



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

---

Escuela Nacional de Estudios Profesionales  
I Z T A C A L A

VIRUS DE POLIHEDROSIS NUCLEAR (NPV) AGENTE  
NATURAL EN EL CONTROL DEL GUSANO DEL  
CORAZON DE LA COL *Spodoptera* sp  
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE).

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

**JOEL LARA REYNA**



TLALNEPANTLA EDO. DE MEX.

1991



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**"ALIADOS CON LA NATURALEZA.....NO CONTRA ELLA"**

## **AGRADECIMIENTOS**

-A la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

Al Centro de Entomología y Acarología, el cual me recibió con los brazos abiertos desde el primer momento.

A la Dra. Raquel Alatorre Rosas por su dirección, comprensión y apoyo durante el desarrollo de este trabajo

A los profesores de mi facultad, quienes aportaron una parte de todos sus conocimientos para inculcarme el amor a la Biología.

Al M.en C. Jorge Valdez Carrasco. por la asesoría y amistad brindada en todo momento.

Al M. en C. José López Collado por su ayuda desinteresada y su amistad.

A mis compañeros de laboratorio de Patología de Insectos: Patricio, Ignacio, Antonio, Francisco, Alfredo e Ismael, por los momentos tan agradables que pasamos juntos.

## DEDICATORIA

Dedico con mucho cariño este trabajo a quienes hicieron posible la culminación de un sueño; a quienes me apoyaron en todo momento; a quienes me becaron durante toda mi vida estudiantil; a quienes me dieron la vida:

A mis padres

Anastacio y María

A mis hermanos y cuñados:

Sergio y Silvia  
Anabel y Rodrigo  
Marina y Javier  
Bertha y Marcial  
Oscar  
Cesar y Mary  
J. Antonio y Alicia  
Alfonso

Con mucho cariño a:

Dulce César  
Conchita Luis  
Lucía Margarita  
Josefina Laura  
Uriel Tonny  
Edgar Adriana

.....por el gusto de conocernos en la Facultad y disfrutar de una amistad tan sincera como la nuestra.

A mis sobrinos y sobrinas:

Sergio Mariana  
Alejandro Marcos  
Adriana Guillermo  
Natalia

A Gaby: por su amistad

## CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. Virus entomopatógenos.....	4
2.1.1. Virus asociados a insectos.....	5
2.1.1.1. Poxvirus (Entomopoxvirus).....	8
2.1.1.2. Iridovirus.....	9
2.1.1.3. Reovirus.....	10
2.1.1.4. Baculovirus.....	11
2.1.2. Importancia de los baculovirus.....	12
2.1.3. Morfología de Baculovirus (Cuerpo de inclusión).....	14
2.1.4. Modo de Acción.....	17
2.1.4.1. Vías de Entrada.....	17
2.1.4.2. Infección.....	18
2.1.4.3. Barreras contra la infección....	24
2.1.4.3.1. Jugos Intestinales.....	24
2.1.4.3.2. La Membrana Peritró- fica.....	26
2.2. Citopatología del Virus de Polihedrosis Nuclear.	28
2.2.1. Citopatología de VPN en lepidópteros.....	30

2.3. Potencialidad de los baculovirus como Bioinsecticidas.....	33
2.3.1. Especificidad (Rango de Hospederos).....	33
2.3.2. Transmisión.....	35
2.3.3. Persistencia.....	37
2.3.3.1. Persistencia en Suelos.....	37
2.3.3.1. Persistencia en plantas.....	39
2.3.4 Producción Masiva de Baculovirus.....	39
3. MATERIALES Y METODOS.....	43
3.1. Cría de <i>Spodoptera sp</i> .....	43
3.2. Extracción y Purificación del VPN de <i>Spodoptera sp</i> .....	45
3.2.1. Extracción.....	45
3.2.2. Purificación.....	46
3.3. Conteo de Polihedros.....	48
3.4. Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ).....	49
3.5. Determinación del Rango de Hospederos.....	52
3.6. Histopatología del VPN de <i>Spodoptera sp</i> .....	53
3.7. Morfología de los Cuerpos de Inclusión.....	53
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	55
4.1. Extracción.....	55
4.2. Purificación.....	55
4.3 Obtención de la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ). .....	56
4.4. Rango de Hospederos.....	59
4.5. Histopatología del VPN de <i>Spodoptera sp</i> .....	64
4.6. Morfología del Cuerpo de Inclusión.....	69



5. CONCLUSIONES.....	70
6. LITERATURA CITADA.....	71
7. APENDICE.....	80

## INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1	Mortalidad experimental y corregida obtenida en los bioensayos de la evaluación del VPN de <i>Spodoptera sp</i> en contra de larvas de tercer estadio de <i>Spodoptera sp</i> ..... 58
2	Valores determinados estadísticamente mediante el análisis Probit para la $CL_5$ $CL_{50}$ y $CL_{95}$ ..... 58
3	Mortalidad de larvas de tercer estadio de <i>Spodoptera sp</i> , <i>Plutella xylostella</i> y <i>Trichoplusia ni</i> tratadas con el VPN de <i>Spodoptera sp</i> .....63

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Morfología general de los subgrupos de baculovirus.....	15
2. Representación esquemática del proceso de descapsulación de los virus de polihedrosis y granulosis e inyección del ADN viral dentro del núcleo.....	20
3. Representación esquemática de los eventos primarios de la infección de <i>T. ni</i> con el VPN de <i>Autographa californica</i> (VPAC), en células epiteliales del intestino medio.....	23
4. Esquema general de producción masiva de baculovirus a partir del hospedero natural o alteradamente.....	42
5. A Diluciones realizadas a partir de la solución viral concentrada. B Impregnación de los discos de col sumergidos en la solución viral.....	51
6. A Tejido graso afectado por nucleopolihedrosis B Corte transversal de traquea.....	66

7. A Corte transversal de hipodermis afectada por nucleopolihedrosis. B Corte transversal de Tejido graso y muscular..... 67
8. A Vista general de los cuerpos de inclusión del VPN de *Spodoptera sp.* B Cuerpos de inclusión - parcialmente disueltos..... 68

#### Gráfica

1. Línea de respuesta del logaritmo de la dosis en contra de la mortalidad provocada por el VPN de *Spodoptera sp* en contra de *Spodoptera sp*..... 57
2. Línea de respuesta del logaritmo de la dosis en contra de la mortalidad provocada por el VPN de *Spodoptera sp* sobre *Trichoplusia ni*..... 61
3. Líneas de respuesta del logaritmo de la dosis en contra de la mortalidad provocada por el VPN de *Spodoptera sp* sobre *Spodoptera sp* y *Trichoplusia ni*..... 62

## R E S U M E N

El gusano del corazón de la col *Spodoptera sp.* provoca fuertes daños a la col o repollo en México, representando grandes pérdidas al agricultor, ya que una sola larva es suficiente para dañar seriamente la calidad del producto. En forma natural *Spodoptera sp* sufre una alta mortalidad como consecuencia de la infección provocada por un virus de polihedrosis nuclear (VPN), perteneciente a la familia de los baculovirus. En el presente trabajo se muestra la evaluación en laboratorio y el método de producción masiva de este virus, así como su potencial como agente de control microbiano en contra del gusano del corazón de la col.

Se evaluaron diferentes concentraciones del VPN de *Spodoptera sp* mediante bioensayo para determinar la Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ ) en el laboratorio. Utilizando la técnica histológica se determinaron los tejidos afectados en larvas de último estadio. A través de micrografías al microscopio electrónico de barrido se determinó la morfología de los cuerpos de inclusión del virus. Se realizaron pruebas de susceptibilidad del VPN de *Spodoptera sp* en contra de *Trichoplusia ni* y *Plutella xylostella*.

La  $CL_{50}$  para *Spodoptera sp* fué de  $5.7 \times 10^3$  polihedros por mililitro; las larvas murieron en un promedio de seis días

posteriores a la infección. Los tejidos que presentaron daños por invasión del virus fueron: intestino medio, hemocitos, tejido graso, tranqueoblastos e hipodermis.

Los cuerpos de inclusión del virus son de forma irregular con una tendencia esférica con viriones, al parecer, distribuidos en forma aleatoria.

La  $CL_{50}$  para *Trichoplusia ni* fué de  $1.056 \times 10^6$  polihedros/ml, dosis muy alta en comparación a la  $CL_{50}$  de *Spodoptera sp*, por lo que se le consideró como ligeramente susceptible. *Plutella xylostella* resultó no susceptible.

Se concluyó que el VPN de *Spodoptera sp* presenta un alto potencial como agente de control microbiano, para ser considerado en programas de manejo integrado del gusano del corazón de la col.

## 1. INTRODUCCION

En México el cultivo de las crucíferas constituye una gran fuente de ingresos, sobre todo en lo que se refiere al cultivo de brócoli, ya que casi el total de su producción es destinada a la exportación (U.N.P.H.,1989).

Según datos de la Unión Nacional de Productores Hortícolas (U.N.P.H.), en la temporada 1987-88, se exportaron un total de 45,682,525 kg de crucíferas, de las cuales el 58.4% correspondió a brócoli, 38% a Coliflor, 12.3% para col de Bruselas y el 1.3% para col.

El cultivo de crucíferas enfrenta una serie de problemas, entre los cuales se encuentran las plagas, destacando por su importancia los defoliadores y barrenadores que provocan daño al alimentarse, tanto del follaje como de la parte comercial y consecuentemente reducen los ingresos del horticultor.

Los insectos defoliadores asociados al cultivo de crucíferas reportadas para México son: el falso medidor de la col *Trichoplusia ni*; la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella*; la palomilla blanca de la col *Pieris rapae* y *Leptophobia aripa*. Dentro de los barrenadores se encuentran aquellos conocidos como "barrenadores del corazón de la col" tales como *Prodenia ornithogalli*, *Copitarsia consueta*, y

*Spodoptera sp* (Mc Gregor y Gutiérrez, 1983).

El barrenador del corazón de la col *Spodoptera sp* en el área de Texcoco, en el Estado de México, es afectado en forma natural por una enfermedad viral que reduce la población larval en forma significativa.

El uso de virus asociados a insectos constituyen una alternativa para controlar plagas insectiles, con las ventajas de que: estos organismos no afectan insectos benéficos, son altamente específicos (no atacan a vertebrados), hasta el momento no se ha reportado resistencia y su aplicación en el campo no requiere maquinaria especial, ya que pueden ser aplicados con la misma tecnología que para los insecticidas químicos (Shieh y Bomfalk, 1980).

La persistencia y capacidad de diseminación de los virus, son dos características que los hacen muy importantes, ya que pueden permanecer activos durante mucho tiempo en suelo y ser diseminados por el viento, la lluvia, la gravedad y por el mismo hospedero e incluso parásitos y depredadores. Todo esto favorece el desarrollo de epizootias en campo (Jaques, 1977).

En base a lo anterior se planteó el presente trabajo con el objetivo principal de aislar y purificar el VPN de *Spodoptera sp* y evaluarlo en laboratorio, con el fin de determinar su potencial como agente de control microbiano del gusano del corazón de la



col y otros lepidópteros asociados al cultivo de crucíferas.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Virus Entomopatógenos

El primer registro de un virus como causante de una enfermedad en un insecto fué reportado en 1909 por Wahl, cuando demostró que una entidad infecciosa, asociada a larvas de la palomilla religiosa *Lymantria monacha* podía pasar un ultrafiltro. Cuerpos polihédricos similares a los que el observó fueron descritos anteriormente para el gusano de seda *Bombix mori* por A. Maestri y E. Cornalia, trabajando separadamente en 1856. La demostración formal de que los virus eran causantes de enfermedades en insectos, fué realizada durante el período de 1894-1898 por Bulle. Cuarenta años más tarde, en 1946, Steinhaus publicó su trabajo clásico "Microbiología de insectos" en donde menciona una lista de 47 insectos reportados que presentaban enfermedades virales (Entwistle y Evans, 1984).

El uso de los virus como control microbiano fué enmarcado por la introducción sucesiva por Balch, en 1946, del virus de *Gilpinia hercyniae* en Canada y por la aplicación aérea del virus de la oruga de la alfalfa *Colias philodice* por Steinhaus y Thompson en 1946 en California (Entwistle y Envas, 1984). En las últimas décadas las enfermedades virales han recibido mayor atención, siendo reportadas en casi todos los ordenes de insectos.

### 2.1.1. Virus asociados a insectos

La virología de insectos es un campo muy dinámico debido al constante descubrimiento de nuevos virus asociados a insectos. Los virus originalmente fueron descritos como restringidos a unas pocas especies de insectos, sin embargo, se sabe que pueden infectar representantes de los diferentes ordenes (Margtinoni e Iwai, 1986). Varios virus similares a los que atacan insectos, han sido reportados en ácaros, crustáceos, plantas y algunos vertebrados.

Cada año se incrementa el número de virus aislados de insectos, existe un catálogo publicado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), en donde Margtinoni e Iwai (1986), mencionan cerca de 1 200 asociaciones de virus a insectos.

No obstante el número de asociaciones virus-insecto existentes, no ha habido un criterio dominante entre los autores en lo referente al número de familias de virus entomopatógenos; sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto adoptar la nomenclatura propuesta por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV), el cual maneja 11 familias de virus asociadas a insectos (Tabla I), y de las cuales cuatro son las que presentan virus que tienen un alto potencial para su uso en el control de plagas inséctiles.

Tabla I. Familias y Grupos de Virus Asociados con Artrópodos

(Tomado de Margtinoni e Iwai, 1986)

---

VIRUS DE ADN

---

**ADN** de doble cadena, envueltos

**POXVIRIDAE**, Poxvirus

**ENTOMOPOXVIRINAE**, Poxvirus de insectos

**BACULOVIRIDAE**

Baculovirus

Subgrupo A, Virus de Polihedrosis Nuclear (VPN)

Subgrupo B, Virus de Granulosis (VG)

Subgrupo C, Baculovirus no Ocluidos

**POLYDNAVIRIDAE**

Baculovirus

Subgrupo A, Virus de Polihedrosis Nuclear (VPN)

Subgrupo B, Virus de Granulosis

Subgrupo C, Baculovirus no Ocluidos

**ADN** de doble cadena, no envueltos

**IRIDOVIRIDAE**, Deoxivirus Citoplásmicos Icosahedrales

Iridovirus, pequeños virus iridiscentes de insectos

Chloriridovirus, grandes virus iridiscentes de insectos

**ADN** de cadena sencilla, no envueltos

**PARVOVIRIDAE**, Parvovirus

Densovirus, Virus de densonucleosis

VIRUS DE ARN

**ARN** de doble cadena, no envueltos

**REOVIRIDAE**, Reovirus

Virus de Polihedrosis Citoplásmica (VPC)

**BIRNAVIRIDAE**, Virus de ARN de doble cadena bisegmentada

Birnavirus, Virus X de Drosophila

**ARN** de cadena sencilla, envueltos

**RHABDOVIRIDAE**, Virus en forma de bala

Sigmavirus, Virus sensibles a CO<sub>2</sub>

---

Tabla I. Familias y Grupos de Virus Asociados con Artrópodos  
(Continuación)

---

VIRUS DE ARN

---

**ARN** de doble cadena, no envueltos

**PICORNAVIRIDAE**, Picornavirus

Virus de la Parálisis de Grillos

Virus C de *Drosophila*

Virus de *Gonometa*

Virus de *Rhopalosiphum padi*

**CALICIVIRIDAE**, Calicivirus

Virus de atrofiamiento crónico de *Amyelosis*

Grupo del Virus de Nudaurelia

Virus de *Nadaurelia*

Virus de ARN de *Trichoplusia*

Virus relacionados aislados de otros lepidópteros

**NODAVIRIDAE**

Nodavirus

Virus de *Nodamura*

Virus del Escarabajo Negro

Pequeños Virus esféricos de ARN no clasificados

Virus de la abeja arkansas

Virus de parálisis aguda de abejas

Virus asociado a parálisis crónica de abejas

Virus de parálisis lenta de abejas

Virus X de abejas

Virus Y de abejas

Virus Celular de la Reyna Negra

Virus de la parálisis de las alas

Virus de arreglo cristalino

Virus A de *Drosophila*

Virus P de *Drosophila*

Pequeños Virus ovoides de ARN, no clasificados

Virus de la parálisis crónica de abejas

Virus RS de *Drosophila*

A continuación se mencionan las características generales de las principales familias asociadas a insectos.

#### 2.1.1.1 Poxvirus (Entomopoxvirus)

Los entomopoxvirus son un grupo de virus de insectos descubierto recientemente, ya que el primer registro fué hecho por Hurpin y Vago en 1963 (Smith, 1976).

El grupo tiene un interés particular a causa de que están estrechamente relacionados con los poxvirus de animales vertebrados. A la fecha se tienen registros para coleópteros, dípteros, lepidópteros y orthópteros (Evans y Entwistle, 1987). Aunque los entomopoxvirus son muy similares en apariencia general, se diferencian de acuerdo al tamaño y al tipo de insecto hospedero. De este modo, los poxvirus del escarabajo *Melolontha melolontha* son los más grandes, midiendo cerca de 400 x 250 nm; los poxvirus de lepidópteros y orthópteros son generalmente pequeños de aproximadamente 350 x 250 nm y, los encontrados en dípteros son los más pequeños midiendo 320 x 250 nm (Smith, 1976).

Los entomopoxvirus son los virus menos estudiados de los tres grupos de virus asociados a insectos que presentan cuerpos de inclusión. El cuerpo de inclusión (también llamado esferoide) presenta incluidas las partículas virales.

El esferoide está compuesto por una matriz paracristalina de naturaleza proteica y cuyo componente principal es la esferoidina (Envans y Entwistle, 1987). Presentan viriones en forma de ladrillo y dependiendo de la especie de virus, presentan formas distintivas para cada uno de ellos (Granados y Roberts, 1970). Durante el proceso de reproducción viral se forman unas estructuras en forma de huso (fusiformes) las cuales al parecer no contienen viriones (Henry, 1969).

La multiplicación de estos virus se realiza en el citoplasma del tejido adiposo y hemocitos (Smith, 1976).

#### 2.1.1.2. Iridovirus

Esta familia de virus es nombrada así debido a la característica iridiscente (verde, azul o púrpura) apreciada en los individuos infectados en un estado avanzado de la enfermedad (Harrap y Payne, 1979).

El Código Internacional de Taxonomía de Virus ha incluido a los virus iridiscentes de artrópodos dentro de la familia Iridoviridae, en donde se incluyen virus similares que afectan a mamíferos, peces y anfibios (Evans y Entwistle, 1987). Para distinguir a los virus de artrópodos se ha sugerido una subfamilia que incluye a estos virus con el nombre de Deoxivirus Citoplásmicos Icosahedrales de Invertebrados (DCII) (Mattews, 1982). aunque no ha sido aceptada formalmente.

Los iridovirus no presentan cuerpos de inclusión y son clasificados dentro de dos grupos de acuerdo al tamaño: aquellos que miden alrededor de los 180 nm y los que están cerca de los 130 nm en diámetro (Evans y Entwistle, 1978). Los viriones están empacados como un núcleo de ADN electro-denso rodeado por una membrana que está envuelta por una cápside icosaedral compuesta por cerca de 1 562 subunidades, dependiendo del tipo de virus (Harrap y Payne, 1979).

Son reportados para dípteros, coleópteros y lepidópteros (Smith, 1976). los órganos afectados por los Iridovirus en larvas de lepidópteros van desde el tejido graso y hemocitos, como principales, hasta la hipodermis, músculos, células subesofágicas y pericárdicas que también pueden ser afectadas (Harrap y Payne, 1979). En un grado avanzado de la enfermedad, es característico que el virus se comporte como sistémico (Kelly y Robertson, 1973).

#### 2.1.1.3 Reovirus

Esta familia presenta como virus tipo de insectos, al Virus de Polihedrosis Citoplásmica (VPC). En un nivel morfológico, los VPC tienen una alta semejanza con los Virus de Polihedrosis Nuclear (VPN) de los baculovirus, debido a que presentan cuerpos de inclusión muy similares (Evans y Entwistle, 1987).

Los VPC son ubicados dentro de la familia Reoviridae por



presentar ARN de doble cadena con 10 segmentos en el genoma (Harrap y Payne, 1979). Los viriones son isométricos y pueden ser incluidos aleatoriamente hasta 10 000 dentro del cuerpo de inclusión sin una deformación de este (Arnott et al, 1968). Los VPC son reportados para coleópteros, dípteros, hymenópteros, lepidópteros y neurópteros (Margtinoni e Iwai, 1986).

En lepidópteros, las larvas infectadas por polihedrosis citoplásmica reducen gradualmente su alimentación o bien cesan de alimentarse, lo cual trae como consecuencia una debilidad general. La larva crece muy lentamente y en un estado avanzado de la enfermedad se presenta un cambio de coloración (fuera del normal de la especie de que se trate). Las larvas pueden llegar a pupar, pero usualmente son pequeñas y los adultos, si llegan a emerger, están deformes o son estériles. La infección se limita a las células epiteliales del mesenteron (Evans y Entwistle, 1987).

La polihedrosis citoplásmica se ha reportado en diferentes familias de lepidópteros, hymenópteros y dípteros (Nematocera) principalmente (Harrap y Payne, 1979).

#### **2.1.1.4 Baculovirus**

Dentro de los virus entomopatógenos se encuentran los baculovirus, que son patógenos obligados aislados de especies específicas de insectos y que comprenden a virus de forma bacilar

o en forma de varilla que contienen ADN de doble cadena, encerrado covalentemente y con un peso molecular de aproximadamente  $8 \times 10^7$  daltones (Shieh y Bomfalk, 1980). En la mayoría de los casos, los viriones están incluidos dentro de un cristal de naturaleza proteica el cual es conocido como cuerpo polihédrico de inclusión.

La presencia o ausencia de éste, determina las subdivisiones dentro de la familia (Entwistle y Evans, 1984).

Los baculovirus incluyen tres subgrupos dentro de la familia: los Virus de Polihedrosis Nuclear (VPN), Virus de Granulosis (VG) y los Baculovirus no Ocluidos que no presentan cuerpos de inclusión (Margtinoni e Iwai, 1986).

En los últimos años, la familia Baculoviridae ha cobrado una gran importancia debido a que muchos de sus miembros presentan características importantes como agentes potenciales de control microbiano.

#### **2.1.2. Importancia de los Baculovirus**

Los Baculovirus son los únicos virus junto con los Poxvirus, que inducen la formación de proteínas cristalinas intracelulares ensambladas como cristales (Kelly, 1985).

Dentro de los grupos virales asociados a insectos, en particular, los Entomopoxvirus, los Reovirus y los Rhabdovirus

muestran cierta similitud, estructural y bioquímica, a ciertos virus de vertebrados (Tweeten et al, 1981). A pesar de que han sido observadas diferencias en la actividad biológica y de especificidad de estos virus, esto no los aleja como un posible peligro para otros organismos superiores.

En contraste, los miembros de la familia Baculoviridae, se encuentran restringidos a hospederos invertebrados, específicamente artrópodos (Tanada y Hess, 1984). Esta característica ha generado un interés científico a nivel mundial por este grupo viral, ya que de los baculovirus reportados, el 71% corresponde a lepidópteros, 14% a dípteros, 7% himenópteros, 5% coleópteros y el 3% repartido en orthópteros, isópteros, hemípteros y neurópteros (Entwistle y Evans, 1984). Esto realza la importancia de los baculovirus si se toma en cuenta, que de los daños ocasionados por plagas insectiles, el mayor daño es provocado por lepidópteros (Mc Gregor y Gutiérrez, 1983).

Una propiedad muy importante de los virus, es la alta especificidad que muestran por su hospedero. En el caso de los baculovirus, muchos de ellos no son tan específicos en cuanto a sus hospederos como en el caso de los demás grupos virales. Se han reportado muchos casos de baculovirus infectando especies, géneros y aún familias distintas a la de su hospedero original (Carner et al, 1979; Tjia et al, 1979; Granados y Lawler, 1981; Entwistle y Evans, 1984).

Estas características mencionadas separan a los baculovirus de los demás grupos en forma tal, que la Organización Mundial de la Salud y la FAO recomiendan en forma conjunta que, solamente el grupo de los baculovirus puede ser considerado agente potencial de control microbiano (Shieh y Bomfalk, 1980).

### 2.1.3. Morfología de Baculovirus (Cuerpo de Inclusión)

La familia Baculoviridae se subdivide en tres grupos, de acuerdo a si presenta o no, cuerpo de inclusión.

El subgrupo A, corresponde a los virus de Polihedrosis Nuclear (VPN), que presentan viriones embebidos en forma aleatoria en una matriz cristalina de naturaleza proteica denominada polihedrina. Los cuerpos de inclusión exhiben una gran variación en tamaño y forma, tanto en virus distintos, como en un mismo tipo viral (Tanada y Hess, 1984). La configuración de los viriones, difiere en que, los nucleocápsides pueden estar envueltas en forma sencilla y se denominan virus de Polihedrosis Nuclear Sencillos (VPNS) o en forma múltiple (VPNM) (Smith, 1976).

Los Virus de Granulosis (VG), en el subgrupo B, presentan uno y raras veces dos, viriones embebidos en el cuerpo de inclusión (Figura 1), el componente del cristal es la proteína granulina. El tamaño del polihedro oscila entre 0.3  $\mu$ m de longitud y en forma ocasional, se pueden producir grandes cuerpos

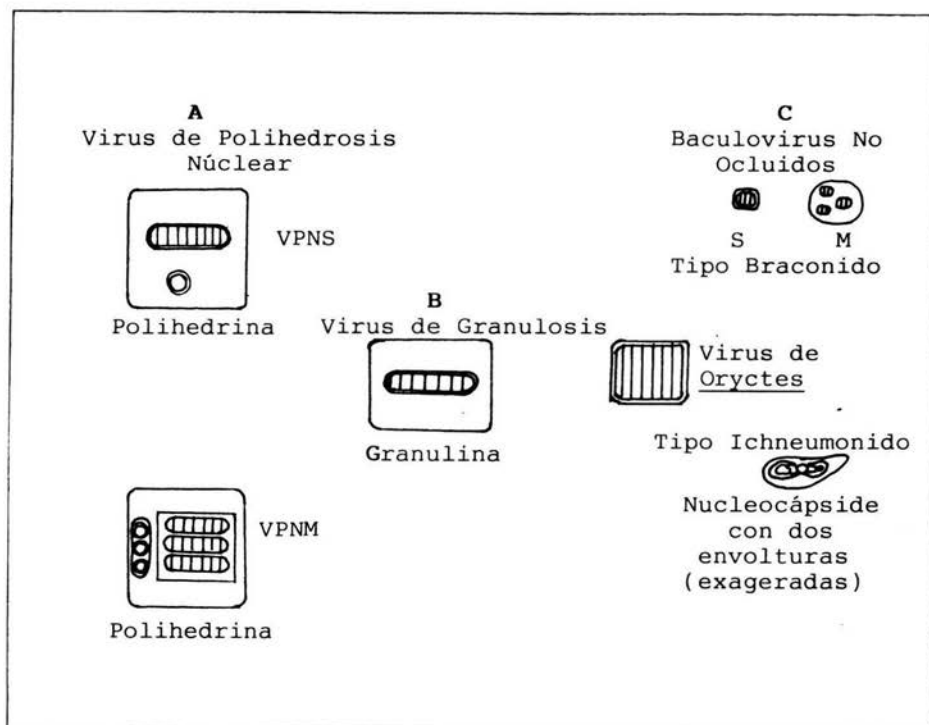


Figura 1. Morfología general de los subgrupos de baculovirus. Una partícula viral consiste de una envoltura exterior y una nucleocápside con núcleo de ADN (Redibujado de Entwistle y Evans, 1984). (VPNS, Virus de Polihedrosis Nuclear con Envoltura Sencilla; VPNM, Virus de Polihedrosis Nuclear con Envoltura Múltiple; S, Sencillo; M, Múltiple).

de inclusión, aunque en estos casos solamente se presenta un virión. Los nucleocápsides están siempre envueltos en forma sencilla dentro del cristal (Kelly, 1985).

El subgrupo C, presenta aquellos baculovirus que no forman cuerpos de inclusión y como virus tipo al del escarabajo *Oryctes rhinoceros*. También se incluyen los baculovirus asociados con el fluido del calix de avispa parasitoides; éstos presentan el genoma empacado dentro de un nucleocápside sencillo o múltiple, rodeados por una envoltura sencilla (Figura 1) (Entwistle y Evans, 1984).

Los polihedros, tanto de los VPN como de los GV, normalmente tienen un tamaño que oscila entre los 0.5 y 4  $\mu\text{m}$  en diámetro (Kelly, 1985), y son altamente refráctiles, por los que pueden ser observados bajo el microscopio óptico. La matriz proteica del cuerpo de inclusión está compuesta por agregados de un polipéptido con un peso molecular promedio de 30 000 daltones (Harrap y Payne. 1979).

Los polihedros maduros están rodeados por otras capas, morfológicamente diferentes y que son conocidas como envolturas polihédricas. Su función y composición no ha sido establecida aún en forma convincente. Se ha teorizado acerca de su función como protección contra la desecación y la radiación ultravioleta (Kelly, 1985). Un hecho importante es la disolución por álcalis, los polihedros son desintegrados completamente, pero las

envolturas permanecen virtualmente intactas (Harrap, 1972 a; Kelly, 1985). Se reporta que la envoltura es resistente a proteasas (Gipson y Scott, 1975).

Las principales características físicas de los polihedros son: estables a pH moderado, débiles a los álcalis y son disueltos a pH mayor de 9.5 (Entwistle y Envas, 1984).

#### **2.1.4 Modo de Acción**

Los baculovirus en forma general son altamente patogénicos e inducen infecciones letales en sus hospederos. Aún cuando las pupas y los estados adultos de algunas especies pueden ser infectados, se considera que el estado más susceptible es el larval (Granados y Williams, 1982). Así pues, la mayoría de la información se refiere a los estados de lepidópteros e himenópteros, aunque también hay suficientes datos acerca de la patología y modo de acción sobre coleópteros y dípteros (Entwistle y Evans, 1984). el modo de acción de los VPN y VG es básicamente el mismo y es descrito a continuación.

##### **2.1.4.1 Vías de Entrada**

La ruta más común de entrada de un baculovirus a su insecto hospedero es por ingestión del virus durante la alimentación de la larva. Sin embargo, son reportadas como vías patológicas la transmisión transovarial, la transmisión transóvulo, a través de

los espiráculos o transmitidos por parasitoides y depredadores (Granados, 1980). Estos mecanismos, con excepción de la infección oral, no son considerados importantes, ya que la frecuencia de estos eventos es relativamente baja (Entwistle y Evans, 1984).

#### 2.1.4.2 Infección

Durante el proceso de infección, los cuerpos polihédricos de los baculovirus, son ingeridos y solubilizados en pocos minutos liberándose los viriones en el lumen del mesenterón. En lepidópteros, los procesos de disolución se llevan a cabo por la acción de los jugos intestinales alcalinos (pH de 9.5 a 11) posiblemente por alguna degradación enzimática (Granados, 1980).

Al parecer, la presencia de una proteasa endógena es muy importante durante los eventos primarios de la infección (Harrap, 1972c). En 1981 Tweeten *et al*, reportaron que la tasa de disolución decrece, si la actividad de la proteasa asociada al virus, es inactivada.

Varios mecanismos por los cuales los baculovirus atacan y penetran a las células del mesenteron han sido reportados, e incluyen: la fusión de la envoltura viral a las microvellosidades de las células epiteliales columnares, la viropexis (pinocitosis) y, el transporte a través de las membranas intercelulares adyacentes (Granados y Williams, 1982).



Debido a que tanto el estomodeo como el proctodeo se encuentran revestidos de cutícula, solamente el epitelio del mesenteron aparentemente, parece jugar un papel muy importante como sitio primario de ataque y entrada del virus (Harrap, 1982). En el epitelio intestinal de lepidópteros se encuentran dos tipos de células principales: las células epiteliales columnares y las células copa (Kelly, 1982). Las células epiteliales columnares parecen ser los únicos tipos celulares envueltos en los procesos de infección; mientras que las células copa son aparentemente resistentes a la infección por baculovirus (Tanada y Hess, 1981).

Después de la disolución de los cuerpos de inclusión, en la luz del mesenteron, numerosos viriones envueltos son encontrados en asociación con las microvellosidades de las células epiteliales columnares. Las envolturas de los viriones interactúan y se fusionan con la membrana plasmática en la región apical de los microvellos (Figura 2), seguido de la entrada del virión al citoplasma, después de dejar sus envolturas virales en las microvellosidades (Tanada y Hess, 1981).

La absorción, fusión y penetración del virus, ocurre entre las 0.25 y las 4 horas posteriores a la ingestión (Granados, 1978). El movimiento de los nucleocápsides de las microvellosidades hacia el citoplasma parece seguir un gradiente, pues éstos son frecuentemente encontrados en forma adyacente a microtubulos y se sugiere que pueden estar involucrados en el movimiento de los nucleocápsides hacia el núcleo .

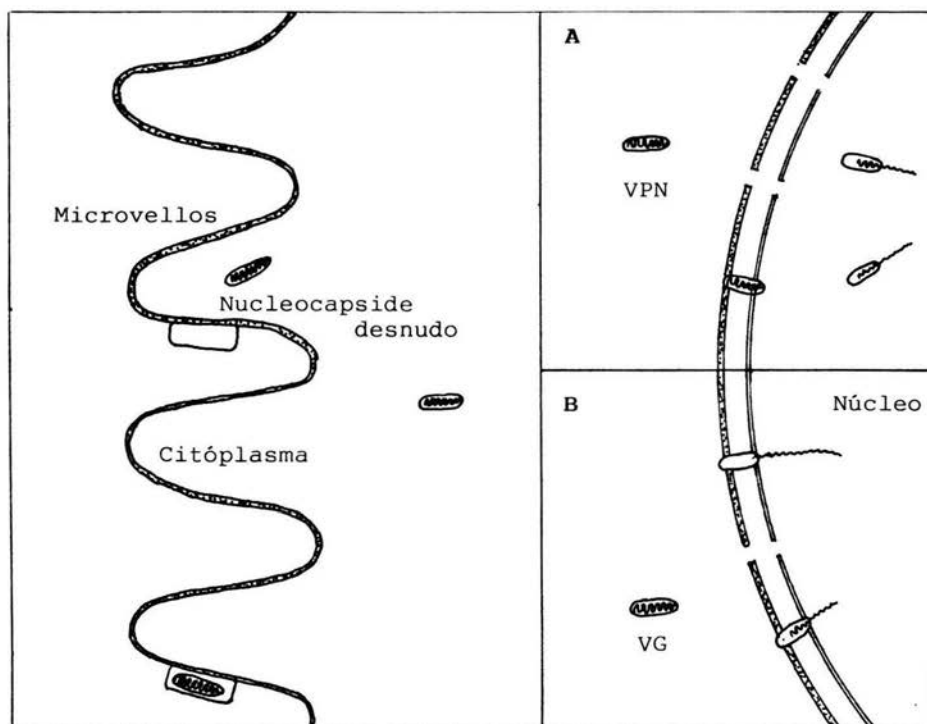


Figura 2. Representación esquemática del proceso de descapsulamiento de los virus de polihedrosis y granulosis, e inyección del ADN viral dentro del núcleo. A virus de polihedrosis nuclear (VPN) penetrando en el complejo de poros nucleares y descapsulándose en el nucleoplasma. B virus de granulosis (VG) descapsulándose en el complejo de poros nucleares e inyectando ADN en el nucleoplasma (Tomando de Granados y Lawler, 1981).

Lawler, 1981).

Una vez que han penetrado los nucleocápsides al citoplasma, y se encuentran en la periferia del núcleo, penetran a través de los poros nucleares y el material genético (ADN) es descargado dentro del núcleo (Tanada y Hess, 1984), o bien, los nucleocápsides penetran por los poros hacia el núcleo, pero se descapsulan en el complejo de poros nucleares sin penetrar completamente al núcleo, descargando solo el ADN (Granados, 1978). Se considera que el sitio donde el virus pierde el cápside, separa a los VPN de los VG: si el descapsulamiento se produce a nivel del complejo de nucleoporos, se afirma que se trata de un virus de granulosis; pero si ocurre en el nucleoplasma, se dice que es un virus de polihedrosis (figura 1). Sin embargo Walker et al (1982) y Kelly (1982), reportan el descubrimiento de virus de granulosis en el núcleo, difiriendo de lo anterior. No obstante se sigue considerando la generalidad como el evento más común.

Una vez que el ADN viral se encuentra en el núcleo, este entra en un período de eclipse y que puede extenderse por varias horas antes de la aparición de la progenie del virus. Durante este período, el núcleo se ensancha y aparece el estroma virogénico en el sitio de replicación del virus. Lepidópteros, dípteros e himenópteros tienen ciclos de replicación muy similares hasta la aparición de los viriones, pero de ahí en adelante surgen diferencias en el desarrollo de la progenie del virus. En himenópteros el ciclo de replicación y producción de

cuerpos polihédricos toma lugar en las células de mesenteron (Entwistle y Evans, 1984). En lepidópteros y dípteros, los viriones parece que raramente forman cuerpos de inclusión, pero tienden a moverse hacia otros tejidos para iniciar nuevos ciclos de infección (Tanda y Hess, 1984).

Summers y Volkman (1976), reportan que la infección hacia otros tejidos aparentemente se lleva a cabo por viriones que penetran através de la membrana basal, de las células columnares del epitelio mesenteral, hacia la hemolinfa. Esto se lleva a cabo por aquellos viriones que son producto de la replicación del virus, o bien de aquellos que atraviesan directamente la membrana basal sin penetrar al núcleo (Figura 3). Estos viriones, al atravesar la membrana basal adquieren unas estructuras en forma de espinas y se les denominan peplómeros (Harrap, 1972b). Estas formas especiales de los virus, inician nuevos ciclos de infección en las células susceptibles restantes y demás órganos del insecto hospedero. En lepidópteros esto incluye a los hemocitos hipodermis, músculos, cuerpo graso, ganglios nerviosos, células pericárdicas, glándulas, traqueoblastos y discos imaginales (Benz, 1963). Los virus se desarrollan solamente en el núcleo de células de tejidos susceptibles, donde se presenta la síntesis de cuerpos polihédricos, culminando con la ruptura, disrupción de células y, normalmente la muerte del hospedero (Entwistle y Evans, 1984).

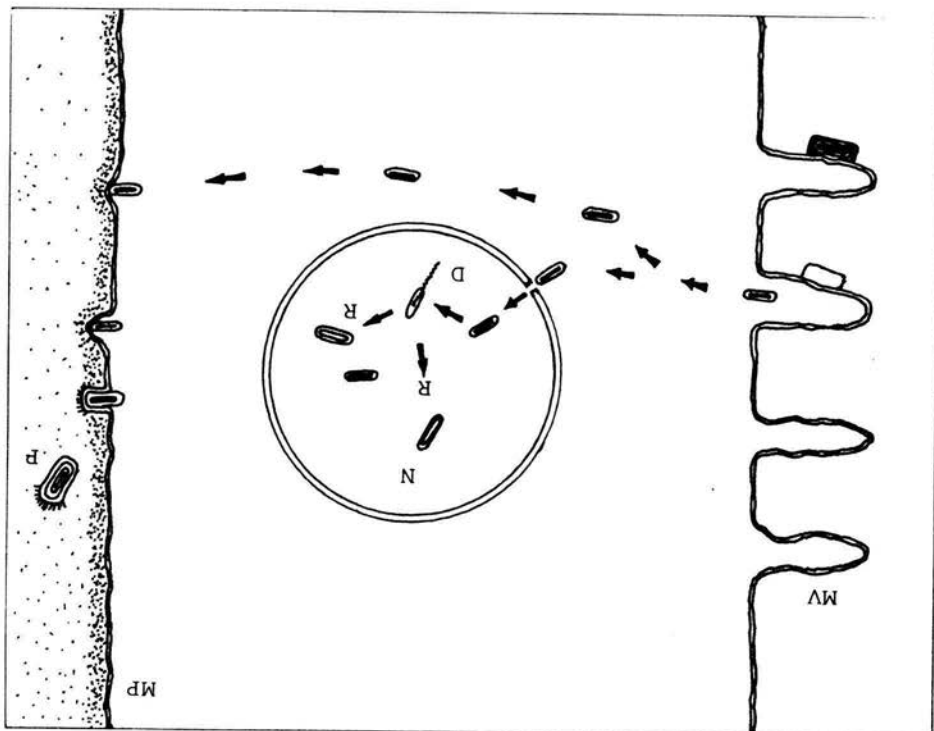


Figura 3. Representación esquemática de los eventos primarios de la infección de *T. ni* con el VPN de *Autographa californica* (VPNAc), en células epiteliales del intestino medio. Después de la fusión de los viriones con las microvellosidades (MV) de las células epiteliales, los nucleocápsides pueden seguir dos rutas: (1) pueden entrar al núcleo (N) a través de los poros nucleares, descapsularse (D) e iniciar la replicación (R) ó (2), pueden moverse directamente hacia la membrana plasmática basal (MP), atravesándola y adquirir una envoltura viral con un halo de filamentos. Estas nuevas formas virales son conocidas como peplómeros (P), y son los responsables de la infección inicial sistémica en el hemocele (Redibujado de Granados y Lawler, 1981).

#### 2.1.4.3 Barreras contra la Infección

Durante el proceso de infección de los VPN, se ha observado que las principales barreras con que tropiezan los virus son, sin duda alguna, los jugos intestinales y la membrana peritrófica.

##### 2.1.4.3.1. Jugos Intestinales

Cuando los polihedros ingeridos son solubilizados, liberando los viriones, éstos quedan expuestos a la acción de los jugos intestinales. Aizawa (1962), en sus experimentos con el gusano de seda *Bombix mori* encontró que, jugos intestinales no tratados y ajustados a un pH de 7 con una solución buffer, redujeron en un 50% la infectividad de hemolinfa infecciosa (con virus), concluyendo que existe una sustancia antiviral en los jugos intestinales. Subsecuentemente el mismo Aizawa (1963), encontró en los jugos intestinales de *Bombix mori* una fracción proteica fluorescente con actividad antiviral. Paschke y Summers (1975), reportan que existe en el mesenteron una degradación extensiva del 50 al 60% para el virus de granulosis de *Trichoplusia ni* y de *Spodoptera frugiperda*. Estos reportes demostraron que la actividad antiviral tienen grados de variación. En larvas susceptibles aparentemente persisten virus suficientes en el medio ambiente intestinal para iniciar la infección (Paschke y Summers, 1975; Brandt et al, 1978).

Harrap (1972c), demostró que cuando jugos intestinales de

*Heliothis zea* eran mezclados con VPN de *Heliothis zea* (VPNH<sub>z</sub>) *in vitro*, el 100% de los virus era inactivado. La diferencia fué grande, pues hubo una reducción de la actividad viral cuando se comparó la DL<sub>50</sub> del testigo. Al parecer algún agente presente en el lumen de *H. zea* juega un papel importante que evita la inactivación del virus. Granados (1978), estudiando los eventos ultraestructurales de la infección de VPNH<sub>z</sub> en *H. zea*, reportó que los viriones liberados, son altamente estables en la luz intestinal y que la degradación de viriones raramente fue observada.

Estudios hechos por Vail *et al* (1973), demostraron que viriones del VPN de *Autographa californica* (VPNA<sub>c</sub>) disueltos *in vitro*, con jugos intestinales de *Estigmene acrea* (larvas) fueron infecciosas a cultivo celular de *T. ni* (Tn-368) medidas por placas de ensayo. Sin embargo, se registró que grandes tiempos de disolución mayores de 2 minutos reducen la actividad viral, sugiriendo que los jugos intestinales inactivan a los viriones liberados (Granados, 1980).

Vail *et al* (1973), reportan que la tasa de disolución de la matriz proteica de los cuerpos polihédricos, tanto de VG como de VPN, decrece si la actividad de la proteasa alcalina asociada a los cuerpos de inclusión, es inactivada. Así, es muy probable que la enzima, activada por los jugos digestivos alcalinos, sea esencial en la iniciación de la infección de los baculovirus por su actividad de proteasa para remover la matriz proteica de los cuerpos de inclusión.

Se reporta el aislamiento y caracterización química de una proteica antiviral por Uchida et al (1984), la cual fue aislada a partir de los jugos digestivos de larvas de *Bombix mori*.

Esta proteina puede precipitar partículas del VPN de *B mori* (VPNBm); pruebas de infectividad viral demuestran que la reacción de precipitación da como resultado la inactivación del virus. Esto fue confirmado por exámenes ultraestructurales de virus tratados, los cuales revelaron que la proteina antiviral desbarata y destruye los nucleocápsides (Tanada et al, 1984).

Estos estudios demuestran que algunas proteínas de los jugos digestivos de larvas de lepidópteros, pueden ser muy importantes como mecanismos de defensa en contra de agentes virales que penetren *per os*. Así, los jugos digestivos del mesenteron representan un medio ambiente hostil para los virones liberados durante los procesos de disolución.

#### **2.1.4.3.2. La Membrana Peritrófica**

Antes de que se inicie la infección de las células epiteliales columnares del mesenteron, los viriones deben atravesar la membrana peritrófica (MP). La MP es una membrana no celular la cual corre a lo largo de la luz del mesenteron en forma de tubo y se extiende al interior del estomodeo y el proctodeo.



La MP es multifuncional y puede servir como barrera a microorganismos patógenos de insectos, incluyendo virus (Brandt et al, 1978). La MP protege al epitelio del mesenteron contra la abrasión y también actúa como un ultrafiltro para enzimas y productos de digestión, ayuda a mantener un gradiente de pH de 7.8 a 9.5 en algunas larvas de lepidópteros (Santos y Terra, 1986). La permeabilidad de la MP, no es de una simple ultrafiltración relacionada al tamaño del poro, sino además se cree que los complejos glicoproteicos proveen las características de selectividad a la MP (Derkseen y Granados, 1988).

En general, el tamaño del poro de la MP difiere en todas las especies de insectos, sin embargo, se reporta que puede ser menor de 30 nm (Richards y Richards, 1977). Investigaciones del tamaño de los poros de la MP sugieren que, los viriones de los baculovirus (60 x 300 nm) no pueden pasar fácilmente la MP (Derkseen y Granados, 1988).

En un principio se suponía que la MP solo permitía el transporte pasivo de algunas partículas virales por lo que su papel era solo mecánico (Grandos, 1980). En un estudio previo Brandt (1978), observó que las enzimas de los baculovirus pueden destruir la integridad de la MP para permitir el paso de los viriones.

En un estudio muy completo hecho por Derkseen y Granados (1988), ellos expresan la idea más clara del mecanismo de acción

de los viriones de baculovirus sobre la MP. En su estudio ellos discuten el efecto de varios baculovirus (VPNAc, VPNTn, VPNH<sub>z</sub>, VPNLd, VGTn y VGPr), sobre la MP de larvas de quinto estadio de *T. ni*, donde ellos concluyen que después de la inoculación con los cuerpos polihédricos, sobrevienen cambios estructurales que vuelven muy frágil a la MP. Esto debido a que el inoculo viral afecta la composición proteica de la MP *in vivo* así como en ensayos *in vitro*. Mencionan que el factor viral responsable de estas alteraciones está más asociado con fracciones de polihedrina y granulina, que con los viriones mismos.

De cualquier modo, al parecer el papel de la MP como barrera contra la infección viral, no parece ser muy eficaz en muchas especies de lepidópteros (Granados, 1980).

## 2.2. Citopatología del Virus de Polihedrosis Nuclear

Los Virus de Polihedrosis Nuclear (VPN), afectan a una gran cantidad de especies de lepidópteros (546), está menos extenso en himenópteros (31), y unos pocos en coleópteros (5), dípteros (24) y trichópteros (1) (Margttoni e Iwai, 1986). La infección es más común en el estado larval, pero también se presenta en el estado adulto. Los signos y síntomas en el orden Lepidóptera varían, especialmente en los tipos de tejidos infectados y los estados de desarrollo del insecto. En la mayoría de las larvas, éstas no presentan síntomas o cambios en el apetito, sino hasta que han pasado dos tercios del período de infección letal

(Aizawa, 1963).

La sintomatología en forma general se presenta como se describe a continuación

Cerca de cuatro a siete días posteriores a la infección el integumento se debilita y gradualmente presenta cambios de coloración así como una reducción del lustre (brillo). La hemolinfa, normalmente clara, se torna turbia y lechosa. La larva se vuelve torpe en sus movimientos pero continúa alimentándose y pocos días después muere. Antes de su muerte, el integumento, si las células hipodérmicas están afectadas, se vuelve muy frágil y se rompe al contacto. La larva en condición flácida es típica de los VPNn en donde el cuerpo es una masa de fluidos. La larva muere generalmente asida a su planta hospedera por sus propatas abdominales o caudales (Tanada y Hess, 1984).

La mayoría de los VPN causan infecciones sistémicas en larvas e infectan a la mayoría de los tejidos (Granados y Williams, 1981). Algunos VPN son tejido-específicos e infectan únicamente uno o pocos tejidos de las larvas. En general las células infectadas con VPN exhiben hipertrofia y unas pocas hiperplasia (Smith, 1976).

### 2.2.1. Citopatología de VPN en Lepidópteros

El modo de acción en VPN en lepidópteros de forma general se puede considerar similar a lo que ocurre en los distintos hospederos.

Una vez que la larva ha ingerido los cuerpos de inclusión, comienzan a diluirse debido a la alcalinidad del pH del mesenteron. Los viriones liberados pasan a través de la membrana peritrófica y se ponen en contacto con las microvellosidades de las células epiteliales columnares del epitelio mesodéico. Harrap (1972c), sugiere que los nucleocápsides envueltos son absorbidos por la membrana plasmática de los microvellos. La fusión subsecuente de la envoltura viral con la membrana plasmática, conduce los nucleocápsides dentro de los microvellos y eventualmente dentro del citoplasma celular. En el sitio de la fusión una abertura es formada a través de la cual los nucleocápsides descapsulan y migran dentro de las microvellosidades (Figura 2). No se ha establecido aún el mecanismo de esta abertura, pero se atribuye a la presencia de actividad enzimática (Tanada y Hess, 1984). La absorción viral, fusión y entrada del virus se presenta en un período que va de una a cuatro horas posteriores a la infección (Granados, 1978). La envoltura viral se asume que se pierde durante los procesos de entrada ya que únicamente los nucleocápsides no envueltos son observados dentro de las microvellosidades.

Las células infectadas del mesenteron no presentan una citopatología aparente, sino hasta después de la invasión del ADN infeccioso dentro del núcleo, donde se evidencia por la presencia de gránulos de cromatina, dispersos en áreas periféricas. Se ha observado (Tanada y Hess, 1984), que el nucleolo desaparece quedando el núcleo con una red muy densa, la cual representa al estroma virogénico que va aumentando gradualmente de tamaño.

Inicialmente el estroma virogénico rellena casi por completo el núcleo, pero las partículas virales pueden ser detectadas en un estado posterior de la infección (Harrap, 1972c). Se reporta también que, perfiles elongados que asemejan tubos largos, aparecen en la vecindad del estroma virogénico y son considerados como cápsides del virus (Granados, 1980). Las partículas virales, aparentemente pueden ser producidas en el estroma virogénico. En un estado avanzado de la infección, se ha reportado que los nucleocápsides están estrechamente relacionados con gránulos de 17.3 nm de diámetro y que al parecer son los ribosomas (Tanda y Hess, 1984). Tal complejo de filamentos granuloso se ven como espiral alrededor de los nucleocápsides y pueden desarrollar una envoltura a través de la acción de tales partículas. Kawanishi et al (1972), reportaron estructuras similares que se presentan durante la síntesis de la envoltura de otros VPN. El ensamblaje viral se cree que ocurre en el estroma virogénico (Granados, 1980).

Cuando los nucleocápsides pasan a través de la membrana

plasmática, la membrana y el nucleocápside se modifican estructuralmente para formar paredes múltiples de configuración bulbosa asociada a un halo de finos filamentos o espinas y cuyo tipo viral resultante es conocido como peplomero (Figura 3) (Tanada y Hess, 1976; Granados y Lawler, 1981). Los nucleocápsides, ya como peplomeros, invaden células susceptibles atravesando la membrana celular de células del hospedero y penetran por viropexis (Adams et al, 1977). La hipertrofia de las células es claramente visible días después posteriores a la infección. La cromatina es más difusa, dispersa y gradualmente desaparece para formar un cuadro citopatológico relativamente claro (Tanada y Hess, 1984).

Harrap (1972a), reporta la primer evidencia de formación de un polihedro, en células del tejido graso, como consecuencia de la depositación de polihedrina polimerizada entre dos o más partículas virales envueltas dentro del estroma virogénico. En el núcleo aparecen grandes cuerpos fibrosos que se cree sirven como precursores estructurales del enrejado macromolecular de los polihedros y de la membrana polihédrica (Tanada y Hess, 1984). En otras instancias la depositación de la polihedrina, aparentemente tiende a extenderse e incluir más partículas virales, la mayoría de las cuales son adyacentes. Cuando el polihedro está virtualmente completo y, la depositación de la polihedrina ha cesado, el polihedro muestra una capa estructuralmente distinta, la cual puede ser detectada por una tinción especial (Harrap, 1972c). Es posible que esta capa sea

adquirida como el resultado de alguna actividad de la célula hospedera o un evento terminal de la replicación viral.

El período de infección viral de la células y la aparición del estroma virogénico, es conocido como el período de eclipse, durante el cual, las actividades metabólicas celulares son bloqueadas. La única característica evidente de la infección con un VPN durante el período de eclipse, es que la hipertrofia de la célula hospedera es muy visible. Asociada a esta hipertrofia, está la desaparición de la cromatina y la aparición de fibras muy finas densas y de ribosomas. Alteraciones que reflejan los complejos cambios bioquímicos y citológicos que ocurren durante el período de eclipse (Entwistle y Evans, 1984).

### **2.3. Potencialidad de los Baculovirus como Bioinsecticidas.**

Hay una serie de requerimientos que debe cumplir todo entomopatógeno para ser considerado como potencialmente efectivo para su uso en programas de manejo integrado de plagas. Entre estas características se pueden mencionar: la especificidad (rango de hospederos), su agresividad (patogenicidad y virulencia), su comportamiento en campo (transmisión, dispersión, persistencia) y, su producción masiva (Huang, 1980).

#### **2.3.1. Especificidad (Rango de Hospederos)**

Una generalidad de todos los virus, es la alta especificidad

que tiene por su hospedero, indicando una coevolución que se manifiesta en la similitud en la secuencia de bases en los ácidos nucleicos entre hospedero y virus (Ayala y Kiger, 1984)

En el caso de los virus asociados a insectos, particularmente el caso de los baculovirus, quienes no obstante ser específicos de artrópodos, se ha observado que tienen la capacidad de afectar a otras especies de insectos, diferentes a su hospedero natural (Entwistle y Evans, 1984).

Esta capacidad de los baculovirus de infectar a otras especies (también llamada infectividad cruzada), ha despertado un gran interés en muchos investigadores, reflejándose en la gran cantidad de trabajos existentes sobre este aspecto (Carner et al, 1979; Entwistle y Evans, 1984; Ignoffo, 1978). El reporte que una idea más clara da de la infectividad cruzada lo encontramos en el VPN de *Autographa californica* (VPNAc) el cual infecta a nueve familias de lepidópteros (Arctiidae, Geometridae, Gelechiidae, Lasiocampidae, Lyonetidae, Noctuidae, Pyralidae, Saturnidae e Yponomeutidae), que comprenden a 29 géneros y 34 especies susceptibles (Entwistle y Evans, 1984).

Intentando esclarecer un poco la especificidad de los baculovirus se han realizado diversos trabajos, utilizando cultivos celulares de diversos hospederos. Tjia et al (1979), infectaron células de *S. frugiperda* con VPNAc, analizaron el ADN viral mediante enzimas de restricción encontrando cierta homogeneidad con el ADN de *S. frugiperda*; Corte et al (1977),



compararon el ADN del VPNAc y el ADN de *S. frujiperda* encontrando una alta correspondencia entre ambos ácidos nucleicos; Alloway y Payne (1983), hacen una comparación entre tres cepas del VPN de *Agrotis segetum* (VPNAs) colectados en distintos países (Inglaterra, Francia y Polonia) encontrando que uno de ellos (Polonia) presentó, aunque mínimas, algunas variaciones estructurales de las otras dos cepas, lo que sugiere posibles mutaciones que pudieran permitir (no obstante ser el mismo virus) la infección de especies diferentes.

Los estudios mencionados hacen referencia a que posiblemente varios baculovirus, por presiones de selección, tuvieron que ajustarse a otros hospederos y, por cuestiones adaptativas, trajera como consecuencia la similitud de su genoma con el de sus hospederos alternantes y por lo tanto, la capacidad de infectarlos (Rohrmann et al, 1981; Smith y Summers, 1982).

La baja o alta especificidad de distintos VPN no es aún bien comprendida, sin embargo esta propiedad provee a algunos baculovirus la capacidad de reproducirse en distintos hospederos proporcionándoles un alto valor como bioinsecticida.

### 2.3.2. Transmisión

La transmisión de un baculovirus por un insecto en el estado adulto, constituye un medio altamente efectivo para su persistencia y transmisión. Los baculovirus se diseminan en las poblaciones insectiles tanto en forma vertical (de generación a

generación), como horizontal (de un hospedero susceptible a otro), así como por agentes bióticos y abióticos (Cunningham y Entwistle, citados por Hostteter y Bell, 1985).

La transmisión vertical de un virus se realiza primeramente por contaminación superficial de los huevecillos durante la ovipostura. Al emerger las larvas, éstas se alimentan del corión del huevecillo, contaminándose de este modo la generación siguiente (Hostteter y Bell, 1985). Otra vía de transmisión vertical del virus está dada por contaminación directa de la superficie del huevo o del follaje en la vecindad de las larvas neonatas (Contaminación transovo) (Entwistle y Evans, 1984). La transmisión también se puede dar en forma transtadial y, que se refiere al paso del patógeno en todo o en parte del ciclo vital del hospedero (Hostteter y Bell, 1985).

La transmisión transovarial se refiere a la contaminación interna del huevecillo por acarreo del virus en los órganos reproductores de la hembra adulta. No ha sido aún explicada totalmente, por lo que su regularidad es discutida (Entwistle y Evans, 1984).

La transmisión horizontal se realiza por contaminación directa entre larvas y adultos infectados, o bien por contacto con follaje que fué contaminado durante la desintegración de larvas infectadas (Entwistle y Evans, 1984).

### 2.3.3. Persistencia

La persistencia de cualquier producto insecticida en el campo, se refiere al tiempo que éste puede permanecer activo, con todas sus propiedades insecticidas, la mayoría de las veces está determinada por las condiciones ambientales.

En cultivos agrícolas el papel de los factores bióticos y abióticos es muy importante en la persistencia de los virus en el campo. De esta manera la superficie de una planta funciona como una fuente de contaminación que es interrumpida temporalmente por la cosecha del cultivo. Una epizootia viral depende grandemente para su inicio de el inóculo presente en el suelo y del hospedero como reservorio (Thompson et al, 1981). En términos generales, la persistencia de un virus en campo está determinada por el suelo, el tiempo de duración del cultivo y la densidad del hospedero (Entwistle y Evans, 1984).

#### 2.3.3.1. Persistencia en Suelos

Es universalmente conocido que el suelo es un reservorio efectivo para la persistencia de un virus (Thompson et al, 1981). Cadáveres de larvas son transportadas por la gravedad y la lluvia, (o riego) hacia el suelo. Los virus persisten en las capas bajas pero con profundidad suficiente para provocar infecciones posteriores (Hostteter y Bell, 1985).

Resultado de una serie de pruebas hechas con VPNTn, Hubner (1977), indica que los niveles de VPN en el suelo se incrementan, conforme la epizootia avanza. Jaques (1967), reporta que la actividad del VPNTn, aplicado en la superficie del suelo no declina significativamente por un período de 231 semanas encontrando entre el 68 y 45% de polihedros del virus después de uno a dos años posteriores al tratamiento. El mayor tiempo de persistencia de un baculovirus en campo es el reportado para el VPN de *Orgyia pseudosugata* (VPNOp), con cerca de 41 años (Thompson, 1981).

La persistencia de un baculovirus en suelos agrícolas está determinada, tanto por la naturaleza física como química del suelo, así como por el grado de cultivo. Los residuos virales en la superficie y en la parte baja del suelo, sirven de futuras fuentes de contaminación de plantas (Hostteter y Bell, 1985).

Estudios sobre el pH del suelo y su papel en la persistencia de baculovirus no han sido abordados con la suficiente profundidad. Jaques y Harcourt (1971), reportaron que, en suelos con un pH tan bajo como 5.6. el VPNTn y VG de *Artogeia rapae* (VGAr), no son afectados. El virus de *A. rapae* fué más frecuentemente encontrado en suelos alcalinos. Se sabe que el VPNTn es inactivo rápidamente en un suelo arenoso franco con un pH de 4.3 a 7.1 (Jaques, 1967).

#### 2.3.3.2. Persistencia en Plantas

Los baculovirus pueden persistir en los cultivos, ya sea en el cadáver larval o en la superficie de las hojas y tallos. La persistencia en los cadáveres, los cuales se adhieren al follaje, son considerados como un importante medio por el cual los baculovirus infectan a su hospedero. El baculovirus persiste en la planta mientras dura el cultivo y, de forma general, la mayor parte de los polihedros son acarreados por la lluvia, viento y gravedad hacia el suelo (Hostteter y Bell, 1985).

El estudio de la persistencia de los baculovirus sobre el follaje tiene una importancia particular en la interpretación epizootiológica y su uso en el control de plagas, pues se sabe que la hoja, además de que es el sitio donde el virus es ingerido, provee el medio ambiente más riguroso para el virus, ya que está sometido, entre otras cosas, a la radiación solar (luz ultravioleta), de la cual se sabe provoca la inactivación de las partículas virales (Moscardí, 1983).

#### 2.3.4. Producción Masiva de Baculovirus

Un requisito indispensable para cualquier entomopatógeno es la factibilidad de ser reproducido en forma masiva para poder ser utilizado como agente de control microbiano.

Básicamente existen dos métodos recomendados para la

producción masiva de baculovirus. El método más comunmente usado es la multiplicación del virus en su hospedero natural. Un método más elaborado es la propagación de ciertos baculovirus en un sistema de cultivo de tejidos celulares de invertebrados similar a los procesos de fermentación microbiana (Shieh y Bomfalk, 1980),

El método de propagación en el hospedero natural involucra la cría masiva del insecto hospedero bajo condiciones controladas. El proceso envuelve el mantenimiento de todo el ciclo de vida el hospedero incluyendo huevo, larva, pupa y adulto. Las larvas pueden ser alimentadas tanto en dieta natural como artificial (Shapiro, 1981).

Las larvas son seleccionadas en un estadio adecuado (determinado experimentalmente) e infectadas con inculo viral, el cual puede ser obtenido a partir de larvas muertas obtenidas en campo. Después de una fase variable de incubación (dependiendo de la especie hospedera y el tipo viral), las larvas enfermas son colectadas y el virus extraido (Shieh y Bohmfalk, 1980).

Los métodos de extracción son variables (Podwait, 1981; Tjia et al, 1979; Granados y Lawler, 1980; Carner et al, 1979). Sin embargo, se considera como método general la recolección de los insectos infectados en una solución buffer procesándolos inmediatamente, o bien, colectarlos en agua destilada y dejar que

se desintegren los tejidos por acción bacteriana durante un período variable de tiempo. La conveniencia del uso de un método, estriba en el tiempo requerido para la obtención de los polihedros; ya que el primero produce un número menor de polihedros por larva que el segundo, pero en un menor tiempo.

La purificación de los polihedros se realiza por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (Granados y Lawler, 1980; Tjia et al, 1979). Cabe señalar, que cuando los polihedros han sido extraídos a partir de cultivo de tejidos, la purificación requiere de menor tiempo del que se utilizaría cuando éstos son obtenidos a partir de larvas infectadas (Vaughn et al, 1981).

El producto es estandarizado finalmente y llevado a un control de calidad para su posterior formulación (Figura 4).

Un método más complicado lo constituye la técnica de cultivo de tejidos para la producción de baculovirus. El cultivo celular, derivado de tejidos del insecto hospedero, son desarrollados en un medio definido estéril, los cuales son inoculados con una solución viral. Una ventaja en la utilización de cultivo de tejidos, es la habilidad inherente de producir un producto viral libre de otros contaminantes microbianos (Shapiro et al, 1981).

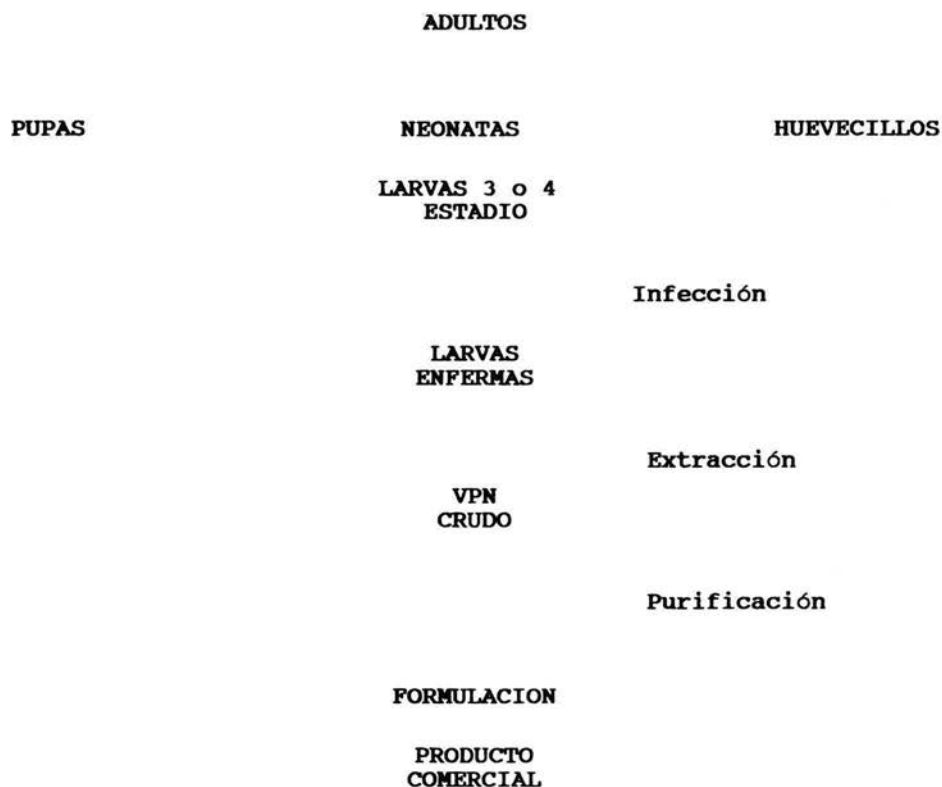


Figura 4. Esquema general de producción masiva de baculovirus a partir del hospedero natural o alternante



### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Cría de *Spodoptera sp.*

Para establecer la cría de *Spodoptera sp* en el laboratorio se colectaron larvas en cultivos de crucíferas de los campos experimentales pertenecientes a la Universidad Autónoma de Chapingo, colectándose preferentemente larvas de estadios avanzados, con el fin de obtener pupas en un período corto de tiempo.

La colecta se realizó revisando aquellas plantas que presentaban señales de daño por *Spodoptera sp.* Las larvas fueron localizadas generalmente en el corazón, en el caso de col, y en la cabezuela en brócoli y coliflor. Los organismos colectados se trasladaron al laboratorio donde fueron colocados en cajas circulares de plástico de 12 cm de radio por 8 cm de alto. Posteriormente se alimentaron con hojas de col esterilizadas, esto con el fin de eliminar cualquier patógeno llevado del campo en las hojas. La esterilización se realizó lavando las hojas con detergente y agua corriente; posteriormente se dejaron reposando en una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se enjuagaron nuevamente y se expusieron durante 15 min. a radiación ultravioleta en una cámara de flujo laminar.

Las larvas se mantuvieron en una cámara de cría a una

temperatura de 25°C y una Humedad relativa del 70%.

Una vez alcanzando el estado de pupa, éstas fueron separadas de acuerdo al sexo en recipientes de plástico circulares de las mismas dimensiones que las utilizadas para las larvas traídas del campo. Tras la emergencia, los adultos fueron trasladados a bolsas de papel de estrasa de número 8, para su apareo y oviposición, en una proporción de dos machos por una hembra, para garantizar la fecundación. Los adultos fueron alimentados con una solución al 10% de miel pura, proporcionada en algodón humedecido colocado en media caja petri de plástico. El algodón humedecido con la solución de miel se cambió diariamente hasta la muerte de los adultos.

Una vez detectadas las primeras oviposturas (Tres a cuatro días), realizadas por la hembra en las paredes de la bolsa, los adultos fueron cambiados a una nueva bolsa para que continuaran ovipositando. Las bolsas con las oviposturas se recortaron en pequeños trozos colocándolos en las cajas circulares descritas anteriormente ; sobre los recortes de papel se colocó una hoja de col, previamente esterilizada, para que al eclosionar, las larvas tuvieran una fuente de alimento. Las larvas neonatas de una misma bolsa se alimentaron juntas hasta el tercer estadio, ya que a partir del cuarto se provocan serias lesiones por sus hábitos canibales.

Este mismo ciclo se repitió tantas veces como fué necesario para obtener las larvas necesarias para la multiplicación del

virus y la realización de los bioensayos.

### 3.2. Extracción y purificación del VPN de *Spodoptera sp.*

#### 3.2.1. Extracción

Son sugeridos varios métodos de extracción de los cuerpos de inclusión. En este estudio, la extracción de los polihedros se realizó siguiendo el método sugerido (con algunas modificaciones) por Granados y Lawler (1981), por la razón de que no se requiere de equipo ni reactivos muy caros. La técnica se describe a continuación:

Las larvas muertas por polihedrosis nuclear fueron puestas en agua destilada en frascos de vidrio esterilizado de 100 ml de capacidad, durante aproximadamente 20 días para que se desintegren los tejidos por acción bacteriana, con el fin de obtener un mayor número de polihedros.

Una vez desintegrados la mayoría de los tejidos, el recipiente que contenía las larvas, se agitó vigorosamente y su contenido fué filtrado a través de cuatro capas de pañalina, previamente humedecidas. Los tejidos que no alcanzaron a descomponerse fueron macerados en un mortero de mano con agua destilada y filtrados nuevamente. La cantidad de agua destilada usada durante la maceración va en función de la cantidad de tejido no desintegrado.

La suspensión obtenida del filtrado se vertió en un tubo

para centrifuga de plástico de 50 ml de capacidad y se centrifugó a 5000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga Internacional IEC modelo k. El sobrenadante se descartó y la pastilla se resuspendió en una solución buffer (Tris-HCl 0.001 M + Urea 4M + NaCl 0.5M + SDS 1%), agitándose regularmente, por 30 minutos temperatura ambiente. La cantidad de solución buffer agregada fué dos veces el volumen de la pastilla. La suspensión fué centrifugada nuevamente a 5 000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se eliminó y se resuspendió la pastilla en un volumen cinco veces mayor, hasta la total disolución de la misma. Se centrifugó nuevamente a 5 000 rpm durante 20 minutos desechándose el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en agua destilada (con el fin de eliminar el SDS), centrifugando a la misma velocidad y tiempo. Este último paso se realizó un mínimo de tres veces hasta que la solución deajo de aglutinarse, señal de que el SDS había sido eliminado.

Finalmente la pastilla se resuspendió en agua destilada colocando la suspensión resultante en un frasco de 50 ml de capacidad cubiertos con papel aluminio y almacenados en refrigeración a 4°C.

### 3.2.2 Purificación

La purificación de los cuerpos de inclusión se realizó siguiendo el método de Scott et al (1971), modificado por Harrap y Longworth (1974).

Previo a la purificación (24 horas antes), se prepararon gradientes de sacarosa en tubos para ultracentrífuga de nitrocelulosa de 40 ml de capacidad en concentraciones de 25, 35, 45, 55, y 60. Los tubos se almacenaron en refrigeración a 4°C.

La suspensión viral obtenida en el proceso de extracción se centrifugó a 7000 rpm por 30 minutos para concentrar los polihedros. La pastilla obtenida fué resuspendida en agua destilada con un volumen tres veces mayor al tamaño de la pastilla. De esta suspensión se tomó un total de 5 ml para cada tubo con el gradiente de sacarosa. Los gradientes fueron centrifugados a 94 000 g (27 000 rpm) por 3 hrs. a 4°C en una ultracentrífuga Beckman L8-70M en un rotor de columpio modelo SW-28.

La banda que contenía los polihedros (55 y 65% en el gradiente), se diferenciaron de las demás bandas por tener un aspecto lechoso turbio. La banda conteniendo los polihedros fué recuperada con una jeringa de plástico de 10 cm<sup>3</sup> de capacidad y colectada en tubos de nitrocelulosa vacíos.

Los polihedros fueron diluidos en agua destilada hasta la capacidad máxima del tubo con el fin de diluir y eliminar la sacarosa. Los tubos se centrifugaron a 66 000 g por 90 minutos. Las pastillas fueron resuspendidas en agua destilada y lavadas un total de tres veces.

La suspensión final se almacenó a 4°C en frascos de vidrio

esterilizados de 50 ml de capacidad y cubiertos con papel aluminio.

### 3.3. Conteo de Polihedros.

Para la cuantificación del número de polihedros existente en la suspensión purificada de virus, se utilizó un hematocitómetro de Neubauer. Para tal fin se hicieron diluciones a partir de la solución viral concentrada hasta obtener aquella dilución, que observada al microscopio, fuera fácil de contar con una mayor precisión; esto es, que no se presentara aglutinación o sobreposición de cristales, ya que provocaría errores en el conteo.

El conteo se realizó utilizando el milímetro central del hematocitómetro, contando los polihedros presentes en los cuadros de las esquinas y el central, obteniendo un total de la suma de los cinco cuadros. Se realizaron un total de 20 conteos obteniéndose un promedio final, el cual se utilizó para calcular la concentración de polihedros por ml mediante el uso de la fórmula de Lipa y Slizynski (1973):

$$\text{Polihedros/ml} = \left[ \frac{\text{Polihedros contados} \times 4 \times 10^6 \times \text{FD}}{80} \right]$$

FD = Factor de dilución

De este modo se determinó la concentración de la solución

viral conecentrada. A partir del dato obtenido se determinaron las equivalencias en polihedros/ml de cada dilución utilizada en los bioensayos por medio de una regla de tres sencilla.

#### 3.4. Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ )

Para determinar el rango de respuesta al virus mediante el bioensayo, se realizó previamente la ventana de respuesta biológica para determinar las concentraciones con las cuales se obtuvieron el 0 y 100% de mortalidad.

A partir de la solución viral purificada del VPN de *Spodoptera sp*, se prepararon diluciones al 1.0, 0.1, 0.001, 0.0001 y 0.00001%, que fueron administradas a las larvas sobre discos de col de 15 mm de diámetro, cortados con un sacabocados del número 12. Para los bioensayos se utilizaron preferentemente hojas de col, debido a que permanecen más tiempo turgentes que las hojas de coliflor y brócoli.

Se probaron un total de 15 larvas por concentración recién mudadas a tercer estadio, previamente seleccionadas y con un peso promedio de  $256 \pm 28$  mg.

A cada dilución se agregó una gota de adherente dispersante (Triton-X) para lograr una mejor adherencia y cobertura de la solución al disco de col.

Las soluciones se mantuvieron en agitación constante en una plancha magnética durante 10 minutos previos a su utilización (Figura 5).

Cada disco se sumergió en la suspensión de virus introduciéndolo con pinzas de relojero del número 5, escurriéndolos y dejándolos secar en una parrilla de fierro.

Una vez que el excedente de humedad se evaporó, los discos se introdujeron en forma individual en pequeños vasos de plástico de 25 ml de capacidad, los cuales contenían un trozo de algodón previamente humedecido, con el fin de mantener el disco de colturgente. En cada vaso se colocó una larva y después se acomodaron en contenedores de cartón e incubaron a  $25^{\circ}\text{C} \pm 7^{\circ}\text{C}$  y humedad de  $70 \pm 5\%$ . En cada una de las concentraciones se trataron un total de 15 larvas.

El efecto del virus sobre las larvas se evaluó a partir de las 48 horas, continuándose por espacio de ocho días, anotando en porcentaje de mortalidad observado desde el cuarto hasta el octavo día, ya que alrededor del noveno, los testigos entraban en estado de prepupa.

Una vez determinado el rango de respuesta del virus, se graficó el porcentaje de mortalidad contra el logaritmo de la concentración en papel probit y de esta manera se establecieron las concentraciones intermedias, distribuidas uniformemente a lo largo de la línea de respuesta y las cuales fueron del 0.1, 0.01,



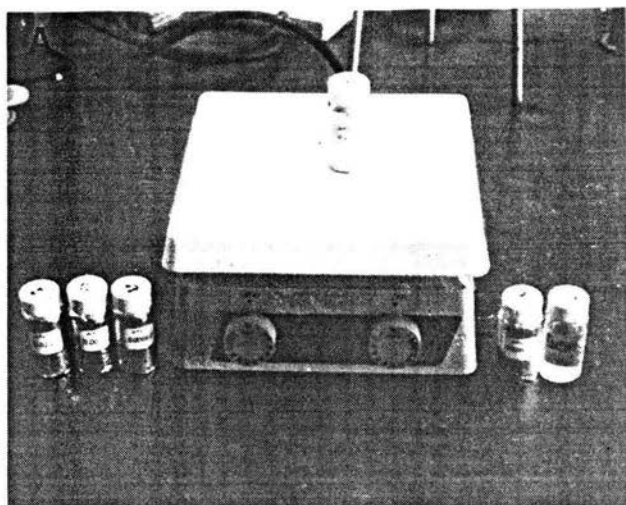


Figura 5. A Diluciones realizadas a partir de la solución viral concentrada. Las diluciones se mantienen en agitación constante en una plancha magnética antes de su utilización. B Impregnación de los discos de col sumergiéndolos en la solución viral.

0.007, 0.003, 0.001, 0.0006 y 0.0001. Estas concentraciones se evaluaron en los bioensayos, utilizando la misma metodología que para la ventana de respuesta biológica.

Se realizaron un total de 6 repeticiones por concentración. Los resultados se analizaron utilizando el paquete SAS-Probit en el Centro de Estadística y Cálculo del Colegio de Postgraduados. Con el análisis Probit (Infante y Calderon, 1980), se obtuvieron las líneas de respuesta logaritmo de la dosis-mortalidad y, los valores de la ecuación de regresión  $Y = a + bX$ , en donde: Y es el valor probit, a la ordenada al origen, b la pendiente de la recta y X el logaritmo de la dosis.

Los bioensayos se realizaron en el Laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados.

### 3.5. Determinación del rango de hospederos

Considerando que los baculovirus pueden atacar a otras especies aparte de su hospedero natural (Harper, 1976; Carner et al, 1979; Entwistle y Evans, 1984), se decidió probar el VPN de *Spodoptera sp* en contra de otras especies asociadas al cultivo de crucíferas, tales como *Plutella xylostella* y *Trichoplusia ni* que se encuentran en cría permanente en el laboratorio de Patología de Insectos. Para la evaluación del virus en contra de estas dos especies se siguió la misma metodología que la utilizada para el hospedero original.

### 3.6. Histopatología del VPN de *Spodoptera sp.*

Algunos VPN son reportados como sistémicos (atacan a la mayoría de los tejidos), y otros como tejido-específicos (Smith, 1976), para lo cual, y a manera de complemento del presente trabajo, se intentó establecer los tejidos susceptibles al ataque del VPN de *Spodoptera sp.*

Para esta parte se utilizaron tres larvas de último estadio de *Spodoptera sp* en un grado avanzado de virosis (seis días posteriores a su inoculación).

Se utilizó la técnica histológica tradicional para tejidos animales, con algunas modificaciones para insectos (Prado y Valdez, 1985). La elaboración de preparaciones histológicas se realizó en el laboratorio de Morfología de Insectos del Colegio de Postgraduados.

### 3.7. Morfología de los Cuerpos de Inclusión.

La morfología de los VPN es muy variable (Harrap y Payne, 1979; Entwistle y Evans, 1984), aún cuando se afirma que son polihedros. La morfología de los baculovirus no se considera como un carácter de peso para la identificación de los VPN. Sin embargo, si nos ayuda a distinguir tipos morfológicos entre algunos. De esta manera, se realiza un breve estudio sobre la morfología de los cuerpos de inclusión del VPN de *Spodoptera sp* a

través de micrografías al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).

El VPN purificado se diluyó suficientemente de tal manera que no se presentaran aglutinaciones de cristales y se facilitara su observación.

Una gota de dilución se colocó sobre un portaobjetos para Microscopio Electrónico de Barrido, el cual previamente se le había cubierto con una capa de adhesivo plástico para lograr mejor adherencia de los polihedros. Las muestras fueron puestas en una cámara de vacío con el fin de evaporar el exceso de humedad.

Las muestras se sometieron a un baño de oro en un Ionizador de oro JEOL-4C, hasta alcanzar 5 nm de espesor.

Las observaciones y micrografías se realizaron en un Microscopio Electrónico de Barrido JEOL-35C con un voltaje de aceleración de 10 KV. El montaje y observación de muestras se realizó en el Area de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Extracción

Con el método utilizado para la extracción de polihedros, se logró obtener la mayoría de los cuerpos de inclusión sin una gran pérdida. Aunque hay que resaltar el hecho de que en cada etapa de centrifugación se van perdiendo cuerpos de inclusión, no obstante recuperar la mayor parte de ellos (observación por apreciación, no cuantitativa). El mayor problema presentado por este método fueron los restos tisulares que no alcanzaron a descomponerse por acción bacteriana, y que al actuar como sustrato para el crecimiento de bacterias indeseables, entorpecía la separación de los polihedros. Debido a esto, en algunos casos fué necesario, posterior a la extracción, agregar un antibiótico (tetraciclina 0.01%).

Por a lo anterior se recomienda ensayar con mayores tiempos de descomposición y mayores velocidades de centrifugación, u otro método auxiliar, para la separación de los tejidos y bacterias.

### 4.2 Purificación

Los cuerpos de inclusión fueron detectados entre las bandas del 55 y 60% en los gradientes de sacarosa. El proceso de purificación presentó ligeros problemas derivados de la cantidad de contaminantes acarreados en la extracción junto con los polihedros.

No obstante la presencia de tales contaminantes, la mayoría de ellos son eliminantes en el gradiente, por lo que no fueron obstáculos para la purificación del virus.

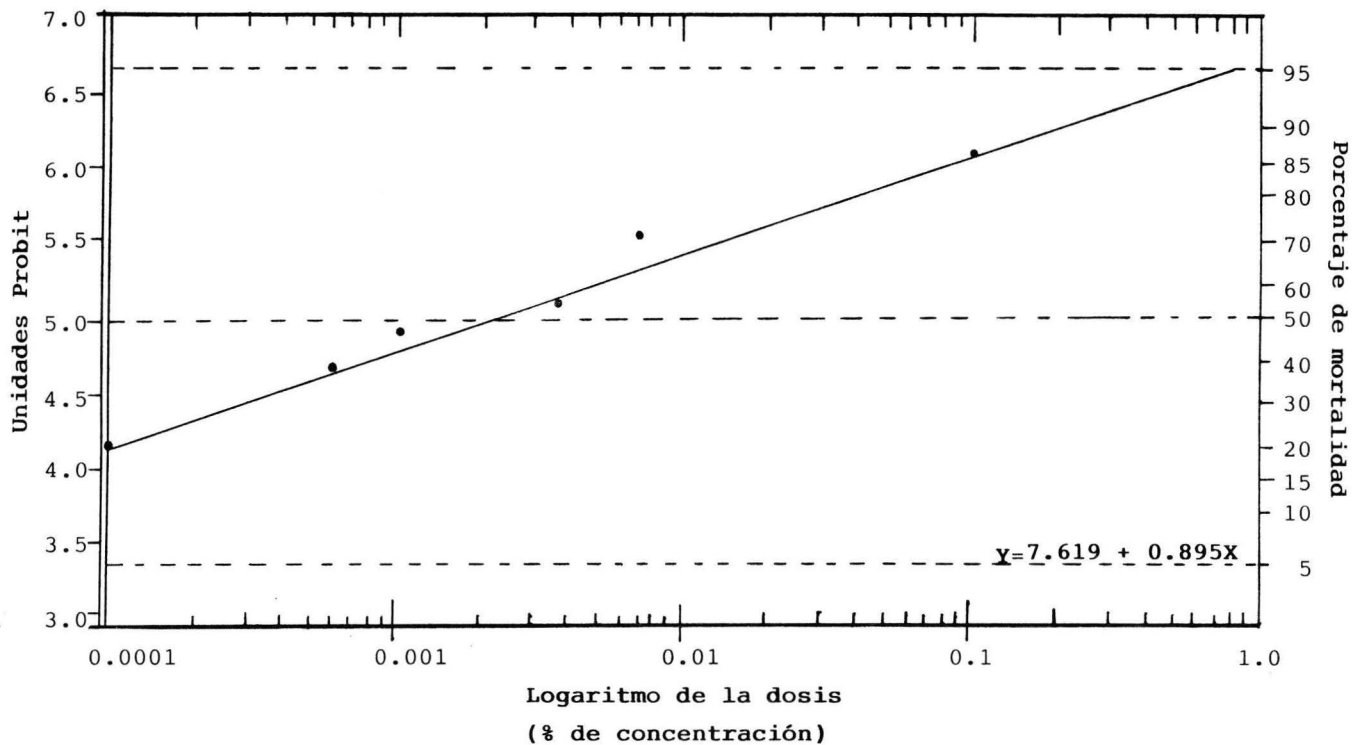
Se sugiere afinar el método de extracción para acarrear menos contaminantes hacia el proceso de purificación. De cualquier manera el método empleado se considera aceptable.

#### 4.3 Obtención de la Concentración Letal Medida ( $CL_{50}$ )

La gráfica 1 nos muestra la línea de respuesta logaritmo dosis-mortalidad, obtenida a partir de los bioensayos realizados y cuyos valores fueron ajustados mediante el programa SAS-Probit.

Se observa en la gráfica los valores obtenidos tanto en forma experimental, como por el ajuste de datos. Aquí mismo, se expresa la ecuación de regresión obtenida del mismo análisis. Las líneas paralelas al eje de las abcisas señalan los valores significativos para la  $CL_5$ ,  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ , mismos que se muestran en la tabla II. Los valores de las concentraciones probadas con sus equivalencias en polihedros/ml, se muestran en la tabla I.

De acuerdo con los datos obtenidos a partir del análisis Probit, para obtener una mortalidad del 50% se necesita proporcionar a nuestra población una solución que contenga una concentración de  $5.7 \times 10^3$  polihedros/ml.



Gráfica 1. Línea de respuesta del logaritmo de la dosis en contra de la mortalidad provocada por el Virus de Polihedrosis Nuclear (VPN) de Spodoptera sp en contra de Spodoptera sp. Los puntos (•), representan los datos obtenidos experimentalmente.

**TABLA I**

Concentración (%)	Concentración (polihedros/ml)	Mortalidad Experimental (%)	Mortalidad Experimental Corregida
0.1000	$4.8 \times 10^5$	96.7	96
0.0100	$4.8 \times 10^4$	86.7	80
0.0070	$3.3 \times 10^4$	72.7	75
0.0030	$1.4 \times 10^4$	55.7	65
0.0010	$4.8 \times 10^3$	47.2	50
0.0006	$2.9 \times 10^3$	37.5	40
0.0001	$4.8 \times 10^2$	20.7	20

Mortalidad experimental y corregida, obtenida en los bioensayos de la evaluación del VPN de *Spodoptera sp* en contra de larvas de tercer estadio de *Spodoptera sp*.

**TABLA II**

Valor	Concentración (%)	Concentración (polihedros/ml)	Límites fiduciales ( $\alpha= 0.05$ )
CL <sub>5</sub>	0.000017	$8.16 \times 10^1$	0.000006-0.000035
CL <sub>50</sub>	0.001190	$5.71 \times 10^3$	0.000869-0.001585
CL <sub>95</sub>	0.081604	$3.92 \times 10^5$	0.045165-0.181736

Valores determinados estadísticamente mediante el análisis Probit para la CL<sub>5</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>95</sub>. Estos son los valores considerados más importantes estadísticamente. Para valores intermedios de interés ver apéndice.



Del mismo modo para mortalidad del 95% se requiere de una concentración de  $3.92 \times 10^5$  polihedros/ml.

En cuanto al modo de acción del virus, se pudo observar que las larvas que presentaron síntomas tempranos característicos de la enfermedad (después del cuarto día posterior a la infección), fueron aquellas que se alimentaron con concentraciones del 0.007, 0.01, y 0.1% y que corresponden a  $3.3 \times 10^4$ ,  $4.8 \times 10^4$  y  $4.8 \times 10^5$  polihedros/ml, respectivamente; sin embargo la mayor mortalidad se presentó a los 6 días. La sintomología general presentada por las larvas enfermas se manifestó como una reducción de la alimentación después del tercer día, comportamiento reportado ya por otros autores (Paschke *et al*, 1968). La región dorsal presentó un color completamente pálido lo mismo que la región abdominal, antes de presentarse la lisis generalizada.

La toxicidad observada en este trabajo, hacen del VPN de *Spodoptera sp* un patógeno con una alto potencial bioinsecticida para el control del gusano del corazón de la col en el cultivo de crucíferas.

#### **4.4. Rango de Hospederos**

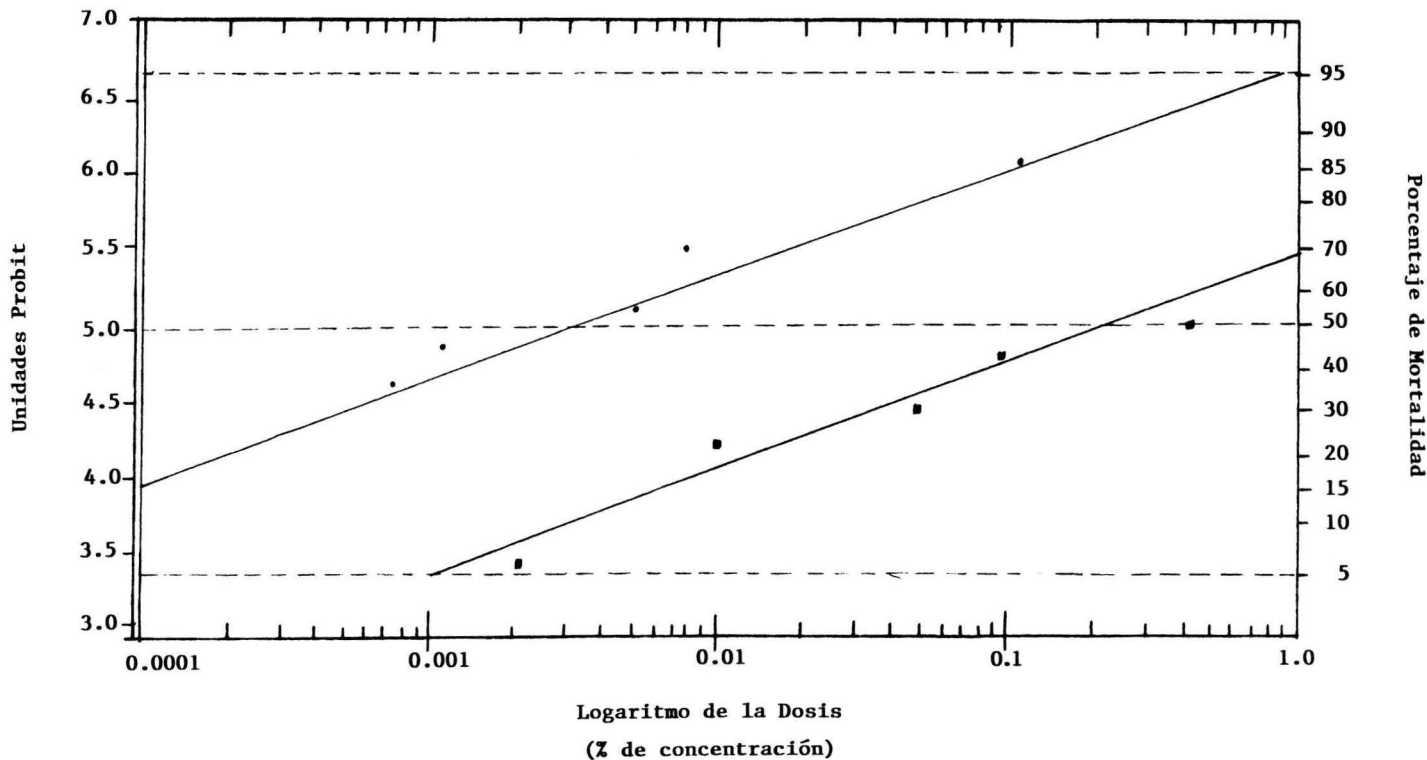
De las evaluaciones en condiciones de laboratorio hechas con el VPN de *Spodoptera sp* en contra de *T. ni* y *P. xylostella* se obtuvieron los siguientes resultados:

Al evaluar las concentraciones del 0.1, 1.0 y 5.0% de la solución viral, en contra de *P xylostella* no se obtuvo mortalidad, por lo cual se consideró que esta especie no es susceptible al ataque del virus. El resultado obtenido es comprensible tomando en cuenta que esta especie se encuentra alejada taxonómicamente, pues se ubica en una familia distinta (Plutellidae) a la del hospedero original (Noctuidae).

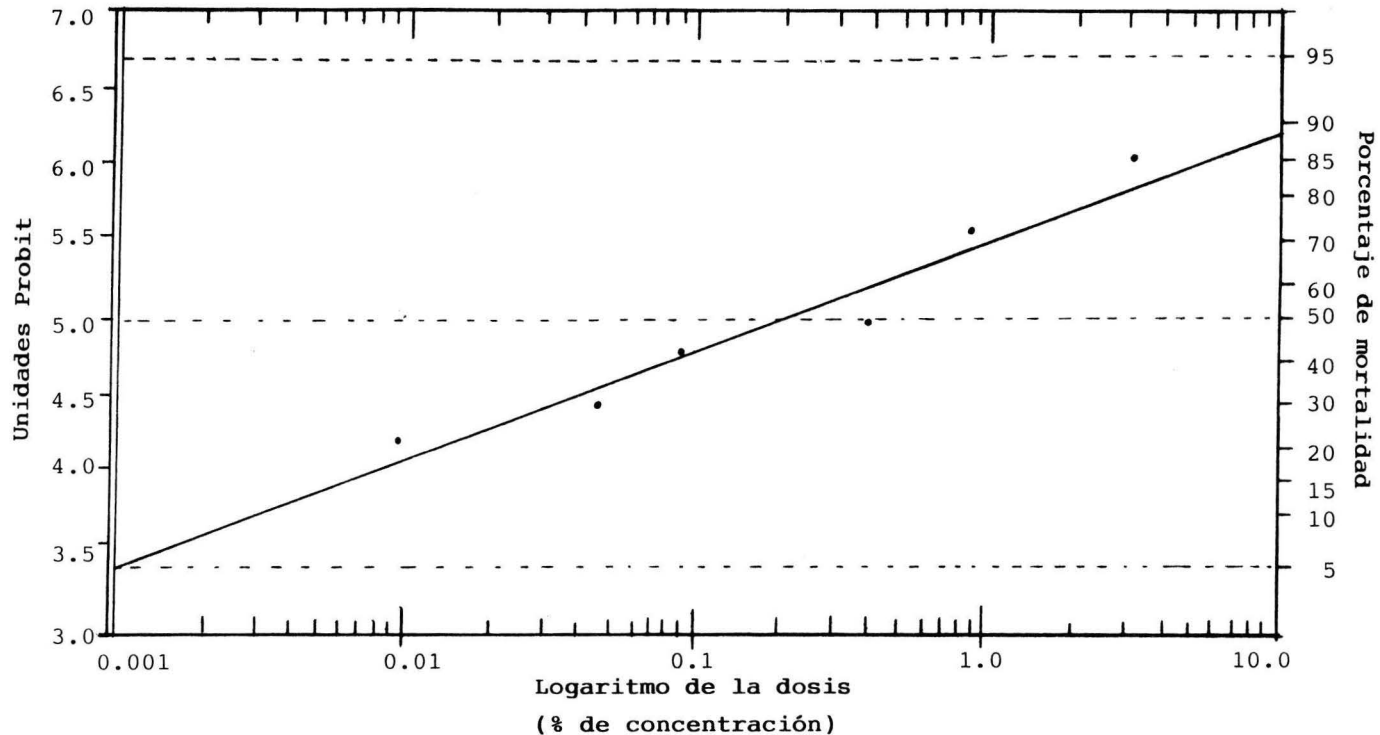
En el caso de *T. ni* si hubo respuesta al ataque del virus, obteniéndose una  $CL_{50}$  de  $1.056 \times 10^6$  polihedros/ml (Gráfica 2). En este caso hay que mencionar que el 100% de mortalidad no fué alcanzado experimentalmente.

La gráfica 3 muestra las líneas de respuesta al VPN de *Spodoptera sp* en contra de *T. ni* y *Spodoptera sp*. Existe una gran variación en cuanto al número de polihedros necesarios para alcanzar el 95% de mortalidad en las dos especies. Comparando la  $CL_{50}$  de ambas especies se ve que hay una diferencia muy grande, ya que la  $CL_{50}$  para *T. ni* ( $1.056 \times 10^6$  polihedros/ml).

Es un valor muy superior al necesario para alcanzar la  $CL_{50}$  en *Spodoptera sp* ( $5.7 \times 10^3$  polihedros/ml). De este modo, aún cuando *T. ni* presenta respuesta al virus, se necesitaría una cantidad 183 veces mayor que la  $CL_{50}$  de *Spodoptera sp* para alcanzar la misma mortalidad en *T. ni*. Este resultado se confirma con el obtenido por otros autores, que reportan esta variación en el número de polihedros cuando el virus es probado en contra de



Gráfica 3. Líneas de respuesta del logaritmo de la dosis en contra de la mortalidad provocada por el VPN de *Spodoptera* sp. en contra de *Spodoptera* sp. (●) y de *Trichoplusia ni* (■). Se puede apreciar claramente la diferencia en susceptibilidad de ambas especies al VPN, al ubicar en la gráfica la  $CI_{50}$  y la dosis necesaria para alcanzarla.



Grafica 2. Línea de respuesta del logaritmo de la dosis en contra de la mortalidad provocada por el VPN de *Spodoptera sp* en contra de *Trichoplusia ni*. Los datos presentados arriba del 1% de la dosis, son obtenidos debido al ajuste, - ya que no se evaluarán experimentalmente dosis arriba del 1%. Los puntos ( ), representan los datos obtenidos experimentalmente. La ecuación de la recta obtenida fué  $Y = 5.479 + 0.725 X$

TABLA III

Hospedero	Dosis (pol/ml)	Número de Larvas Tratadas	Mortalidad Experimental (%)
<i>Spodoptera</i> sp	$4.8 \times 10^5$	90	96.7
	$4.8 \times 10^4$	90	86.7
	$3.3 \times 10^4$	88	72.7
	$1.4 \times 10^4$	88	55.7
	$4.8 \times 10^3$	89	47.2
	$2.9 \times 10^3$	88	37.5
	$4.8 \times 10^2$	87	20.7
<i>Trichoplusia</i> ni	$4.8 \times 10^7$	100	68.0
	$1.4 \times 10^7$	100	50.0
	$4.8 \times 10^6$	90	43.3
	$1.9 \times 10^6$	90	28.8
	$4.8 \times 10^5$	90	6.6
	$9.6 \times 10^4$	90	6.6
	$4.8 \times 10^4$	90	1.1
<i>P. xylostella</i>	$2.4 \times 10^7$	30	0.0
	$4.8 \times 10^6$	30	0.0
	$4.8 \times 10^5$	30	0.0

Mortalidad de larvas de tercer estadio de *Spodoptera* sp, *P. xylostella*, y *Trichoplusia* ni tratadas con el VPN de *Spodoptera* sp. Se puede apreciar en la mortalidad experimental la diferencia en susceptibilidad de las tres especies al virus.

especie diferente de su hospedero natural. Por ejemplo, Carner et al (1979), evaluaron el VPN de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg) en contra de siete especies de noctuidos, aparte de su hospedero natural. Ellos reportan que de las siete especies probadas, solo *Heliothis virescens* resulto tan susceptible como *A.gemmatalis*; dosis muy altas fueron necesarias para matar a *Heliothis zea*, *Trichoplusia ni*, *Peseudoplusia includens* y *Spodoptera scabra* y *Spodoptera frugiperda* resultaron no susceptibles.

A pesar de que existen numerosos trabajos sobre infectividad cruzada, en ninguno de ellos se menciona algún criterio para establecer el grado de susceptibilidad del insecto hacia un virus dado. Sin embargo, es notorio el hecho de que, para obtener el 100% de mortalidad experimental en el hospedero natural, siempre se necesita una cantidad relativamente baja del virus, mientras que el hospedero alternante requiere de una cantidad mucho mayor.

Por lo anteriormente expuesto y en base a los resultados obtenidos, se consideró a *T. ni* como ligeramente susceptible, ya que aún cuando presentó respuesta a la acción del virus, se necesitó una dosis muy alta para que se presentara la respuesta. *P xylostella* al no presentar respuesta se consideró como no susceptible.

#### 4.5 Histopatología del VPN de *Spodoptera sp.*

De acuerdo con los resultados de las observaciones histológicas, el VPN de *Spodoptera sp* al parecer, se comporta como

sistémico. Los tejidos en los que se pudo observar la presencia de cuerpos polihédricos de inclusión fueron: hemocitos (observado en preparaciones fresca de hemolinfa), tejido graso, traqueoblastos, mesenteron e hipodermis.

Los tejidos afectados muestran ocasionalmente núcleos hipertrofiados (Figura 6); sin embargo, por el grado de avance de la enfermedad, la mayoría de ellos no fueron observados, debido a la lisis nuclear provocada por el virus. La hipodermis es reportada como uno de los últimos tejidos afectados por los VPN (Granados, 1981), lo que da una idea del grado de avance de la enfermedad en un insecto atacado por el virus. Esta situación se puede observar claramente en la Figura 7.

El tejido graso (figura 6), es donde se registra una mayor concentración de polihedros, debido a que constituye el mayor porcentaje de los tejidos de la larva. En el mismo, solo se observaron acumulaciones de polihedros no siendo posible delimitar las paredes celulares en ninguno de los cortes realizados.

Los tejidos que aquí se reportan como afectados pueden no ser los únicos que presenten daño al ataque del virus, ya que se reportan también como tejidos afectados a los discos imaginales, enocitos, glándulas de cera, tubulos de Malpigio, cerebro, células ganglionares, células musculares y células pericárdicas (Granados y Williams, 1985). Debido a estos reportes, se sugiere hacer un estudio más detallado, para definir aquellos otros tejidos que

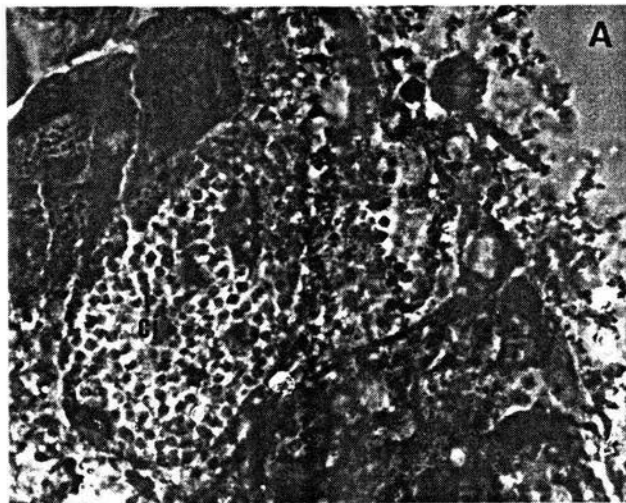


Figura 6. A Tejido graso afectado por nucleopolihedrosis. Nótese la gran cantidad de cuerpos de inclusión (ci) dentro del citoplasma celular y la ausencia de núcleos como consecuencia de la lisis nuclear. B Corte transversal de tráquea, donde se aprecian los traqueoblastos muy inflamados, ya que éstos en forma normal son células muy aplanadas y difíciles de observar (n núcleo).



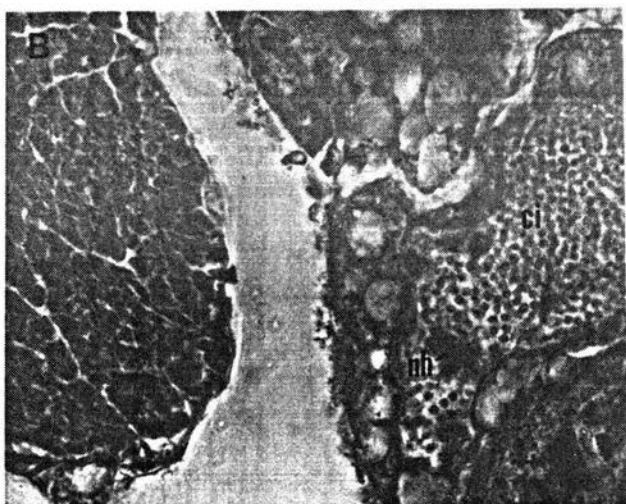
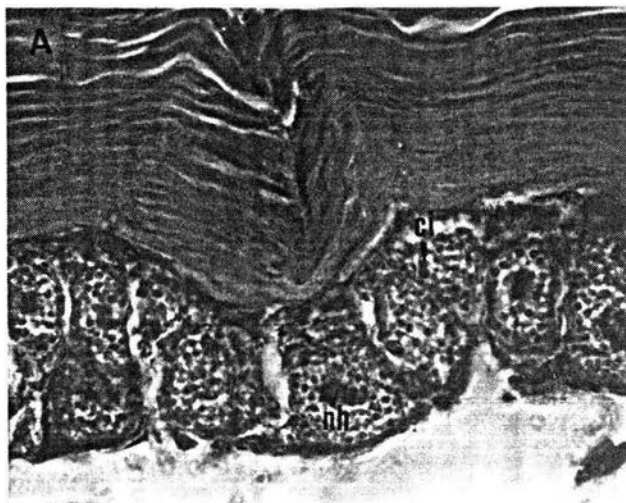


Figura 7. Corte transversal de hipodermis afectada por nucleopolihedrosis (A) donde se puede observar algunos núcleos hipertrofiados (nh) y cuerpos de inclusión (ci) en el citoplasma (c). Corte tranversal de tejido graso y muscular (B) en donde se pueden observar algunos núcleos hipertrofiados y como el tejido muscular no es afectado al no observarse cuerpos de inclusión aparentes.

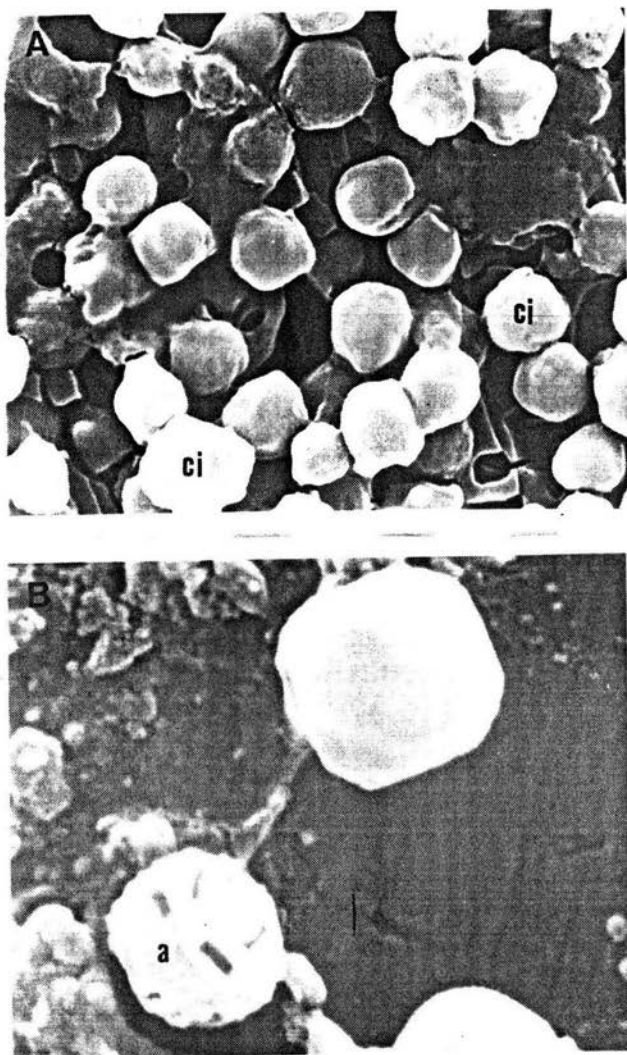


Figura 8. A vista general de los cuerpos de inclusión (ci) del VPN de *Spodoptera* sp. Nótese la forma irregular, presentando una tendencia más bien esférica (7 800 X). B cuerpo de inclusión parcialmente disuelto (a) presentando pequeñas oquedades donde presumiblemente se alojaban los viriones.

pudieran ser afectados en *Spodoptera sp* y que no fueron detectados en este estudio.

#### 4.6. Morfología del Cuerpo de Inclusión

Como resultado de las observaciones a través de las micrografías al MEB se pudo detectar lo siguiente acerca de los cuerpos de inclusión el VPN de *Spodoptera sp*:

Los cuerpos de inclusión presentan una forma irregular, con una tendencia esférica (Figura 8). El tamaño promedio determinado fué de  $1.7 + 0.5$   $\mu$ m de diámetro.

Durante el proceso de extracción y purificación, algunos cristales fueron parcialmente disueltos, esto pudo observarse a través de las micrografías, en las cuales se pudieron observar las oquedades donde se localizaban los viriones (figura 8). Por el tamaño de estas oquedades, que aparentemente serían demasiado grandes para un virion solo, por lo que se puede pensar en viriones incluidos en forma múltiple; sin embargo esto no se puede afirmar ya que no se contó con el material suficiente para afirmar este hecho.

Los viriones, aparentemente, no presentan un acomodo regular, si no más bien se encuentran distribuidas en forma aleatoria, lo que concuerda con lo reportado por otros autores para otros virus (Harrap, 1972b; Entwistle y Evans, 1984).

## 5. CONCLUSIONES

Del estudio aquí presentado se puede concluir lo siguiente:

- De acuerdo con los bioensayos, una concentración de  $5.71 \times 10^3$  polihedros/ml (0.00119%), es suficiente para alcanzar la  $CL_{50}$  en *Spodoptera sp.*
- El falso medidor de la col *Trichoplusia ni* es ligeramente susceptible al VPN de *Spodoptera sp.*, pues presenta una  $CL_{50}$  de  $1.056 \times 10^6$  polihedros/ml.
- La palomilla dorso de diámetro *Plutella xylostella* no es susceptible al ataque del virus de la polihedrosis de *Spodoptera sp.*
- Los tejidos afectados por el VPN en *Spodoptera sp* son: intestino medio, tejido graso, hemocitos, traqueoblastos e hipodermis.
- El cuerpo de inclusión del VPN de *Spodoptera sp* es de forma irregular con tendencia esférica y un tamaño promedio de  $1.7 \pm 0.5$   $\mu$ m de diámetro.
- El VPN de *Spodoptera sp* presenta un alto potencial para ser considerado como agente natural de control microbiano del gusano del corazón de la col.

## 6. LITERATURA CITADA

- Adams, J.R., Godwin, R.H., and Wilcox, T.A. (1977). Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. *Biol. Cell.* 28: 261-268.
- Adang, M.J., and Spence, K.D. (1981). Surface morphology of peritrophic membrane formation in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Cell. Tissue Res.* 218: 141-147.
- Aizawa, K. (1962). Infection of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Linn.), with the nuclear polyhedrosis of the silkworm. *J. Insect. Pathol.* 4: 122-127.
- Aizawa, K. (1963). The nature of infections caused by nuclear polyhedrosis viruses. In Steinhaus, E.A. (Eds). *Insect Pathology*. Academic Press, New York.
- Alloway, P.G., and Payne, C.C. (1983). A biochemical and biological comparison of three european isolates of nuclear polyhedrosis viruses from *Agrotis segetum*. *Arch. Virol.* 77: 45-54.
- Arnott, J.H., Smith, K.M., and Fullilove, S.L. (1968). Ultrastructure of a cytoplasmic polyhedrosis virus affecting the monarch butterfly *Danaus plexippus*. *J. Ultrastruct. Res.* 24: 479-485.
- Ayala, J. F. y Kiger, A.J. (1984). *Genética Moderna*. Fondo Educativo Interamericano. México, 836 pags.
- Benz, G. (1963). A nuclear polyhedrosis of *Malacosoma alpicola* (Stand). *J. Insect. Pathol.* 5: 215-241.

- Brandt, C.R. Adang, M.A., and Spence, K.D. (1978). The peritrophic membrane: ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudosugata*. J. Invert. Pathol. 32: 12-24.
- Carner, G.R., Hudson, J.S., and Barnett, U.W. (1979). The infectivity of a nuclear polyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar for eighth noctuid hosts. J. Invertebr. Path 88: 211-216.
- Corte, J.L., Crawford, A.M. and Kalmakoff, J. (1977). Effect of alkaline protease on the antigenic nature of *Wiseana* nuclear polyhedrosis virus polyhedron protein. J. Virol. 24: 412-415.
- Derksen, G.H. and Granados, R.R. (1988). Alteration of a lepidoptera peritrophic membrane by baculovirus and enhancement of viral infectivity. Virology 167: 242-250.
- Entwistle, P.F. and Evans, H.F. (1984). Viral control. In Gilbert, L.I., and Kerbut, G.A. Eds., Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Vol. 12, Pergamon Press, Oxford, 347-412 pp.
- Evans, H.F., and Entwistle, P.F. (1987). Viral Diseases. In Fuxa, R.J., and Tanada, Eds., Epizootiology of Insect Disease. John Wiley & Sons, Ed.
- Gipson, J.L., and Scott, P.A. (1975). The virogenic stroma in nuclear and cytoplasmic polyhedrosis. J. Ultrastruct. Res. 35: 606-625.
- Granados, R.R. (1978). Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus. Virology. 90: 170-174.
- Granados, R.R. (1980). Infectivity and Mode of action of baculoviruses. Biotechnol. Bioeng. 22: 65-93.

- Granados, R.R. (1981). Infection and replication of insect pathogenic viruses in tissue culture. *Adv. Virus. Res.* 16: 71-79.
- Granados, R.R., and Lawler, A.K. (1981). *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus, invasion and infection. *Virology*. 108: 279-308.
- Granados, R.R., and Williams, G.K. (1981). Replication of heliiothis zea baculovirus, invasion and infection. *Intervirology*, 16: 189-239.
- Granados, R.R., and Williams, G,k. (1985). Cell infection by a nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 42: 311-318.
- Granados, R.R., and Roberts, D.W. (1979). Electron microscopy of a Poxlike virus infecting an invertebrate host. *Virology*, 40: 230-243.
- Harper, J.D. (1976). Cross-infectivity of six plussine nuclear polyhedrosis virus isolates to plussine hosts. *J.Invertebrt, Pathol*, 27: 275-277.
- Harrap, K.A (1972a). The structure of nuclear polyhedrosis viruses. I The inclusion body. *Virology*, 50: 114-123.
- Harrap, K.A. (1972b). The structure of nuclear polyhedrosis viruses II The virus particle. *Virology*, 50: 124-132.
- Harrap, K.A. (1972c).The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III Virus assembly. *Virology*, 50: 133-139.
- Harrap, K.A. and Longworth, J.F. (1974). An evaluation of purification methods for baculoviruses. *J.Invertebrt. Pathol* 24: 55-62.

- Harrap, K.A. and Payne, C.C. (1979). The structure properties and identification of insect virus. *Adv. Virus, Res.* 25: 173-354.
- Harrap, K.A. (1982). The internal structure of an insect virus. *Virology*, 28: 175-178.
- Henry, J.E. (1969). Comparative observations on poxvirus of invertebrates and vertebrates. *Arch. Virol*, 55: 247-250.
- Henry, J.E., Nelson, B.P., and Jutila, J.W. (1969). Pathology and development of the grasshopper inclusion body virus in *Melanoplus sanguinipes*. *J.Virol.* 3(6): 605-610.
- Hostetter, D.L., and Bell, M.R. (1985). Natural dispersal of baculoviruses. In *Viral Insecticides for Biological Control*. Academic Press, New York. 249-273.
- Huang, T.H. (1980). Introduction of the 178th National Meeting of the American Chemical Society. *Biotech. Bioeng.* 22: 1295-1296.
- Hubner, J. (1977). Codling moth granulosis virus: its efficiency in the field in comparison with organophosphorus insecticides. *J.Econ.Ent.* 70: 557-561.
- Ignoffo, C.M. (1978). Strategies to increase the use of entomopathogens. *J.Invertebrt. Pathol.* 31: 1-3.
- Infante, G.S. y Calderon, A.(1980). *Manual de Analisis Probit*. Colegio de Postgraduados. 107 pags.
- Jaques, R.P. (1967). The persistence of a nuclear polyhedrosis virus in the habitat of the host insect, *Trichoplusia ni* II. Polyhedra in soil. *Canad. Ent.* 99: 820-829.
- Jaques, R.P. (1985). The persistence of a nuclear polyhedrosis virus in soil. *J. Insect. Pathol.* 6: 251-254.



- Jaques, R.P. and Harcourt, D.G. (1971). Viruses of *Trichoplusia ni* and *Pieris rapae* in soil in fields of crucifers in Southern Ontario. *Canad. Ent.* 103: 1285-1290.
- Kawanishi, C.Y., Summers, M.D., Stoltz, D.B., and Arnott, H.J. (1972). Entry of an insect virus *in vivo* by fusion envelope and microvillus membrane. *J. Invertebr. Pathol.* 20: 104-108.
- Kelly, C.D., and Roberts, J.S. (1973). Icosahedral cytoplasmic deoxyviruses. *J. Gen. Virol.* 20: 17-41.
- Kelly, D.C. (1982). Baculovirus Replication. *J. Gen. Virol.* 63: 1-13.
- Kelly, D.C. (1985). The structure and physical characteristics of baculoviruses. In *Viral insecticides for biological control*. Academic Press, New York. 469-283 pp.
- Lipa, J.J., and Slizinki, K. (1973). Wskazówki Metodyczne I Terminologia de Wyznaczania Sredniej Smiertelnej ( $LD_{50}$ ) W Patologii Owadów I Toksykologii. *Prace Naukowe IOR* 15(1): 58-83.
- Mattehews, F.E.R. (1982). Clasification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Commitee on Taxonomy of Viruses. *Intervirol.* 17: 200-154.
- Margtinoni, E.M., and Iwai, J.P. (1986). A catalog of viral diseases of insect, mites and ticks. U.S.D.A. General Technical Report. 51 p.
- Mc. Gregor, R. y Gutiérrez, G. (1983). Guía de insectos nocivos para la agricultura en México, Ed. Alhambra. 164 pags.

- Moscardi, F. (1983). Utilizacao de *Baculovirus anticarsia* para o controle da lagarta de soja. *Anticarsia gemmatalis*, Comunicado Tecnico. 23: 21 p.
- Paschke, J.D., Lowe, R.E., and Giese, R.L. (1968). Bioassay of the nuclear polyhedrosis and granulosis viruses of the *Trichoplusia ni*. *J.Invertebrt. Pathol.* 10: 327-334.
- Paschke, J.D., and Summers, M.D. (1975). Early events in the infection of arthropod gut by pathogenic insect viruses. In Maramorosh, K., and Shope, R.E.(eds.) *Invertebrate Immunity*. Academic Press, New York. 75-112 pp.
- Podwaite, D.J. (1981). NPV production and quality control. In Doane, C., and Mc.Manus, M. (Eds.) *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*, U.S.D.A., Washington.
- Prado, B.E. y Valdez, C.J. (1985). Introducción a la elaboración de preparaciones histológicas. Colegio de Postgraduados C.E.N.A., Chapingo, México, 27 pags.
- Richards, A.G., and Richards, P.A.(1977). The peritrophic membrane of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 22: 219-240.
- Rhormann, G.J., Pearson M.N., Brailey, T.J., Becker, R.R., and Beadreau, G.S.(1981). N-terminal Polyhedrin sequences and occluded baculovirus evolution. *J.Mol.Evol.* 17: 329-333.
- Santos, D.C., and Terra, R.W. (1986). Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnys ello* larvae and inferences concerning secretory mechanism and the permeability of the peritrophic membrane. *Insect. Biochem.* 16(4): 691-700.

- Shapiro, M. (1981). *In vivo* Production at Otis Air Base, Mass. In Doan, C., and Mc.Manus (Eds). *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Manegement*. U.S.D.A., Washington.
- Shapiro, M., Bell, A.R., and Owens, D.C. (1981). *In vivo* Mass production of gypsy moth nucleopolihedrosis virus. In Doane C., and Mc.Manus (Eds). *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Manegement*. U.S.D.A. Washington.
- Shieh, R.T., and Bohmfalk, T.J. (1980). Production and Efficacy of Baculoviruses. *Biotech.Bioeng.* 22: 1357-1375.
- Smith, M.K. (1976). *Virus-Insect Relationships*. Longman Eds. New York. 291 p.
- Smith, E.G. and Summers, M.D. (1982). DNA homology among subgroup A,B, and C baculoviruses. *Virology* 123: 393-406.
- Summers, M.D., and Volkman, L.E. (1976). Comparison of biophysical and morphological preperities of occluded and extracellular nonoccluded baculovirus from *in vivo* and *in vitro* host sistems. *J. Virol.* 17: 962-972.
- Tanada, Y., and Hess, T.R. (1976). Development of a nuclear polihedrosis virus in midgut cells and penetration of the virus into the hemocoel of the armyworn, *Pseudaletia unipuncta*. *J.Invertebrt. Pathol.* 28: 67-76.
- Tanada, Y., and Hess T.R.(1981). Invasion of nuclear polyhedrosis virus in midgut of the armyworm *Pseudaletia unipuncta*, and the enhancement of a sinergistic enzyme. *J. Invertbrt. Pathol.* 26: 99-76.

- Tanada Y., and Hess, T.R. (1984). The cytopathology of baculoviruses. Infection in insects. In King, R.C. and Akai, H. (Eds). *Insect Ultrastructure*. Vol.2, Plenum Publ. Corp. New York. 517-556.
- Tanada, Y., Hess, T.R. and Omi, E.M. (1984). Unique virus morphogenesis and cytopatology of a baculovirus (hypertrophy strai) in larva of armyworm *Pseudaletia unipuncta*. *J. Invertebrt. Pathol.* 26: 99-104.
- Thompson, C.G., Scott, D.W., and Wickman, B.E. (1981). Long term persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the Douglas-fir Tussock Moth, *Orgyia Pseudosugata* (Lepidoptera: Lymantridae) in forest Soil. *Environ. Ent.* 10: 254-255.
- Tjia, T.S., Carsten, B.E., and Doerfler, E. (1979). Ifection of *Spodoptera frujiperda* cells with *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 99: 399-409.
- Tweeten, A.K., Bulla, A.L. and Consigli, A.R. (1981). Applied and Molecular Aspects of Insect Granulosis Viruses. *Microbiol. Rev.* 45(3): 379-408.
- Union Nacional de Productores Hortícolas. (1989). Reporte anual de exportaciones agrícolas.
- Uchida, Y., Kawanoto, F., Himeno, M. and Hayashiya, K. (1984). A virus-inactivating protein isolated from the digestive juice of the silkworn *Bombix mori*. *J. Invertebrt. Pathol.* 43: 182-188.
- Vail, V.P., Henneberry, J.T., and Bell, R.M. (1973). Cotton leafperforator: effect of a nuclear polyhedrosis virus on field populations. *J. Invertebrt. Pathol.* 70(6): 727-728.

Vaughn, L.J., Goodwin, H.R., and Mika, E. (1981). Production in Cell culture. In Doane, C., and Mc.Manus M.(Eds). The Gypsy Moth: Research Toward Rest Manegment. U.S.D.A. Washington.

Walker, S., Kawanishi, C. Y., and Hamm, J.J. (1982). Cellular Pathology of a Granulosis Virus Infection. J. Ultrastructure. Res. 80: 163-177.

APENDICE I

ANALISIS PROBIT DEL VPN DE *Spodoptera sp*  
EN CONTRA DE *Spodoptera sp*

DATOS

Observaciones	Dosis	Tratados	Muertos
1	0.1000	90	87
2	0.0100	90	78
3	0.0070	88	64
4	0.0030	88	49
5	0.0010	89	42
6	0.0006	88	33
7	0.0001	87	18

PROBIT ANALISIS ON LOG10 (DOSIS)

ITERATION	INTERCEPT	SLOPE	MU	SIGMA
0	7.69681196	0.91576479	-2.94487403	1.09198345
1	7.61851602	0.89546419	-2.92419960	1.11673924
2	7.61982451	0.89587859	-2.92430753	1.11622268
3	7.61982482	0.89587869	-2.92430755	1.11622255

COVARIANCE MATRIX		COVARIANCE MATRIX		
	INTERCEPT	SLOPE	MU	SIGMA
INTERCEPT	0.04498240	0.01542174	MU	0.00429793
SLOPE	0.01542174	0.00569053	SIG	-0.00169548
				0.00883396

CHI-SQ = 7.0744                      5 DF PROB > CHI-SQ = 0.2152

NOTE : SINCE THE CHI-SQUARE IS SMALL (P > 0.10), FIDUCIAL  
LIMITS WILL BE COMPUTED USING A T VALUE OF 1.96.

PROBIT ANALYSIS ON LOG10(DOSIS)

95 PERCENT FIDUCIAL LIMITS

PROBABILITY	LOG10(DOSIS)	LOWER	UPPER
0.01	-5.52102951	-6.09281330	-5.10665966
0.02	-5.21674840	-5.73027569	-4.84359526
0.03	-5.02369179	-5.50049801	-4.67644853
0.04	-4.87846282	-5.32780151	-4.44803026
0.05	-4.76033026	-5.18744493	-4.44803026
0.06	-4.65978090	-5.06807715	-4.36066854
0.07	-4.57161877	-4.96349952	-4.28398483
0.08	-4.49268011	-4.86993845	-4.21524800
0.09	-4.42088855	-4.78491790	-4.15266509
0.10	-4.35480430	-4.70672135	-4.09499242
0.15	-4.08119787	-4.38378952	-3.85538937
0.20	-3.86374415	-4.12842272	-3.66367129
0.25	-3.67718822	-3.91068987	-3.49784512
0.30	-3.50965522	-3.71668020	-3.34740692
0.35	-3.35441094	-3.53870058	-3.20620428
0.40	-3.20709930	-3.37200878	-3.07002331
0.45	-3.06457357	-3.21344364	-2.93555555
0.50	-2.92430755	-3.06072554	-2.79988668
0.55	-2.78404152	-2.91199206	-2.66023317
0.60	-2.64151580	-2.76538743	-2.51380490
0.65	-2.49420415	-2.61865684	-2.35766273
0.70	-2.33895987	-2.46875586	-2.18838143
0.75	-2.17142688	-2.31139175	-2.00129769
0.80	-1.98487094	-2.14013928	-1.78899114
0.85	-1.76741722	-1.94416244	-1.53788309
0.90	-1.49381079	-1.70114365	-1.21836701
0.91	-1.42772654	-1.64286078	-1.14078065
0.92	-1.35593498	-1.57978536	-1.05635262
0.93	-1.27699632	-1.51037020	-0.96336987
0.94	-1.18883420	-1.43311811	-0.85936063
0.95	-1.08828483	-1.34519238	-0.74055686
0.96	-0.97015227	-1.24210079	-0.60076788
0.97	-0.82492330	-1.11562228	-0.42865561
0.98	-0.63186670	-0.94784917	-0.19950430
0.99	-0.32758558	-0.68404685	0.16229539

PROBIT ANALYSIS ON LOG10(DOSIS)

PROBABILITY	LOG10(DOSIS)	95 PERCENT FIDUCIAL LIMITS	
		LOWER	UPPER
0.01	0.000003	0.000001	0.000008
0.02	0.000006	0.000002	0.000014
0.03	0.000009	0.000003	0.000021
0.04	0.000013	0.000005	0.000028
0.05	0.000017	0.000006	0.000035
0.06	0.000022	0.000008	0.000043
0.07	0.000026	0.000011	0.000052
0.08	0.000032	0.000013	0.000061
0.09	0.000037	0.000016	0.000070
0.10	0.000044	0.000019	0.000080
0.15	0.000082	0.000041	0.000139
0.20	0.000136	0.000073	0.000216
0.25	0.000208	0.000121	0.000316
0.30	0.000307	0.000189	0.000447
0.35	0.000439	0.000285	0.000619
0.40	0.000616	0.000419	0.000847
0.45	0.000856	0.000605	0.001154
0.50	0.001182	0.000861	0.001577
0.55	0.001634	0.001214	0.002174
0.60	0.002269	0.001704	0.003043
0.65	0.003187	0.002393	0.004358
0.70	0.004559	0.003384	0.006432
0.75	0.006709	0.004868	0.009894
0.80	0.010314	0.007229	0.016133
0.85	0.017029	0.011365	0.028772
0.90	0.032003	0.019910	0.060087
0.91	0.037270	0.022776	0.071855
0.92	0.043980	0.026349	0.087293
0.93	0.052760	0.030917	0.108162
0.94	0.064653	0.036947	0.137471
0.95	0.081523	0.045253	0.180787
0.96	0.107048	0.057399	0.249539
0.97	0.149626	0.076838	0.371092
0.98	0.233525	0.113136	0.629432
0.99	0.471020	0.207868	1.449640



APENDICE II

ANALISIS PROBIT DEL VPN DE *Spodoptera sp*  
EN CONTRA DE *Trichoplusia ni*

DATOS				
Observaciones	Dosis	Tratados	Muertos	
1	1.000	100	68	
2	0.300	100	50	
3	0.100	90	39	
4	0.040	90	26	
5	0.010	90	21	
6	0.002	90	6	
7	0.001	90	1	

PROBIT ANALYSIS ON LOG10(DOSIS)

ITERATION	INTERCEPT	SLOPE	MU	SIGMA
0	5.56310823	0.82055621	-0.68625186	1.21868556
1	5.47552141	0.71981724	-0.66061409	1.38924152
2	5.47962097	0.72574988	-0.66086262	1.37788517
3	5.47963836	0.72577620	-0.66086261	1.37783521

COVARIANCE MATRIX

	INTERCEPT	SLOPE
INTERCEPT	0.00845824	0.00455609
SLOPE	0.00455609	0.00393467

COVARIANCE MATRIX

	MU	SIGMA
MU	0.00788752	0.00511587
SIG	0.00511587	0.01418069

CHI-SQ = 6.4125 WITH 5 DF PROB > CHI-SQ = 0.2681

NOTE: SINCE THE CHI-SQUARE IS SMALL ( $P > 0.10$ ), FIDUCIAL LIMITS WILL BE COMPUTED USING A T VALUE OF 1.96

PROBIT ANALYSIS ON LOG10 (DOSIS)

PROBABILITY	LOG10(DOSIS)	95 PERCENT FIDUCIAL LIMITS	
		LOWER	UPPER
0.01	-3.86618662	-4.44317558	-3.44921922
0.02	-3.49059017	-3.99470455	-3.12430461
0.03	-3.25228627	-3.71078465	-2.91753611
0.04	-3.07301952	-3.49763140	-2.76156360
0.05	-2.92719985	-3.32458990	-2.63434976
0.06	-2.80308441	-3.17759873	-2.52577648
0.07	-2.69425945	-3.04898119	-2.43031400
0.08	-2.59681968	-2.93406548	-2.34459276
0.09	-2.50820210	-2.82978770	-2.26639928
0.10	-2.42662948	-2.73402511	-2.19419677
0.15	-2.08889703	-2.34058293	-1.89221856
0.20	-1.82047798	-2.03304872	-1.64705469
0.25	-1.59019834	-1.77495601	-1.43098166
0.30	-1.38340010	-1.54956807	-1.23055411
0.35	-1.19177072	-1.34746717	-1.03807349
0.40	-1.00993317	-1.16228512	-0.84883627
0.45	-0.83400324	-0.98901728	-0.65984914
0.50	-0.66086261	-0.82341046	-0.46894439
0.55	-0.48772198	-0.66172256	-0.27412074
0.60	-0.31179205	-0.50050654	-0.07308178
0.65	-0.12995451	-0.33630880	0.13713975
0.70	0.06167488	-0.16523626	0.36064871
0.75	0.26847311	0.01772796	0.60349999
0.80	0.49875275	0.22001270	0.87538099
0.85	0.76717180	0.45442493	1.19366684
0.90	1.10490426	0.74791600	1.59559619
0.91	1.18647688	0.81862128	1.69585598
0.92	1.27509445	0.89536745	1.79858108
0.93	1.37253423	0.97968259	1.91490288
0.94	1.48135919	1.07376982	2.04489567
0.95	1.60547463	1.18098537	2.19324457
0.96	1.75129429	1.30684008	2.36764520
0.97	1.93056104	1.46142164	2.58218940
0.98	2.16886494	1.66670822	2.86759122
0.99	2.54446139	1.98989005	3.31779504

PROBIT ANALYSIS ON LOG10(DOSIS)

PROBABILITY	LOG10(DOSIS)	95 PERCENT FIDUCIAL LIMITS	
		LOWER	UPPER
0.01	0.00013609	0.00003604	0.00035545
0.02	0.00032315	0.13210123	0.00075110
0.03	0.00055939	0.00019463	0.00120910
0.04	0.00084524	0.00031796	0.00173156
0.05	0.00118250	0.00047360	0.00232087
0.06	0.00157368	0.00066436	0.00298005
0.07	0.00202181	0.00089334	0.00371267
0.08	0.00253035	0.00116395	0.00452280
0.09	0.00310312	0.00147983	0.00541503
0.10	0.00374430	0.00184491	0.00639445
0.15	0.00814897	0.00456475	0.01281685
0.20	0.01511896	0.00926726	0.02253955
0.25	0.02569222	0.01678974	0.03706964
0.30	0.04136184	0.02821187	0.05880928
0.35	0.06430271	0.04492963	0.09160955
0.40	0.09773876	0.06882003	0.14163276
0.45	0.14655369	0.10256111	0.21885217
0.50	0.21834205	0.15017220	0.33966876
0.55	0.32529547	0.21791014	0.53196034
0.60	0.48776198	0.31585915	0.84511969
0.65	0.74138790	0.46098968	1.37132295
0.70	1.15259008	0.68353970	2.29429212
0.75	1.85555193	1.04166472	4.01328491
0.80	3.15320898	1.65963542	7.50552357
0.85	5.85021466	2.84724559	15.61948977
0.90	12.73222355	5.59649349	39.40906771
0.91	15.36302998	6.58599325	49.30102888
0.92	18.84058801	7.85900287	62.88992608
0.93	23.57948012	9.54294864	82.20587991
0.94	30.29417895	11.85140455	110.89083965
0.95	40.31573915	15.16999265	156.04310131
0.96	56.40197276	20.26936214	233.15524843
0.97	85.22382843	28.93487718	382.11087709
0.98	147.52476954	46.42032956	737.21000232
0.99	350.31714626	97.69898362	2078.71540914