oligonucleótidos de PCR para la generación de productos de amplificación de DNA cercanos y NPV relacionados distantemente. Estos oligonucleótidos de PCR son diseñados a partir la secuencia de DNA genómico tomados de un aislado de referencia y finalmente los productos de PCR específicos, se digieren con endonucleasas de restricción, para generar perfiles de diagnóstico de DNA (haplotipos), que pueden ser usados para identificar NPVs heterólogos y virus relacionados, y para diferenciar las variantes genotípicas (Christian *et al.*, 2001).

Purificación de genotipos de baculovirus

Las técnicas de purificación en placa, permitieron la clonación de variantes genotípicas presentes en los aislados silvestres. Se basan en la infección de un cultivo celular con diluciones apropiadas de viriones gemados (BVs) tales que asegura la mayoría de las pocas células que son inicialmente infectadas, hayan recibido un solo BV

y replican un único genotipo. La progenie viral producida en estas células se expandirá a las células vecinas iniciando nuevas infecciones y formando eventualmente una placa donde todos los virus procederán del mismo genotipo inicial. La expansión de las nuevas generaciones de BVs a las células más lejanas, donde se puede estar replicando un genotipo distinto, se evita cubriendo el cultivo celular con una capa de agar mezclada con todos los nutrientes necesarios para las células. Con esta técnica, Lee y Miller (1978), purificaron a partir de un aislado silvestre, cinco variantes genotípicas cuyos genomas presentaban cambios mínimos con respecto al aislado de campo. Desde entonces se han clonado los genotipos presentes en otros aislados virales utilizando este método, como los MNPVs y SNPVs (Corsaro y Fraser, 1987; Croizier y Ribeiro, 1992).

La falta de líneas celulares capaces de soportar la replicación de los GVs y de muchos NPVs, potenció el desarrollo de las técnicas de clonación *in vivo*. En 1985, Crook y colaboradores purificaron un genotipo de un aislado de campo, infectando larvas neonatas con dosis muy bajas de COs con el fin de obtener infecciones originarias de un único CO. Smith y Crook (1988), aplicaron la misma metodología a los MNPVs, para ello infectaron larvas de primer estadio con dosis muy bajas de COs, en torno a la dosis que mata al 10 % de las larvas tratadas (DL_{10}), de forma que solo o mayoritariamente fuera uno, el genotipo responsable de la infección de todo el organismo hospedero. Infectaron cientos de larvas neonatas y la progenie viral, posteriormente se amplificó en larvas de estadios avanzados para su posterior caracterización. Una modificación de este método fue hecha por Muñoz y colaboradores (1998), para la clonación de siete variantes de SeMNPV, utilizando diluciones de la hemolinfa de larvas infectadas entre 48 y 72 h. Utilizando la hemolinfa donde, se

encuentran mayoritariamente los BVs, los autores la diluyeron para infectar *per os* un gran número de larvas del cuarto estadio, que pudieron analizar individualmente. La clonación de genotipos, tanto mediante técnicas *in vitro* o *in vivo*, ha revelado la gran heterogeneidad genotípica existente en los aislados silvestres de los baculovirus (Muñoz y Caballero, 2001).

Establecimiento de un sistema de producción de baculovirus

Desde hace varios años, en varios países como Nicaragua, Honduras, Argentina, España, USA, entre otros, se han realizado trabajos de investigación sobre la cría de insectos y reproducción de virus entomopatógenos *in vivo*. Aunque este sistema de producción es relativamente tedioso y resulta también costoso por los insumos requeridos para la preparación de la dieta artificial para la alimentación de insecto hospedero (Greene *et al.*, 1976; Narváez-Solís *et al.*, 2004).

En los últimos años han existido grandes avances en la producción comercial de virus entomopatógenos. La técnica más común es reproducirlos en sus hospederos, los cuales se crían en dieta artificial e inclusive en dietas naturales. También se realiza la producción de virus colectando larvas enfermas en los cultivos después de una aplicación de virus, como se realiza en EMBRAPA Brasil (Gómez *et al.*, 1999). Un sistema más eficiente es la producción en cultivos de tejidos de células del insecto hospedero, lo cual ha permitido reducir los costos y aumentar la eficiencia de las

formulaciones. Este sistema, sin embargo, requiere de una gran inversión, lo que lo hace inaccesible a países en desarrollo.

Cría de insectos hospederos

La colonia se debe establecer en condiciones controladas y asépticas, y las larvas se alimentan con dieta artificial hasta el estadio de pre-pupa. Las pupas sanas se depositan directamente dentro de las jaulas. Una vez emergidos los adultos se alimentan con agua azucarada, diariamente; los huevos ovipositados por las hembras se recolectan de forma manual y se desinfectan con hipoclorito de sodio para la eliminación de patógenos contaminantes en la cría, posteriormente se colocan en dieta artificial para su alimentación al momento de su eclosión. Posterior a la emergencia las larvas de primer estadio, se colocan de manera individual en vasos de plástico con dieta artificial para evitar el canibalismo (Narváez-Solís *et al.*, 2004; Lasa *et al.*, 2007)

Preparación de dieta artificial

La dieta artificial se puede preparar de manera manual, ésta puede prepararse con los ingredientes por separado, para el caso de la cría de *S. frugiperda*, primero se hierve el agua junto con el agar, posterior a esto se le agrega la dieta hecha a base de: harina de soya, germen de trigo, levadura de cerveza, ácido ascórbico, ácido sórbico, metil parabenzoato, sal wesson, y contenido vitamínico. Cabe mencionar que la harina de soya

y germen de trigo se mezclan por separado, al igual que el ácido sórbico y el ascórbico, y al final del proceso se le agrega el metil parabenzoato, sal wesson, y el contenido vitamínico. Una vez realizado este proceso se pasa a una licuadora para evitar la formación de grumos, y de ésta, se pasa a los contenedores, se espera a que enfríen por completo para ser tapados y almacenados, para evitar la deshidratación de la dieta (Greene *et al.*, 1976; Narváez-Solís *et al.*, 2004); sin embargo en la actualidad ya existen dietas preparadas con todos los requerimientos de los insectos, que solo debemos hervir el agua, anexar la dieta, mezclar muy bien y verterla en los contenedores.

Cabe mencionar que el buen manejo de una colonia de insectos hospederos, libre de contaminantes, homogénea y aséptica, da como resultado un suministro constante y homogéneo de larvas de los hospederos cultivados para replicar el virus de interés. Por regla la colonia debe estar establecida por separado físicamente de la unidad de donde se produce el virus, ya que la mayoría de los baculovirus son muy infectivos y patogénicos y pueden infectar a toda la colonia.

Producción de virus entomopatógenos

La producción de virus se lleva a cabo en dos etapas. La primera consiste en cultivar o reproducir de manera aséptica larvas del insecto hospedero que sirve como hospedero para replicar el virus, para lo cual es importante contar con una cría de insectos en dieta artificial, de tal manera que siempre estén disponibles para la infección de las larvas, y así mantener de forma permanente la producción del mismo. A mayor

cantidad de insectos criados, mayor será la producción viral (Fig. 3) (Narváez-Solís *et al.*, 2004).

La segunda etapa consiste en inoculación de los insectos en un área retirada de la cría del insecto hospedero, de manera directa con soluciones virales sobre la superficie de la dieta artificial con la cual se alimentará la larva del insecto hospedero o bien asperjar las suspensiones virales superficialmente sobre las larvas del insecto. Es importante aclarar que para propósitos prácticos, la recolecta de las larvas muertas por la acción del virus debe realizarse antes de que éstas sufran plasmólisis (licuefacción de los órganos internos y externos), ya que al ocurrir esto se dificulta la cosecha del virus, dado que se mezcla con la dieta del insecto y/o con las excretas de este, lo que dificulta su separación, así como la calidad de los virus producidos (Lasa *et al.*, 2007). Otro aspecto importante es mantener las larvas infectadas recolectadas a -20 °C para evitar la proliferación de agentes contaminantes (Del Rincón, 1993)

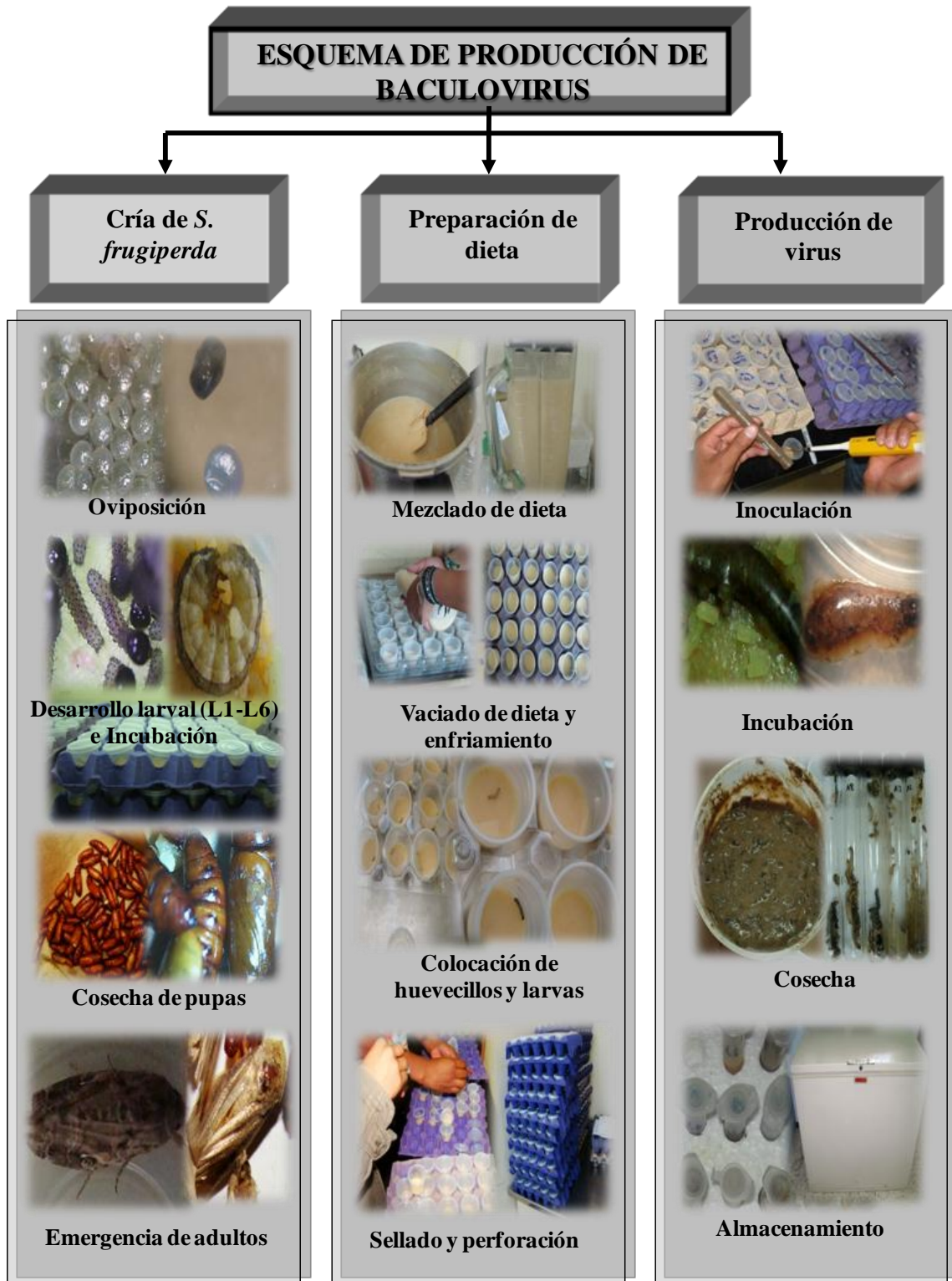


Figura 3. Esquema de producción de baculovirus bajo condiciones de laboratorio.

ARTICULO I

NATURAL ENEMIES OF THE FALL ARMYWORM *SPODOPTERA* *FRUGIPERDA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN COAHUILA, MÉXICO

CLAUDIO RIOS-VELASCO¹, GABRIEL GALLEGOS-MORALES¹, JHONATHAN
CAMBERO-CAMPOS¹, ERNESTO CERNA-CHÁVEZ¹, SERGIO R. SANCHÉZ-
PEÑA¹, MA. CRISTINA DEL RINCÓN-CASTRO² AND MELCHOR CEPEDA-
SILLER¹

¹Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro,
Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25315. Phone
and Fax number (+52844) 4110226. e-mail: riveclaus@gmail.com

²Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-
Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex-Hacienda El Copal, Irapuato, Guanajuato,
México, C.P. 36500. Irapuato-Silao Km 9

ABSTRACT

Larvae of the first three instars of the fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) were collected in corn landraces in Buenavista, Coahuila, México, from July to September, 2009. A total of 1,200 larvae of FAW from 12 samplings were examined in search for biological control agents. Two species of Hyphomycetes entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuilleimin and *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson), were recovered from 11 larvae (0.91%). Twenty four larvae (2.0%) were infected by Nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae). Three species of Braconidae; *Chelonus insularis* Cresson, *Ch. cautus* Cresson and *Ch. sonorensis* (Cameron), two species of Ichneumonidae; *Campoletis sonorensis* (Cameron) and *Pristomerus* sp., and one species of Eulophidae; *Euplectrus plathyphenae* Howard were found. In addition, a tachinid fly *Archytas marmoratus* was recovered from FAW larvae. The biological control agent most widely recovered from FAW larvae was the parasitoid *Ch. insularis*.

Key Words: *Chelonus insularis*, *Chelonus cautus*, *Archytas marmoratus*, *Nomuraea rileyi*, Nucleopolyhedrovirus.

RESUMEN

Larvas de los tres primeros estadios de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (FAW) fueron recolectadas en maíces criollos, en Buenavista, Coahuila, México,

de julio a septiembre de 2009. Un total de 1200 larvas de FAW de 12 muestreos realizados fueron examinadas para la búsqueda de agentes de control biológico de FAW. Dos especies de hongos entomopatógenos Hyphomycetes (*Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuilleimin y *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson) fueron recuperadas de 11 (0.91%) de las larvas. 24 larvas (2.0%) infectadas por Nucleopoliedrovirus (Baculoviridae). Tres especies de Braconidae; *Chelonus insularis* Cresson, *Ch. cautus* Cresson y *Ch. sonorensis* Cameron, dos especies de Ichneumonidae; *Campoletis sonorensis* (Cameron) y *Pristomerus* sp., y una especie de Eulophidae; *Euplectrus plathyphenae* Howard. Además de un tachínido *Archytas marmoratus* fueron recuperadas de larvas. El agente de control biológico más ampliamente representado sobre larvas de FAW fue el parasitoide *Chelonus insularis*.

Palabras Clave: *Chelonus insularis*, *Chelonus cautus*, *Archytas marmoratus*, *Nomuraea rileyi*, Nucleopoliedrovirus

The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) is the main insect pest of corn and other crops in Latin America (Castillejos et al. 2002; Hernández et al. 2008). In Central America if the crop infection exceeds 55%, it can be reflected in production reduction from 15-73% (Hruska & Gould 1997). The larvae cause severe damage in all phenological stages of the plant (Villa-Castoreña & Catalan-Valencia 2004). Control has been with synthetic pesticides (Cisneros et al. 2002); however, this method is inefficient and causes chronic poisoning to growers in México due to incorrect use (Tinoco & Halperin 1998). This has led to the search of other options to manage *S. frugiperda* such

as the use of natural enemies. Twenty two species of natural enemies have been reported in various parts of México (Molina-Ochoa et al. 2004). In the northern states the parasitoids associated to FAW are hymenopterous and in southern states include tachinids fly (Molina-Ochoa et al. 2001; Delfín-González et al. 2007). Due to the high level of natural control found, the study of these organisms has increased (Molina-Ochoa et al. 2001; Molina-Ochoa et al. 2004; Ruíz-Nájera et al. 2007). The objective of this research was to identify the natural enemies of the fall armyworm as well as the level of parasitism in the area of Buenavista, Coahuila, México.

MATERIALS AND METHODS

Larval Sampling and Parasitoids Identification

-Twelve-weekly samplings of FAW larvae were made from July to September in corn fields infested with *S. frugiperda* at the “El Bajío” experimental station of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. The station is located at 25° 23’ N, 101° 00’ W and at an altitude of 1743 m. In each sampling date 100 larvae of the first three instars were randomly collected with healthy appearance, and placed in 1 oz. plastic cups containing an artificial diet (Southland Products Incorporated) and incubated in a bioclimatic chamber at 25±2 °C with a photoperiod of 12:12 (L:D) and 50-60% RH. Parasitoids were recovered, tagged and preserved in 70% alcohol for further mounting and identification using the taxonomic keys (Werner 1973; Gibson et al. 1997; Triplehorn & Johnson 2005). Confirmation and identification of the specimens was

made by Dr. Alejandro González Hernández (Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Nuevo León, en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México).

Recovery of Entomopathogens

-Entomopathogenic fungi From dead larvae, were cultured in moist chambers and purified in an artificial medium of potato dextrose agar (PDA) complemented with corn liquor for *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuilleiman and V8-Agar for *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson), at a pH of 6.0. The purified entomopathogens *N. rileyi* and *B. bassiana* were identified according to their micro and macroscopic characteristics such as phialides and conidias from typical structures of vegetative reproduction and semi permanently mounting them in slides with lactophenol and observed under the microscope at 400X (Ignoffo 1981; Barnett 1986).

Larvae with symptoms of viral infection, such as loose skin, white or blackish appearance, loss of appetite, slow movements and those hanging with their false legs to the top of the containers, were processed by taken samples of these larvae (occlusion bodies) dying the preparations with 0.4% Giemsa stain (Muñoz et al. 2001). Identification was made at the Parasitology Dept., based on the occlusion bodies (OBs) which show polyhedral characteristics of the nucleopolyhedrovirus group (NPV), which are very easily seen under the contrast phase.

The percentage of parasitism was calculated based on the total number of larvae of *S. frugiperda* which were positive for parasitoids and entomopathogens over the total

number of larvae of the same species collected multiplied by 100. The rate of parasitism was calculated according to Pair *et al.* (1986), using the following formula:

$$RP = N_{pi} / N_t \times 100$$

Where: N_{pi} is the number of parasitized individuals of species i ; and N_t is the number total of individuals collected.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 1200 larvae of *S. frugiperda* were collected obtaining and 526 (43.83%) larvae were killed by parasitoids and parasites such as Hymenoptera (Ichneumonidae, Braconidae, Eulophidae) and Diptera (Tachinidae), as well as by entomopathogens (Nucleopolyhedrovirus, *N. rileyi* and *B. bassiana*). Sixty-eight (5.7%) died from unknown causes and the remainder of the larvae (674) reached the adult stage (Table 1). There was some mortality of the parasitoids before emergence of the adult parasitoids (132), which represent 11% of the total obtained. Cortéz *et al.* (2008), refer to a higher percentage of dead larvae (62.8%), by unknown causes and 13.8% that reached the adult stage.

Parasitoids caused 35.25 % parasitism o the FAW larvae. The highest percentage of partial parasitism was registered in the sampling of August 12th with 69% and the lowest (6 %) during the first sampling date of July 08 (Table 1). Cortéz *et al.* (2008), and

Armenta et al. (2008), reported a parasitism rate of 23.3% and 32.2% for Sinaloa and Sonora, México respectively.

Parasitoids Species and Percent Parasitism

Braconidae was the best represented with 261 specimens (21.75% of total parasitism), in which 257 were from *Chelonus insularis* (21.42%), *Ch. cautus* (0.25%) and *Ch. sonorensis* (0.08%) (Table 2). Ashley (1986) and Andrews (1988), reported 63% parasitism of *Ch. insularis* in South Florida and Molina-Ochoa et al. (2004) reported a similar percent of parasitism in Michoacán Mexico (45.3%). On the other hand, Cortéz et al. (2008), and Molina-Ochoa et al. (2001) reported low parasitism for this species in Colima (2.3%) and Sinaloa, Mexico (5.0%). For *Ch. sonorensis*, Armenta et al. (2008), registered a 7.3% of parasitism on larvae of *S. frugiperda* in Sonora, México. As for *Ch. cautus*, Ruíz-Nájera et al. (2007), and Cruz-Sosa et al. (2007), reported low level of parasitism, similar to the findings on this research survey.

Ichneumonidae showed low levels of parasitism (1.17%). This information is similar to that reported by Molina-Ochoa et al. (2001), and Murúa et al. (2006), with 1.3% of parasitism. *Pristomerus* sp. presented a low level of parasitism (0.42%), which was similar to the 0.24% reported by Ruiz-Nájera et al. (2007) and under the 2.0% found by Cortéz et al. (2008) in Chiapas and Sinaloa, México respectively (Table 2). However, Armenta et al. (2008) cited a 5.4% parasitism in Sonora, México. *C. sonorensis* showed a parasitism level of 0.75%, contrasting with that obtained by Cruz-Sosa (2007) that mentioned as the most abundant specie in Oaxaca, México.

Euplectrus plathyphenae (Eulophidae) showed 0.42% parasitism, less than the reported by Ruiz-Nájera et al. (2007); Delfín-González et al. (2007) in Chiapas and Yucatán, México (3.53 and 6.32%) respectively.

The tachinids fly *Archytas* spp. have been reported attacking *S. frugiperda* in several areas in Latin America (Andrews 1988). Although Pair et al. (1986) reported that *A. marmoratus* was the primary parasitoid attacking FAW larvae in whorl-stage corn throughout in the southern United States and northeastern Mexico, only a 0.92% parasitism by *A. marmoratus* was found in this research. However, Ashley (1986) mentioned that members of this family show low levels of parasitism. Ruiz-Nájera et al. (2007) and Murúa et al. (2006), reported 3.04 and 5.7% of parasitism for *Archytas* spp. in Chiapas, Mexico and the southeast of Argentina respectively. On the other hand Gross & Pair (1991), refers to *A. marmoratus* with high levels of parasitism over 4th and 6th larval instars of FAW.

Entomopathogens Species

-The mortality percentage caused by entomopathogens, NPV, *N. rileyi* and *B. bassiana* were of 2.0, 0.75 and 0.08% respectively (Table 2). Such these control agents have been reported as natural biological control agents in the same area (Rios et al. 2008; Rios et al. 2009; Sánchez-Peña 2000). Lezama-Gutiérrez et al. (2001), mentioned *N. rileyi* as the most abundant and extensively distributed fungi in western México, attacking larvae of

FAW. They also reported the presence of *B. bassiana* in low numbers on *S. frugiperda* larvae coinciding with the information found in this research survey.

From all natural enemies found, the most frequent affecting *S. frugiperda* larvae was *Ch. insularis* and the most representative entomopathogen was NPV. Data indicate that the results obtained in this investigation show the participation of several parasitoids and entomopathogens regulating FAW population on corn in Buenavista, Coah. México.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Alejandro González Hernández for identification and confirmation of parasitoids.

REFERENCED CITED

- ANDREWS, K. L. 1988. Latin American research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomol. 71: 630-653.
- ARMENTA-CÁRDENAS, I., CORTEZ, M. E., COLÍN, A. M. M., PÉREZ, M. J., AND BAHENA, J. F. 2008. Reporte preliminar de parasitoides asociados a gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en el sur de Sonora, México, pp. 80-83. *En Memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico*. Soc. Mex. Contr. Biol. Noviembre 17-21, 2008. Zacatecas, Zacatecas, México.

- ASHLEY, T. R. 1986. Geographical distributions and parasitization levels for parasitoids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Florida Entomol. 69:516-524.
- BARNETT, G. J., AND HUNTER, B. B. 1986. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. McMillan Publishing Company. USA, 218 p.
- CASTILLEJOS, V., TRUJILLO, J., ORTEGA, L. D., SANTIZO, J. A., CISNEROS, J., PENAGOS, D. I., VALLE, J., AND WILLIAMS, T. 2002. Granular phagoestimulant nucleopolyhedrovirus formulations for control of *Spodoptera frugiperda* in maize. Biological Control. 24:300-310.
- CISNEROS, J., PEREZ, J. A., PENAGOS, D. I., RUIZ, V. J., GOULSON, D., CABALLERO, P., CAVE, R. D., AND WILLIAMS, T. 2002. Formulation of a Nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. Biological Control. 23:87-95.
- CORTÉZ-MONDACA, E., FIERRO, C. J. M., BAHENA, J. F., MACHADO, T. E. J., AND REYES, R. M. A. 2008. Reporte preliminar de parasitoides de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith en maíz, en Sinaloa, México, pp. 76-80. *En* Memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico. Soc. Mex. Contr. Biol. Noviembre 17-21, 2008. Zacatecas, Zacatecas, México.
- CRUZ-SOSA, E., MARTÍNEZ, L. M., JARQUÍN, R. L., AND PÉREZ, N. P. 2007. Parasitismo del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae), en Oaxaca, México, pp. 70-73. *En* Memorias del XXX Congreso Nacional de Control Biológico- Simposio del IOBC. Soc. Mex. Contr. Biol. Noviembre 2007. Mérida, Yucatán.

- DELFIN-GONZÁLEZ, H., BOJÓRQUEZ-ACEVEDO, M., AND MANRIQUE-SAIDE, P. 2007. Parasitoids of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) from a traditional maize crop in the Mexican State of Yucatan. *Florida Entomol.* 90:759-761.
- GIBSON, G. A. P., HUBER, J. T., AND WOLLEY, J. B. 1997. Annotated keys to genera of Nearctic Chalcidoidea (Hymenoptera). National Research Council of Canada. Canada. 793 p.
- GROSS, H. R., AND PAIR, S. D. 1991. Seasonal distribution, response to host developmental stage, and screened-cage performance of *Archytas marmoratus* (Diptera: Tachinidae) and *Ophion flavidus* (Hymenoptera: Ichneumonidae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomol.* 74 (2): 237-245.
- HERNÁNDEZ-MENDOZA, J. L., LÓPEZ-BARBOSA, E. C., GARZA-GONZÁLEZ, E., AND PÉREZ, M. N. 2008. Spatial distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize landraces grown in Colima, México. *Inter. J. of Trop. Insect Sci.* 28: 126-129.
- HRUSKA, A. J., AND GOULD, F. 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *J. Econ. Entomol.* 90:611-622.
- IGNOFFO, C. M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi*. *En: Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980*. Burges, H. D. (Ed.), Academic Press, London, New York, p. 523-538.
- LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., HAMM, J. J., MOLINA-OCHOA, J., LÓPEZ-EDWARDS, M., PESCADOR-RUBIO, A., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M., AND STYER, E. L. 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda*

- (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. Florida Entomol. 84 (1): 23-30
- MOLINA-OCHOA, J., HAMM, J. J., LEZAMA-GUTIERREZ, R., LÓPEZ-EDWARDS, M., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M., AND PESCADOR-RUBIO, A. 2001. A survey of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) parasitoids in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco, and Tamaulipas. Florida Entomol. 84:31-36.
- MOLINA-OCHOA, J., CARPENTER, J. E., LEZAMA-GUTIERREZ, R., FOSTER J. E., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M., ÁNGEL-SAHAGÚN, C. A., AND FARÍAS-LARIOS J. 2004. Natural distribution of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in México. Florida Entomol. 87: 461-472.
- MUÑOZ, D., MABEL, M. A., MURILLO, R., RUIZ, DE E.I., AND VILAPLANA, L. 2001. Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus, p. 478-518. *En* P. Caballero., T. Williams & M. López (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, España.
- MURÚA, G., MOLINA-OCHOA, J., AND COVIELLA, C. 2006. Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its hymenopteran parasitoids in Northwestern Argentina. Florida Entomol. 89: 175-182.
- PAIR, S. D., RAULSTON, J. R., SPARKS, A. N., AND MARTIN P. B. 1986. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) parasitoids: differential spring distribution and incidence on corn and sorghum in the Southern United States and Northeastern México. Environ. Entomol. 15: 342-348.

- RIOS-VELASCO, C., GALLEGOS-MORALES, G., AND CEPEDA-SILLER, M. 2009. Caracterización biológica de un aislado del virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera frugiperda* en Buenavista, Saltillo, Coahuila, pp. 397-401. *En* Memorias del XLIV Congreso Nacional de Entomología. Soc. Méx. Entomol. Junio 29- Julio 01, 2009. San José del Cabo, Baja California Sur, México.
- RIOS-VELASCO C., GALLEGOS-MORALES, G., CEPEDA-SILLER, M., SÁNCHEZ-PEÑA, S.R., AND CERNA-CHÁVEZ, E. 2008. Presencia natural de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson infectando al gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, en Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, pp. 392-394. *En* memorias del XXXI Congreso Nacional de Control Biológico. Soc. Mex. Contr. Biol. Noviembre 17-21, 2008. Zacatecas, Zacatecas, México.
- RUÍZ-NÁJERA, R. E., MOLINA-OCHOA. J., CARPENTER, J. E., ESPINOSA, M. J. A., RUÍZ, N. J. A., LEZAMA, G. R., AND FOSTER, J. E. 2007. Survey for hymenopteran and dipteran parasitoids of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Chiapas, México. *J. Agric. Urban Entomol.* 24(1): 35–42
- SÁNCHEZ-PEÑA, S. R. 2000. Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in México. *BioControl*, 45: 63-78.
- TINOCO, R., AND HALPERIN, D. 1998. Poverty, production and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase through occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, México. *Arch. Environ. Health.* 53:29-35.
- TRIPLEHORN, C. A., AND JOHNSON, N. F. 2005. *Study of insects.* 7th Edition. Thompson Brooks/Cole. USA. 864 p.
- VILLA-CASTOREÑA, MA. M., AND CATALÁN-VALENCIA, E. A. 2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

(Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. *Folia Entomol. Mex.* 43:307-312.

WERNER, F. G. 1973. Keys for identification of parasitic insects in Arizona agricultural areas. Technical Bulletin 236. University of Arizona, Tucson Arizona. 39 p.

TABLE 1. PERCENTAGE OF PARASITISM OF NATURAL ENEMIES OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA* LARVAE FOUND IN CORN LANDRACES IN BUENAVISTA, COAHUILA, 2009.

Date Month and day	Total of larvae collected	Parasitized Larvae	Parasitoids emerged	% of parasitism by date	Entomopathogens			Died from unknown causes
					NPV	<i>N. rileyi</i>	<i>B. bassiana</i>	
08-jul	100	6	6	6	1	0	0	0
15-jul	100	33	18	33	4	0	0	8
22-jul	100	29	18	29	3	0	0	12
29-jul	100	56	43	56	0	0	0	13
05-ago	100	51	26	51	4	0	0	11
12-ago	100	69	29	69	2	2	0	5
19-ago	100	35	30	35	2	0	0	2
26-ago	100	32	28	32	1	1	0	0
02-sep	100	24	19	24	1	0	1	2
09-sep	100	31	30	31	0	0	0	0
16-sep	100	30	21	30	3	5	1	13
25-sep	100	27	23	27	3	1	0	2
Total	1200	423	291	35.25	24	9	2	68

NPV: Nucleopolyhedrovirus

TABLE 2. NATURAL ENEMIES IDENTIFIED OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA* LARVAES FOUND IN CORN LANDRACES IN BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, 2009.

Natural enemies	July				August				September				Total	% Parasitism
	8	15	22	29	5	12	19	26	2	9	16	25		
Hymenoptera														
Braconidae														
<i>Chelonus insularis</i>	0	8	7	39	17	26	19	13	38	29	26	35	257	21.42
<i>Chelonus cautus</i>	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0.25
<i>Chelonus sonorensis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.08
Ichneumonidae														
<i>Campoletis sonorensis</i>	0	0	0	1	0	3	0	0	5	0	0	0	9	0.75
<i>Pristomerus</i> sp.	0	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	1	5	0.42
Eulophidae														
<i>Euplectrus plathyphenae</i>	0	0	2	0	0	0	1	0	0	2	0	0	5	0.42
Diptera														
Tachinidae														
<i>Archytas marmoratus</i>	0	5	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0.92
Entomopathogens														
<i>Nomuraea rileyi</i>	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	5	1	9	0.75
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0.16
NPV	1	4	3	0	4	2	2	1	1	0	3	3	24	2.0
Total	3	18	18	40	21	35	24	15	46	31	35	40	326	27.17

NPV = Nucleopolyhedrovirus

ARTICULO II

INSECTICIDAL ACTIVITY OF NATIVE ISOLATES OF *SPODOPTERA FRUGIPERDA* MULTIPLE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS FROM SOIL SAMPLES IN MEXICO

CLAUDIO RIOS-VELASCO¹, GABRIEL GALLEGOS-MORALES¹, MA. CRISTINA DEL RINCÓN-CASTRO², ERNESTO CERNA-CHÁVEZ¹, SERGIO R. SANCHÉZ-PEÑA¹ AND MELCHOR CEPEDA-SILLER¹

¹Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25315. Phone and Fax number (+52844) 4110226. e-mail: riveclaus@gmail.com

²Departament de Aliments, Divisi3n de Ci3ncies de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex-Hacienda El Copal, Irapuato, Guanajuato, México, C.P. 36500. Irapuato-Silao Km 9

ABSTRACT

The fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) is the main insect pest of corn in Latin America. The larvae are susceptible to *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV), a potentially effective entomopathogenic agent for biological control. In pursuit of an alternative to chemical control of *S. frugiperda*, native isolates of NPVs to control of this pest were used. Ten isolates were collected from soil of corn plots infested with *S. frugiperda* in the states of Coahuila, Nuevo Leon and Nayarit, Mexico. Bioassays were performed to determine the biological response of larvae to baculovirus infection. The isolates were evaluated in third instar larvae of *S. frugiperda* to select the most effective isolate. In the bioassays, larvae were fed on artificial diet inoculated superficially with viral occlusion bodies (OBs) (concentration range of 2.0×10^1 to 4.0×10^6 OBs/mm²). The virus strains isolate from Coahuila SfMNPV-AN₂ was highly infectious, with a mortality of 100% at a concentration of 2.0×10^3 OBs/mm². The median lethal concentration (LC₅₀) was 5.7×10^2 OBs/mm² and the mean time to dead was 6.5 ± 0.5 days. Additional bioassays of the same isolate were performed in all instars to determinate mortality. The LC₅₀ increased as the size of the insect increased from 1.15×10^2 to 2.4×10^7 OBs/mm² from first to fifth instar, respectively. A similar pattern occurred with the mean time to dead which ranged from 4 to 8 days. It was demonstrated that the isolation of NPV from soil yield highly virulent isolates of SfMNPV.

Key Words: Fall armyworm, Nucleopolyhedrovirus, Bioassay, Lethal concentration, Lethal time, Geographic isolates.

RESUMEN

El cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) es la principal plaga de maíz en Latinoamérica. Las larvas son susceptibles a un nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV), un entomopatógeno efectivo con gran potencial como agente de control biológico. En la búsqueda de una alternativa al control químico de *S. frugiperda*, se usaron aislados nativos de baculovirus para el control de esta plaga. Diez aislados fueron recolectados de suelo de parcelas de maíz infestados con *S. frugiperda* en los estados de Coahuila, Nuevo León y Nayarit, México. Se realizaron bioensayos para determinar la respuesta biológica de las larvas a la infección por baculovirus. Los aislados fueron evaluados en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* para seleccionar el aislado más efectivo. En los bioensayos, las larvas fueron alimentadas con dieta artificial inoculada superficialmente con cuerpos de oclusión (COs) (con un rango de concentraciones de 2.0×10^1 a 4.0×10^6 COs/mm²). La cepa de virus aislado de Coahuila SfMNPV-AN₂ fue altamente infecciosa, con una mortalidad del 100 % a una concentración de 2.0×10^3 COs/mm². La concentración letal media (CL₅₀) fue de 5.7×10^2 COs/mm² y el tiempo medio de muerte fue de 6.5 ± 0.5 días. Bioensayos adicionales del mismo aislado fueron realizados en todos los instares para determinar la mortalidad. La CL₅₀ se incrementa conforme el tamaño del insecto también se incrementa de 1.15×10^2 a 2.4×10^7 COs/mm² para primero y quinto instar, respectivamente. Un patrón similar ocurrió con la media del tiempo para morir, con rangos de 4 a 8 días. Esto demuestra que los aislados de suelo de SfMNPV, son altamente virulentos.

The fall armyworm (FAW), *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is a major pest of corn (*Zea mays* L.) in Latin America (Castillejos et al. 2002). In infested crops, damaged plants may have a reduced biomass and grain accumulation (Hernández-Mendoza et al. 2008), and severe damage can cause complete destruction of seedlings. Control of *S. frugiperda* requires 2-4 applications of chemical insecticides during the growing season and represents a major expense in production of maize (Hruska & Gould 1987). An alternative to control *S. frugiperda* is the integration of natural enemies that attack juvenile stages (Gardner & Fuxa 1980; Ashley 1986). FAW larvae are susceptible to infection by fungi, bacteria, nematodes, protozoa (Gardner & Fuxa 1980; Lezama-Gutiérrez et al. 2001) and baculovirus, specifically *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) (Hughes et al. 1984; Shapiro et al. 1991). This NPV is an effective biopesticide to control this pest, due to its specificity, biosecurity, persistence, and their virulence level, which range from moderate to high (Hunter-Fujita et al. 1998; Fuxa 2004). This virus represents an alternative to chemical control, reducing the risk of resistance development and environmental pollution. Essentially all isolates used against *S. frugiperda* have been isolated from infected insects (Cisneros et al. 2002; Martinez et al. 2003). There are no reports on the obtaining and use of isolates from soil. In this study the biopesticide activity of different isolates of native NPV on *S. frugiperda* larvae were measured.

MATERIALS AND METHODS

Insect colony

-Three hundred *S. frugiperda* larvae of the later instars (fifth and sixth) were collected from a corn infested experimental field of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro in Saltillo, Mexico in 2007. This field is located 25° 23 'N and 101° 00' W, at a 1743 masl. The colony was established under controlled conditions in a growth chamber at 25±2 °C with a 12:12 (L:D) and 50-60% relative humidity, and refreshed periodically with pupae from same site. Larvae were fed with artificial diet (Southland Products Incorporated), until the pre-pupa stage. Healthy pupae were placed in oviposition cages containing strips of paper, as support for oviposition. Once emerged, adults were fed daily with 10% sugar water. Eggs were collected and disinfected with sodium hypochlorite 0.2% to eliminate contaminants, and placed in transparent one-ounce plastic cups (Envases Cuevas S.A. de C.V. Mexico State, Mexico) containing artificial diet. For identification of the pest the keys of the genus *Spodoptera* by Frederick (2005) were used.

Origin and identification of NPV isolates

-Corn plots (1-5 ha) with a planting density of 40,000 to 50,000 plants/ha were sampled in the states of Coahuila (35 samples), Nuevo Leon (70) and Nayarit (15) Mexico. Soil samples were taken by scraping away the upper 5 cm of soil, and collecting soil at depths of 5-10 cm as indicated by Murillo et al. (2006) and Murillo et al. (2007). Each sample consisted of subsamples from five points combined into a total of 600 to 800 g soil from each plot. The samples were classified taking into account the date, plot, and geographical zone from which they were collected. The samples were transported to the Department of Parasitology of the UAAAN and were stored four three weeks prior to

analysis. The ten native isolates SfMNPV, recovered from these samples were processed according to the methodology described by Richards & Christian (1999), taking 25 g sample (W/V) of sieved soil and incorporated twice in 100 ml of artificial diet at a temperature of 50 °C. (1st-2nd instar of *S. frugiperda*) were placed on diet. Larvae that died of polyhedrosis disease were used as inoculum. Each dead larvae was considered an isolate. These viral isolates were amplified in third instar larva with diet contaminated on the surface with the viral suspension according to the methodology described by Murillo et al. (2007). After infection, larvae were reared individually on an artificial diet under controlled conditions. Detection of NPV was made on the basis of occlusion bodies (OBs) which have the polyhedral shape characteristic of this group of viruses, which are observable in a phase-contrast microscope (Carl Zeiss) 400x.

Amplification, purification and titration of isolates

-NPVs were amplified by infection *in vivo* with a viral suspension without purification and were subject to several passages in *S. frugiperda* larvae reared in the laboratory. Viral occlusion bodies (OBs) were extracted from dead diseased larvae by trituration in distilled water and purified by filtration and centrifugation and distributed on the surface of the artificial diet, and allowed to dry at room temperature; third-instar larvae were then placed during 24 h. After this time, larvae were transferred to containers with artificial diet without virus and incubated for a period of 10 to 12 days. At the end, the viruses were purified according to the methodology described by Muñoz et al. (1997) and Muñoz et al. (2001). The OBs concentration was quantified and calculated with an Improved Neubauer chamber (Blau Brand, Germany) under a phase-contrast

microscopy. This data was used to calculate the number of OBs, provided to larvae; the concentration was expressed in number of occlusion bodies/mm² of artificial diet (OBs/mm²). The purified OBs were stored in aliquots of 500 µl of distilled water until required at 0 °C.

Preliminary study of native isolates of SfMNPV

-For lethal concentration bioassays of the different viral isolates, artificial *S. frugiperda* diet was prepared in plastic cups. Different dilutions of each isolate were prepared in sterilized water from stocks of purified polyhedra. The Median lethal concentration (LC₅₀) of the ten isolates was determined by the surface contamination technique from the diet, using transparent one-ounce plastic cups. Each container with diet was inoculated with seven viral concentrations from 2.0 x10¹ to 4.0 x10⁶ OBs/mm². Subsequently, they were allowed to dry at room temperature and 20 larvae by replicate were infected individually (N=60 for each instar), and placed individually in cups for each OBs concentration, until death by virus and/or reach adulthood. Larvae used as control in the bioassay, were placed in cups with diet without virus, treated only with sterile distilled water, where they remained until the end of the bioassay. Cups were inspected daily, and the number of deaths recorded. All dead larvae were kept in the containers. To determine the mean time of death, mortality was measured daily for 25 days, until larvae death or pupation. To confirm the viral infection as a cause of death, larvae were examined by microscopic observation of OBs of the hemolymph of the larvae. These bioassays were repeated three times using the same number of larvae. Mortality was corrected by Abbott's (1925) formula and established a line of

concentration-mortality regression, and the confidence limits by using the statistical computational program SAS Proc Probit System version 9.0 (SAS, 2002).

Bioassays with isolate SfMNPV-AN₂

-Based on the highest mortality and shortest time LC₅₀ through death from above to the most effective isolate (SfMNPV-AN₂) was selected (Table 1), and bioassays were conducted on five *S. frugiperda* instars (Table 2). To determine the LC₅₀ and mean time to death, a purified suspension and entitled, as described above was used. The LC₅₀ and the average time of death were determined using the technique of surface contamination of the diet in one-ounce plastic cups, where larvae were placed individually. Seven concentrations were used for this purpose from 1.0 x10¹ to 1.0 x10⁷ OBs/mm². Each plastic cup was contaminated with these suspensions and allowed to dry at room temperature. Bioassays with 20 larvae of each instar per virus concentration and a control were replicated three times. Larvae were stored at 25±2 °C, and larval mortality was recorded every 12 h until the insects had either died or pupated (25 days), to determine the average time of death after infection.

Statistical analysis

-The period between introduction in the container and death by virus for each larvae was recorded. Abbott's (1925) formula was used to correct mortality. The means of each treatment were analyzed using the Tukey's test (P<0.05) The LC₅₀ values and the estimated confidence intervals for the five larval instars were calculated by the Probit

method using the statistical program SAS Proc Probit System view 9.0 (SAS 2002). Analysis was performed using the Generalized Linear Modelling Program (GLM), to estimate the mean time to death of the larvae in each treatment

RESULTS AND DISCUSSION

Soil samples of NPV collected

-Of a total of 120 soil samples collected and analyzed, 10 samples were positive to SfMNPV. While performing bioassays, the isolates were determined and some were caused to cause significant mortality levels in *S. frugiperda* larvae. Table 1 shows the LC₅₀s and confidence limits of ten NPV isolates tested against third instar FAW larvae. The isolate SfMNPV-AN₂ of Coahuila was as the most infective, causing 100% mortality at a concentration of 2.0×10^3 OBs/mm² and an LC₅₀ of 5.7×10^2 OBs/mm² with a mean time death of 6.5 ± 0.5 days was found. The second most virulent isolate was the SfMNPV-NAY from Nayarit, with an LC₅₀ of 7.5×10^3 OBs/mm². For the rest of the isolates, LC₅₀s ranged from 1.2×10^4 to 1.5×10^6 OBs/mm² and the average time of death ranged between 6 and 11 days post-infection.

Susceptibility of *S. frugiperda* instars to SfMNPV-AN₂

-While performing the bioassays with isolated SfMNPV-AN₂, the presence of OBs was observed in all infected larvae under the microscope. This isolate proved to be more

pathogenic than others and very efficient at inducing high mortalities in larval populations of the five instars of *S. frugiperda* tested.

The LC_{50} 's of SfMNPV-AN₂ show a positive correlation. It was found that the first two instars are more susceptible at (LC_{50} 's 1.15×10^2 and 3.6×10^2 OBs/mm²), when compared with the last larval stages (LC_{50} of 2.4×10^7 on fifth instar). LC_{50} of sixth instar larvae could not be determined because they usually reached the stage of pre-pupae and pupae, respectively (Table 2). The time of death ranged from four to eight days post-inoculation from first to fifth instars, respectively.

OBs persist in the environment for considerable periods of time, particularly when they are protected from degradation by UV rays (Carruthers et al. 1988). In this regard, Cory & Myers (2003) and Christian et al. (2006), report that the eventual reservoir for most of the viruses is the soil where the OBs of nucleopolyhedrovirus strongly adhere to particles, especially clays, where they remain protected from sun exposure. The soil is possibly very important in host-NPV population, but this depends on the speed of transport of OBs by splashing rain or by dragging arthropods on the underside of the floor area where they can be transmitted to susceptible insects (Fuxa & Richter 2001).

The ten geographic isolates of NPV tested against *S. frugiperda* third instar showed to be pathogenic; the mortality ranged from 82 to 100%. However, there were variations in virulence reflected in LC_{50} and average time of death (Table 1).

Baculovirus-infected larvae exhibit a characteristic set of symptoms that were manifested in one or more days, after the start of the infection depending on dose, instar and temperature (Sciocco 2001). In this regard, Mazzone (1985), mentions that in a baculovirus infection in the affected larvae have no symptoms during the first days after infection. Larvae killed by the action of the virus are usually attached by their pseudopodia to the top of the container (Vásquez et al. 2002; Lynn 2002; Herniöu et al. 2003). In most NPVs, larvae collection is complicated because, the break of the cuticle and the liquefaction of internal organs of the host occurred immediately after death, making it difficult to recover them complete (Vasconcelos et al. 1996; Federici 1997; Toprak & Gürkan, 2004). Infected larvae loose their appetite and soon stopped feeding and grew slowly than healthy larvae (Tanada & Kaya 1993).

Data on pathogenic isolates of NPV in *S. frugiperda* larvae have been reviewed by Hughes et al. (1984); Gómez et al. (1999) and Escribano et al. (1999). Sciocco (2001), emphasizes that mortality of larvae will depend on the pathogenicity and virulence of the isolates, ingested dose, host susceptibility, nutritional status, development speed, age, size of the larvae, temperature, etc. Vásquez et al. (2002) reported an LD₅₀ of 4.9 x10⁴ OBs/larvae on third instar *S. frugiperda* and an average time of death of 6.2 to 7.6 days post-inoculation. The SfMNPV-AN₂ isolated with an LC₅₀ 5.7x10² with the technique of surface contamination of the diet and time through death of 6.5±0.5 days post-inoculation is similar in terms of LC₅₀'s and mean time of death, with previous studies. Martínez et al. (2003) and Vásquez et al. (2002), reported mortalities of 63 to 100% of third instar *S. frugiperda* larvae when treated with NPV. The results of LC₅₀ in this work are lower than those found by Martínez et al. (2003), who indicate an LC₅₀ of 3.4x10⁴

OBs/larvae in *S. frugiperda* third instar and mean death time of 3.9 days post-inoculation. In this regard Starnes et al. (1993) and Moscardi (1999), mention that the time of death of the insect depends on the species, but is usually 3 to 7 days; but may go up to 3 to 4 weeks, depending on the interactions between virus, insect, food and temperature.

The first instar is more susceptible to NPV with an LC_{50} of 1.15×10^2 OBs/mm², this result is similar to that reported by Cisneros et al. (2002) for the same insect. Gómez et al. (1999), working with 7 geographical isolates from Argentina, Guatemala and the United States against *S. frugiperda* second instar found LC_{50} s from 5×10^3 to 2.5×10^4 OBs/ml, with a mean time of death of 8.3 to 10 days, which are higher than those found in this study, because the isolated SfNPV-AN₂ in second instar larvae showed an LC_{50} of 3.6×10^2 OBs/mm². Escribano et al. (1999), reported 1.23×10^7 and 2.04×10^5 OBs/ml for *S. frugiperda* second instar with isolates Sf-NIC and Sf-2 respectively. The same authors report that the isolated Sf-NIC over larvae of third, fourth and fifth instars showed LC_{50} s of 8.05×10^5 , 1.66×10^7 and 1.84×10^8 OBs/ml respectively. These results are higher than those found in this study. Martínez et al. (2003), reported LC_{50} s for second and fourth instars with a 3.1×10^5 and 2.6×10^4 and an average time of death, 4.1 and 5.3 days post-inoculation. The time required for the virus to cause larval death increases according to the instars, as noted by Martínez et al. (2003), which reported an increase in lethal time mortality rate of 3 to 8 days post-inoculation in the first and sixth instars at the end of 12 days of evaluation, also mentioning that the variation in LC_{50} and LT_{50} *S. frugiperda* larvae are due to the initial inoculation concentration, and larval bioassay method used. In this regard Escribano et al. (1999), reported an increase in the mean time of death in

the second to the fifth instar larvae varied from 4.3 to 5.7 days. Based on these results we conclude that in Mexico there are native isolates of nucleopolyhedrovirus in soil with potential for use in biological control of *S. frugiperda*.

REFERENCED CITED

- ABBOTT, W. S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entomol. 18: 265-267.
- ASHLEY, T. R. 1986. Geographical distribution and parasitization levels for parasitoids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Florida Entomol. 69: 516-524.
- CARRUTHERS, W. R., CORY J. S., AND ENTWISTLE, P. F. 1988. Recovery of pine beauty moth *Panolis flammea* nuclear polyhedrosis virus from pine foliage. J. Invertebr. Pathol. 52:27-32.
- CASTILLEJOS, V., TRUJILLO J., ORTEGA L. D., SANTIZO, J. A., CISNEROS, J., PENAGOS, D. I., VALLE, J., AND WILLIAMS, T. 2002. Granular phagoestimulant nucleopolyhedrovirus formulations for control of *Spodoptera frugiperda* in maize. Biol. Contr. 24: 300-310.
- CHRISTIAN, P. D., RICHARDS, A. R., AND WILLIAMS, T. 2006. Differential adsorption of occluded and nonoccluded insect-pathogenic viruses to soilforming minerals. Appl. Environ. Microbiol. 72, 4648-4652.
- CISNEROS, J., PÉREZ, J. A., PENAGOS, D.I., RUIZ, V. J., GOULSON, D., CABALLERO, P., CAVE, R. D., AND WILLIAMS, T. 2002. Formulation of a

- nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize. Biol. Contr. 23: 87-95.
- CORY J. S., AND MYERS, J. H. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 34: 239-272
- ESCRIBANO, A., WILLIAMS, T., GOULSON, D., CAVE, R. D., CHAPMAN, J. W. AND CABALLERO, P. 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. J. Econ. Entomol. 92: 1079-1085.
- FEDERICI, B. 1997. Baculovirus pathogenesis, p. 33-60. In L.K. Miller (ed.). The Baculoviruses. Plenum Press, Nueva York, EEUU.
- FREDERICK, W. S. 2005. Order Lepidoptera, p. 288.596. In W.S. Frederick (ed.). Inmature Insects. Vol. 1. Kendall/Hunt, EEUU.
- FUXA, J. R. 2004. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. Agric. Ecosyst. Env. 103: 27-43.
- FUXA, J. R., AND RICHTER, A. R. 2001. Quantification of soil-to-plant transport of recombinant nucleopolyhedrovirus: effects of soil type and moisture, air currents, and precipitation. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5166–5170.
- GARDNER, W. A., AND FUXA, J. R. 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. Florida Entomol. 63: 439-447.
- GÓMEZ, S. A., MOSCARDI, F., AND SOSA-GÓMEZ, D. R. 1999. Susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. Pesq. Agropec. Bras., Brasilia. 34: 1539-1544.
- HERNÁNDEZ-MENDOZA, J. L., LÓPEZ-BARBOSA, E. C., GARZA-GONZÁLEZ, E., AND MAYEK-PÉREZ, N. 2008. Spatial distribution of *Spodoptera frugiperda*

- (Lepidoptera: Noctuidae) in maize landraces grown in Colima, México. *Inter. J. of Trop. Insect Sci.* 28: 126-129.
- HERNIÖU, E. A., OLSZEWSKI, J. A., CORY, J. S. AND O'REILLY, D. R. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu. Rev. Entomol.* 48: 211-234.
- HRUSKA, A. J., AND GOULD, F. 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *J. Econ. Entomol.* 90: 611-622.
- HUGHES, P. R., WOOD, H. A., BURAND, J. P., AND GRANADOS, R. R. 1984. Quantification of the dose-mortality response to *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis viruses: Applicability of an exponential model. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 343-350.
- HUNTER-FUJITA, F. R., ENTWISTLE, P. F., EVANS, H. F., AND CROOK, N. E. 1998. *Insect viruses and pest management*. Wiley, Chichester, UK. 632 p.
- LASA, R., CABALLERO, P., AND WILLIAMS, T. 2007. Juvenile hormone analogs greatly increase the production of a nucleopolyhedrovirus. *Biol. Contr.* 41: 389-396.
- LEZAMA-GUTIÉRREZ, R., HAMM, J. J., MOLINA-OCHOA, J., LÓPEZ-EDWARDS, M., PESCADOR-RUBIO, A., GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M., AND STYLER, E. L. 2001. Occurrence of entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican states of Michoacán, Colima, Jalisco and Tamaulipas. *Florida Entomol.* 84: 23-30.
- LYNN, D. E. 2002. Effects of temperature on the susceptibility of insect cells to infection by baculoviruses. *Methods Cell Sci.* 23: 221-225.

- MARTÍNEZ, A. M., SIMÓN, O., WILLIAMS, T., AND CABALLERO, P. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *Entomol. Exp. Appl.* 109: 139-146.
- MAZZONE, H. M. 1985. Pathology associated with baculovirus infection, p. 81-120. *In* K. Maramorosch & K.E. Sherman (eds.). *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, Orlando, FL.
- MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.
- MUÑOZ, D., VLAK, J. M., AND CABALLERO, P. 1997. *In vivo* recombination between two strains of the genus *Nucleopolyhedrovirus* in its natural host, *Spodoptera exigua*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3025-3031.
- MUÑOZ, D., MABEL, M. A., MURILLO, R., RUIZ E. I., AND VILAPLANA, L. 2001. Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus, p. 478-518. *In* P. Caballero., T. Williams & M. López (eds.). *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma, España.
- MURILLO, R., MUÑOZ D., RUÍZ-PORTERO, M. C., ALCÁZAR, M. D., BELDA, J. E., WILLIAMS, T., AND CABALLERO, P. 2007. Abundance and genetic structure of nucleopolyhedrovirus populations in greenhouse substrate reservoirs. *Biol. Contr.* 42: 216-225.
- MURILLO, R., ELVIRA, S., MUÑOZ, D., WILLIAMS, T., AND CABALLERO, P. 2006. Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain. *Biol. Control.* 38, 157–175.

- RICHARDS, A. R., AND CHRISTIAN, P. D. 1999. A rapid bioassay screen for quantifying nucleopolyhedroviruses (Baculoviridae) in the environment. *J. Virol. Meth.* 82, 63–75.
- SAS INSTITUTE. 2002. “SAS User’s Guide. Version 9.0.” SAS Institute, Cary, NC USA.
- SCIOCCO, A. 2001. Biología y patogénesis de los baculovirus, p. 48-71. *In* P. Caballero., T. Williams & M. López (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, España.
- SHAPIRO, D.I., FUXA, J.R., BRAYMER, H.D., AND PASHLEY, D.B. 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolate of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 96-105
- SHAPIRO, M. 1986. *In vivo* production of baculoviruses, p. 31-62. *In* R.R. Granados & B.A. Federici (eds.). The biology of Baculovirus, vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL.
- SHERMAN, K. E. 1985. Considerations in the large-scale and commercial production of viral insecticides, p. 757-774. *In* K. Maramorosch & K.E. Sherman (eds.). Viral insecticides for biological control. Academic Press, Orlando, FL.
- STARNES, R. L., LIU C. L., AND MARRONE, P. G. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. *Am. Entomol.* 39: 83–91.
- TANADA, Y., AND KAYA, H. 1993. Insect pathology, p. 171-244. *In* Y. Tanada & H. Kaya (eds.). Baculoviridae. Academic Press. San Diego, California, 666p.
- TOPRAK, U., AND GÜRKAN, M. O. 2004. First record of a NPV isolated from *Spodoptera littoralis* (Boisad) (Lepidoptera: Noctuidae) for Turkey and its

molecular identification according to the partial *left-8* gene. Turkish J. Biol. 28: 71-77.

VASCONCELOS, S. D., CORY, J. S., WILSON, K. R., SAIT, S. M., AND HAILS, R. S. 1996. Modified behavior in baculovirus-infected lepidopteran larvae and its impact on the spatial distribution of inoculums. Biol. Contr. 7: 299-306.

VÁSQUEZ, J., ZEDDAM, J., AND TRESIERRA, A. A. 2002. Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfVPN, en Iquitos, Perú. Folia Amazon, 13:25-29.

TABLE 1. MEDIAN LETHAL CONCENTRATION LC_{50} AND 95% CONFIDENCE LIMITS OF NATIVE ISOLATES OF SFMNPV ON THIRD INSTAR *SPODOPTERA FRUGIPERDA*.

Isolates ^a	N ^b	% Mortality ^c	Lower limit	LC_{50} (95%) ^d	Upper limit	Slope (\pm SE)	Intercept (\pm SE)	X ²	R ²
SfMNPV-NAV ₁	420	52.63	6.7X10 ⁴	1.9X10 ⁵	9.5X10 ⁵	0.52 \pm (0,07)	-2.73 \pm (0.34)	0.98	0.86
SfMNPV-NAV ₂	420	70.00	3.7X10 ⁵	1.5X10 ⁶	2.8X10 ⁷	0.53 \pm (0,10)	-3.27 \pm (0.59)	0.96	0.94
SfMNPV-NAV ₄	420	89.47	5.5X10 ⁵	7.4X10 ⁵	9.9X10 ⁵	2.93 \pm (0,39)	-17.20 \pm (2.32)	0.77	0.94
SfMNPV-NAV ₆	420	85.00	1.0X10 ⁴	1.2X10 ⁴	1.5X10 ⁵	1.22 \pm (0,10)	-5.02 \pm (0.41)	0.99	0.81
SfMNPV-NAV ₈	420	90.00	9.9X10 ³	2.3X10 ⁴	4.8X10 ⁴	0.72 \pm (0,08)	-3.12 \pm (0.37)	0.96	0.77
SfMNPV-NAV ₉	420	78.95	6.8X10 ⁴	1.0X10 ⁵	1.7X10 ⁵	0.55 \pm (0,06)	-2.75 \pm (0.28)	0.96	0.87
SfMNPV-CAD	420	80.00	9.7X10 ⁴	1.2X10 ⁵	1.4X10 ⁵	1.25 \pm (0,13)	-6.34 \pm (0.67)	0.83	0.98
SfMNPV-NAY	420	94.74	5.6X10 ³	7.5X10 ³	9.8X10 ³	2.06 \pm (0,23)	-7.98 \pm (0.92)	0.99	0.70
SfMNPV-AN ₁	420	72.22	5.4X10 ⁴	6.5X10 ⁴	7.7X10 ⁴	1.53 \pm (0,18)	-7.35 \pm (0.90)	0.87	0.96
SfMNPV-AN ₂	420	100.00	4.3X10 ²	5.7X10 ²	7.2X10 ²	2.86 \pm (0,34)	-7.92 \pm (0.97)	0.99	0.95

^aNPV Isolates, SfMNPV-NAV_{1, 2, 4, 6, 8 and 9}: Isolated from corn plots Navidad Nuevo León; SfMNPV-CAD: Cadereyta Nuevo León; SfMNPV-NAY: Isolated from Nayarit; SfMNPV-AN_{1, 2}: Isolated from Coahuila, México. ^bNumber of insects treated; ^cMortality percentage with the highest concentration (4.0x10⁶ OBs/mm²).

^d LC_{50} values were expressed as OBs/mm² from the diet surface; We used 20 larvae per NPV concentration, by replicate, seven concentrations per treatment by replicate, 20 untreated larvae (control) by replicate were used.

SE= Standard error; X²=Goodness of fit test; R²=Coefficient of determination

TABLE 2. MEDIAN LETHAL CONCENTRATION LC₅₀, MEAN TIME TO DEATH AND 95% CONFIDENCE LIMITS OF SFMNPV-AN₂ ISOLATE IN FIRST TO FIFTH INSTAR *SPODOPTERA FRUGIPERDA* LARVAE.

Instar larvae	N ^a	Lower limit	LC ₅₀ (95%) ^b	Upper limit	Slope (±SE)	Intercept (±SE)	X ²	R ²	Lower limit	Mean time to death (days)	Upper limit
first	420	6.1X10 ¹	1.15X10 ²	1.7X10 ²	0.58±(0.04)	-1.61±(0.13)	0.72	0.73	3.35	3.96	4.52
second	420	2.6X10 ²	3.6X10 ²	4.8X10 ²	0.87±(0.07)	-2.23±(0.22)	0.99	0.69	5.21	5.88	6.58
third	420	2.6X10 ²	5.7X10 ²	1.4X10 ³	2.86±(0.34)	-7.92±(0.97)	0.83	0.86	5.26	6.55	8.00
fourth	420	1.3X10 ⁵	4.3X10 ⁵	4.5X10 ⁶	1.07±(0.31)	-6.02±(1.72)	0.74	0.95	5.88	7.01	8.71
fifth	420	1.1X10 ⁷	2.4X10 ⁷	4.4X10 ⁷	1.42±(0.21)	-10.54±(1.64)	0.81	0.66	6.23	7.82	9.34

^aNumber of insects treated

^bLC₅₀ values were expressed as OBs/mm² from the diet surface contaminated; 20 larvae per concentration of NPV per treatment, per replication were used; seven concentrations per treatment by replicate, 20 untreated larvae (control) by repetition, by isolate were used.

SE= Standard error; X²=Goodness of fit test; R²=Coefficient of determination

ARTICULO III

**Mortality and occlusion body's production in *Spodoptera frugiperda*
larvae J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) inoculated with
Nucleopolyhedrovirus**

¹Claudio Rios-Velasco, ¹Gabriel Gallegos-Morales, ¹Sergio René Sánchez-
Peña, ²Ma. Cristina Del Rincón-Castro, ¹Ernesto Cerna-Chávez and ¹Melchor
Cepeda-Siller.

¹Department of Agricultural Parasitology, Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro, Buenavista, 25315, Saltillo, Coahuila, México.

²Department of Food, División de Ciencias de la Vida, University campus
Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato, El Copal, Km. 9 Road
Irapuato-Silao, 36500 Irapuato, Guanajuato, Mexico.

Abstract: Problem statement: Fall armyworm (FAW) *Spodoptera frugiperda* is the main corn pest in Latin America. An alternative to chemical control is the use of its nucleopolyhedrovirus (NPV), due to high virulence, persistence, and specificity, also safety for both farm workers and consumers of products treated with this bioinsecticide.

Approach: One isolate of NPV isolated soil samples from an experimental field in Saltillo, Coahuila, Mexico was evaluated. Egg masses of the pest were superficially inoculated by the immersion method, with known NPV concentrations expressed as occlusion bodies/mL (OBs/mL). Additionally, bioassays were performed on 1st to 6th instar larvae to determine the number of occlusion bodies produced by larvae using the superficial contamination technique. The artificial diet was inoculated with the known virus concentration. **Results:** The highest mortality was recorded in the larval stage (67%), mainly in the first three instars, with the highest in the first instar with 56.5% mortality. The number of OBs produced per larvae ranged from 5.15×10^6 to 2.3×10^9 , with 5th and 6th instar larvae producing the highest amount of OBs. **Conclusions:** The use of the immersion method on eggs masses was efficient, with the highest mortality in the first three larval instars, and the final weight at death and OB yield, (OB yield per mg weight), were higher in the last larval stages as compared with the first three instars.

Key words: Virus, Baculoviridae, nucleopolyhedrovirus, fall armyworm, eggs, occlusion bodies, mortality

INTRODUCTION

The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) is a major pest of corn (*Zea mays* L.) in Latin America (Castillejos *et al.*, 2002), causing reductions in the accumulation of biomass and grain in infested crops (Hernández-Mendoza *et al.*, 2008), as well as the complete destruction of plant in severe cases. The control of this pest depends greatly on chemical insecticides, requiring 2-4 applications during plant development, which represents an extra economic cost in production (Hruska and Gould, 1987). In addition, chemicals cause resistance, elimination of natural enemies and, environmental pollution. An alternative method of control this pest is the use of entomopathogens (Gardner and Fuxa, 1980; Ashley, 1986). These have been successful in pest control in recent years; such is the case of viruses, specifically the nucleopolyhedroviruses (NPV) of the family Baculoviridae (Hughes *et al.*, 1984, Shapiro *et al.*, 1991). The *S. frugiperda* NPV biopesticide is a widely studied and effective way for controlling this pest, because of their specificity, biosecurity, persistence, and their levels high of virulence (Fuxa, 2004). However, most of the research activity of the *S. frugiperda* NPV has been on larval stages of this pest. The objective of this study was to measure biopesticide activity of a native isolate of NPV against *S. frugiperda* applied to the egg stage; and to determine the occlusion body's production in larvae fed NPV-contaminated diet.

MATERIALS AND METHODS

Insect colony and virus isolate: Egg masses and larvae of FAW were obtained from a laboratory colony maintained at 25 ± 2 °C temperature, 50-60% relative humidity and 12:12 light/dark photoperiod in the Parasitology Department of the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), and fed with artificial diet (Southland Products Incorporated, to the Lake Village, Arkansas).

A NPV isolate named SfNPV-AN₂ (Isolate native to the UAAAN experimental fields) was multiplied in third-instar *S. frugiperda* larvae, purified by filtration and centrifugation as described by Muñoz *et al.* (1997), and quantified by counting in Neubauer Improved Chamber (Blau Brand Germany), expressed in numbers of occlusion bodies/ml (OBs/ml of water) and stored in 500µl aliquots at 0 °C until required.

Eggs masses treated with NPV: The eggs were disinfected with sodium hypochlorite 0.2%, and placed in dry paper. Seven concentrations were used ranging from 8×10^1 to 8×10^6 OBs/ml and a control (Table 1). Seven egg masses were taken, as an initial cohort of 50 eggs to follow up in each concentration. Emergence of first instar larvae, larval death, pre-pupal and pupal and/or development to adult stage were recorded. To perform the bioassay, the egg immersion technique was used for five seconds in the concentrations of NPV listed and placed in blotting paper, and left to dry at room temperature; then they were transferred to transparent one- ounce plastic cups (Envases Cuevas S.A. de C.V., Mexico State, Mexico) with untreated artificial diet.

Determining the number of OBs produced by larvae: Larvae of the six stages were inoculated with OBs. In each case, a group of 50 larvae were placed individually in plastic cups containing artificial diet inoculated with 2.0×10^3 to 2.0×10^9 OBs/mm² (Table 1). Larvae were fed the contaminated diet during 24 h, and they were transferred individually to untreated diet. Larvae were weighed and examined to observe the signs and symptoms of disease caused by NPV until death. Ten larvae of each instar were considered as a control. To facilitate the collection of OBs, the plastic cup containing artificial diet and death larvae were placed at -20 °C before the breakup of the cuticle (Lasa *et al.*, 2007). Dead larvae were frozen and placed individually in plastic Eppendorf tubes containing 2ml of sterile distilled water, and the samples were thawed, homogenized, filtered and centrifuged at 1000 g for 5 minutes to remove the sclerotized parts of larvae (cuticle and head). The resulting of suspensions of OBs was gauge to final volume 2ml. Sterile distilled water alone was used as control. The assays were performed three times using the same number of insects of each stage (Table 1).

The number of occlusion bodies recovered from each larvae was determined using a Neubauer Improved counting chamber under a phase contrast microscope at 400x, taking two samples from each larvae. The relationship between OBs production and host weight (OBs/mg) was estimated based on larval weight recorded on the day prior to death. OBs production and larval weight data were subjected to analysis of variance, the last day of experiment was considered as a block (ANOVA). Values of OBs per mg of larval weight were normally distributed and were subjected to ANOVA in SAS System version 9.0 (SAS, 2002). The bioassay was performed three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Mortality after eggs treatment: The egg masses treated with NPV showed mortality in the larval stage of FAW in various degrees, mainly in the first three stages. The highest mortality was observed in neonate larvae (first stage), and in the second instar (Fig. 1). Note that from the fourth to sixth stages, there was mortality, but this occurred in pre-pupae, and pupae in some of the concentrations used (Table 1), which when macerated and observed with phase-contrast microscope at 400x, showed the presence of OBs.

From an average of 350 eggs separated for follow up, treated with different OBs concentrations), 67.85% died in larval stage, in pre-pupa (6.09%), pupae (0.57%), and no mortality was observed in the adult stage (Table 1). The highest mortality was recorded in neonate larvae (58.05%), 8.38% in the second instar and 1.43% in third instar (Fig. 1). In the subsequent larval stages there was not death. Ibarra and Del Rincón (2001), mention that egg immersion method takes advantage on the feeding habit of this insect, as the neonate larvae of FAW, feed on the contaminated chorion of eggs when they hatch, then become infected, so that an integrated strategic management of this pest by the virus, can be started from the egg stage.

OBs produced by larvae: Ingestion diet contaminated with suspensions (2.0×10^3 to 2.0×10^9 OBs/mm²) of SfMNPV- AN₂ resulted in > 50% mortality of larvae from first to sixth instars (Table 1). The average number of OBs produced by larvae in the six stages varied broadly according to larval size, as expected. In the first three stages, low production of OBs (5.15×10^6 , 8.8×10^7 and 1.06×10^8 OBs per larvae) was found,

compared to the last larval stages (fifth and sixth) that were the major OBs producers with 1.74 and 2.31×10^9 OBs/larvae (Table 1). It should be noted that all larvae in the control reached the adult stage. Larvae of the first three stages showed an average weight of 1.4, 6.8 and 33.9 mg respectively, while that fifth and sixth larval instars obtained a final average weight of 276.3 and 340.9 mg, respectively.

The key parameters of the production of OBs by larvae of the host depended of the dose used for larval infection, duration of infection, growth rate, and weight gain during the infection period and final weight obtained at death (Shapiro, 1986; Sherman, 1985). The data obtained in this study of larval weight and OBs production on the 5th and 6th instars are similar to those obtained by other authors, such as Vásquez *et al.* (2002), that reported a production of OBs by larvae of 5.4×10^8 and 7.3×10^8 for fifth and sixth instars respectively. Lasa *et al.* (2007), reported a production of OBs from 1.6×10^9 to 2.29×10^9 per larvae and an average larval weight of 197.6 ± 42.5 for fifth instar larvae of *S. exigua*.

CONCLUSION

Based on these results we conclude that the native isolate of NPV have a high potential for use in biological control, and that strategic management of FAW, can be started on the egg stage and larvae of the last two stages can be use for mass production of NPV under laboratory conditions.

ACKNOWLEDMENT

Author C. Rios thanks to CONACYT for the financial support provided during his Ph.D. Studies

REFERENCES

- Ashley, T. R., 1986. Geographical distribution and parasitization levels for parasitoids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Florida Entomol., 69: 516-524.
- Castillejos, V., J. Trujillo, L. D. Ortega, J. A. Santizo, J. Cisneros, D. I. Penagos, J. Valle and T. Williams, 2002. Granular phagoestimulant nucleopolyhedrovirus formulations for control of *Spodoptera frugiperda* in maize. Biol. Control., 24: 300-310.
- Fuxa, J. R., 2004. Ecology of insect nucleopolyhedrovirus. Agr. Ecos & Environ., 103: 27-43.
- Gardner, W.A. and J.R. Fuxa, 1980. Pathogens for the suppression of the fall armyworm. Florida Entomol., 63: 439-447.
- Hernández-Mendoza, J. L., E. C. López-Barbosa, E. Garza-González and N. Mayek-Pérez, 2008. Spatial distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize landraces grown in Colima, México. Inter. J. Trop. Insect Sci., 28: 126-129.
- Hruska, A. J. and F. Gould, 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level

- and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *J. Econ. Entomol.*, 90: 611-622.
- Hughes, P. R., H. A. Wood, J. P. Burand and R. R. Granados, 1984. Quantification of the dose-mortality response to *Trichoplusia ni*, *Heliothis zea*, and *Spodoptera frugiperda* to nuclear polyhedrosis viruses: Applicability of an exponential model. *J. Invertebr. Pathol.*, 43: 343-350.
- Ibarra J. E. and Del Rincón C. Ma. C, 2001. Capacidad insecticida de los baculovirus. In: Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas (eds P. Caballero, T. Williams and M. López) pp: 203-256. Phytoma, España.
- Lasa, R., P. Caballero and T. Williams, 2007. Juvenile hormone analogs greatly increase the production of a nucleopolyhedrovirus. *Biol. Contr.*, 41: 389- 396.
- SAS Institute, 2002. "SAS User's Guide. Version 9.0." SAS Institute, Cary, NC USA.
- Shapiro, D. I., J. R. Fuxa, H. D. Braymer and D. B. Pashley, 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolate of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 58: 96-105.
- Sherman, K.E., 1985. Considerations in the large-scale and commercial production of viral insecticides, In: *Viral insecticides for biological control* (eds K. Maramorosch and K.E. Sherman) pp. 757-774. Academic Press, Orlando, FL.
- Vásquez, J., J. Zeddám and A.A. Tresierra, 2002. Control biológico del "cogollero del maíz" *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfVPN, en Iquitos, Perú. *Folia Amazon.* 13: 25-39.

Table 1: Larval, pre-pupae and pupae mortality of *Spodoptera frugiperda* treated in the egg stage with different concentrations of nucleopolyhedrovirus*

Concentration OBs per ml	Average of eggs treated	N	Percentage mortality (%)			Survival to adult stage (%)
			Larvae	Pre-pupae	Pupae	
8×10^6	426.00	50	100.00	0.00	0.00	0.00
2×10^5	157.00	50	98.00	0.00	0.00	2.00
8×10^4	302.33	50	92.00	2.00	0.00	6.00
8×10^3	208.66	50	70.00	8.00	0.00	22.00
2×10^3	412.00	50	53.33	12.66	2.00*	32.00
8×10^2	305.00	50	33.00	14.00	4.00	49.00
8×10^1	327.33	50	28.66	6.00	0.00	65.33
Control	224.00	50	0.00	2.00*	0.00	98.00

^aData are based in the average of three replicates.

n=Number of sample eggs followed through developmental/treatment (OB concentration), *Dead by unknown cause.

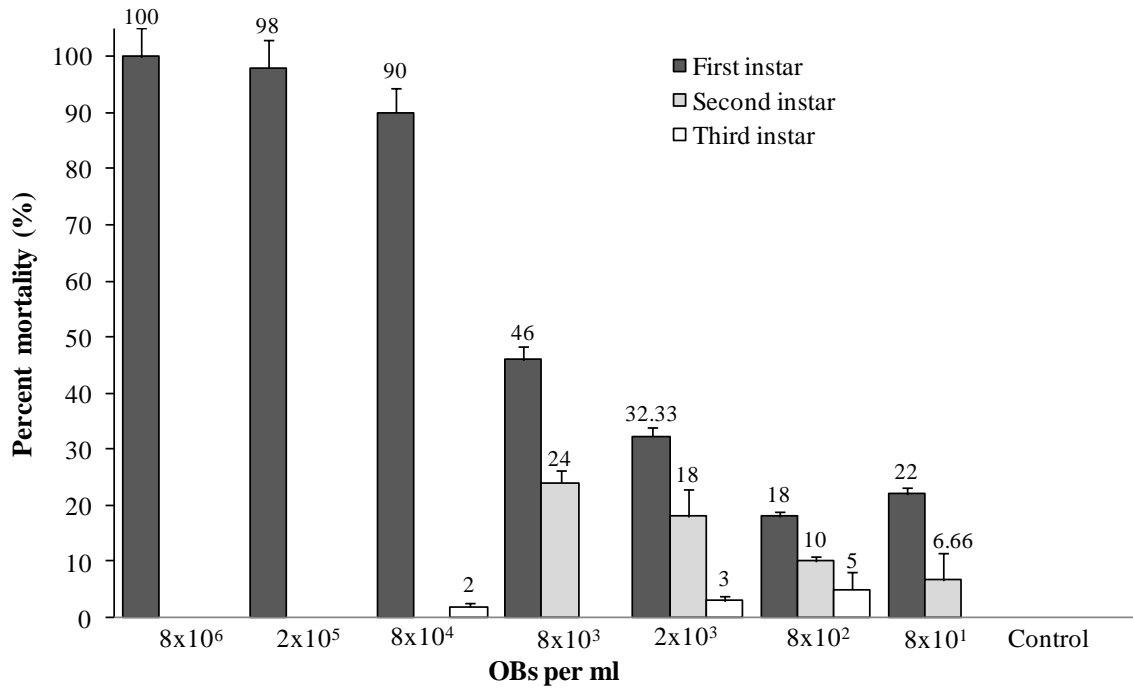


Fig. 1: Percent mortality of *Spodoptera frugiperda* larvae treated with different concentrations of nucleopolyhedrovirus in egg stage using the immersion method.

Table 2. Occlusion body's production in *Spodoptera frugiperda* larvae inoculated with nucleopolyhedrovirus

Instar	Number of insects inoculated	OBs per mm ² (Treatment)	Insects that dead from virus infection	Weight (\pm SD) when collected (mg)*	Mean (\pm SD) of OBs per larvae*
First	50	2x10 ³	47	1.4 \pm 1.0e	5.15X10 ⁶ \pm 0.49d
Second	50	2x10 ⁴	44	6.8 \pm 1.9e	8.8X10 ⁷ \pm 0.33d
Third	50	2x10 ⁵	42	33.9 \pm 5.8d	1.06X10 ⁸ \pm 0.71d
Fourth	50	2x10 ⁷	43	154.8 \pm 4.6c	1.09X10 ⁹ \pm 0.37c
Fifth	50	2x10 ⁸	32	276.3 \pm 7.4b	1.74X10 ⁹ \pm 0.43b
Sixth	50	2x10 ⁹	29	340.9 \pm 8.5a	2.31X10 ⁹ \pm 0.79a

*In both cases, values followed by identical letter did not differ significantly according to Tukey (P>0.05). The results were subjected to ANOVA without prior transformation

ARTICULO IV

**Natural occurrence of entomopathogenic fungi *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson
infecting *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila México**

**Claudio Rios-Velasco, Ernesto Cerna-Chávez, Sergio René Sánchez-Peña
and Gabriel Gallegos-Morales¹**

Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro,
Calzada Antonio Narro # 1923, Buenavista, Coahuila, México.

¹Corresponding author (e-mail: ggalmor@uaaan.mx). Phone (+52 844) 411-03-26 and 411-03-27. Fax numbers (+52 844) 411 02 26

Fall armyworm *S. frugiperda* (J. E. Smith) (FAW), is a common pest in corn and other crops (Lu & Adang, 1966). It is a pest of major economic importance capable of greatly reducing crop production rates (Carnevalli & Florcovski 1995). This insect has 5 to 6 larval instars which feed on tender leaves and stalks causing severe damage in every stage of plant development (Villa-Castoreña y Catalán-Valencia, 2005; Wiseman *et al.*, 1966). FAW has been reported to be susceptible to more than 20 species of entomopathogenic fungi (Gardner & Fuxa 1980; Sánchez-Peña, 2000). One of these is *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, family Moniliaceae (Lezama-Gutierrez *et al.*, 2001) causing epizooties as observed during August and September 2007, in non-irrigated corn plots infested with *S. frugiperda* at the Buenavista experimental field, in Buenavista, Coahuila. The experimental field is located 25°23' latitude, 101°00' longitude, at an altitude of 1743 m above sea level with maximum average temperatures of 29°C and 86% relative humidity. This fungus was found among *S. frugiperda* populations for three consecutive years (2005, 2006 and 2007). The infected larvae were covered with a whitish fungus, later turning greenish-gray and identified as *N. rileyi* according to the morphological traits described by Ignoffo (1981). Temperature, relative humidity and rainfall measurements were obtained with the meteorological station of Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, located 100 m from the experimental site. FAW populations were observed within a 0.2-0.6 ha area. Samples were collected from leaves by finger tapping the plants recording the number of infected larvae. Putatively infested larvae were observed under the microscope to confirm *N. rileyi* infection.

Experimental corn plots had an average infestation of 1.2, 6.0, 4.1, 0.4 and 0.0 *N. rileyi*-infested larvae per meter in June, July, August, September and October 2007

respectively (Fig. 1). Populations of *S. frugiperda* decreased immediately after the samples taken in July; by September, the few larvae found on corn leaves infected with this entomopathogen were already dead. The larvae were fully covered with whitish hyphae (Fig. 2a and b) and a green mass of *N. rileyi* spores (Fig. 2c). Conidias as well as phialides were also observed (Fig. 2d). This research was focused on infected larvae during the growing stage of the corn plant, particularly at the corn boot formation. The largest number of dead larvae found was 6 larvae per linear meter in July. Larvae killed by *N. rileyi* were removed from the upper side of the leaves and examined at the laboratory and cultured in Petri dishes with Potato-Dextrose-Agar (PDA) and V8-Agar (V8A). Based upon the microscope observations of the characteristics of the infected larvae as well as slide observations, the fungus was identified as *N. rileyi* as reported by Barnett & Hunter (1986).

Average maximum and minimum temperatures during the months of this study (June-October, 2007) was 28.2 and 13.2°C respectively, averaging 20.65°C and a relative humidity average of 76.25% (Fig. 1). Sun light hours were between 2.1 to 8.4 indicating mostly cloudy days. The total number of rainy days and the amount of rainfall from June to October were 41 and 439.7 mm respectively (Fig.1). These environmental conditions favored the growth and natural infective power of the fungus, as previously reported by Vimala-Devi *et al.* (1966). Infectiveness and pathogenesis of *N. rileyi* is influenced by environmental conditions, mainly humidity which is the main requirement for conidia germination and fungus survival (Ignoffo & García 1985). The temperature range was also ideal for *N. rileyi*'s thriving and consequent unleashing of the infection (18 to

25°C). Temperatures over 35°C usually inhibit the development of this entomopathogenic fungus (Edelstein *et al.* 2005).

References

- Barnett., G.J., and Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. McMillan Publishing Company. USA, 218p.
- Edelstein, J.D., Trumper, E.V., and Lecuona, R.E. 2005. Temperature-Dependent Development of the Entomopathogenic Fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson in *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) Larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Neotropical Entomology, **34**: 593-599.
- Gardner, W.A., and Fuxa, J.R. 1980. Pathogens for the Suppression of the fall armyworm. Florida Entomologist, **63**: 439-447.
- Ignoffo, C.M. 1981. The fungus *Nomuraea rileyi*. In Burges H D, (ed) Microbial control of pests and plant Diseases, 1970-1980, p. 523-538. New York London Academic Press.
- Ignoffo, C.M. and García, C. 1985. Hosts spectrum and relative virulence of an Ecuadoran and Mississippian biotype of *Nomuraea rileyi*. Journal of Invertebrate Phatol, **45**: 346-352
- Lezama Gutierrez, R., Hamm, J.J., Molina-Ochoa, R.J., López Edwards M., Pescador–Rubio, A. Gonzales–Ramirez, M., and Eloise, L. 2001. Occurrence of Entomopathogens of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Mexican

- States of Michoacan, Colima, Jalisco and Tamaulipas. Florida Entomologist, **84**: 23-30.
- Lu, Y., and Adang, M.J. 1996. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. Florida Entomologist, **79**: 48-55.
- Sánchez-Peña, S.R. 2000. Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in Mexico. BioControl, **45**: 63-78.
- Villa-Castorena, Ma. M., and Catalán-Valencia, E.A. 2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la construcción de un modelo de predicción. Folia Entomológica Mexicana, **43**: 307-312.
- Vimala-Devi, P.S., Prasad, Y.G., Rajeshwari, B., and Vijay, B.L. 1996. Epizootics of the entomofungal pathogen, *Nomuraea rileyi*, on lepidopterous pests of oilseed. Journal Oilseeds Research, **13**: 44-148.
- Wiseman, B.R., Davis, F.M., Williams, W.P., and Widstrom, N.W. 1996. Resistance of a maize population, FAWCC(C5), to fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomologist, **79**: 329-336.

Figure 1. Natural occurrence of *Nomuraea rileyi* on *Spodoptera frugiperda* larvae in Coahuila, Mexico in 2007, correlated with precipitation, temperature and relative humidity.

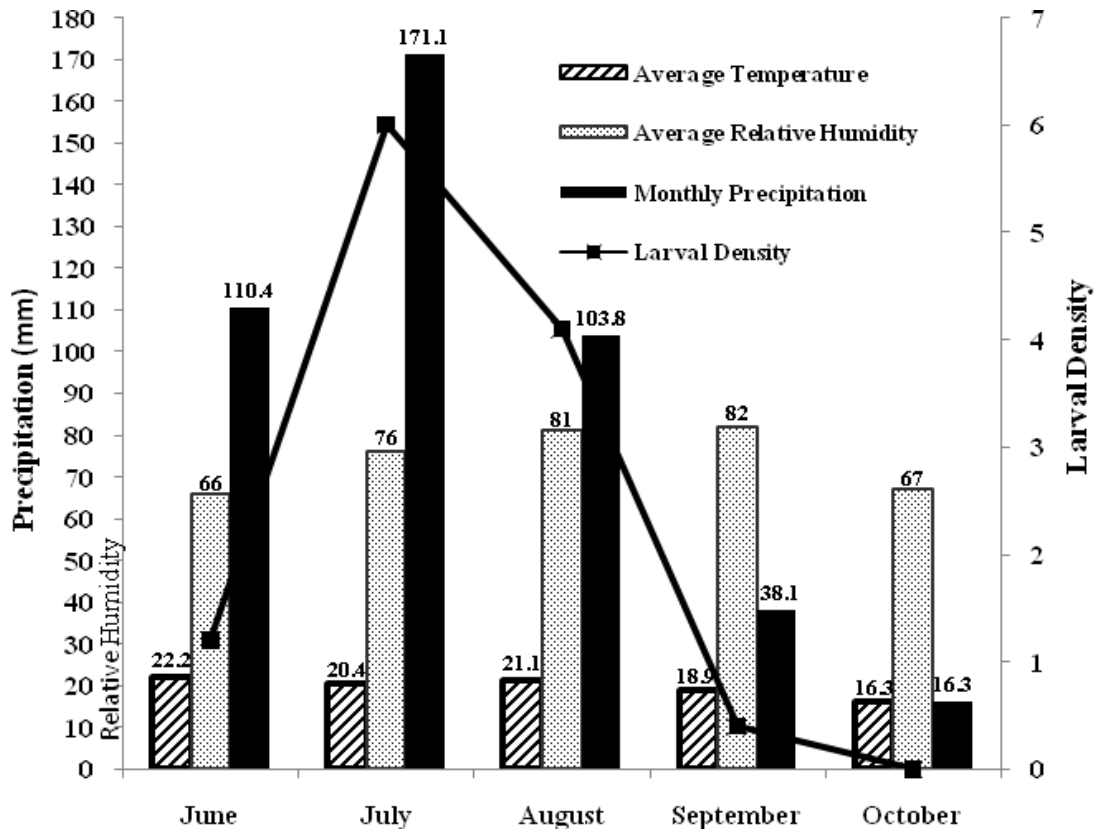


Figure 2. *Spodoptera frugiperda* larvae covered with a) and b) whitish mycelia of hyphae, c) mass of green spores *Nomuraea rileyi* attached on corn leaves and d) fungus conidia and phialides.



ARTICULO V

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE SUELO DE BACULOVIRUS DE *Spodoptera frugiperda* MEDIANTE PATRONES DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Claudio Rios-Velasco¹, Ma. Cristina Del Rincón-Castro², Sergio René Sánchez-Peña¹,
Ernesto Cerna-Chávez¹, Melchor Cepeda-Siller¹ y Gabriel Gallegos-Morales¹

¹Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro,
Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, C.P. 25315. Tel. y
Fax (+52844) 4110226. e-mail: riveclaus@gmail.com

²Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-
Salamanca, Universidad de Guanajuato, Ex-Hacienda El Copal, Km. 9 Carretera
Irapuato-Silao, 36500 Irapuato, Guanajuato, México.

Resumen

Se caracterizaron cuatro aislamientos de baculovirus de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) recuperados de suelo, utilizando tres diferentes enzimas de restricción. Cada aislamiento se amplificó en larvas de un cultivo axénico del mismo insecto, por separado, para incrementar el número de cuerpo de oclusión. Los diferentes aislamientos de virus se purificaron en gradientes continuos de sacarosa por ultracentrifugación. El DNA purificado de cada aislamiento fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI*. Cada aislado mostró diferencias significativas en los fragmentos obtenidos por electroforesis, teniendo una mayor similitud de bandas comigrantes de DNA, los aislamientos CAD y NAV₁ con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, mientras que en el caso de los aislamientos AN₁ y AN₂, estos presentaron diferencias heterogénicas con las enzimas de restricción utilizadas. Aislados virulentos de baculovirus pueden ser obtenidos de suelo, el cual puede ser un importante reservorio de estos virus.

Introducción

Actualmente se conoce una gran diversidad de baculovirus que ha quedado patente con la caracterización de distintos aislados geográficos, y sobre todo con las variantes genóticas presentes dentro de un mismo aislado. El conocimiento de la diversidad natural, inter e intra específica entre los baculovirus, podría contribuir a establecer una mejor clasificación de esta familia, además de ser de especial importancia para el diseño de bioinsecticidas, cuyo material genético podría incluirse en el mejoramiento de cepas con mejor potencial para su aplicación en ecosistemas

específicos (Muñoz y Caballero, 2001). La selección en baculovirus se fundamenta en los niveles de variación genética. Sin embargo aislados recuperados de la misma especie hospedera en distintos lugares geográficos son a menudo diferentes (Cory y Myers, 2003).

Los baculovirus se clasifican acorde al hospedero del cual fueron aislados que son altamente específicos, sin embargo existen baculovirus que infectan a varias especies de hospederos, por lo cual se les referencia con diferentes nombres, como es el caso de *Anagrapha falcifera* NPV y *Rachiplusia ou* NPV (Harrison y Bonning, 1999). También los aislamientos de una misma especie hospedera pueden representar virus diferentes, ya que en una muestra individual se pueden encontrar MNPVs y SNPVs (Zanotto *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2002a, b) e inclusive dos géneros de baculovirus. Los perfiles de DNA de los baculovirus, obtenidos mediante el uso de enzimas de restricción (REN) muestran que estos son extremadamente variables. Los aislamientos de NPV de la misma especie hospedera obtenidos de diferentes regiones geográficas con frecuencia muestran diferencias en los patrones de REN de aislados recuperados de lepidópteros. Takatsuka y colaboradores (2003), mencionan que la variación es ubicua en los virus de insectos (Williams y Cory, 1993; Graham *et al.*, 2006). Sin embargo la importancia de la variación genética de los baculovirus, ha sido poco estudiada y se sabe muy poco acerca de los patrones de variación genética en estos virus.

Los baculovirus son considerados como potenciales agentes de control biológico de plagas de insectos. El interés en este complejo de macromoléculas como bioinsecticidas ha orientado los esfuerzos científicos para detectar un aislado o cepa

potencialmente más eficaz para controlar poblaciones de insectos plaga. El uso del baculovirus de *Spodoptera frugiperda* para el control de poblaciones del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* (J. E. Smith) es de gran relevancia económica y se encuentra ampliamente estudiado (Escribano *et al.*, 1999), además de que se le ha reportado controlando poblaciones de manera natural al cogollero de maíz en Brasil y Perú (Gómez *et al.*, 1999; Vásquez *et al.*, 2002).

Se han aislado baculovirus de cientos de especies de insectos, sin embargo, pocas se han caracterizado detalladamente. Los baculovirus son a menudo identificados inicialmente por su morfología y sintomatología característica en sus hospederos. Es posible caracterizar rutinariamente a los baculovirus mediante la obtención de sus patrones de fragmentos de restricción y así diferenciar su DNA genómico entre las diferentes especies o aislamientos (Cory y Myers, 2003; Theilmann *et al.*, 2005). En el presente trabajo se reporta el aislamiento, purificación y caracterización molecular utilizando tres diferentes enzimas de restricción, de aislamientos de baculovirus obtenidos de larvas de *S. frugiperda* colectadas de suelos en parcelas de maíz en los estados de Coahuila y Nuevo León, en México.

Materiales y Métodos

Obtención de aislamientos y amplificación de los baculovirus

Las cepas de baculovirus de *S. frugiperda* fueron aisladas de suelo de parcelas de maíz de los estados de Coahuila y Nuevo León, México. Estos aislamientos se

amplificaron en larvas de *S. frugiperda* acorde a la metodología descrita por Richards y Christian (1999), y Murillo y colaboradores (2007). Para su amplificación se empleó una suspensión no purificada, ni cuantificada, la cual fue distribuida en la superficie de dieta artificial a base de (harina de soya, germen de trigo, agar, levadura de cerveza, ácido ascórbico y sórbico, sal wesson y contenido vitamínico), dejándose secar a temperatura ambiente y sobre esta dieta se colocaron de 30 a 50 larvas del segundo y tercer estadio de *S. frugiperda* tomadas de una colonia mantenida bajo condiciones de insectario (25 ± 2 °C con un fotoperiodo 12:12 y 50-60% de HR) y alimentadas con dieta artificial (Southland Products Incorporated). Las larvas infectadas y muertas por la acción del virus, se recolectaron después de 10 a 12 días y se colocaron en tubos de ensayo para ser almacenados a 4 °C, hasta su posterior utilización.

Purificación de cuerpos de oclusión y viriones

La purificación de los cuerpos de oclusión (COs) de los baculovirus se realizó mediante gradientes continuos de sacarosa del 40 al 66 % w/w, con el uso de un formador de gradiente de doble tubo (Bethesda Research Laboratories). En el tubo interno se colocó la concentración más alta de sacarosa y en el tubo externo la concentración más baja. El gradiente se recolectó en tubos de polialómero de 50 ml y se centrifugó a 24,000 rpm en una ultracentrífuga (Beckman L8-70M), a 4 °C durante 1 hora con un rotor SW 28. De las bandas obtenidas se tomaron las correspondientes a los COs (poliedros y/o gránulos), éstas se lavaron con agua estilada a 10,000 rpm y finalmente se resuspendieron en alícuotas de 500 µl de H₂O destilada estéril y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. Para la liberación de viriones, a los COs

previamente purificados se les agregó 300 µl de álcali (0.1 M Na₂CO₃, 0.1 M NaCl) a un pH de 10.8 y 100 µl de amortiguador TE (0.01 M Tris-HCL, 0.001 M EDTA) a pH 7.6, se incubaron a 25 °C a 140 rpm durante 90 min. Los viriones liberados se purificaron en gradientes continuos de sacarosa del 20 al 60 %, mediante ultracentrifugación a 28,000 rpm por 1.5 h en una ultracentrífuga (Beckman L8-70M). Posteriormente se colectaron las bandas azules que contenían a los viriones con una pipeta Pasteur y se realizó un lavado adicional a 28,000 rpm durante 40 min. Los viriones se almacenaron en tubos Eppendorf a 4 °C hasta su uso posterior.

Extracción de DNA y digestión con enzimas de restricción

Para la extracción de DNA, los viriones purificados se trataron con 400 µl de amortiguador para proteinasa K (0.01 M Tris, 0.005 M EDTA, 0.5 % SDS), y 100 µl de Proteinasa K (200 µg/ml) y se incubaron durante 2 h en baño maría a 37 °C. Posteriormente, la extracción de DNA se hizo agregando 500 µl fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1), y se centrifugó a 13,000 durante 5 min, se colectó la fase acuosa y se paso a un tubo nuevo. Se agregaron 500 µl de Isopropanol, se incubó por 10 min a 4 °C y se centrifugó a 13,000 por 10 min, la pastilla colectada de este proceso se resuspendió en 30 µl de agua destilada estéril y se almacenó a -20 °C, hasta su utilización.

El DNA de cada aislamiento se digirió separadamente con las enzimas de restricción, *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI* incubando la reacción por 2 h a 37 °C. El DNA se

corrió en un gel de agarosa al 0.6 % a 30V por 18-24 h en una cámara de electroforesis horizontal Maxicell, con amortiguador TBE (Tris Base 0.089 M, ácido bórico 0.089M, 0.0025 M de EDTA pH 8.0), como amortiguador de reacción. Se utilizó como marcador de peso molecular el Ladder de 1kb (Gibco, BRL). Los fragmentos de DNA en el gel, se tiñeron con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se examinaron con un transluminador UV.

Resultados y Discusión

Muestras de las larvas infectadas por baculovirus fueron maceradas y una alícuota de la suspensión resultante fue observada bajo un microscopio compuesto de contraste de fases (Carl Zeiss), donde se observaron los COs típicos de NPV, de tamaño variable, característicos de la familia Baculoviridae. Se encontró que los cuatro aislados obtenidos de suelo son una mezcla de los dos géneros de la familia baculoviridae: *Nucleopoliedrovirus* y *Granulovirus* (Fig. 1). Al respecto Stiles y Himmerich (1998) y Cory y colaboradores (2005), mencionan que los aislamientos de NPV a partir de larvas individuales rara vez contienen un solo genotipo o variante, tal y como se muestra en las imágenes observadas al microscopio, por lo que se puede afirmar que en los suelos donde se cultiva maíz en las zonas analizadas, y que cuentan con la presencia de *S. frugiperda*, constituyen un gran reservorio natural de COs pertenecientes a dos géneros diferentes de baculovirus de *S. frugiperda*, SfNPV y SfGV (Richards y Christian, 1999). Como puede observarse en la Fig 1., en los aislamientos de baculovirus aislados de suelo, se evidenció la presencia de al menos dos tipos de COs virales, poliedros y gránulos.

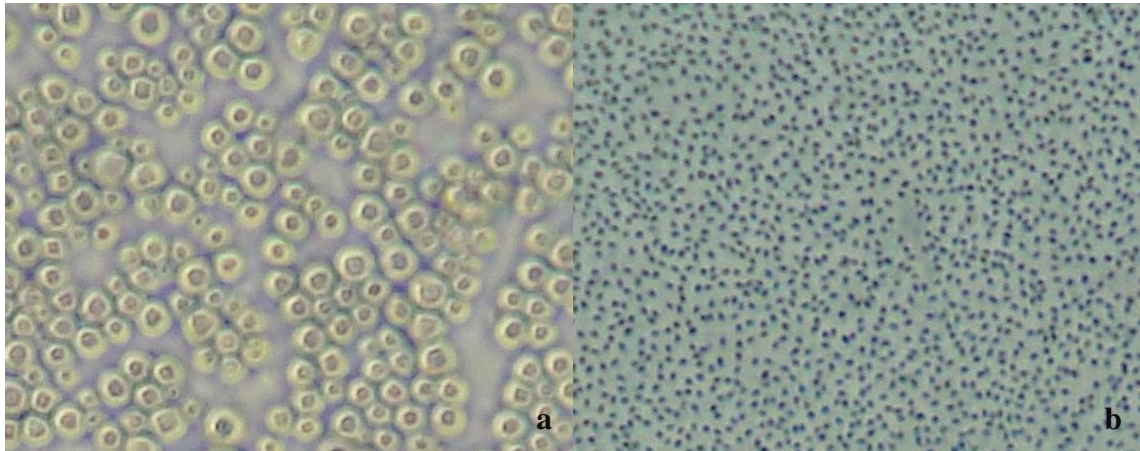


Figura 1. a) Cuerpos de inclusión de baculovirus obtenidos de la purificación de larvas de *Spodoptera frugiperda* a) poliedros, y b), gránulos. Microfotografía a 100X.

Los cuatro aislados geográficos de NPV evaluados contra larvas del tercer estadio de *S. frugiperda* mostraron ser patogénicos; sin embargo hubo variaciones en el nivel de virulencia, reflejados en la concentración letal media o CL_{50} (Cuadro 1), siendo el aislamiento AN_2 (proveniente del campo experimental de Buenavista), el que mostró mayor actividad biológica, dado que la CL_{50} estimada para *S. frugiperda* (5.7×10^2 COs/mm²), fue menor (100 veces menos) que en los demás aislamientos. El segundo más virulento fue el AN_1 con 6.5×10^4 COs/mm². Éste nivel de actividad bioinsecticida, es similar a los calculados para los aislamientos descritos por Martínez y colaboradores (2003), ya que ellos reportan una CL_{50} de 3.4×10^4 COs/ml. En los aislados CAD y NAV_1 se estimó una CL_{50} de 1.2×10^5 y 1.9×10^5 COs/mm² respectivamente, inferior en actividad a lo publicado por Vásquez y colaboradores (2002) (4.9×10^4 COs/ml). Cabe mencionar que ha excepción del aislamiento AN_2 , el resto de los aislamientos contenían una mezcla de baculovirus: gránulos y poliedros (SfGVs y SfNPVs).

Un estudio reciente con el NPV de *Panolis flammea* demostró que el inóculo que contenía más de una variante era más patogénico que el que tenía una sola variante (Hodgson *et al.*, 2004). Sin embargo, en este trabajo los niveles de virulencia más elevados corresponden al único aislamiento que no tenía mezclas de genotipos, AN₂ (Cuadro 1), tal y como se evidenció en los estudios morfológicos, el resto de los aislamientos fueron una mezcla de dos géneros virales. Adicionalmente, una mezcla de poblaciones de baculovirus también podría ser capaz de retener un conjunto de características biológicas y tener la capacidad de adaptarse más rápidamente a condiciones cambiantes, fenómeno que no se pudo comprobar en este trabajo.

Cuadro 1. Concentración letal media CL₅₀ y límites fiduciales al 95 % de aislados nativos de baculovirus sobre larvas de tercer instar de *Spodoptera frugiperda*.

Aislados ^a	N ^b	% de Mortalidad ^c	Límite inferior	CL ₅₀ (95%) ^d	Límite superior	X ²	R ²
SfMNPV-NAV ₁	420	52.63	6.7X10 ⁴	1.9X10 ⁵ c	9.5X10 ⁵	0.98	0.86
SfMNPV-CAD	420	80.00	9.7X10 ⁴	1.2X10 ⁵ c	1.4X10 ⁵	0.83	0.98
SfMNPV-AN ₁	420	72.22	5.4X10 ⁴	6.5X10 ⁴ b	7.7X10 ⁴	0.87	0.96
SfMNPV-AN ₂	420	100.00	4.3X10 ²	5.7X10 ² a	7.2X10 ²	0.99	0.95

^aAislados de NPV, SfMNPV-NAV₁: aislado de parcelas de maíz de Navidad Nuevo León; SfMNPV-CAD: Cadereyta Nuevo León; AN_{1,2}: Aislado de Coahuila, México. ^bNúmero de insectos tratados ^cPorcentaje de mortalidad con la concentración más alta (4.0x10⁶ COs/mm²). ^dLos valores de la CL₅₀ fueron expresados como COs/mm² de la superficie de la dieta, en donde los valores aquí mostrados seguidos por la misma letra no difieren estadísticamente de acuerdo a Tukey (P>0.05); Se usaron 20 larvas por concentración de NPV, por repetición (siete concentraciones por tratamiento por repetición). Además de 20 larvas no tratadas como control por repetición. X²=Prueba de bondad de ajuste; R²=Coeficiente de determinación.

Cuando se realizó la caracterización molecular, mediante la obtención de los patrones de fragmentos de restricción con diferentes enzimas, como puede observarse en la figura 2, casi todas las cepas se diferencian unas de otras por sus perfiles de DNA o fragmentos de restricción con excepción de los aislamientos CAD y NAV₁, que fueron muy similares. Tres de los cuatro aislamientos (AN₁, AN₂ y CAD-NAV₁) mostraron perfiles diferentes por lo que posiblemente se trate de cepas con distintos COs, dependiendo del origen del suelo. Los aislamientos AN₁ y AN₂, mostraron perfiles muy similares entre ellos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, (Fig. 2), pero con niveles de virulencia diferentes estadísticamente, siendo el aislado AN₂ el más patogénico (Cuadro 1). No obstante, estos patrones de bandeo fueron totalmente diferentes a los de las cepas CAD y NAV₁ al digerirlos con las mismas enzimas, y sus niveles de virulencia fueron estadísticamente similares (Cuadro 1). Las bandas de DNA obtenidas con estos dos aislamientos empleando las enzimas *BamHI*, *EcoRI* y *HindIII* diferían ampliamente, por lo que posiblemente ambos aislamientos corresponden a dos cepas diferentes.

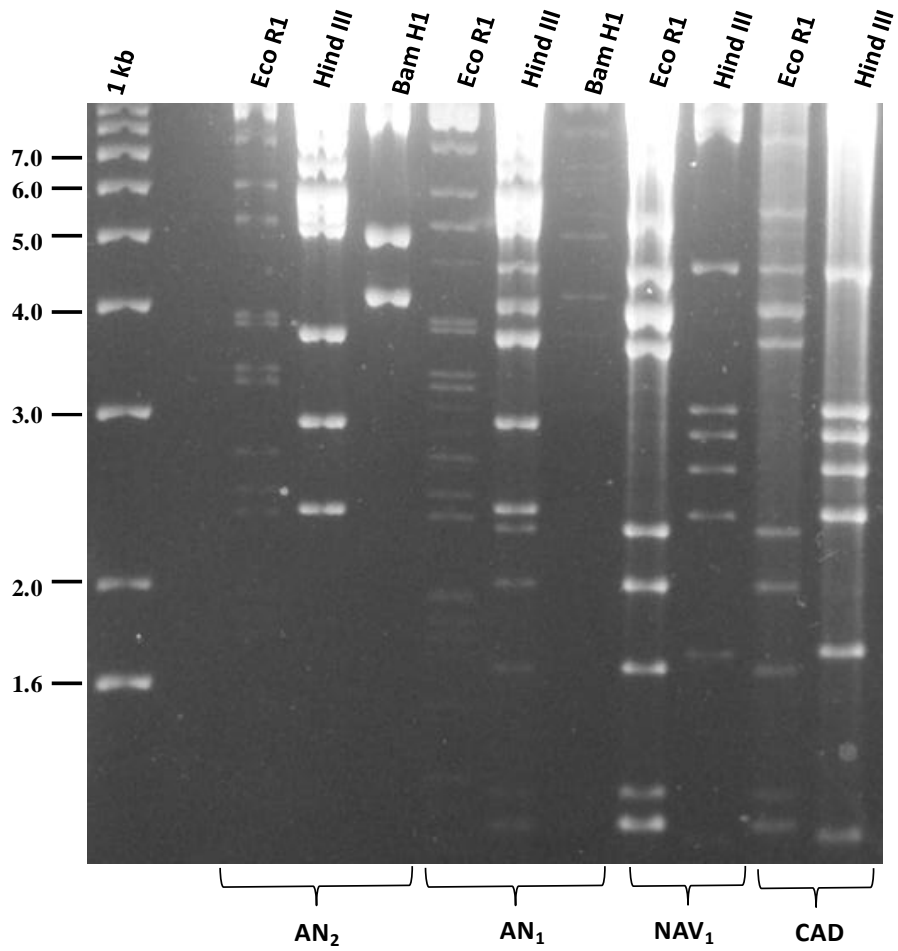


Figura 2. Análisis de fragmentos de DNA de cuatro aislados de baculovirus digeridos con tres enzimas de restricción (*EcoRI*, *HindIII* y *BamHI*). La designación de los aislados se encuentra en el cuadro 1. 1 kb ladder.

Las principales diferencias entre las cepas fueron la presencia ó ausencia de pequeños fragmentos de DNA que variaron en tamaño. En general, cuanto mayor es la separación geográfica de cada aislamiento, mayor es la variación genotípica. Las diferencias en los fragmentos de DNA obtenidos empleando *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI*, mostraron que los patrones los cuatro aislados son diferentes (AN₂, AN₁, NAY₁ y CAD), tal y como se comportan en su mortalidad hacia *S. frugiperda*. Tres de estos cuatro

aislamientos de baculovirus obtenidos de suelo (AN₁, NAV₁ y CAD), son mezclas, constituidos al menos por NPVs y GVs, con la excepción del aislado AN₂ el cual solo contenía poliedros del SfNPV. Además muestran diferente grado de actividad en el mismo insecto y con el mismo estadio y muestran patrones de bandas (grupos de genes) diferentes por lo que factiblemente sean genotipos ó razas diferentes de virus.

En la naturaleza, las infecciones mezcladas de virus no se observan frecuentemente. Sin embargo, se han encontrado generalmente en lepidópteros, trayendo consigo tanto efectos sinérgicos como antagónicos (Krieg, 1971). Dentro de los primeros, Tanada en 1959 (citado por Mazzone, 1985) observó un sinergismo cuando infectó larvas del gusano soldado *Pseudaletia unipuncta* con un GV y un NPV aislados del mismo insecto, encontrando un efecto más severo en las mismas, cuando ambos virus actuaban juntos. Interesantemente, en este trabajo, la cepa que presentó los mayores niveles de virulencia, la AN₂ fue la única en donde no estaban mezclados poliedros y gránulos. Esto nos indica que probablemente existe un antagonismo entre las cepas mezcladas, al cual se debe el bajo nivel de actividad encontrado en las mismas. Sin embargo, se requieren realizar más estudios para comprobar este fenómeno.

En diferentes aislados de *S. frugiperda*, Smits y Vlak (1988) encontraron que pequeñas diferencias genotípicas entre estos no influían en su actividad biológica. Sin embargo, en este trabajo cepas con patrones de restricción similares, si presentaron diferencias en sus niveles de virulencia. Por lo anterior, se puede suponer que probablemente, las bandas diferentes en cada una de ellas podrían contener algunos genes involucrados en la virulencia. Las causas de la variabilidad en los patrones de

restricción entre cepas de baculovirus se han atribuido básicamente a 3 fenómenos: duplicación de secuencias virales, inserción de secuencias celulares y mutaciones puntuales (Brown *et al.*, 1985). Otra posible causa podría ser la recombinación entre virus. En este estudio, no se cuenta aún con los elementos necesarios para atribuir la variabilidad encontrada en los aislados, a uno u otro fenómeno.

Literatura Citada

- Brown, S. E., J. E. Maruniak and D.L. Knudson. 1985. Baculovirus (MNPV) Genomic Variants: Characterization of *Spodoptera exempta* MNPV DNAs and Comparasion with other *Autographa californica* MNPV DNAs. *J. Gen. Virol.* 66: 2431-2441.
- Cory, J. S. and Myers, J. H. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annu. Rev. Ecol. Evol.Syst.* 34: 239–272.
- Cory, J. S., B.M. Green, R.K. Paul, and F. Hunter-Fujita. 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *J. Invert. Pathol.* 89: 101–111.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R.D. Cave, J.W. Chapman and P. Caballero. 1999. Selection of a Nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *Biol. and Microb. contr.* 92: 1079-1085.
- Gómez, S. A., F. Moscardi and D. R. Sosa-Gómez. 1999. Susceptibilidade de *Spodoptera frugiperda* a isolados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. *Pesq. Agropec. Bras., Brasilia.* 34 (9): 1539-1544.

- Graham, R. I., S. J. Rao, R. D. Possee, S. M. Sait, P. P. C Mertens and R. S. Hails. 2006. Detection and characterisation of three novel species of reovirus (Reoviridae), isolated from geographically separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) on Orkney. *J. Invertebr. Pathol.* 91: 79–87.
- Harrison, R. F. and B. C. Bonning. 1999. The nucleopolyhedroviruses of *Rachoplusia ou* and *Anagrapha falcifera* are isolates of the same virus. *J. Gen. Virol.* 80: 2793–98.
- Hodgson, D. J., R. B. Hitchman, A. J. Vanbergen, R. S. Hails, R. D. Possee. and J. S. Cory 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed genotype nucleopolyhedrovirus infections. *J. Evol. Biol.* 17: 1018–1025.
- Krieg, A. 1971. Interactions Between Pathogens. *In*: H.D. Burges and N.W. Hussey (Eds.). Microbial control of insects and mites. Academic Press, New York. pp. 459-489.
- Li, Q., C., Donly, L. Li, L.G. Willis, D. A. Theilmann and M. Erlandson. 2002a. Sequence organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. *Virology.* 294: 106–21.
- Li, L., C. Donly, Q. Li, L. G. Willis, B. A. Keddie, *et al.* 2002b. Identification and genomic analysis analysis of a second species of nucleopolyhedrovirus isolated from *Mamestra configurata*. *Virology.* 297: 226–44.
- Martínez, A. M., O. Simón, T. Williams and P. Caballero. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *Entomol. Exp. Appl.* 109: 139-146.
- Mazzone, H. M. 1985. Pathology Associated with Baculovirus Infection. *In*: K. Maramorosh and K.E. Sherman (Eds.) Viral Insecticides for Biological Control. Academic Press. Orlando, Florida. pp. 81-120.

- Muñoz, D., J. Castillejo and P. Caballero. 1998. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population. *Appl. Environ. Micro.* 64: 4372–77.
- Muñoz, D., M.A. Mabel, R. Murillo, De E.I. Ruíz and L. Vilaplana. 2001. Técnicas básicas para la caracterización de baculovirus, p. 478-518. In P. Caballero., T. Williams & M. López (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, España.
- Murillo, R., D. Muñoz, M. C. Ruíz-Portero, M. D. Alcázar, J. E. Belda, T. Williams and P. Caballero. 2007. Abundance and genetic structure of Nucleopolyhedrovirus populations in greenhouse substrate reservoirs. *Biol. Contr.* 42: 216-225.
- Richards, A. R. and P. D. Christian. 1999. A rapid bioassay screen for quantifying nucleopolyhedroviruses (Baculoviridae) in the environment. *J. Virol. Meth.* 82: 63–75.
- Smits, P. H. and J. M. Vlak. 1988. Selection of Nuclear Polyhedrosis Viruses as Biological Control Agents of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera:Noctuidae). *Entomophaga* 33(3): 299-308.
- Stiles, S. and B. Himmerich. 1998. *Autographa californica* NPV isolates: restriction endonuclease analysis and comparative biological activity. *J. Invertebr. Pathol.* 72:174–77.
- Takatsuka, J., S. Okuno, M. Nakai and Y. Kunimi. 2003. Genetic and biological comparison of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 26:32–39.
- Theilmann D. A., G. W. Blissard, B. Bonning, *et al.* 2005. Family Baculoviridae. In: Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Virus

- Taxonomy. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., *et al.* (eds.). San Diego: Elsevier Press. p. 177-185.
- Vásquez, J., J. Zeddám and A. A. Tresierra. 2002. Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfVPN, en Iquitos, Perú. *Folia Amazon*, 13: 25-29.
- Williams, T. and J. S. Cory. 1993. DNA restriction fragment polymorphism in iridovirus isolates from individual blackflies (Diptera: Simuliidae). *Med. Vet. Entomol.* 7: 199–201.
- Zanotto, P. M. A., B.D. Kessing and J. E. Maruniak. 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 147–62.

CONCLUSIONES GENERALES

En México existe una gran diversidad de enemigos naturales con potencial para ser usados dentro de un programa de manejo integrado del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*, tales como parasitoides y diversos entomopatógenos. Dentro de este trabajo, se logró aislar y caracterizar a diferentes parasitoides y entomopatógenos naturales de *S. frugiperda*.

Los parasitoides más abundantes de *S. frugiperda* fueron los himenópteros de las familias Braconidae (*Chelonus insularis*, *Ch. cautus*, *Ch. sonorensis*), Ichneumonidae (*Pristomerus* sp., *Campoletis sonorensis*), Eulophidae (*Euplectrus plathyphenae*) y Dípteros de la familia Tachinidae (*Archytas marmoratus*). *Chelonus insularis* fue el parasitoide con mayor porcentaje de parasitismo.

Los entomopatógenos infectivos encontrados de manera natural causando micosis en *S. frugiperda* fueron los Hyphomycetes, *Beauveria bassiana* y *Nomuraea rileyi*, y un Nucleopoliedrovirus (SfMNPV) de la familia Baculoviridae.

Los aislados de NPV obtenidos de suelo tienen alto potencial para ser empleados en el control biológico de *S. frugiperda*. El aislado nativo SfMNPV-AN₂, registró la

menor CL_{50} de 5.7×10^2 , y el menor TL_{50} que fue de 6.5 días para larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*.

Estratégicamente el manejo de *S. frugiperda* con baculovirus debe de iniciarse en la fase de huevecillo y durante los tres primeros estadios larvales.

Los estadios larvales 5^{to} y 6^{to} de *S. frugiperda* pueden ser usados para la producción en masa de NPV bajo condiciones de laboratorio.

Los aislamientos de baculovirus son del tipo múltiple constituidos al menos por dos géneros que causan finalmente la muerte de este insecto (un nucleopoliedrovirus y un granulovirus, que son molecularmente diferentes).

Es factible técnicamente la replicación del complejo del baculovirus en un sistema de cultivos empleando dieta artificial como procedimiento de propagación *in vivo* e incremento de cuerpos de oclusión (COs).

LITERATURA CITADA

- Allaway, G. P. y C. C. Payne. 1983. A biochemical and biological comparison of three European isolates of nuclear polyhedrosis viruses from *Agrotis segetum*. Arch. Virol. 75:43–54.
- Allen, M. F. y Ball. 1992. Virus detection in Aphis (Homoptera: Aphididae) kept in a storage solution for suction trap catches. J. Invertebr. Pathol. 53:201-202.
- Andrews, R. E., D. E. Spence y L. K. Miller. 1980. Virulence of cloned variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Appl. Environ. Microbiol. 39: 932-933.
- Arends, H. M., D. Winstanley y J. A. Jehle. 2005. Virulence and competitiveness of *Cydia pomonella* granulovirus mutants: parameters that do not match. J. Gen. Virol. 86: 2731–2738.
- Armenta, R., A. M. Martínez, J. W. Chapman, R. Magallanes, *et al.* 2003. Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in Southern Mexico. J. Econ. Entomol. 96(3): 649-661.
- Arthurs, S. P. y L. A. Lacey. 2004. Field evaluation of commercial formulations of the codling moth granulovirus: persistence of activity and success of seasonal applications against natural infestations of codling moth in Pacific Northwest apple orchards. Biol. Control. 31: 388-397.
- Benz, G. A. 1986. Introduction: Historical perspectives. *En: Granados R.R. y B.A. Federici (Eds.). The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology, Vol. 1. Academic Press. San Diego, USA. Vol I, pp. 1-36.*
- Biever, K.D. y J. F. Wilkinson. 1978. A stress-induced granulosis virus of *Pieris rapae*. Environ. Entomol. 7: 572-576.
- Bjornson, R. M., y G. F. Rohrmann, 1992. Nucleotide sequence of the polyhedron envelope protein gene region of the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. J. Gen. Virol. 73: 1499-1505.

- Black, B. C., L. A. Brennan, P. M. Dierks y I. E. Gard. 1997. Commercialization of baculoviral insecticides, p. 341-387. *En*: L. K. Miller (Ed.). The Baculoviruses. Plenum Press, Nueva York, Estados Unidos.
- Bull, J. C., H. C. J. Godfray y D. R. O'Reilly. 2003. A few-polyhedra mutant and wild-type nucleopolyhedrovirus remain as a stable polymorphism during serial coinfection in *Trichoplusia ni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2052–2057.
- Burden, J. P., C. M. Griffiths, J. S. Cory, P. Smith y S. M. Sait. 2002. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Molecular ecology* 11: 547–555.
- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Alvarez y J. M. Vlack. 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontr. Sci. Technol.* 2: 145-157.
- Caballero, P., T. Williams y M. López-Ferber. 2001. Estructura y clasificación de los baculovirus. *En*: Caballero, P; Williams, T. y López, M. (Eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma Navarra, España. pp. 10-48.
- Carnevali, P. C. y J. L. Florcovski. 1995. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio em milho (*Zea mays* L.) sobre *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797). *Ecosistema.* 20: 41-49.
- Carruthers, W. R., J. S. Cory y P. F. Entwistle. 1988. Recovery of pine beauty moth *Panolis flammea* nuclear polyhedrosis virus from pine foliage. *J. Invertebr. Pathol.* 52: 27–32.
- Chapman, J. W., T. Williams, A. Escibano, P. Caballero, R. D. Cave y D. Goulson. 1999. Age-related cannibalism and horizontal transmission of a nuclear polyhedrosis virus in larval *Spodoptera frugiperda*. *Ecological Entomol.* 24: 268-275.
- Chávez, A. 1990. Distribución espacial del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidóptera: Noctuidae). *Revista de la Facultad de Agronomía de Maracay.* 26: 93-99.
- Christian, P. D., N. Gibb, A. B. Kasprzak y A. Richards. 2001. A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa* nucleopolyhedroviruses (NPV *Baculoviridae*) isolated from the environment. *Journal of Virological Methods.* 96: 51-65
- Christian, P. D., A. R. Richards y T. Williams. 2006. Differential adsorption of occluded and nonoccluded insect-pathogenic viruses to soilforming minerals. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4648–4652.

- Corsaro, B. G. y M. J. Frazer. 1987. Characterization of genotypic and phenotypic variation in plaque purified strains of HzSNPV Elkar isolate. *Intervirology*. 28: 185-191.
- Cory, J. S. y J. H. Myers. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 239-272.
- Cory, J. S. y J. H. Myers. 2004. Adaptation in an insect host-plant pathogen interaction. *Ecol. Letts.* 7: 632–639.
- Cory, J. S., B. M. Green, R. K. Paul y F. Hunter-Fujita. 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *J. Invert. Pathol.* 89: 101–111.
- Croizier, G., L. y H. C. Ribeiro. 1992. Recombination as a possible mayor cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus populations. *Virus Res.* 26: 183-196.
- Croizier, G., L. Croizier, O. Argaud y D. Poudevigne. 1994. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 48-57.
- Del Rincón, C. Ma. C. 1993. Caracterización de cepas nativas de baculovirus patógenas al falso medidor de la col *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato. Irapuato Gto. Pp. 43.
- Engelhard, E. K. y L. E. Volkman. 1995. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology.* 209:384–89.
- Entwistle, P. F. y H. F. Evans. 1985. Viral control, p. 347-412. *En: L.I. Gilbert y G.A. Kerkut (Eds.). Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, vol. 12.* Pergamon Press, Oxford.
- Erlandson, M., S. Newhouse, K. Moore, A. Janmaat, J. Myers y D. Theilmann. 2007. Characterization of baculovirus isolates from *Trichoplusia ni* populations from vegetable greenhouses. *Biol. Control* 41: 256–263.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. D. Cave, J. W. Chapman y P. Caballero. 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J. Econ. Entomol.* 92: 1079-1085.

- Evans, H. F y K. A. Harrap. 1982. Persistence of insect viruses En: B. W. J. Mahy, A. C. Minson y G. Darby (Ed.), Virus persistence. 33rd Symp. Soc. Gen. Microbiol., Cambridge University Press, London. pp. 57-98.
- 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, USA. Vol I. Pp. 61-88.
- Federici, B. A. 1997. Baculovirus pathogenesis. *En*: The Baculoviruses, pp. 33-60. Edited by L. K. Miller. New York: Plenum Press.
- Fernández, R. 1991. Plagas de gramíneas. *En*: Guía de Protección Vegetal. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. Pp. 155-171.
- Fuxa, J. R. 1995. Ecological factors critical to the exploitation of entomopathogens in pest control. *En*: F. R. Hall y J. W Barry (Eds.). Biorational pest control agents: formulation and delivery. Amer. Chem. Soc. Symp. Series 595, Washington. p. 42-67.
- Gallegos, M. G., Cepeda, S. M. y P. R. P. Olayo. 2003. Entomopatógenos. Edit. Trillas. 148 p.
- Gallegos, M. G., C. Rios-Velasco, V. M. Sánchez-Valdez., E. Guerrero-Rodríguez, S. R. Sánchez-Peña y F. De J. Sánchez-Pérez. 2009. Protección de frutos de manzano con el virus de la granulosis de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae). *Southwestern Entomologist*. 34: 331-335.
- Garcia-Maruniak, A., O. H. O. Pawan y J. E. Maruniak. 1996. A variable región of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences. *Virus Res*. 41: 123-132.
- Gómez, S. A., F. Moscardi y D. R. Sosa-Gómez. 1999. Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a aislados geográficos de um vírus de poliedrose nuclear. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*. 34 (9): 1539-1544.
- Goulson, D. y J. S. Cory. 1995. Responses of *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) to crowding: interactions with disease resistance, color phase and growth. *Oecologia*. 104: 416-23.
- Granados, R. R. y B. A. Federici. 1986. The biology of Baculoviruses Vol. I, II CRC Press, Inc Boca Raton, Florida. Pp. 275.
- Granados, R. R. y K. A. Williams. 1986. *In vivo* infection and replication of baculoviruses. *En*: Granados R.R. y B. A. Federici (Eds.). The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology. Academic Press. San Diego, USA. Vol I, Pp. 89-108.

- Greene, G. L., N. C. Leppla y W. A. Dickerson. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *J. Econ. Entomol.* 69: 487-488.
- Harrap, K. A. y C. C. Payne. 1979. The structural properties and identification of insect viruses. *ADV. Virus Research.* 25: 273-355.
- Harrison, R. L. y B. C. Bonning. 2000. Use of scorpion neurotoxins to improve the insecticidal activity of *Rachiplusia ou* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Biol. Contr.* 17: 191-201.
- Hawtin, R. E., K. Arnold, M. D. Ayres, P. M. A. Zanotto, S. C. Howard, G. W. Gooday, L. H. Chappel, P. A. Kitss, L. A. King y R. D. Possee. 1995. Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome. *Virology.* 212: 673-685.
- Hernández-Mendoza, J. L., E. C. López-Barbosa, E. Garza-González y N. Mayek-Pérez. 2008. Spatial distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize landraces grown in Colima, México. *Inter. J. Trop. Insect Sci.* 28: 126-129.
- Herniöu, E. A., J. A. Olszewski, J. S. Cory y D. R. O'Reilly. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu. Rev. Entomo.* 48: 211-234.
- Hitchman, R. B., D. J. Hodgson, L. A. King, R. S. Hails, J. S. Cory y R.D. Possee 2007a. Host mediated selection of pathogen genotypes as a mechanism for the maintenance of baculovirus diversity in the field. *Journal of Invertebrate Pathology.* 94: 153–162.
- Hitchman, R. B., E. A. Siaterli, C. P. Nixon y L. A. King. 2007b. Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnol. Bioeng.* 96: 810–814.
- Hodgson, D. J., A. J. Vanbergen, A. D. Watt, R.S. Hails y J. S. Cory. 2001. Phenotypic variation between coexisting genotypic strains of a lepidopteran baculovirus. *Evol. Ecol. Res.* 3: 687–701.
- Hodgson, D. J., R. B. Hitchman, A. J. Vanbergen, R. S. Hails, R. D. Possee y J. S. Cory. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixedgenotype nucleopolyhedrovirus infections. *J. Evol. Biol.* 17: 1018–1025.
- Hoover, K., J. O. Washburn y L. E. Volkman. 2000. Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. *J. Insect Physiol.* 46: 999–1007.
- Hruska, A. J. y C. Gladstone. 1987. El costo del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* en el maíz. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias. Managua, Nicaragua. 25 p.

- Hruska, A. J. y F. Gould. 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *J. Econ Entomol.* 90: 611-622.
- Hu, Z., T. Luijckx, L. C. Van Dinten, M. M. Van Oers, P. J. Hajos, F. J. J. A. Bianchi, J. W. M. Van Lent, D. Zuidema y J. M. Black. 1999. Specificity of polyhedrin in the generation of baculovirus occlusion bodies. *J. Gen. Virol.* 80: 1045-1053.
- Hughes, P. R., R. R. Gettig y W. J. McCarthy. 1983. Comparison of the time-mortality response of *Heliothis zea* to 14 isolates of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 41: 256-61.
- Hughes, P. R. y H. A. Wood. 1986. *In vivo* and *in vitro* bioassay methods for baculoviruses. *En: Granados R. R. and B. A. Federici (Eds.). The Biology of Baculoviruses. Vol. II, pp. 1-30. CRC Press, Boca Raton, Florida.*
- Ignoffo, C. M. 1964. Bioassay technique and pathogenicity of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner). *J. Insect Pathol.* 6: 237-240.
- Jaques, 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. New York, USA. Pp. 285-360.*
- Kalmakoff, J. y V. Ward. 2003. Baculoviruses. University of Otago, Department of Microbiology.
- Kathleen, A. T., L. A. Bulla y R. A. Consigli. 1981. Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. *Microbiol. Rev.* 45(3): 379-408.
- Kikhno, I., S. Gutierrez, L. Croizier, G. Croizier y M. López-Ferber. 2002. Characterization of *pif*, a gene required for the per os infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* 83: 3013-3022.
- Kuzio, J., M. N. Pearson, S. H. Arwood, C. J. Funk, J. T. Evans, J. M. Slavicek y G. F. Rohrmann. 1999. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology.* 253: 17-34.
- Lasa, R., P. Caballero y T. Williams. 2007. Juvenile hormone analogs greatly increase the production of a nucleopolyhedrovirus. *Biol. Contr.* 41: 389-396.
- Le, T. H., T. Q. Wu, A. Robertson, D. Bulach, P. Cowan, K. Goodge y D. Tribe. 1997. Genetically variable triplet repeats in a RING-finger ORF of *Helicoverpa zea* species baculoviruses. *Virus Res.* 49: 67-77.
- Lee, H. H. y L. K. Miller. 1978. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* 27: 754-767.

- León, M. y J. L. Pulido. 1991. Importancia del control natural del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. Memorias. Seminario *Spodoptera frugiperda* (El Gusano Cogollero) en sorgo, maíz y en otros cultivos. Revista Colombiana de Entomología. Pp. 78-82.
- Lezama, G. R. 1993. Patogenicidad de hongos (Hyphomycetes) y del nematodo entomopatígeno *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar sobre *S. frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidóptera: Noctuidae). Tesis de doctorado en ciencias. Universidad de Colima. Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias. Colima, México. Pp. 82.
- Lo, H.R. y Y.C. Chao. 2004. Rapid titer determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. Biotechnol. Prog. 20: 354–360.
- López-Ferber, M., O. Simon, T. Williams y P. Caballero. 2003. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. Proc. Royal Soc. Lond. Ser. B-Biolog. Sci. 270: 2249–2255.
- Lynn, D. E., M. Shapiro y E. M. Dougherty. 1993. Selection and screening of clonal isolates of the Abington strain of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 62: 191–95.
- Lynn, D. E. 2002. Effects of temperature on the susceptibility of insect cells to infection by baculoviruses. Methods Cell Sci. 23: 221–225.
- Mackay, I.M., K.E. Arden y A. Nitsche. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acids Res. 30: 1292–1305.
- Majima, K., R. Kobara y S. Maeda. 1993. Divergence and evolution of homologous regions of *Bombix mori* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. 67: 7513-7521.
- Martínez, M. R. y J. López. 2009. Hymenópteros parasitoides y depredadores en cultivos de maíz-frijol en valles centrales de Oaxaca, México. Memorias. Sociedad Mexicana de Entomología. 437 p.
- Mazzone, H. M. 1985. Pathology associated with baculoviruses infection. In: Maramorosh K. and K. E. Sherman (Eds.). Viral insecticides for biological control. Academic Press. Orlando, Florida. Pp. 81-120.
- Metcalf, C. L. y W. P. Flint. 1965. Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control. 1^{ra} ed. Editorial McGraw-Hill Book Company, Inc. México D. F. 530 p.
- Milks, M. 1997. Ingestion time does not influence the susceptibility of *Trichoplusia ni* to a nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 70: 165-166.

- Miller, L. K. y K. P. Dawes, 1978. Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses, *Autographa californica* MNPV and *Trichoplusia ni* MNPV. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 411-421.
- Molina-Ochoa, J., J. E. Carpenter, E. A. Heinrichs y J. E. Foster. 2003. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean basin: an inventory. *Fla. Entomol.* 86: (3). 254-289.
- Molina-Ochoa, J., J. E. Carpenter, R. Lezama-Gutierrez, J. E. Foster, M. González-Ramírez, C. A. Ángel-Sahagún y J. Farías-Larios. 2004. Natural distribution of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Florida Entomologist.* 87: 461-472.
- Monsma, S. A., A. G. P. Oomens y G. W. Blissard. 1996. The gp64 envelope fusion proteins is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *J. Virol.* 70: 4607-4616.
- Moscardi, F. 1983. Utilizacao de Baculovirus *Anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisador de EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soya. Londrina.* 23: 1-21.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.
- Muñoz, D., J. Castillejo y P. Caballero. 1998. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population. *Appl. Environ. Micro.* 64: 4372-77.
- Muñoz, D. y P. Caballero. 2001. Diversidad natural de los baculovirus. *En: Caballero, P; Williams, T. y López, M. (Eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Pp 95-118.*
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, y M. D. Summers. 1995. *Virus taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Vienna y New York. Springer-verlag.*
- Nagoshi, R. N. y R. L. Meagher. 2008. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. *Fla. Entomol.* 41: 546-554.
- Narváez-Solís, C., Z. C. M. Rizo, P. Castillo, I. Baca, M. Ortiz y G. Gallegos. 2004. *Manual de procedimientos para la producción de virus entomopatógenos (VPN). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. León, Nicaragua. 23 p.*
- O'Reilly, D. R. y L. K. Miller. 1991. Improvement of baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *BioTechnol.* 9: 1086-1089.

- Paschke, J. D., R. E. Lowe y R. L. Giese. 1968. Bioassay of the nucleopolyhedrovirus and granulovirus viruses of *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 10: 327-329.
- Quaant-Russell, R. L., M. N. Pearson, G. F. Rohrmann y G. S. Beaudreau. 1987. Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies. Virology. 160: 9-19.
- Reeson, A. F, K. Wilson, A. Gunn, R.S. Hails y D. Goulson. 1998. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. Proc. R. Soc. London Ser. B. 265:1787-91.
- Ribeiro, H. C. T., O. H. O. Pavan y A. R. Muotri. 1997. Comparative susceptibility of two different hosts to genotypic variants of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus. Entomol. Exp. Appl. 83: 233-237.
- Robertson, J. L. y H. K. Preslier. 1992. Pesticide bioassays with Arthropods. CRC Press Boca Raton, Florida, 127 pp.
- Rodríguez, M., R. y C. De León. 2008. El cultivo del maíz. Temas selectos. 1^{ra} ed. Editorial Colegio de Posgraduados, Mundi-Prensa México. Pp. 29-45.
- Rosas, A. S. L. 2002. Hongos entomopatógenos. Memorias, I Curso Internacional de Patología de Insectos. Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. Cap. 5. 49 p.
- Sánchez-Peña, S. R. 2000. Entomopathogens from two Chihuahuan desert localities in Mexico. BioControl. 45: 63-78.
- Schmid-Hempel, P. y Ebert D. 2003. On the evolutionary ecology of specific immune defense. Trends Ecol. Evol. 18: 27-32.
- Sciocco, A. 2001. Estructura y clasificación de los baculovirus *En*: Caballero, P; Williams, T. y López, M. (Eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Pp 48-71.
- Shapiro, D. I., J. R. Fuxa, H. D. Braymer y D. B. Pashley. 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolate of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 58: 96-105
- Simon, O., T. Williams, P. Caballero y M. López-Ferber. 2006. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. Proc. Royal Soc. Biolog. Sci. 273: 783-790.
- Smith, I. R. L. y N. E. Crook. 1988. *In vivo* isolation of baculovirus genotypes. Virology. 166: 240-244.
- Starnes, R. L., C. L. Liu y P. G. Marrone. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. Am. Entomol. 39: 83-91.

- Stiles, S. y B. Himmerich. 1998. *Autographa californica* NPV isolates: restriction endonuclease analysis and comparative biological activity. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 174–77.
- Takatsuka, J., S. Okuno, M. Nakai y Y. Kunimi. 2003. Genetic and biological comparison of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biol. Control* 26:32–39.
- 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, USA. Pp. 227-257.
- Tanada, Y. y K. H. Kaya. 1993. *Insect pathology.* Academic Press. San Diego, C. 666 p.
- Teakle, R. E., J. M. Jensen, J. E. Giles. 1986. Agerelated susceptibility of *Heliothis punctiger* to a commercial formulation of nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 47: 82–92.
- Thiem, S. M., X. Du, M. E. Quentin y M. M. Berner. 1996. Identification of a baculoviruses gene that promotes *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line, *J. Virol.* 70: 2221-2227.
- Tinoco, R. y D. Halperin. 1998. Poverty, production and health: inhibition of erythrocyte cholinesterase through occupational exposure to organophosphate insecticides in Chiapas, Mexico. *Archive Environment Health.* 53: 29-35.
- Toprak, U. y M.O. Gürkan, 2004. First record of a NPV isolated from *Spodoptera littoralis* (Boisad) (Lepidoptera: Noctuidae) for Turkey and its molecular identification according to the partial *left-8* gene. *Turkish J. Biol.* 28(2-4): 71-77.
- Toprak, U., S. Bayram y M. O. Gürkan, 2005. Gross pathology of SpliNPVs and alterations in *Spodoptera littoralis* Boisad, (Lepidoptera: Noctuidae) morphology due to baculoviral infection. *J. Agric. Sci.* 11(1): 65-71.
- Vasconcelos, S. D., J. S. Cory, K. R. Wilson, S. M. Sait y R.S. Hails. 1996. Modified behavior in baculovirus-infected lepidopteran larvae and its impact on the spatial distribution of inoculum. *Biol. Contr.* 7: 299-306.
- Vilaplana, L., K. Wilson, E. M. Redman y J. S. Cory. 2010. Pathogen persistence in migratory insects: high levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm. *Evolutionary Ecology.* 24: 147–160.
- Villa-Castoreña, Ma. M. y E. A. Catalán-Valencia. 2004. Determinación de estadios larvales de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) para la Construcción de un modelo de predicción. *Folia Entomológica Mexicana.* 43:307-312.

- Villamizar, L., C. Arriero, F. Bosa y A. Cotes. 2004. Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología. 30: 99-105.
- Volkman, L. E. y P. A. Golsdmith. 1985. Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. Virology. 143: 185-195.
- Volkman, L. E. y B. A. Keddie. 1990. Nuclear polyhedrosis virus pathogenesis. Seminars in Virology. 1: 249-256.
- Volkman, L. E., G. W. Blissard, P. Friesen, B. A. Keddie, R. D. Possee, y D. A. Thielmann. 1995. Baculoviridae. In: Murphy, F.A. C.M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Matelli, M. A. Mayo y M. D. Summers (Eds.). Virus taxonomy: sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag, New York, USA. Pp. 104-113.
- Washburn, J. O., B. A. Kirkpatrick y L. E. Volkman. 1996. Insect protection against viruses. Nature. 383:767.
- Whittaker, G. R., M. Kann y A. Helenius. 2000. Viral entry into the nucleus. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 16: 627-651.