



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA

PATOGENICIDAD DE LOS VIRUS DE LA POLIEDROSIS  
NUCLEAR DE *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatalis* y  
*Autographa californica* SOBRE LARVAS DE *Trichoplusia*  
*ni* (Hübner) (LEPIDOPTERA; NOCTUIDAE).

T E S I S

PRESENTADA POR

NATALIA REAL LUNA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O



1 9 9 4 .



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.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala**, especialmente a los Profesores por compartir sus conocimientos y el amor a la Biología.

Al Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Montecillo en especial a la Dra. Raquel Alatorre Rosas por su dirección, apoyo y confianza en la realización de la presente investigación.

Al Biol. Joel Lara Reyna por su apoyo, enseñanza y amistad durante la realización de este trabajo.

A mis amigos Aida Rubio Fernández, Beatriz Rubio Morales, Ma. Teresa Santillán Galicia y Ariel Guzmán Franco por los momentos que compartimos durante la licenciatura.

A Rosa María Calderón Hernández, Ma. Eugenia González López, Adelina Gabriel Cristobal, Vicente Vargas y Raymundo Monroy por su amistad, comprensión y por todos los momentos que hemos compartido juntos.

A Gerardo, Claudia, Baeza, Rebollar, Juan Carlos, Alvaro, Ana Lilia, Corro y Victor por todos los momentos que compartimos en el Laboratorio de Patología de Insectos.

Y A todas las personas que de alguna manera me han brindado su apoyo mi más sincero agradecimiento.

## **DEDICATORIA**

A mis Padres:

Ma. Efigenia Luna Aburto

Clemente Real Correa

Por su apoyo, amor y comprensión que me han brindado durante estos años de estudio.

A mi Abuelito:

Antonio Luna Tinoco

Porque mi papá y él fueron parte muy importante en mi vida, siempre estarán presentes, con admiración y respeto siempre los recordaré con mucho cariño.

A mis hermanos:

Beatriz y José Marcelo

Oscar

Javier

Sara y Raúl

Porque juntos hemos logrado salir adelante.

A mis sobrinos:

José Carlos

Wendy Guadalupe

Miriam Paola

Con mucho cariño

A mi Abuelita y mis Tíos:

Leonor Aburto Gutierrez

Armando

Domi

Virginia

Por su apoyo cuando más lo necesite, Gracias.

## CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	viii
RESUMEN.....	ix
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVO Y JUSTIFICACION.....	4
3. REVISION DE LITERATURA.....	5
3.1. Características generales del insecto.....	5
3.1.1. Taxonomía.....	5
3.1.2. Daños que ocasiona.....	5
3.1.3. Biología.....	5
3.2. Virus entomopatógenos.....	6
3.2.1. Antecedentes históricos.....	6
3.2.2. Virus asociados a insectos.....	7
3.2.3. Características generales de Baculovirus.....	7
3.2.4. Características del VPN.....	8
3.2.5. Vías de entrada.....	8
3.2.6. Barreras contra la infección.....	9
3.2.7. Modo de infección del virus de la poliedrosis nuclear.....	9

3.2.8. Signos y síntomas.....	11
3.2.9. Susceptibilidad.....	11
3.2.10. Potencialidad de los <b>Baculovirus</b> como <b>Bioinsecticidas</b> .....	12
3.2.10.1. Transmisión.....	13
3.2.10.2. Persistencia.....	13
3.2.10.3. Rango de hospederos.....	15
3.2.10.4. Producción masiva de <b>Baculovirus</b> y <b>Equivalente larval</b> .....	16
3.3. Criterios usados para caracterizar <b>baculovirus</b> .....	18
3.4. Importancia de los <b>Baculovirus</b> .....	20
3.4.1. Control de plagas.....	20
3.5. Ventajas del uso de <b>Baculovirus</b> .....	22
3.6. Límites en el uso de <b>Baculovirus</b> .....	22
3.7. Compatibilidad del <b>VPN</b> con insecticidas.....	23
3.8. Avances en el futuro de <b>Baculovirus</b> .....	23
4. MATERIALES Y METODOS.....	24
4.1. Cría de <b><i>Trichoplusia ni</i></b> .....	24
4.2. Propagación del virus de la poliedrosis nuclear ( <b>VPN</b> ).....	25
4.2.1. Cálculo del <b>Equivalente larval (EL)</b> .....	25

4.3. Extracción de virus entomopatógenos.....	26
4.4. Bioensayo.....	26
4.4.1. Determinación de la $CL_{50}$ .....	26
4.4.2. Conteo de poliedros/ml.....	27
4.4.3. Método de Bioensayo.....	27
4.4.4. Tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ).....	29
5. RESULTADOS Y DISUSION.....	31
5.1. Cría de <i>Trichoplusia ni</i> .....	31
5.2. Propagación del virus.....	31
5.3. Equivalente larval (EL).....	32
5.4. Bioensayo.....	32
5.4.1. Concentración letal media ( $CL_{50}$ ).....	32
5.4.2. Mortalidad a diferentes días, después de la exposición al virus de la poliedrosis nuclear.....	36
5.4.3. Tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ).....	41
6. CONCLUSIONES.....	45
7. BIBLIOGRAFIA.....	46
8. APENDICE.....	54

## INDICE DE CONTENIDO

	CONTENIDO
Figura 1. Componentes estructurales de un <i>Baculovirus</i> .....	8
Figura 2. Componentes estructurales de un <i>peplomero</i> .....	10
Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la poliedrosis nuclear.....	18
Figura 4. Esquema general de la producción de <i>Baculovirus in vivo</i> .....	21
Figura 5. Líneas de respuesta dosis-mortalidad observada con tres virus de la poliedrosis nuclear sobre larvas de <i>T.ni</i> .....	27
Figura 6. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de <i>T.ni</i> expuestas a diferentes concentraciones (pol/ml) de VPN1.....	37
Figura 7. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de <i>T.ni</i> expuestas a diferentes concentraciones (pol/ml) de VPN2.....	38
Figura 8. No. de larvas de tercer instar temprano de <i>T.ni</i> expuestas a diferentes concentraciones (pol/ml) de VPNAc.....	44
Figura 9. Tiempo letal medio observado en larvas de <i>T.ni</i> tratadas con diferentes concentraciones de los tres virus de la poliedrosis nuclear.....	46

## INDICE DE CUADROS

	PAGINA
Cuadro 1. Bioinsecticidas a base de virus entomopatógenos.....	21
Cuadro 2. Mortalidad de larvas de <i>Trichoplusia ni</i> , tratadas con diferentes concentraciones de VPNTn, VPNAg y VPNAc.....	33
Cuadro 3. Datos del analisis Probit de los bioensayos con VPNTn, VPNAg y VPNAc contra larvas de <i>Trichoplusia ni</i> .....	34
Cuadro 4. No de larvas muertas de tercer instar temprano de <i>Trichoplusia ni</i> , expuestas a cuatro concentraciones diferentes de VPNTn.....	36
Cuadro 5. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de <i>Trichoplusia ni</i> después de expuestas a diferentes concentraciones de VPNAg.....	39
Cuadro 6. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de <i>Trichoplusia ni</i> después de expuestas a diferentes concentraciones de VPNAc.....	39
Cuadro 7. Tiempo letal medio (TL <sub>50</sub> ) de larvas de tercer instar temprano de <i>Trichoplusia ni</i> tratadas con diferentes concentraciones de VPNTn, VPNAg y VPNAc.....	41
Cuadro 8. Número de larvas de <i>Trichoplusia ni</i> que puparon días después de la exposición al VPNTn, VPNAg y VPNAc.....	42

## RESUMEN

*Trichoplusia ni* (Hübner), se considera como una de las principales plagas de diversos cultivos agrícolas, el control de está ha sido ineficiente con insecticidas convencionales, una alternativa de control es mediante el uso de virus entomopatógenos. En el presente trabajo se determinó la virulencia en laboratorio mediante bioensayos de los virus de la poliedrosis nuclear de *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatalis* y *Autographa californica* sobre larvas de *Trichoplusia ni*; para la realización de este trabajo se llevó a cabo la cría y mantenimiento del insecto en laboratorio, reaislamiento y purificación de los VPNS, determinación del Equivalente larval en larvas de cuarto estadio temprano de *T. ni* y por último determinar la  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$  de los VPNS sobre larvas de *T. ni*. Para la propagación del virus se utilizó el método de inoculación de insectos en laboratorio; la extracción de los virus se realizó con la técnica recomendada por Granados y Lawler (1981), y para la determinación de la  $CL_{50}$  y  $TL_{50}$  la técnica de bioensayo de residuos en las hojas. El menor EL se obtuvo con VPNAc con  $1.10 \times 10^8$  poliedros/larva, seguido del VPNAg con  $8.29 \times 10^8$  poliedros/larva y por último el VPNTn  $8.63 \times 10^8$  poliedros/larva. El virus más agresivo contra *T. ni* fué el VPNAg con una  $CL_{50}$  de  $8.7 \times 10^4$  poliedros/ml seguido del VPNAc con  $2.9 \times 10^6$  poliedros/ml y por último el VPNTn con  $1.56 \times 10^7$  poliedros/ml. El  $TL_{50}$  sobre larvas de *T. ni* de tercer estadio temprano fue para VPNAc de 1.27 días siendo más activo, que el VPNTn y VPNAg con una  $TL_{50}$  de 4.5 y 3.2 días respectivamente. Sin embargo se recomienda utilizar VPNAg para el control de *T. ni* al presentar una menor concentración de poliedros por ml para matar el 50% de la población plagá y una producción de poliedros similar al VPNTn, y el tiempo letal medio al ser de 3.2 días permitió el desarrollo completo del estado larval. La cruza infectiva que existe entre estos VPNS con miembros de la misma familia Noctuidae, hace necesario realizar pruebas con otros virus y encontrar virus más patógenos y generalistas de Lepidópteros plaga.

## 1.INTRODUCCION

El falso medidor de la col *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae), constituye una de las principales plagas de diversos cultivos agrícolas. Se le encuentra alimentandose sobre el follaje de crucíferas, lechuga, espinaca, betabel, chícharo, apio, perejil, papa, jitomate, algodón, soya, tabaco, clavel y de numerosos hospederos silvestres. Este Lepidóptero es un insecto cosmopolita que se originó en Africa tropical o subtropical y de ahí se extendió hacia Europa, Asia y América (Metcalf y Flint, 1977).

En los últimos años, el control del falso medidor de la col *Trichoplusia ni*, ha sido ineficiente debido a que el uso de insecticidas convencionales no ha logrado abatir las poblaciones insectiles a niveles económicamente aceptables. Se deduce, que las poblaciones naturales de la plaga han adquirido resistencia a los insecticidas químicos y que mientras la susceptibilidad natural de las poblaciones no se restituya eliminando la presión de selección de los insecticidas, se requerirá de una alternativa de control similarmente eficiente. La alternativa más factible es el uso de insecticidas microbianos (López e Ibarra, 1991).

Los insectos son susceptibles a un amplio espectro de enfermedades, estas pueden ser muy importantes como reguladores naturales, o bien por la explotación de esos organismos causantes de enfermedades como agentes de "control microbiano".

Aunque los insecticidas microbianos representan el 1% del mercado global de insecticidas, su uso está incrementando de 10-25% por año en comparación con los insecticidas químicos cuyo incremento va del 1-2% por año (Starnes, 1993).

Entre las características sobresalientes de los agentes microbianos resalta el hecho de presentar un rango de hospederos limitado, son biodegradables, bajos costos de producción en comparación con los insecticidas químicos, y son generalmente buenos en el manejo integrado de plagas (Roberts et al., 1991). Estos permiten un balance en la fauna de predadores y parásitos.

El control microbiano en México, poco a poco ha cobrado interés entre los agricultores debido a las ventajas que ofrecen por ejemplo, no dañan a la fauna benéfica, ni a vertebrados, no contaminan, son fáciles de aplicar; se utiliza equipo y tecnología desarrollada para insecticidas químicos, es difícil que los insectos plaga generen resistencia y además tienen la ventaja de poder establecerse en la zona donde son introducidos. El único efecto negativo es indirecto sobre las poblaciones de insectos entomófagos como consecuencia de la reducción de su hospedero (Roberts et al., 1991).

Dentro de los microorganismos asociados a insectos capaces de provocar enfermedades se encuentran bacterias, hongos, protozoarios, virus y nemátodos. Hasta el momento más de 1500 agentes microbianos han sido aislados tanto de insectos como de ácaros. El grupo de agentes microbianos más numeroso está constituido por virus, el siguiente grupo son los hongos, seguido de protozoarios, bacterias, rickettsias y nemátodos (Tanada y Kaya, 1993).

Los virus entomopatógenos causan enfermedades epizooticas, las cuales son debidas a la persistencia y a su eficiente transmisión horizontal y vertical. 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 el suelo y ser diseminados por el viento, la lluvia, la gravedad y por el mismo hospedero incluso parásitos y depredadores; ofrecen seguridad ambiental debido principalmente a la especificidad que existe entre hospedero y virus (Kathleen et al., 1981).

Otra de las ventajas que ofrecen los virus es el potencial a ser manipulados por técnicas de recombinación de DNA, debido a la relativa simplicidad del genoma viral. Las aplicaciones de la Ingeniería Genética contribuyen al uso de los insecticidas microbianos incrementando virulencia, rango de hospedero y persistencia (Roberts et al., 1991).

Los virus por otro lado no son totalmente aceptados debido a su alto costo de producción, acción lenta y por su especificidad. Debido a que son parásitos obligados requieren ser propagados en células vivas (*in vivo* o *in vitro*) necesitan tiempo para su desarrollo y matar o

debilitar a su insecto hospedero. Este tiempo es un período de 7 días o más, lo cual permite que la planta sea dañada. La especificidad hacia un insecto hospedero limita su uso en cultivos que presentan un complejo de plagas. La persistencia es también un factor limitante ya que el virus es rápidamente inactivado por la luz ultravioleta (Payne, 1982).

Pocos insecticidas virales han sido desarrollados comercialmente. En los Estados Unidos la EPA (Environmental Protection Agency) ha registrado VPNs para infectar *Heliothis zea*, *Autographa californica*, *Neodiprion sertifer* y un VG que infecta *Cydia pomonella* (Miller et al., 1983). Algunos productos comerciales son Gypchek usado para el control de la palomilla gitana *Lymantria dispar*, TM-Biocontrol-1, para el gusano peludo del abeto *Orgyia pseudosugata*; en Guatemala VPN 80 para el control de *Autographa californica*, *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni* y *Spodoptera exigua*, y VPN 82 para controlar *S. exigua* y *S. sunia*. El insecticida viral más exitoso en cuanto al número de hectáreas tratadas es el producto brasileño Multigen, basado en el VPN de *Anticarsia gemmatalis* (VPNAg).

## 2. OBJETIVO Y JUSTIFICACION

### Objetivo general

Determinar la virulencia en laboratorio mediante la técnica de bioensayo de los virus de la poliedrosis nuclear de *Trichoplusia ni*, *Anticarsia gemmatilis* y *Autographa californica* sobre larvas de *Trichoplusia ni*.

### Objetivos particulares:

1. Determinar el equivalente larval en larvas de *Trichoplusia ni* de cuarto instar temprano, con VPNTn, VPNAg y VPNAc.
2. Determinar la  $CI_{50}$  y  $TI_{50}$  de VPNTn, VPNAg y VPNAc, sobre larvas de *Trichoplusia ni*.

### JUSTIFICACION

*Trichoplusia ni* es un insecto que puede ser controlado biológicamente mediante el uso de virus entomopatógenos, la selección de aislamientos agresivos y persistentes permitirán lograr este objetivo.

### 3. REVISION DE LITERATURA.

#### 3.1. Características generales del insecto

##### 3.1.1. Taxonomía

*Trichoplusia ni* (Hübner) pertenece al Phylum: Artrópoda, Clase: Insecta, Orden: Lepidoptera, Familia: Noctuidae, Género: *Trichoplusia*, Especie: *T. ni*.

##### 3.1.2. Daños que ocasiona

*Trichoplusia ni* (falso medidor de la col), es importante por el tipo de daño que ocasiona a las plantas ya que las primeras hojas exteriores en la col, coliflor y otras crucíferas son generalmente acribilladas con agujeros grandes de forma y tamaño regulares, las capas exteriores de las cabezas de la col son perforadas también por las larvas de diferentes tamaños que aproximadamente llegan a medir hasta 3.5 cm de largo. Si las hojas son separadas, se encuentran masas de excremento (verde o café) sostenido en los angulos de las hojas. Como el tejido de las hojas es generalmente devorado por las larvas, el crecimiento de la planta es afectado (Metcalf y Flint, 1977).

##### 3.1.3. Biología

*Trichoplusia ni* presenta una pupa de color verdoso o café, mide aproximadamente 1.9 cm de largo y esta envuelta en un capullo delicado de hilos blancos entretreídos, es sostenida por uno de sus lados generalmente a una hoja de la planta. Estas pupas se transforman en palomillas de color café grisáceo, miden en promedio 2.5 cm de largo, con una extensión alar de 3.7 cm. Las alas anteriores son de color café moteado, tienen una mancha plateada cerca de la mitad, semejando un ocho, las alas posteriores son de un color más claro a bronceado. Son de hábitos nocturnos, alcanzan a depositar de 275 a 350 huevecillos en forma aislada en el envés de las hojas (Metcalf y Flint, 1977).

Todo el daño es causado por la larva, que pasa por cinco estadios, presenta tres pares de patas delgadas cerca de la cabeza y tres pares de falsas patas más anchas en forma de maza después de la mitad del cuerpo. La larva se desarrolla de 30 a 35 días, después teje el capullo, y posteriormente a los 3 ó 4 días emergen los adultos (Hill, 1983).

### 3.2. Virus Entomopatógenos

#### 3.2.1. Antecedentes históricos

Entre los primeros estudios sobre enfermedades virales en insectos se encuentra la enfermedad del gusano de seda *Bombix mori* descrita por Nysten en 1808, sin embargo el agente casual fué identificado en ese tiempo equivocadamente como una bacteria y más tarde como un protozoario. Acqua en 1918-1919 dió la primera prueba convincente de que el agente casual de la enfermedad del gusano de seda era un virus. En 1856 Cornalia describió algunas de las manifestaciones patológicas de la enfermedad del gusano de seda y Maestri localizó los corpúsculos en el núcleo de varios tejidos. Bolle en 1894 reportó que los poliedros del gusano de seda y los de la palomilla religiosa *Lymantria monacha* son similares, Wahl en 1909 mostró que los poliedros de estas dos especies son diferentes, tienen forma hexagonal y trigonal respectivamente.

Steinhaus en 1946 publicó su trabajo Microbiología de insectos donde hace referencia a las enfermedades virales, y Bergold en 1947 publica las primeras micrografías de los poliedros de *Bombix mori* y *Lymantria dispar* (Granados y Federici, 1986). Pocos años más tarde las enfermedades por virus fueron observadas y descritas en una amplia variedad de insectos.

Los virus patógenos constituyen un medio natural que afectan plagas de insectos. Frecuentemente en el campo ocurren epizootias naturales, esto provee una evidencia de que los virus pueden incrementarse rápidamente y causar una alta mortalidad. Por ejemplo, en Canadá fue introducida *Gilpinia hercyniae*, después de cuatro años los virus también fueron introducidos

accidentalmente, estos se propagaron en forma natural constituyéndose en un factor importante para el control de la especie plaga (Tinsley, 1977).

### **3.2.2. Virus asociados a insectos**

Aproximadamente 650 virus han sido aislados de insectos 83% son de Lepidópteros, cerca de 14% de Hymenopteros y 3% son de Orthopteros, Coleopteros y Dípteros (Kathleen et al., 1981). Allen y Ball (1992), demostraron la presencia de partículas virales en varias especies de áfidos.

### **3.2.3. Características generales de Baculovirus**

De los virus asociados a insectos, solo los Baculovirus han sido recomendados para ser utilizados en el campo, para el manejo integrado de plagas (Moscardi, 1983).

Los Baculovirus son los más ampliamente investigados. Se localizan dentro de la Familia Baculoviridae (Matthews, 1982 citado por Tanada y Hess, 1984), comprenden virus de forma bacilar o en forma de varilla que contienen DNA de doble cadena, encerrado covalentemente en nucleocápsides con un peso molecular de aproximadamente  $8 \times 10^7$  daltones. En la mayoría de los casos los viriones están incluidos dentro de un cristal de naturaleza proteica conocido como cuerpo poliédrico de inclusión, este contribuye a su estabilidad en el ambiente (Starnes, 1993) (Fig. 1). Los baculovirus se separan en los subgrupos: A, virus de la Poliedrosis nuclear (VPN), y B, virus de la Granulosis (VG). Otros dos subgrupos han sido propuestos: no ocluidos, virus en forma de varilla y virus ocluidos con un genoma de DNA polidiserso (Tanada y Hess, 1984).

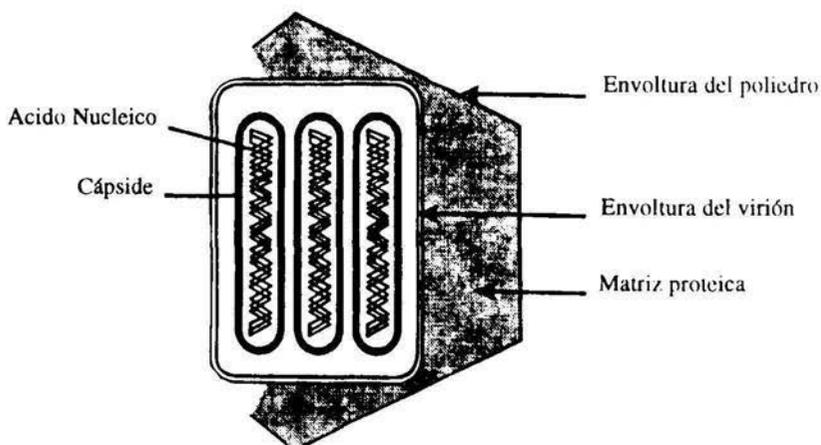


Figura 1. Componentes estructurales de un Baculovirus. Tomado de Blissard y Rohrmann, 1990.

#### 3.2.4. Características del VPN

El virus de la poliedrosis nuclear, presenta viriones embebidos en una matriz cristalina de naturaleza proteica denominada poliedrina o cuerpo de inclusión de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los nucleocápsides del virus de la poliedrosis nuclear de *Trichoplusia ni* (VPNTn) consiste de 12 proteínas (Young y Lovell, 1973). La configuración de los viriones difiere en que, los nucleocápsides pueden estar envueltos en forma sencilla ó multiple, denominandose virus de la poliedrosis nuclear múltiple (VPNM) ó virus de la poliedrosis nuclear sencilla (VPNS) (Tanada y Hess, 1984).

#### 3.2.5. Vías de entrada

La via de infección de los Baculovirus es de importancia fundamental en el entendimiento de la interacción virus - hospedero. El conocimiento de los mecanismos de infección pueden revelar los síntomas principales del hospedero, la susceptibilidad o resistencia al virus.

La vía más común de infección con el virus de la poliedrosis nuclear es por ingestión, sin embargo también puede transmitirse trasoval y transováricamente, a través de espiráculos y por medio de parásitos sin embargo, estos mecanismos no se consideran importantes por su baja frecuencia (Granados y Federici, 1986).

### **3.2.6. Barreras contra la infección**

Antes de que se inicie la infección de las células epiteliales columnares del mesenteron, los viriones deben atravesar la membrana peritrófica (MP). La MP sirve en los insectos como una barrera mecánica a la invasión por microorganismos. Derksen y Granados (1988), estudiaron la alteración de la MP debida a la infección de VPnMAc, VPnSTn y VGTn, dichos autores observaron que existe una interacción específica entre el baculovirus y la MP y el grado de susceptibilidad de las larvas de *T.ni*, a los 15 min de la postinoculación de VPnMAc ó VPnSTn, desaparece una glicoproteína A 68 KDa de la MP, y en larvas inoculadas con VGTn desaparecen 3 glicoproteínas de 253, 194 y 123 KDa. Los bioensayos en larvas de *T.ni* muestran que existe un factor presente en la granulina ó poliedrina, que aumenta la infectividad. Esto indica también un factor presente en los cuerpos de inclusión en los tres baculovirus, que pueden causar cambios bioquímicos y estructurales en la MP.

### **3.2.7. Modo de infección del virus de la poliedrosis nuclear**

Después de la ingestión de los poliedros, estos son disueltos en el lumen del intestino medio a través de la acción del jugo digestivo alcalino, pH 9.5 a 11.5 y posiblemente por la degradación enzimática, Pritchett et al. (1984), reportan que al adicionar tripsina y chymotripsina al buffer de carbonato de sodio 0.1 M-NaCl 0.1 M, a un pH de 9 a 11 no afectó la disolución de VPnMAc. Sin embargo, la adición de la proteasa bacteriana (*Streptomyces griseus*) a pH de 9.5 resultó en la disolución de los poliedros de manera similar como ocurre con los fluidos digestivos del intestino medio.

Los viriones embebidos en el poliedro son liberados, las células columnares son invadidas por las nucleocápsides. Las cubiertas de los viriones se fusionan a las microvellosidades de las células. La adhesión parece ser dependiente de los fosfolípidos y las cargas iónicas de la cubierta de los virus (Tanada y Hess, 1984).

Las nucleocápsides entran en las microvellosidades a través de una abertura, la absorción, fusión y entrada del virus se lleva a cabo dentro de 0.25 a 4 hrs postinfección. El movimiento en las microvellosidades al interior del citoplasma aparentemente sigue un gradiente. Las nucleocápsides llegan a adherirse a un nucleoporo dentro de 1 hr y el ácido nucleico (DNA) es descargado dentro de los núcleos. Posterior a estos eventos se inicia el periodo de eclipse la replicación del virus (Fig. 3), y este termina con la aparición del estroma virogénico al producir las nucleocápsides. Las nucleocápsides son envueltas por una membrana producida por síntesis *de novo* en el núcleo. En un estado temprano de formación algunas nucleocápsides, pasan a través de los nucleoporos, otras en forma de yemas a través de la cubierta nuclear. Los viriones al atravesar la membrana basal adquieren unas estructuras en forma de espinas denominadas peplómeros (Fig. 2). Estas formas inician nuevos ciclos de infección en las células susceptibles (Tanada y Hess, 1984).

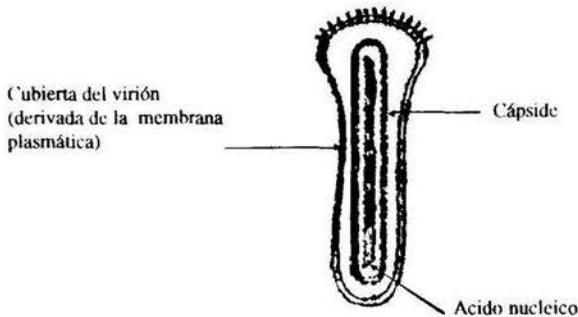


Figura 2 Componentes estructurales de un peplómero. Tomado de Blissard y Rohrmann, 1990.

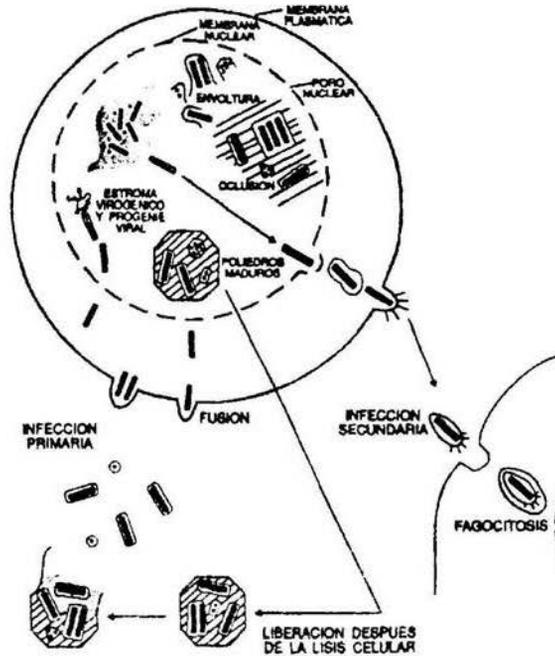


Figura 3. Ciclo de replicación del virus de la poliedrosis nuclear según Blissard y Rohrmann, 1990.

### 3.2.8. Signos y síntomas

Los signos y síntomas de la enfermedad causada por Baculovirus no son aparentes en el momento de la ingestión sino después de algunos días. Uno de los primeros signos de la infección viral lo constituye el cambio que sufre la hemolinfa por la reducción en la concentración de proteínas. En algunos Lepidópteros esto es seguido por una pérdida de apetito y después cesan de alimentarse presentando inactividad general; los insectos infectados llegan a ser flácidos, los tejidos del cuerpo se desintegran, y la cutícula se vuelve frágil rompiéndose y liberando los poliedros. Los Lepidópteros mueren adheridos de las propatas a ramas u hojas (Granados y Federici, 1986) El tiempo requerido para que ocurra la muerte del insecto depende de las especies, pero este tiempo generalmente es de 3 a 7 días y puede ser de 3 a 4 semanas dependiendo de las interacciones entre el virus, el insecto y la planta (Starnes, 1993)

### 3.2.9. Susceptibilidad

Los baculovirus producen infecciones crónicas o letales en sus hospederos, las pupas y los

adultos de algunas especies pueden ser infectados pero, se considera que el estado larval es el más susceptible (Payne, 1982). La susceptibilidad de *Trichoplusia ni* hacia diversas cepas de baculovirus es ampliamente conocida (López e Ibarra, 1991) Ignoffo y Garcia (1969), determinan la susceptibilidad de *Trichoplusia ni* al virus de la poliedrosis nuclear, mencionan que el virus de *T. ni* es más activo que el virus de otros noctuidos. El porcentaje de mortalidad es variable dependiendo de la dosis y tiempo de exposición.

En un estudio sobre la susceptibilidad de las pupas de *Trichoplusia ni* al virus de la poliedrosis nuclear, Vail y Hall (1969) reportan que las pupas del falso medidor de la col fueron susceptibles al VPN, la respuesta depende del estado pupal pero el sexo no es un factor determinante. Sin embargo, las palomillas que emergieron de las pupas infectadas con virus fueron frecuentemente deformes, y muchas carecían de pigmentación oscura característica de los adultos normales, además presentan una baja longevidad, bajo apareamiento, baja fertilidad y oviposición de huevecillos.

Estos mismos autores, estudiaron la influencia de la infección del VPN en adultos y en la progenie de *Trichoplusia ni*, observaron que la longevidad y oviposición de los adultos no fue afectada, estudios histológicos mostraron núcleos de células traqueales infectados pero raramente cuerpo graso, hipodermis y otros tejidos. La viabilidad de los huevecillos fue significativamente reducida (10%). Una palomilla hembra de un día de edad fue inoculada con el virus, pero el efecto decreció con la dilución, también fue menor el efecto cuando se inoculó una palomilla hembra de mayor edad. El examen de los huevecillos afectados mostraron que el desarrollo embrionario había comenzado, no se observó la transmisión transovarial. La progenie de las palomillas alimentadas con poliedros, frecuentemente infectaban los huevecillos pero esterilizando la superficie de estos pueden eliminarse los poliedros.

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

Entre las características que debe cumplir todo entomopatógeno para su uso efectivo en programas de manejo integrado de plagas, se pueden mencionar: su comportamiento en campo

(transmisión, dispersión, persistencia), la especificidad (rango de hospederos), su agresividad (patogenicidad y virulencia) y su producción masiva (Roberts et al., 1991).

### 3.2.10.1. Transmisión

Los baculovirus se diseminan en las poblaciones de insectos tanto en forma vertical (de generación a generación), como horizontal (de un hospedero susceptible a otro), así como por agentes bióticos y abióticos (Kathleen y Elkinton, 1989).

Murray y Elkinton (1989), consideran la transmisión transovum es decir la contaminación directa de la superficie del huevo como la más importante para transmitir el VPN de una generación a otra. La transmisión de baculovirus por insectos adultos, constituyen un medio efectivo para su transmisión, sin embargo la dispersión del virus aplicado al follaje de las plantas es más efectivo, que la diseminación por adultos de *Trichoplusia ni* contaminados con VPNT<sub>1</sub> (Elmore y Howland, 1964).

Young y Yearian (1988), estudiaron la transmisión secundaria del virus de la poliedrosis nuclear de *Pseudoplusia includens*, y *Anticarsia gemmatilis*. En ambas especies la transmisión secundaria esta relacionada directamente al estado de la enfermedad en las larvas infectadas primariamente, el tiempo de exposición y tamaño larval; sin embargo, el efecto de la transmisión secundaria difiere en las especies de insectos.

### 3.2.10.2. Persistencia

Mientras que el insecto hospedero continúa su crecimiento, la infección viral se sigue extendiendo, además de que puede permanecer a través de generaciones, esta característica es importante ya que persiste a través del tiempo. Existen evidencias de infecciones latentes, Kislev et al. (1971) al caracterizar el DNA del virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera littoralis* y de su hospedero, detectaron DNA viral en larvas donde no fué inoculado, sugiriendo infección latente, lo cual es una alternativa para combatir la plaga en el campo.

Las infecciones virales latentes definidas como "aquellos fenómenos donde se infecta un organismo con un virus pero que no muestran los signos de la infección" (Smith, 1967 citado por Metcalf y Luckmann, 1990), ocurre frecuentemente en los insectos. Existen varios ejemplos de infecciones latentes causadas por virus en los insectos. Sin embargo, se conoce poco sobre las condiciones que determinan si una infección viral es latente o virulenta. Se cree que las infecciones latentes se presentan cuando la dosis inicial de virus es muy pequeña, si la dosis se recibe durante una etapa tardía del desarrollo de la larva o en ambos casos. Varios factores pueden hacer que estas infecciones latentes se conviertan en infecciones activas virulentas que afectan la población de insectos hospederos. Steinhaus (1963), llamó a todos esos factores "factores de estrés", que incluyen temperaturas extremas, sustancias químicas tóxicas, calidad de los alimentos y otras enfermedades.

Los VPNs de *Trichoplusia ni* pueden soportar condiciones desfavorables de almacenamiento, Jaques y Huston (1969), demostraron que los VPN-Tni pueden almacenarse tanto en suspensiones acuosas como en el suelo, presumiblemente los poliedros se encuentran intactos, esto indica un alto grado de resistencia de la proteína poliedral a la descomposición por acción microbiana. Los VPNs pueden ser almacenados a 4°C por períodos considerables; y pueden conservar su infectividad (Ignoffo y McIntosh, 1988).

En campo el virus de la poliedrosis nuclear de *T. ni* persiste en el follaje de las hojas de col, al monitorear parcelas tratadas con VPNTn, se asoció la acumulación de altas concentraciones de virus, con el desarrollo de epizootias (Jaques, 1974). Biever y Hostetter (1985), reportan que la actividad del virus localizado en el envés de las hojas fue más alta (50% de mortalidad de las larvas probadas después de 3 semanas), comparado con la actividad del virus presente en la superficie de las hojas (13% de mortalidad después de 5 días). Es importante considerar la localización del virus en las plantas y el comportamiento de alimentación del insecto.

### 3.2.10.3. Rango de hospederos

En los estudios de la crusa infectiva de los VPNs se ha observado que tienen la capacidad de afectar a otras especies de insectos, diferentes a su hospedero natural. La infectividad de muchos VPNs son limitados a miembros del Género o Familia del hospedero original. Por ejemplo, *Anticarsia gemmatalis* (Lep.:Noctuidae), *Autographa californica* (Lep. Noctuidae) presentan como hospedero alternante a *Trichoplusia ni* (Lep.:Noctuidae) El VPN de *Autographa californica* infecta 12 Familias, Noctuidae, Arctiidae, Gelechiidae, Geometridae, Lasiocampidae, Lymantriidae, Lyonetiidae, Notodontidae, Plutellidae, Pyralidae, Saturniidae, y Tortricidae (Granados y Federici, 1986).

Sheepens y Wysoki (1989) al realizar pruebas de patogenicidad con VPNMAc contra cinco especies de lepidópteros, observan diferencias en susceptibilidad: *Heliothis peltigera* y *Heliothis armigera* (Noctuidae) fueron muy susceptibles, *Boarmia selenaria* (Geometridae) y *Ephestia cautella* (Pyralidae) pocos fueron infectados, y *Spodoptera littoralis* (Noctuidae) no fue susceptible.

La infectividad reciproca de VPNM (embebido en forma múltiple) de *Autographa californica* y VPNS (embebido en forma simple) de *Trichoplusia ni*, muestra que el VPN de *A. californica* es bastante patógeno para ambas especies ya que presenta un amplio rango de hospederos, mientras que el VPN de *T.ni* parece ser más patógeno a *T.ni*. La diferencia en infectividad puede ser resultado del número de viriones contenidos en los dos tipos de poliedros. El VPNSAc tiene un limitado rango de hospederos comparado con el VPNMtN (Granados y Federici, 1986) Entonces, si la infectividad de un virus fue igual o superior a los otros virus en ambos hospederos, esto puede ser necesario a propagar y estandarizar solo un virus para el control de varias especies (Vail et al., 1971; Van Beek et al., 1988, McIntosh e Ignoffo, 1989)

En estudios de la patología del VPNAc en *T.ni*, *Spodoptera exigua*, *Estigmene acrea*, *Heliothis zea*, *Bucculatrix thurberiella* y *Plutella xylostella*, Vail y Jay (1973), observaron que en todos estos hospederos fue infectada la hipodermis, tráquea, cuerpo graso, tubulos de

Malpigio, músculo, hemocitos, ganglio, intestino medio y posterior. Los síntomas externos fueron típicos de VPN en todas las especies.

Evaluaciones en campo de VPNM-Tni y VPNS-Tni, se reporta que estos tienen diferentes respuestas según la especie de insecto. Por ejemplo, suspensiones donde predomina VPNM-Tni son infectivas en altas dosis contra larvas de *Ceramica picta* mientras que VPNS-Tni no causa mortalidad. Así mismo se tiene semejante respuesta con *Heliothis zea*. El VPNS-Tni es considerado el VPN específico para *T. ni* ya que no es infectivo para *Ceramica picta* y *Heliothis zea*, mientras que el VPNM-Tni no tiene un rango tan específico (Splittstoesser y McEven, 1971).

Tompkins et al. (1969), muestran la cruza infectiva de dos virus diferentes morfológicamente de VPN-Tni en larvas de *Trichoplusia ni* y *Heliothis zea*. El VPNM se encontró en células del cuerpo graso, hipodermis, tráquea, tejido conectivo y epitelio del intestino medio y algunos hemocitos; el VPNS estuvo presente en algunos tejidos pero no en el epitelio del intestino medio. El VPNM-Tni cuando fue transmitido a *Heliothis zea*, se encuentra en el núcleo de células de la hipodermis, tráquea y frecuentemente del epitelio del intestino medio y raramente en el cuerpo graso.

Stairs (1989), estudió los efectos del virus de la poliedrosis nuclear de *Malacosoma disstria* en el crecimiento larval de *Lymantria dispar*, el porcentaje de mortalidad fue bajo, y al examinar larvas infectadas y eventualmente recuperadas, la presencia de poliedros fue alta pero no letal, aunque el VPN pareció ser infeccioso no causó enfermedad.

#### **3.2.10.4. Producción masiva de Baculovirus y Equivalente larval**

Debido a que los virus de Artrópodos son un grupo de patógenos obligados, específicos de especies de insectos, uno de los requisitos para que sean utilizados como pesticidas microbiales, es producirlos en forma masiva. Entre los métodos que existen para producir virus se encuentra: 1) colección de larvas enfermas en campo, 2) inocular insectos en laboratorio, y 3) por medio de

cultivo de tejidos celulares, este método es similar a los procesos de fermentación microbiana (Shieh y Bohmfalk, 1980).

El método más usado es la multiplicación del virus en su insecto hospedero, el cual involucra el mantenimiento de la cría del hospedero incluyendo huevo, larva, pupa y adulto (Shieh y Bohmfalk, 1980). Las larvas pueden ser alimentadas con dieta natural o artificial. Las larvas se seleccionan en un estadio adecuado (determinado experimentalmente) e infectadas con el inoculo viral, el cual se puede obtener de larvas muertas en campo. Después de un tiempo de incubación (dependiendo de la especie hospedera y el tipo viral) las larvas se colectan y posteriormente se extrae el virus (Fig. 4) (Shieh y Bohmfalk, 1980).



Figura 4. Esquema general de la producción de Baculovirus *in vivo*. Tomado de Shieh y Bohmfalk, 1980.

En la producción de baculovirus por medio de cultivos celulares de invertebrados, se han establecido más de 200 líneas celulares de aproximadamente 70 especies de insectos, la mayoría de éstas son de lepidópteros, dípteros, ortópteros, homópteros, hemípteros, coleópteros e himenópteros (Granados et al., 1987).

Una de las ventajas de la utilización de la técnica de cultivo de tejidos es la producción de un producto viral puro, es decir libre de contaminantes microbianos, pero una limitante es el alto costo por la tecnología que se utiliza (Shieh y Bohmfalk, 1980).

Algunos baculovirus son altamente patógenos en insectos y pueden producir suficiente progenie de virus por insectos, para permitir su producción comercial (Miller et al., 1983), para definir el número de larvas necesarias que deberán ser aplicadas por hectárea, es importante conocer el "Equivalente larval" (EL), el cual es una unidad que se define como el número máximo de poliedros que puede producir una larva en un estadio y una dosis dada.

### 3.3. Criterios usados para caracterizar baculovirus

Existen diversos criterios para caracterizar Baculovirus:

Morfológicos.- La morfología se emplea comúnmente como patrón de diagnóstico en insectos infectados, ya que la presencia de cuerpos de inclusión cuyas dimensiones varían de pocos cientos de nm a varios  $\mu\text{m}$ , facilita su observación al microscopio óptico, lo cual permite la fácil diagnosis de los VPNS (Crook y Jarret, 1991); a través de microscopía electrónica de transmisión se diferencia un VPNM de un VPNS (Burgues, 1981).

Propiedades bioquímicas.- El criterio morfológico no es suficiente para la identificación de una nueva cepa de baculovirus, es necesario determinar las propiedades biofísicas como el coeficiente de sedimentación, densidad del virus, de la nucleocápside y del DNA con estas características se puede identificar a un miembro de la Familia Baculoviridae, pero no permite hacer una identificación a niveles taxonómicos más inferiores. Se han estudiado las proteínas estructurales del cuerpo de inclusión y del virión mediante electroforesis, se han analizado los polipéptidos más abundantes y sus propiedades en el poliedro y el virión, así como también se ha realizado el mapeo de péptidos, el análisis de aminoácidos y enzimas asociadas con los virus; Maskel y DiCapua, (1988), comparan la actividad proteolítica de la poliedrina de cuatro diferentes VPNS (*Heliothis armigera*, *Lymantria dispar*, *Pseudoplusia includens*, y *Trichoplusia ni*) en cuatro substratos (gelatina, azoalbumina, succinyl - L - fenilalanina - p - nitroanilide (Suphepa), y alfa - N - benzoyl -

**DL - arginine - p - nitroanilide hydrochloride (DL - BAPA)** Las comparaciones realizadas muestran que probablemente los NPVs son similares, pero es necesario hacer más estudios para determinar si una o más enzimas están presentes y si son endógenas o exógenas para cada uno de esos virus, además está actividad proteolítica puede proveer una correcta manera de distinguir los baculovirus.

**Serología.** - La serología se emplea para confirmar categorías subgenéricas y de grupos dentro de subgéneros. Es importante destacar que se requieren antígenos virales puros, mientras que la especificidad del antisuero depende del propósito de la investigación. Dentro de las técnicas serológicas más empleadas son: la precipitación, inmunodifusión, fijación del complemento, inmunoelectróforesis, hemaglutinación, inhibición de la hemaglutinación, neutralización, tinción con inmunoperoxidasa y anticuerpos fluorescentes, radioinmunoensayo (RIA) y ensayo inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA) (Burgues, 1981).

**Enzimas de restricción.** - Este criterio es importante para identificar y comparar una cepa de baculovirus con otra. Se realiza mediante el análisis del genoma con enzimas ó endonucleasas de restricción. Sin embargo, la limitante de esta técnica es que los resultados son difíciles de examinar, ya que en algunas ocasiones las digestiones son parciales y puede haber un exceso de fragmentos que no representan a los fragmentos reales producto de una buena digestión (Bilimoria, 1986 citado por Del Rincón, 1993).

**Actividad patológica.** - Uno de los procedimientos más empleados para caracterizar a una nueva cepa de baculovirus, es la determinación de los niveles de patogenicidad de dicha cepa contra un hospedero en particular o en grupos de ellos. Una manera de cuantificar la actividad patológica es mediante bioensayos, los cuales miden la potencia de cualquier estímulo físico, biológico, fisiológico o psicológico, mediante la respuesta producida en una materia viviente. Finney define al bioensayo como un método que permite determinar alguna propiedad de un material o substancia en base a la respuesta biológica que producen (Steinhaus y Martigoni, 1970 citado por Del Rincón, 1993).

Generalmente los bioensayos se utilizan para determinar la  $DL_{50}$  ó  $CL_{50}$ , que se define como la dosis o concentración necesaria para matar a la mitad de individuos dentro de una población probada (Busvine, 1971 citado por Vázquez, 1993).

Para encontrar la concentración letal media  $CL_{50}$  de cualquier insecticida microbial contra una especie dada, el primer paso consiste en determinar la dosis mínima cuyo efecto se refleja en una mortalidad del 0% o un valor cercano a este y, la dosis máxima capaz de matar al 100%. A dicho intervalo de respuesta se le conoce como respuesta biológica (RB). Una vez determinada la RB, el siguiente paso consiste en preparar diluciones intermedias para el bioensayo a través del cual obtendremos la línea de respuesta dosis mortalidad y la concentración letal media ( $CL_{50}$ ).

Los métodos que se emplean en los bioensayos para baculovirus son inoculación oral, incorporando el virus a la dieta artificial o por contaminación superficial de la dieta artificial o natural; Ignoffo (1964), desarrollo la técnica de bioensayo para determinar la patogenicidad del virus de la poliedrosis nuclear de *Trichoplusia ni* sobre larvas de *T. ni*. Utilizó una dieta semisintética para la cría y como vehículo para proporcionar el virus a las larvas; esto se realiza debido a que la acción del patógeno es estomacal, aunque también puede transmitirse por contacto. El desarrollo de la cría en dieta artificial ha sido una herramienta valiosa, para probar baculovirus (Magnoler, 1974), aunque es importante considerar los ingredientes de la dieta artificial, ya que estos pueden variar la susceptibilidad de las larvas al VPN (Keating et al., 1989).

### 3.4. Importancia de los Baculovirus.

#### 3.4.1. Control de Plagas.

El uso de Baculovirus para el control de plagas ha dado resultados exitosos como por ejemplo en Colombia el VPNTn, ha sido usado en gran escala contra larvas de *Trichoplusia ni* en algodón, fue efectivo al remplazar todos los otros métodos de control y el insecto dejó de ser una de las principales plagas (Crook y Jarrett, 1991).

Richter y Fuxa (1984), encontraron que el VPN de *Anticarsia gemmatalis* aplicado en campo, fue más efectivo para reducir la población de *Anticarsia gemmatalis* que los insecticidas químicos.

A pesar de lo arriba mencionado existen pocos productos registrados como bioinsecticidas a base de baculovirus Cuadro 1.

Cuadro 1. Bioinsecticidas a base de virus entomopatógenos. Tomado de Del Rincón, 1993.

Producto	Compañía	País
Elcar	Sandoz	E.U.
Gypchek	Serv. Forestal	E.U.
Virin-ENSh	Gobierno	URSS
Virin-EKS	Gobierno	URSS
Virin HS	Gobierno	URSS
Virin-Diprion	Gobierno	URSS
Virin-KSH	Gobierno	URSS
Virin-LS	Gobierno	URSS
Mamestrin	Calliope	Francia
Monisärmid-virus	Kemira Oy	Finlandia
TM-Biocontrol-1	Serv. Forestal	E.U.
Virox	Oxford Virol	Inglaterra
Preserve	Microgenesys	E.U.
Spodoterin	Calliope	Francia
Neocheck S	Serv. Forestal	E.U.
Virtuss	Serv. Forestal	Canadá
Lecontvirus	Serv. Forestal	Canadá
Multigen	Agrogen	Brasil
VPN 80	Agric. El Sol	Guatemala
VPN 82	Agric. El Sol	Guatemala
SAN 404	-----	E.U.

### 3.5. Ventajas del uso de Baculovirus

El uso de virus entomopatógenos constituye una alternativa para controlar plagas insectiles, con las siguientes ventajas: a) son específicos de invertebrados, a pesar de que los baculovirus parecen ser muy complejos en estructura, no presentan propiedades físicas, químicas o biológicas en común con virus de vertebrados (Kathleen, 1981), b) presentan una alta especificidad de hospederos, por lo tanto no dañan parásitos y depredadores, el único efecto es indirecto, c) no contaminan el medio ambiente debido a que no causan problemas residuales, ya que son degradados por los rayos ultravioleta del sol, d) se reproducen exclusivamente en el interior del insecto hospedero, e) no generan resistencia, f) son compatibles con insecticidas químicos, es decir, su aplicación puede ser exitosa mezclando insecticidas químicos y microbiales, y g) se pueden aplicar con la misma tecnología que para los insecticidas químicos.

### 3.6. Limitaciones en el uso de Baculovirus

Los baculovirus presentan algunas características que restringen su uso como agentes de control, por ejemplo: a) su alta especificidad aun cuando es una ventaja se considera una desventaja ya que su rango específico de hospederos limita su uso en cultivos que presentan un complejo de plagas, además de que las compañías productoras prefieren comercializar productos de amplio espectro de acción (Payne, 1982), b) el hecho de que los baculovirus son efectivos solamente en los estadios larvales de los insectos, c) al presentar parasitismo obligado necesitan su producción en células vivas, además requieren tiempo para su desarrollo y para matar o debilitar a su insecto hospedero, lo cual implica alto costo y lenta acción. Entre las alternativas que existen actualmente para solucionar estos inconvenientes, está el uso de cultivo de tejidos celulares de insectos y la Ingeniería Genética, d) la persistencia es también un factor limitante ya que el virus es rápidamente inactivado por la luz ultravioleta sin embargo, este problema ha sido resuelto mediante la técnica de encapsulación en almidón, Ignoffo et al. (1991), determinaron la estabilidad a la luz ultravioleta del VPN de *Heliothis zea* encapsulado, y e) existen algunos problemas para registrar y patentar productos a base de baculovirus (Wood y Granados, 1991).

### 3.7. Compatibilidad de VPN con insecticidas

Los virus son más estables en el ambiente, además los productos comerciales tienen una larga vida, y son compatibles con formulaciones de otros agroquímicos (Miller et al., 1983)

Estudios en laboratorio y en campo, demuestran la eficacia de las mezclas de permetrina y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, y VPNAc, contra larvas de *T.ni*. La aplicación en mezclas de insecticidas químicos y microbiales protegen al cultivo. Estas pruebas demostraron que la aplicación de este tipo de mezclas es un método factible para reducir la cantidad de insecticidas químicos (Jaques, 1977; Jaques, 1988 y Jaques et al. 1989).

### 3.8. Avances en el uso futuro de Baculovirus

El conocimiento de la Biología Molecular y Genética de los baculovirus ha incrementado considerablemente en los últimos años. El potencial de la biotecnología ha tenido un gran impacto ya que ofrece nuevas técnicas y estrategias de control de plagas, a través de Ingeniería Genética las propiedades insecticidas y el rango de hospedero pueden ser mejoradas, esto se puede hacer cambiando el material genético entre baculovirus o por inserción de genes extraños dentro del genoma viral (Maeda et al., 1991; Maramorosch, 1991). Por otro lado la genética y bases moleculares de la patogénesis de los baculovirus en larvas de insectos son importantes para el entendimiento de los factores implicados en el modo de acción de esos virus, y con esto facilitar la Ingeniería Genética (Wood y Granados, 1991)

#### 4. MATERIALES Y METODOS

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Patología de Insectos del Centro de Entomología y Acarología del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México.

Sea cual sea el entomopatógeno que se pretenda utilizar, es necesario hacer varias pruebas del mismo contra el insecto que se quiere controlar. De este modo, se hace necesario un número considerable de insectos, lo cual se puede realizar a través de su cría y mantenimiento en laboratorio, y de no ser posible a través de la colecta en campo.

##### 4.1 Cría de *Trichoplusia ni*

El material para obtener el pie de cría de *Trichoplusia ni*, fué proporcionado por el laboratorio de Bioinsecticidas del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato.

La cría de *Trichoplusia ni* se estableció en una cámara con una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 70%. La limpieza y mantenimiento fueron seguidas como lo menciona Martínez et al. (1988).

Las pupas se colocaron en bolsas de papel de estrasa del número 8 para su emergencia, en la cual se colocó una proporción de dos machos por una hembra para garantizar su fecundación. Aproximadamente 8 días después de que emergen los adultos, dentro de la bolsa se colocó media caja petri con algodón humedecido con solución de azúcar (no refinada) al 10%, para su alimentación, ésta se cambió diariamente.

Cuando se presentaron las primeras oviposuras sobre las paredes de la bolsa entre 3 y 4 días, los adultos se cambiaron a otra bolsa de papel. Las bolsas con oviposuras se recortaron en pequeños trozos, éstos se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex) al 0.05% durante 15 min, después se enjuagaron con agua destilada durante 10 min, los trozos de

papel ya secos se colocaron en recipientes de plástico para gelatina de 8 cm de diámetro por 6 cm de altura con dieta artificial (Apéndice A), se esperó 3 ó 4 días a la eclosión de los huevecillos. Todo este procedimiento se siguió hasta la muerte de los adultos, durante aproximadamente 20 días.

De manera rutinaria se siguió con el mantenimiento de la cría, alimentando las larvas con dieta artificial, seleccionando larvas del instar adecuado, para las pruebas a realizar manteniendo un pie de cría.

#### **4.2. Propagación del virus de la poliedrosis nuclear (VPN)**

En la propagación del virus se utilizaron larvas de cuarto instar temprano, de aproximadamente 52.1 mg, se colocaron en cajas de plástico de 18 cm de diámetro por 7 cm de altura. Las larvas se alimentaron con hojas de col inoculadas con virus, después se siguieron alimentando con hojas de col sin virus. Las larvas enfermas fueron colectadas aproximadamente a los cuatro días después de infectadas depositandolas en un frasco con agua destilada, que se mantuvo a 4°C. Esto se llevó a cabo para la propagación masiva y para la activación del VPNTn, VPNAg y VPNAc.

##### **4.2.1. Cálculo del equivalente larval (EL)**

Para determinar el EL se plaqueó 0.1 ml de cada uno de los virus a una concentración del 1% (VPNTn  $6.2 \times 10^8$  poliedros/ml, VPNAg  $6.6 \times 10^8$  poliedros/ml y VPNAc  $6.8 \times 10^8$  poliedros/ml), en cajas petri con dieta artificial, se colocó una rejilla de plástico para separar las larvas de cuarto instar temprano. Las larvas muertas fueron colectadas aproximadamente al cuarto día en un frasco con agua destilada y se mantuvieron a 4°C. Se colectaron 20 larvas al azar tratadas con cada uno de los virus, con la finalidad de extraer y determinar los poliedros producidos por larva.

### 4.3. Extracción de virus entomopatógenos

La extracción de los poliedros se realizó siguiendo el método sugerido por Granados y Lawler, (1981) (con algunas modificaciones). La técnica utilizada fue la siguiente: Las larvas muertas por virus, fueron almacenadas durante 20 días para su desintegración por maceración. Las larvas infectadas fueron maceradas en un mortero de mano con agua destilada, y el producto resultante fué filtrado a través de 4 capas de pañalina, la suspensión obtenida se centrifugó durante 15 min a 500 rpm, se desechó la pastilla, el sobrenadante se centrifugó 20 min a 4500 rpm, se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en una solución buffer (Tris-HCl 0.001M + Ac. ascórbico 0.01M + NaCl 0.5 M pH 7.5) agitándose regularmente por 30 min a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó 20 min a 4500 rpm, se desecho el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con agua destilada, se centrifugó 20 min a 4500 rpm, este último paso se repitió tres veces. Por último la pastilla se resuspendió en agua destilada, la suspensión final se almacenó a 4°C en frascos ambar de 50 ml.

### 4.4. Bioensayo

#### 4.4.1. Determinación de la $CL_{50}$

Para determinar la  $CL_{50}$  se siguió el método de bioensayo, se utilizaron diluciones apartir de una suspensión de virus concentrado, para determinar la concentración mínima cuyo efecto se reflejó en una mortalidad del 0% o un valor cercano a este y la concentración máxima capaz de matar al 100%; y así encontrar el intervalo de respuesta biológica (RB). Se experimentó con las siguientes concentraciones: 1.0%, 0.1%, 0.01%, 0.001%, 0.0001% y 0.00001%, en caso de no encontrarse en éstas concentraciones el 0 y 100%, se añadieron concentraciones superiores o inferiores según fuera el caso.

A cada dilución se le agregó adherente dispersante (Tritón-X) al 0.01% con el fin de obtener una mejor homogenización de los poliedros en suspensión, además de una mejor adherencia y dispersión de las gotas sobre los discos de col, utilizadas para la alimentación de las larvas.

#### 4.4.2. Conteo de Poliedros/ml

Para el cálculo de los poliedros por ml se llevaron a cabo conteos de las diluciones preparadas a partir de la suspensión de virus concentrado en el Hematocitómetro, con el microscopio compuesto (40 X). Para el cálculo del número de poliedros se consideraron únicamente cinco cuadros del milímetro central: los cuatro de las esquinas y el centro.

La solución a cuantificar se mantuvo en agitación constante en una plancha magnética, cuando menos 15 min, se esperó de 3 a 5 min para realizar el conteo (para que se sedimenten los poliedros), se hicieron de 5 a 10 conteos (dependiendo de la homogeneidad de los datos), se calculó el número de poliedros presentes en las diferentes concentraciones de virus utilizadas en el bioensayo por ml, aplicando la siguiente fórmula: (Lipa y Slizynski, 1973).

$$\text{No. de poliedros/ml} = \frac{\text{Poliedros contados} \times 4 \times 10^6 \times \text{FD}}{80}$$

FD = Factor dilución

#### 4.4.3. Método de Bioensayo

Se llevó a cabo la técnica de bioensayo de residuos en las hojas (Tabashnik y Cushing, 1987 citado por Díaz, 1992).

- 1) Se seleccionaron larvas de *Trichoplusia ni* de tercer instar temprano, de aproximadamente 12.81 mg.
- 2) De hojas de col previamente lavadas con detergente y agua corriente se recortaron discos de 8 mm de diámetro, cortados con un sacabocados del número 5, tamaño óptimo para ser ingerido por las larvas de tercer instar en un período de 24 hrs, y así asegurar que la cantidad de poliedros por disco fuera consumido por la larva.

- 3) Las soluciones preparadas a partir de la suspensión de virus concentrado se mantuvieron en una agitación constante en una plancha magnética durante 10 min previos a su utilización.
- 4) Cada disco se sumergió en la solución de virus durante tres segundos, se dejó secar en una parrilla a temperatura ambiente.
- 5) Una vez que el excedente se evaporó, los discos se introdujeron en vasos de plástico de 3.5 cm de diámetro por 3.5 cm de altura en forma individual, en los cuales se colocó una mota de algodón humedecido para evitar la deshidratación del disco de col.
- 6) En cada vaso se colocó una larva, después se acomodaron en contenedores de cartón y se mantuvieron en la cámara de cría, con una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 70%.

En cada una de las concentraciones preparadas a partir de la suspensión madre se trataron 20 larvas, realizando 3 repeticiones por separado.

Se siguieron alimentando las larvas con círculos de hojas de col, las hojas fueron previamente esterilizadas, lavadas con agua y detergente, después se mantuvieron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex) al 10% durante 15 min, posteriormente se enjuagaron con agua corriente.

Una vez determinados los rangos de RB, el siguiente paso consistió en determinar las diluciones intermedias para obtener la  $CL_{50}$ , las concentraciones intermedias se obtuvieron al graficar en papel probit la mortalidad resultante en cada una de las concentraciones probadas, después se trazó una línea recta "a ojo" que pasara por la mayoría de los puntos. Se dividió en forma equidistante la línea que atravesó cada una de las concentraciones, y se trazaron líneas dirigidas hacia el eje de las abscisas determinandose los puntos que corresponden a las concentraciones intermedias que se utilizaron en el bioensayo.

#### 4.4.4. Tiempo letal medio $TL_{50}$

El tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) se registró al mismo tiempo que los bioensayos, por lo que se evaluó el efecto del virus (mortalidad) sobre las larvas a las 48 hrs, se continuó cada 24 hrs, por espacio de 10 días.

Este mismo procedimiento se siguió para realizar las pruebas de patogenicidad de los diferentes virus de la poliedrosis nuclear de *Trichoplusia ni*, *Autographa californica*, *Anticarsia gemmatalis*, en larvas de *Trichoplusia ni*.

Los resultados se analizaron mediante el programa de cómputo Análisis Pc-Probit. Este programa sirve para estimar la  $CL_{50}$  (concentración letal media) y  $TL_{50}$  (tiempo letal medio), mediante la transformación de los datos de mortalidad a unidades probabilísticas. En todos los casos en que se realizaron bioensayos, se colocó un testigo negativo, el cual solo se bañó con la solución de Tritón-agua, colocando un mínimo de 20 larvas del tercer estadio.

Los requisitos que se tomaron en cuenta para considerar un bioensayo como válido fueron como lo mencionan Ibarra y Federici, (1987), que son los siguientes:

- Mortalidad menor del 10% (medida en el testigo).
- Valor de la pendiente entre 1.5 y 6.
- Valor de la ji-cuadrada menor de 5.
- Cociente entre los límites fiduciales superior e inferior no debe ser mayor de 2.
- Al menos 4 de los valores de mortalidad deben de estar entre 10 y 90% (distribución de mortalidad).

- El valor de la  $CL_{50}$  debe estar ubicado entre la segunda y la quinta dosis (punto de equilibrio), en un total de 6 dosis.
- Obtener al menos tres repeticiones que cumplan con los requisitos anteriores realizados en días diferentes y con un coeficiente de variación menor del 20%.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. Cría de *Trichoplusia ni*

La cría de *Trichoplusia ni*, se desarrolló en condiciones óptimas a una temperatura de 25°C y una humedad relativa del 70%. Se observó que la emergencia de adultos ocurre a los 8 días, a los 3 y 4 días de emergidos empiezan a ovipositar proceso que se prolonga hasta 8 días. La eclosión de huevecillos ocurre a los 3 y 4 días, el tiempo que tardan en completar su desarrollo del primero al quinto estadio larval es de aproximadamente 20 días. Estas observaciones del ciclo de vida son similares a las reportadas por Santos (1991), quién mantuvo la cría de *Trichoplusia ni* en laboratorio con dieta natural.

Al utilizar dieta natural para la alimentación de las larvas, éstas presentaron un mejor desarrollo comparado con la dieta artificial; sin embargo esta última presenta mayores ventajas ya que se evita la contaminación por patógenos que pueden ser introducidos con las hojas de col, al no realizarse su correcta esterilización.

### 5.2. Propagación del virus

La inoculación de larvas de cuarto instar temprano, aseguró una alta producción de poliedros. Las larvas tratadas con dieta contaminada con tres diferentes virus produjeron diferentes cantidades de poliedros; obteniéndose suspensiones equivalentes a  $2.1 \times 10^{10}$  poliedros/ml para el VPNTn,  $3.3 \times 10^{10}$  poliedros/ml y  $3.4 \times 10^{10}$  poliedros/ml para VPNAg y VPNAc respectivamente.

Las larvas al cuarto día de haber ingerido los virus, mostraron los primeros síntomas de enfermedad, éstas empezaron a perder su color característico, presentando un aspecto blanquecino, debido a la formación de paquetes blancos que corresponden al tejido adiposo hipertrofiado, se volvieron lentas, su integumento se volvió flácido, y en una etapa más desarrollada de la enfermedad la larva tomó un color café oscuro, siendo de consistencia muy frágil.

### 5.3. Equivalente larval (EL)

La determinación del EL, que representa el número de poliedros producidos por cada larva, cuando estas alcanzan su máximo desarrollo, permite además definir el número de larvas necesarias que deberán ser aplicadas por hectárea.

Larvas de *T.ni* de cuarto instar temprano (52.1 mg) infectadas independientemente con una concentración de  $6 \times 10^8$  poliedros/ml de tres virus diferentes, se encontró que la cantidad de poliedros producidos fué muy similar en el caso del VPNTn ( $8.63 \times 10^8$ ) y VPNAg ( $8.29 \times 10^8$ ), valores que fueron superiores a los obtenidos con VPNAc ( $1.10 \times 10^8$ ).

Con el VPNAc, se obtuvo la menor producción de poliedros por larva debido a que estas no alcanzaron a completar su desarrollo lo cual no permitió la máxima producción de cuerpos virales.

## 5.4 BIOENSAYO

### 5.4.1. Concentración letal media ( $CL_{50}$ )

Para determinar la  $CL_{50}$ , el primer paso consistió en encontrar el intervalo de respuesta biológica (RB) (Apéndice D), y a partir de estos valores se determinaron las concentraciones intermedias, superiores ó inferiores.

De acuerdo a los resultados que se obtuvieron se observó que existen diferencias significativas entre los tres VPNs con respecto al porcentaje de mortalidad sobre *T.ni*, así como también entre las concentraciones utilizadas en los tres virus y la mortalidad observada (Cuadro 2). El VPNAg a concentraciones de 0.001% redujo 60% de la población de *T.ni* probada mientras que con el VPNTn y VPNAc a esta concentración se alcanzó un 22.9 y 33.3% de mortalidad respectivamente, a la concentración de 1.0% se observó una mortalidad de 84.8% con VPNTn y se obtuvo el 100% de mortalidad en la población probada con VPNAg y VPNAc.

Cuadro 2. Mortalidad de larvas de *Trichoplusia ni* tratadas con diferentes concentraciones de VPNTn, VPNAg y VPNAc.

VIRUS	Concentración (%)	Concentración (poliedros/ml)	Mortalidad (%)
VPNTn	0.001	$6.2 \times 10^5$	22.9
	0.003	$1.8 \times 10^6$	25.5
	0.01	$6.2 \times 10^6$	26.6
	0.03	$1.8 \times 10^7$	35.5
	0.1	$6.2 \times 10^7$	51.0
	0.2	$1.2 \times 10^8$	61.3
	0.47	$2.9 \times 10^8$	72.5
	1.0	$6.2 \times 10^8$	84.8
VPNAg	0.00001	$6.6 \times 10^3$	23.5
	0.0001	$6.6 \times 10^4$	55.5
	0.001	$6.6 \times 10^5$	61.1
	0.003	$1.9 \times 10^6$	77.7
	0.01	$6.6 \times 10^6$	90.0
	0.1	$6.6 \times 10^7$	95.0
	1.0	$6.6 \times 10^8$	100
VPNAc	0.0001	$6.8 \times 10^4$	14.2
	0.0003	$2.0 \times 10^5$	25.0
	0.001	$6.8 \times 10^5$	33.3
	0.003	$2.0 \times 10^6$	46.6
	0.01	$6.8 \times 10^6$	43.7
	0.03	$2.0 \times 10^7$	75.0
	0.1	$6.8 \times 10^8$	81.2
	0.3	$2.0 \times 10^8$	93.7
	1.0	$6.8 \times 10^8$	100

El análisis Probit de cada bioensayo realizado con VPNTn, VPNAg y VPNAc sobre *T.ni*, se muestran en el Cuadro 3, en el cual se presentan los valores  $CL_{50}$  y  $CL_{95}$ , concentración (%) y Pol/ml, límites fiduciales al 95%, la ecuación de regresión y el valor de ji-cuadrada (la cual refleja el nivel de similitud entre los datos obtenidos del bioensayo y los teóricos).

Cuadro 3. Datos del análisis Probit de los bioensayos con VPNTn, VPNAg y VPNAc contra larvas de *Trichoplusia ni*.

VIRUS	$CL_{50}$	$CL_{95}$	(Pol/ml)	Límites fiduciales (alfa=0.05)	Ecuación de regresión	$\chi^2$
VPNTn	0.02525	5.909	$1.56 \times 10^7$	0.0088-0.0617	$Y = 6.109 + 0.0694X$	1.7
VPNAg	0.00013	0.070	$8.7 \times 10^6$	0.00002-0.0003	$Y = 7.339 + 0.6030X$	1.6
VPNAc	0.00429	0.755	$2.9 \times 10^6$	0.0017-0.0093	$Y = 6.734 + 0.7328X$	3.2

El virus más agresivo contra larvas de *T.ni* fué el VPNAg con una  $CL_{50}$  de  $8.7 \times 10^6$  poliedros/ml, es decir que requiere menor concentración de poliedros por ml para matar el 50% de la población plaga. Seguindo del VPNAc con  $2.9 \times 10^6$  poliedros/ml y por último el VPNTn con  $1.56 \times 10^7$  poliedros/ml.

El VPNTn, VPNAg y VPNAc fueron estadísticamente diferentes ya que sus límites fiduciales no se traslapan. En cuanto a la ji-cuadrada se observó una máxima similitud ya que se obtuvieron valores menores a 5. Las líneas de respuesta dosis-mortalidad de VPNTn, VPNAg y VPNAc muestran una respuesta más homogénea con el VPNAc que se define por el mayor valor de pendiente (0.7328) (Fig. 5).

La comparación de medias de los valores de mortalidad mediante la prueba de Tukey (Alfa=0.05) (Apendice E) indicó diferencias entre la agresividad de VPNTn, comparado con VPNAg y VPNAc. Siendo estadísticamente iguales al VPNAg y VPNAc, sin embargo se recomienda utilizar VPNAg al presentar una menor  $CL_{50}$ .

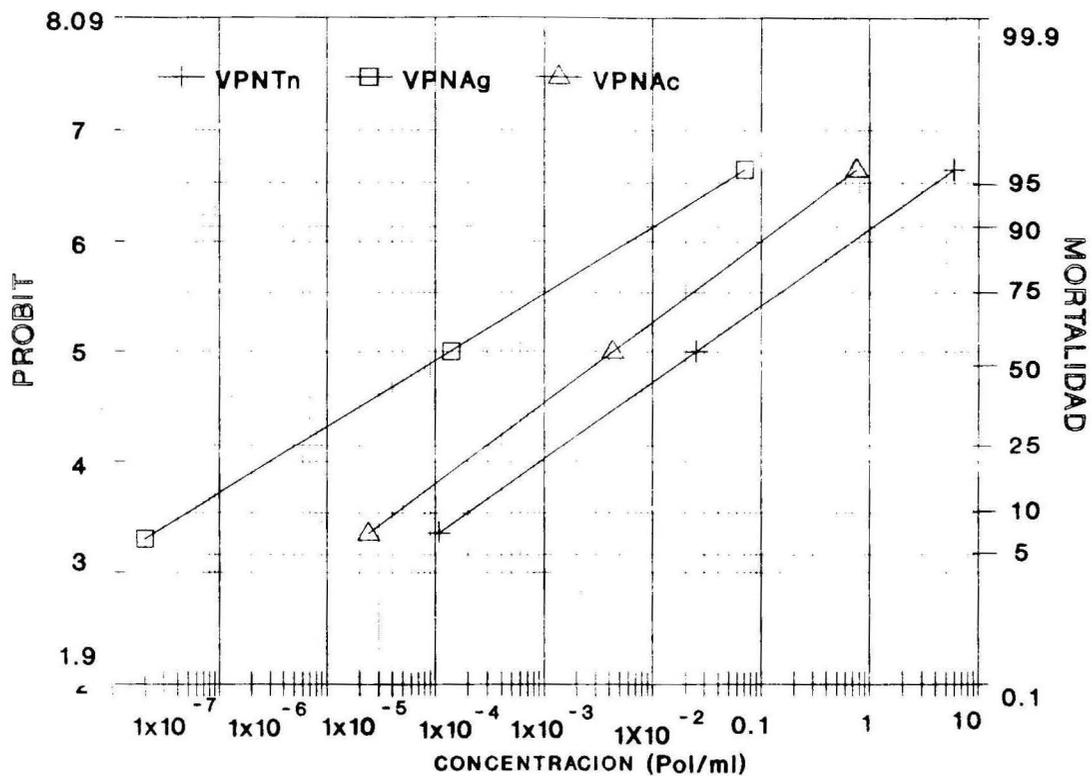


Fig.5. Líneas de respuesta dosis-mortalidad observada con tres virus de la poliedrosis nuclear sobre larvas de *T.ni*.

#### 5.4.2. Mortalidad a diferentes días, después de la exposición al virus de la poliedrosis nuclear

Larvas tratadas con diferentes concentraciones de VPNTn mostraron diferencias en el patrón de respuesta; a bajas concentraciones la mortalidad fué lenta y al final del estudio el número de larvas afectadas fué bajo comparado con los valores de mortalidad que se obtuvieron en las concentraciones más altas. A una concentración de  $6.2 \times 10^8$  la mortalidad se extendió del cuarto al séptimo día, lapso en el que se logró la máxima mortalidad de larvas tratadas (Fig. 6). Sin embargo el pico de mayor mortalidad se notó al quinto día en las diferentes concentraciones utilizadas (Cuadro 4).

Cuadro 4. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de *Trichoplusia ni*, expuestas a cuatro concentraciones diferentes de VPNTn.

Poliedros/ml	No. de larvas muertas a diferentes días después de la exposición al virus.										Total de larvas muertas	Mortalidad (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
$6.2 \times 10^5$	-	1	-	-	7	2	-	2	1	-	13	22.4
$6.2 \times 10^6$	-	-	-	-	7	6	2	5	1	-	21	40.3
$6.2 \times 10^7$	-	2	1	1	15	7	3	6	6	-	41	74.5
$6.2 \times 10^8$	-	3	1	12	20	11	1	4	1	-	53	92.8

Larvas expuestas a diferentes concentraciones del VPNAg manifestaron efectos de la infección viral, se observó baja mortalidad al quinto día con la concentración de  $6.6 \times 10^8$  poliedros/ml, al séptimo día se presentó mortalidad en las cuatro concentraciones utilizadas, y entre el noveno y décimo día se registró la más alta mortalidad (Fig. 7), esto permite inferir que las larvas completan su desarrollo larval, permitiendo una alta producción de poliedros, sin embargo mueren antes de llegar al estado de pupa (Cuadro 5).

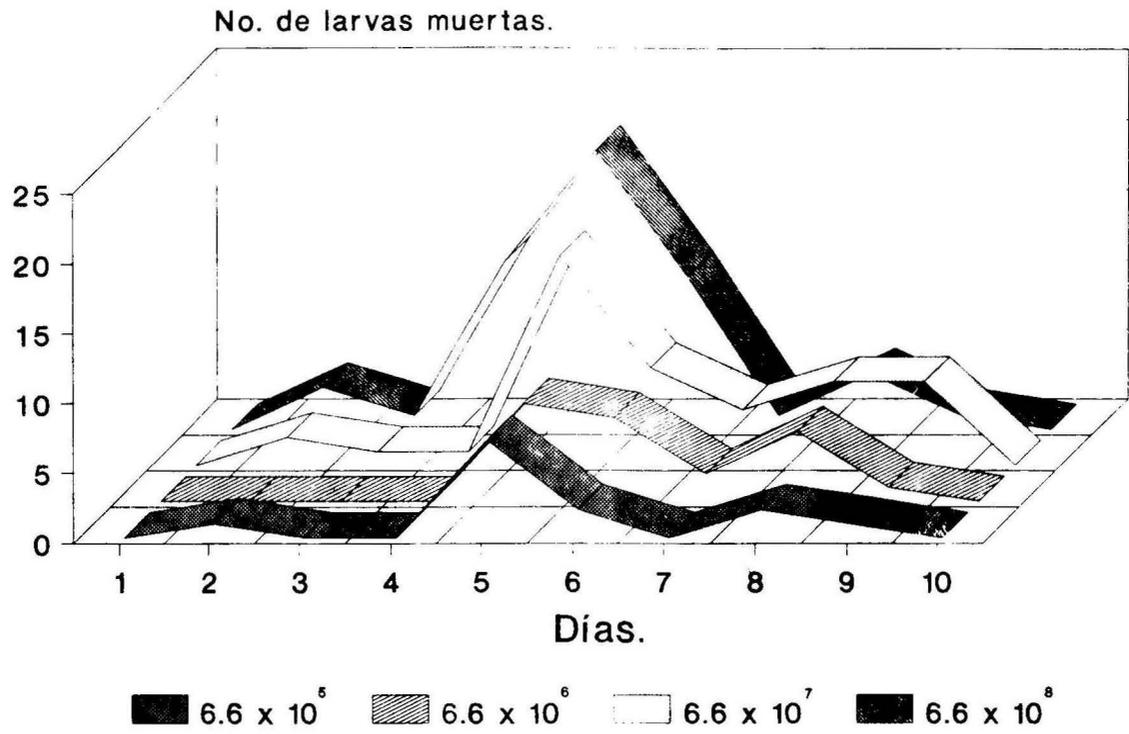


Fig.6. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de *T.ni* expuestas a diferentes concentraciones (pol/ml) de VPNTn.

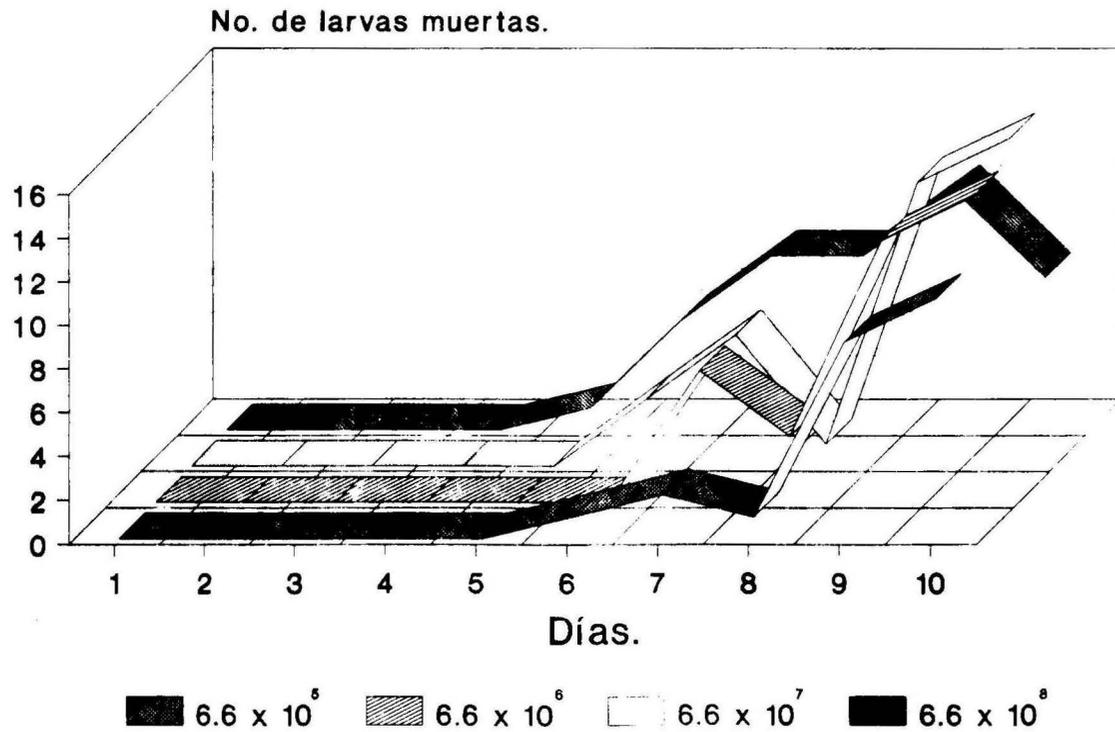


Fig.7. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de *T.ni* expuestas a cuatro concentraciones (pol/ml) de VPNAg.

Cuadro 5. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de *Trichoplusia ni* después de expuestas a diferentes concentraciones de VPNAg.

Poliedros/ml	No. de larvas muertas a diferentes días después de la exposición al virus.										Total de larvas muertas	Mortalidad (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
$6.6 \times 10^5$	-	-	-	-	-	1	2	1	9	11	24	60
$6.6 \times 10^6$	-	-	-	-	-	-	6	3	12	14	35	87.5
$6.6 \times 10^7$	-	-	-	-	-	3	6	1	13	15	38	95
$6.6 \times 10^8$	-	-	-	-	1	5	8	8	11	7	40	100

Larvas de *T.ni* expuestas a altas concentraciones del VPNAc registraron una baja mortalidad al quinto día de ocurrida la infección. La mortalidad más alta se registró al séptimo día en todas las concentraciones (Cuadro 6), sobresaliendo el pico de mortalidad producido con la concentración de  $6.8 \times 10^8$  pol/ml (Fig. 8).

Cuadro 6. No. de larvas muertas de tercer instar temprano de *Trichoplusia ni* después de expuestas a diferentes concentraciones de VPNAc.

Poliedros/ml	No. de larvas muertas a diferentes días después de la exposición al virus.										Total de larvas muertas	Mortalidad (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
$6.8 \times 10^5$	-	-	-	-	-	-	4	7	-	9	20	58.8
$6.8 \times 10^6$	-	-	-	-	-	2	10	7	-	9	28	80
$6.8 \times 10^7$	-	-	-	-	6	3	10	5	-	10	34	100
$6.8 \times 10^8$	-	-	-	-	9	2	15	7	-	2	35	100

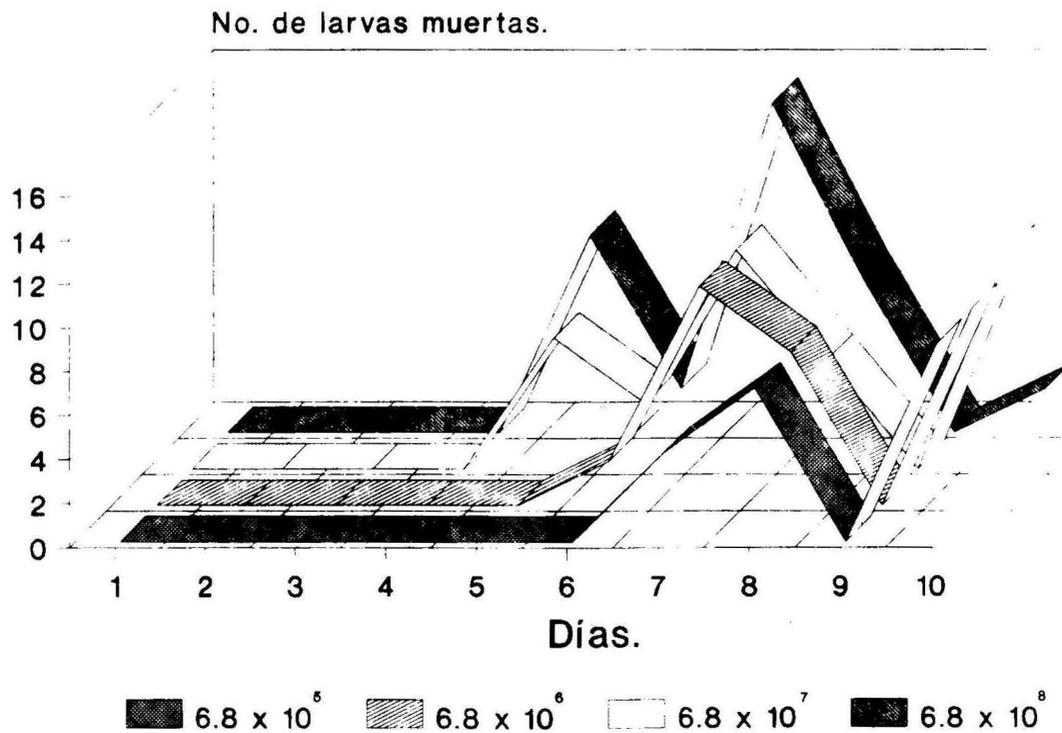


Fig.8. No. de larvas de tercer instar temprano de *T.ni* expuestas a diferentes concentraciones (pqi/ml) de VPNAc.

### 5.4.3. Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>)

Cuando las larvas de tercer instar temprano de *Trichoplusia ni*, fueron expuestas a las diferentes concentraciones de los virus, se observó que con el VPNAc se presentaron los valores más bajos de TL<sub>50</sub> de 3.7 a 1.27, con el VPNTn y VPNAg el tiempo letal medio fué de 18.3 a 4.5 y 5.0 a 2.5 respectivamente (Cuadro 7).

Cuadro 7. Tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de larvas de tercer instar temprano de *Trichoplusia ni* tratadas con diferentes concentraciones de VPNTn, VPNAg y VPNAc.

VIRUS	Poliedros/ml	Mortalidad (%)	TL <sub>50</sub>	Límites fiduciales (alfa=0.05)
VPNTn	6.2X10 <sup>5</sup>	22.4	18.3	13.7-32.2
	6.2X10 <sup>6</sup>	40.3	10.0	9.0-11.6
	6.2X10 <sup>7</sup>	74.5	6.6	6.2-7.1
	6.2X10 <sup>8</sup>	92.8	4.5	4.3-4.8
VPNAg	6.6X10 <sup>5</sup>	60.0	5.0	4.3-6.6
	6.6X10 <sup>6</sup>	87.5	2.5	2.1-2.96
	6.6X10 <sup>7</sup>	95.0	3.2	2.8-3.6
	6.6X10 <sup>8</sup>	100	-	-
VPNAc	6.8X10 <sup>5</sup>	58.8	3.7	2.8-6.5
	6.8X10 <sup>6</sup>	80	2.9	2.5-3.5
	6.8X10 <sup>7</sup>	100	-	-
	6.8X10 <sup>8</sup>	100	1.27	0.6-1.7

De los tres virus probados contra larvas de tercer instar de *T.ni*, se puede concluir que de acuerdo con los valores de la TL<sub>50</sub> el VPNAc mostró mayor agresividad comparado con el

VPNTn y VPNAg (Fig. 9); sin embargo en este caso el grado de pupación de larvas infectadas fué alto, comparable al obtenido con el VPNTn (Cuadro 8). En el caso del VPNAg aún cuando se presentó una  $TL_{50}$  de 5 a 2.5 días, la pupación fué muy baja después del tratamiento, lo cual permite suponer que a las dosis utilizadas el virus es capaz de replicarse permitiendo a la larva hospedera alcanzar su máximo desarrollo, con lo cual el Equivalente larval es muy alto.

Cuadro 8. Número de larvas de *Trichoplusia ni* que puparon días después de la exposición al VPNTn, VPNAg y VPNAc.

VIRUS	Poliedros/ml	No. de larvas tratadas	Días después de la exposición al virus	Pupas	% de pupación
VPNTn	Testigo	49	9	47	95.9
	$6.2 \times 10^5$	58	9	45	77.5
	$6.2 \times 10^6$	52	9	28	53.8
	$6.2 \times 10^7$	55	9	13	23.6
	$6.2 \times 10^8$	56	9	3	5.3
VPNAg	Testigo	40	13	33	82.5
	$6.6 \times 10^5$	40	13	10	25
	$6.6 \times 10^6$	40	13	13	7.5
	$6.6 \times 10^7$	40	13	1	2.5
	$6.6 \times 10^8$	40	13	-	-
VPNAc	Testigo	34	9	31	91.1
	$6.8 \times 10^5$	34	9	30	88.23
	$6.8 \times 10^6$	35	9	21	60
	$6.8 \times 10^7$	34	9	13	38.2
	$6.8 \times 10^8$	35	9	2	5.7

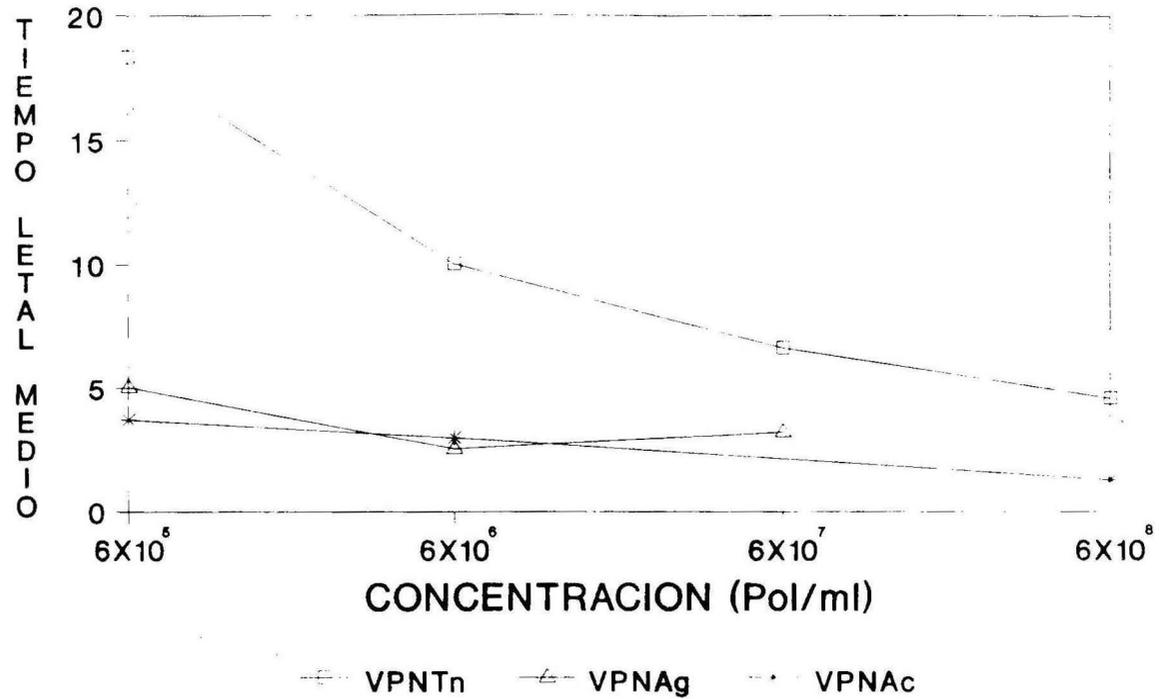


Fig.9. Tiempo letal medio observado en larvas de *T.ni* tratadas con diferentes concentraciones de los tres virus de la poliedrosis nuclear.

Considerando los resultados obtenidos, se demostró además de la patogenicidad de estos virus, su capacidad para causar infecciones cruzadas, o sea la capacidad que tienen de afectar a otras especies diferentes a su hospedero natural. La infectividad en este caso se observó con miembros de la misma Familia Noctuidae. El VPNAg resultó ser más agresivo contra *T.ni*, por lo cual se podría recomendar ser utilizado para el control de *T.ni* y de *Anticarsia gemmatilis* como lo mencionan Vail et al., (1971), Van Beek et al., (1988), y McIntosh e Ignoffo, (1989). Sin embargo considerando las concentraciones utilizadas, las cuales son muy altas, se hace necesario realizar pruebas con otros virus y encontrar virus más patógenos y generalistas, que permitan ser utilizados en el control de complejos de Lepidópteros plaga.

## 6. CONCLUSIONES

-La alimentación de las larvas de *Trichoplusia ni* con dieta artificial, evita la contaminación de la colonia por otros microorganismos patógenos ó contaminantes, el tiempo de atención a la cría se reduce, y el desarrollo de las larvas es similar que con dieta natural.

-Las larvas de cuarto estadio tratadas con dieta contaminada con VPNTn, VPNAg y VPNAc aseguró una alta producción de poliedros. Con el VPNAc se obtuvo la menor producción con  $1.10 \times 10^8$  poliedros/larva, comparado con VPNTn de  $8.63 \times 10^8$  poliedros/larva y VPNAg  $8.29 \times 10^8$  poliedros/larva.

-La mayor mortalidad sobre larvas de *Trichoplusia ni*, para el VPNTn fué al quinto día, siendo más activo que el VPNAg que fue al noveno y décimo día y el VPNAc al séptimo día.

-El virus más agresivo contra *Trichoplusia ni* fué el VPNAg al presentar una  $CL_{50}$  de  $8.7 \times 10^4$  poliedros/ml seguido del VPNAc con  $2.9 \times 10^6$  poliedros/ml y por último el VPNTn con  $1.56 \times 10^7$  poliedros/ml.

-El tiempo letal medio ( $TL_{50}$ ) sobre larvas de *Trichoplusia ni*, con el VPNAc fué de 1.27 días siendo más agresivo que el VPNTn y VPNAg en donde se presento una  $TL_{50}$  de 4.5 y 3.2 días respectivamente.

-Es necesario realizar pruebas con otros virus para encontrar virus más patógenos y generalistas, así como realizar pruebas en campo, para observar si existe el mismo comportamiento que en laboratorio, además de que esto debe ser manejado por el agricultor para comprobar su eficacia.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Allen, M.F. and B.V. Ball. 1992. Virus detection in Aphids (Homoptera: Aphididae) kept in a storage solution for suction trap catches. *J. Invertebr. Pathol.* 53:201-202.
- Biever, K.D. and D.L. Hostetter. 1985. Field persistence of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera:Noctuidae) single-embedded nuclear polyhedrosis virus on cabbage foliage. *Environ. Entomol.* 14(5): 579-581.
- Blissard, G.W. and G.F. Rohrmann. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 1990. 35:127-155.
- Burges, H.D. 1981. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press. London New York. 949 pp.
- Crook, N.E. and P. Jarret. 1991. Viral and bacterial pathogens of insects. *J. Applied Bacteriology Symposium supplement.* 70:91S-96S.
- Del Rincón, C.M.C. 1993. Caracterización de cepas nativas de Baculovirus patógenas al falso medidor de la col *Trichoplusia ni* (Lepidoptera:Noctuidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato, México. 132 págs.
- Derksen, A.C.G. and R.R. Granados. 1988. Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by Baculoviruses and enhancement of viral infectivity. *Virology.* 167:242-250.
- Díaz, G.O. 1992. Susceptibilidad de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Yponomeutidae) insecticidas organosintéticos y microbiales. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados de Chapingo. 100 págs.

- Elmore, J.C. and A.F. Howland. 1964. Natural versus artificial dissemination of nuclear polyhedrosis virus by contaminated adult cabbage loopers. *J. Insect Pathol.* 6:430-438.
- Granados, R.R. and A.K. Lawler. 1981. *In vivo* pathway of *Autographa californica* baculovirus, invasion and infection. *Virology.* 108:279-308.
- Granados, R.R., K.G. Dwyer and A.C.G. Derksen. 1987. Production of viral agents in invertebrate cell cultures. In:K. Maramorosh (ED.). *Biotechnology in Invertebrate Pathology and cell culture.* Academic Press, Inc. San Diego, California. pp. 167-181.
- Granados, R.R. Ph.D. and B.A. Federici, Ph.D. 1986. *The biology of Baculoviruses Vol. I,II.* CRC Press, Inc Boca Raton, Florida 275 pp.
- Hill, D.S. 1983. *Agricultural insect pests of the tropics and their control.* 2a. ed. Ed. Cambridge University Press. Cambridge. 746 pp.
- Ibarra, J.E. and B.A. Federici. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Amer. Mosquito Control Assoc.* 3:187-192.
- Ignoffo, C.M. 1964. Bioassay technique and pathogenicity of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner). *J. Invertebr. Pathol.* 6:237-245.
- Ignoffo, C.M. and A.H. McIntosh. 1988. Low temperature stability of baculovirus virions from tissue culture and from inclusion bodies. *J. Invertebr. Pathol.* 51:304-306.
- Ignoffo, C.M., B.S. Shasha, M. Shapiro. 1991. Sunlight ultraviolet protection of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus through starch - encapsulation technology. *J. Invertebr. Pathol.* 57:134-136.

- Ignoffo, C.M., and C. García. 1969. Relative susceptibility of four noctuids to their respective nucleopolyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 14:282-283.
- Jaques, R.P. 1974. Occurrence and accumulation of viruses of *Trichoplusia ni* in treated field plots. *J. Invertebr. Pathol.* 23:140-152.
- Jaques, R.P. 1977. Field efficacy of viruses infectious to the cabbage looper and imported cabbageworm on late cabbage. *J. Econ. Entomol.* 70(1):111-118.
- Jaques, R.P. 1988. Field tests on control of the imported cabbageworm (Lepidoptera:Pieridae) and the cabbage looper (Lepidoptera:Noctuidae) by mixtures of microbial and chemical insecticides. *Can. Ent.* 120:575-580.
- Jaques, R.P., D.R. Laing, and H.E.L. Maw. 1989. Efficacy of mixtures of microbial insecticides and permethrin against the cabbage looper (Lepidoptera:Noctuidae) and the imported cabbageworm (Lepidoptera:Pieridae). *Can Ent.* 121: 809-820.
- Jaques, R.P. and F. Huston. 1969. Test on microbial decomposition of polyhedra of the nuclear-polyhedrosis virus of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 14:289-290.
- Kathleen, A.T., L.A. Bulla Jr., and R.A. Consigli. 1981. Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses. *Microbiol. Rev.* 45(3):379-408.
- Kathleen, D.M. and J.S. Elkinton. 1989. Environmental contamination of egg masses as a major component of transgenerational transmission of Gypsy moth nuclear polyhedrosis virus(LdMNPV). *J. Invertebr. Pathol.* 53:324-334.

- Keating, S.T., W.J. McCarthy, and W.G. Yendol 1989. Gypsy moth (*Lymantria dispar*) larval susceptibility to a baculovirus affect by selected nutrients, hydrogen ions (pH, and plant allelochemicals in artificial diets. *J. Invertebr. Pathol.* 54:165-174.
- Kislev, N.M. Edelman, and I. Harpaz. 1971. Nuclear polyhedrosis viral DNA:Characterization and comparison to host DNA. *J. Invertebr. Pathol.* 17:199-202.
- Lipa, J.J., Slizynski. 1973. Wskazówki metodyczne i terminologia dowyznacznia sredniej dawki swiertelnej (LD<sub>50</sub>) w patologii owadow i toksykologii. *Prace Naukowe instytutu ochrony roslin.* Tom. XV. Zeszyt 1. Polonia. 60-83.
- López, M.G.C. y J. Ibarra. 1991. Resistencia natural del falso medidor de la col *Trichoplusia ni* (Lepidoptera:Noctuidae), a tres cepas de virus de la poliedrosis nuclear, en el Bajío. XXVI Congreso Nacional de Entomología. Veracruz, Ver. Págs. 207-208.
- Maeda, S., S.L. Volrath, T.N. Hanzlik, S.A. Harper, K. Majima, D.W.Maddox, B.D. Hammock, and E. Fowler. 1991. Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. *Virology.* 184:777-780.
- Magnoler, A. 1974. Bioassay of a nucleopolyhedrosis virus of the Gypsy moth, *Porthetria dispar*. *J. Invertebr. Pathol.* 23:190-196.
- Maramorosch, K. Ph. D. 1991. *Biotechnology for biological control of pests and vectors.* CRS Press Boca Raton Ann Arbor Boston London. 278 pp.
- Martínez, A.J., J. Bard, and T. Hollert. 1988. Mass rearing sugarcane borer and mexican rice borer for production of parasites *Allorgas pyralophagus* and *Rhaconotus roslinensis*. U.S. Department of Agriculture and Plant Health Inspection Service Plant Protection and Quarantine. APHIS 83-1. 27 pp.

- Maskel, S.M. and R.A. DiCapua. 1988. Comparison of protease activity of four nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 52:447-452.
- McIntosh, A.H. and C.M. Ignoffo. 1989. Replication of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in five lepidopteran cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* 54:97-102.
- Metcalf, C.L. y W.P. Flint. 1977. *Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control*. 4a. ed. Ed. Continental S.A. México. 1208 págs.
- Metcalf, R.L. y W.H. Luckmann. 1990. *Introducción al manejo de plagas de insectos*. 2a. ed. Ed. Limusa. México. 710 págs.
- Miller, L.K., A.J. Lingg, L.A. Bulla, Jr. 1983. Bacterial, viral and fungal insecticides. *Science*. 219:715-721.
- Moscardi, F. 1983. Utilizacao de Baculovirus *Anticarsia* para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*. Pesquisador de EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Londrina. 23:1-21.
- Murray, K.D. and J.S. Elkinton. 1989. Environmental contamination of egg masses as a major component of transgenerational transmission of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus (NPVMLd). *J. Invertebr. Pathol.* 53:324-334.
- Payne, C.C. 1982. Insect viruses as control agents. *Parasitology*. 84:37-77.
- Pritchett, D.W., S.Y. Young, and W.C. Yearian. 1984. Some factors involved in the dissolution of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus polyhedra by digestive fluids of *Trichoplusia ni* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 43:160-168.

- Richter, A.R. and J.R. Fuxa. 1984. Timing formulation, and persistence of a nuclear polyhedrosis virus and a *Microsporidium* for control of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera:Noctuidae) in Soybeans. *J. Econ. Entomol.* 77: 1299-1306.
- Roberts, D.W., J.R. Fuxa, R. Gaugler, M. Goettel, R. Jaques, and J. Maddox. 1991. Use of pathogens in insect control. In: *Handbook of pest management in Agricultures*. 2nd.ed. Vol.2. D. Pimentel, ed CRC Press, Boca Raton, Fl. pp. 243-278.
- Santos, G.F. 1991. Propagación y pruebas de patogenicidad del virus NPV-Tni contra *Trichoplusia ni* (Hübner). Tesis Profesional Universidad Autonoma de Chapingo. 48 págs.
- Shieh, T.R. and G.T. Bohmfalk. 1980. Production and efficacy of baculovirus. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. XXII:1357-1375.
- Scheepens, M.H.M. and M. Wysoki. 1989. Pathogenicity of AcMNPV for larvae of *Boarmia selenaria*, *Heliothis armigera*, *Heliothis peltigera*, *Spodoptera littoralis*, and *Ephestia cautella*. *J. Invertebr. Pathol.* 53:183-189.
- Splittstoesser, C.M. and F.L. McEwen. 1971. Field evaluations of nuclear polyhedrosis viruses from the cabbage looper, *Trichoplusia ni* *J. Invertebr. Pathol.* 17:194-198.
- Stairs, G.R. 1989. Effects of a nuclear polyhedrosis virus isolate from *Malacosoma disstria* on *Lymantria dispar* larval growth pattern. *J. Invertebr. Pathol.* 53:247-250.
- Starnes, R.L., Chi Li Liu, and P.G. Marrone. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. *American Entomologist*. 39(2):83-90.

- Steinhaus, A.E.A. 1963. *Insect Pathology an advanced treatise*. Academic Press. New York and London. Vol. 1. pp. 381-527.
- Tanada, Y. and H.K. Kaya 1993. *Insect Pathology*. Academic Press. Inc. London. 666 pp.
- Tanada, Y. and R.T. Hess. 1984. The cytopathology of Baculovirus infections in insects. *Insect Ultrastructure*. 2:517-556.
- Tinsley, T.W. 1977. Viruses and the biological control of insect pest. *Bioscience*. 27(10): 659-661.
- Tompkins, G.J., J.R. Adams, and A.M. Heimpel. 1969. Cross infection studies with *Heliothis zea* using nuclear - polyhedrosis viruses from *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 343-357.
- Vail, P.V. and D.L. Jay. 1973. Pathology of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in alternate hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 21:198-204.
- Vail, P.V. and I.M. Hall. 1969. Susceptibility of cabbage looper, *Trichoplusia ni*, to a nucleopolyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 14: 227-236.
- Vail, P.V. and L.M. Hall. 1969. The influence of infections of nuclear-polyhedrosis virus on adult cabbage loopers and their progeny. *J. Invertebr. Pathol.* 13:358-370.
- Vail, P.V., G. Sutter, D.L. Jay, and D. Gough. 1971. Reciprocal infectivity of nuclear polyhedrosis viruses of the cabbage looper and alfalfa looper. *J. Invertebr. Pathol.* 17:383-388.

- Van Beek, N.A.M., H.A. Wood, and P.R. Hughes. 1988. The number of nucleocapsids of enveloped *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus particles affects the survival time of neonate *Trichoplusia ni* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 52:185-186.
- Vázquez, N.J.M. 1993. Elaboración de un documento de referencia para el monitoreo de resistencia a plaguicidas en artrópodos mediante bioensayo. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados Montecillo, Edo. de México. 187 págs.
- Wood, H.A. and R.R. Granados. 1991. Genetically engineered Baculoviruses as agents for pest control. *Annu. Rev. Microbiol.* 45:69-87.
- Young, S.Y. and J.S. Lovell. 1973. Virion proteins of the *Trichoplusia ni* nuclear polyhedrosis virus. *J. Invertebr. Pathol.* 22:471-472.
- Young, S.Y. and W.C. Yearian. 1988. Secondary transmission of nuclear polyhedrosis virus by *Pseudoplusia includens* and *Anticarsia gemmatilis* larvae on semisynthetic diet. *J. Invertebr. Pathol.* 51:133-138.

## APENDICE A

### Dieta artificial para *Trichoplusia ni*

Ingredientes:

Agua destilada	450 ml
Frijol	87.5 gr
Agar	5.5 gr
Ac. sórbico	1.25 gr
Methyl parabén	3.0 gr
Ac. ascórbico	4.5 gr
Salvado	5.0 gr
Levadura	70.0 gr
Aceite de germen de trigo	1.25 ml
Formaldehído	3.0 ml

Preparación:

Agregar el agar en 200 ml de agua destilada, y calentar hasta ebullición. Licuar el frijol con la otra mitad de agua destilada (250 ml) y agregar en el siguiente orden el Ac. sórbico, el Methyl parabén, el Ac. ascórbico, salvado, el aceite de germen de trigo y el formaldehído, posteriormente agregar el agar, mezclar por 1 min, vaciar en recipientes y dejar enfriar.

## APENDICE B

### ANALISIS PROBIT

Existen varios métodos para obtener la línea de respuesta logaritmo dosis mortalidad. La relación entre la dosis y la mortalidad está representada por la línea sigmoide, la cual, es difícil de comparar e interpretar; por lo que se debe transformar para poder ajustar a un modelo líneal. Es necesario usar el logaritmo de la dosis y cambiar el porcentaje de mortalidad a unidades Probit. Existen tablas que permiten hacer directamente dichas transformaciones; y un programa para computadoras personales PC-Probit; que facilita el procesamiento de los datos.

Los parámetros principales resultantes de un análisis Probit son: la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), sus límites fiduciales, el valor de ji-cuadrada y la pendiente de la línea de regresión.

La  $CL_{50}$  nos muestra la cantidad de unidades infectivas necesarias para matar el 50% de la población plaga. Si el límite fiducial (95%) inferior o superior de la  $CL_{50}$  de una de las poblaciones se traslapan se dice que las poblaciones son estadísticamente iguales (95% de certeza) es decir provienen de poblaciones con susceptibilidad similar al tóxico. La ji-cuadrada refleja el nivel de similitud entre los datos obtenidos del bioensayo y los datos teóricos. Un valor mínimo de la ji-cuadrada expresa una máxima similitud. El valor de la pendiente de la línea de regresión  $Y = a + bx$  (donde Y es igual al valor Probit, a la ordenada al origen, b la pendiente y x el logaritmo de la dosis), nos permite conocer el rango de dosis que abarca la respuesta de la muestra en el bioensayo. Valores bajos de pendiente indican un rango amplio de dosis, lo cual es probable que se trate de un proporción alta de individuos con genotipo resistente al tóxico; y a mayor pendiente mayor homogeneidad.

## CRITERIOS USADOS PARA UN BUEN BIOENSAYO

Para que los resultados de un bioensayo sean confiables debe de reunir los siguientes requisitos:

- a) La respuesta debe ser lineal. Es decir, que se observe una relación lineal entre el logaritmo de la dosis y las unidades Probit.
- b) La dosis que se aplique o se pruebe, debe ser precisa.
- c) La respuesta debe ser determinante: vivo o muerto. No pueden considerarse los puntos intermedios. Dependiendo del patógeno, el criterio para tomar a un organismo como vivo o muerto depende del modo de acción del mismo.
- d) Cuando en el testigo exista mortalidad esta debe ser corregida a través de la ecuación de Abbot, debido a que no se podría inferir si la mortalidad de los tratamientos se debe al efecto del patógeno o a otros factores como la alimentación deficiente, contaminación o mal manejo.
- e) La temperatura debe ser constante y adecuada con la finalidad de evitar sesgos en la mortalidad.
- f) El método debe ser sensible para poder captar las diferencias en la mortalidad como una respuesta al cambio de dosis.
- g) El método debe ser reproducible.
- h) La nutrición de los insectos debe ser uniforme.
- i) El lugar de aplicación debe ser constante.
- j) Las repeticiones del experimento deberán hacerse a la misma hora pero en días diferentes.

### APENDICE C

Bioensayos y respuestas biológicas realizados durante esta investigación con valores no significativos

Bioensayos realizados con VPNT<sub>II</sub> contra *Trichoplusia ni*

FECHA	CL <sub>50</sub>	CL <sub>95</sub>	Límites fiduciales (alfa=0.05)	Ecuación de regresión	X <sup>2</sup>
18/06/92	0.009214	0.768508	2.454507-1.631226	Y = 6.7427 + 0.8561X	15.89
28/06/92 *	0.000494	0.114427	4.038780-2.830109	Y = 7.2996 + 0.6955X	0.41
4/07/92 *	0.123819	1.388292	1.232699-0.575446	Y = 6.4215 + 1.5669X	2.16
28/06/93	0.597684	264.177842	0.642854-0.566427	Y = 5.1389 + 0.6217X	12.61
30/06/93	0.343267	3366.654031	1.013357-0.775687	Y = 5.1913 + 0.4120X	8.54
1/07/93	0.289533	742.888655	1.032859-0.699320	Y = 6.2597 + 0.4824X	16.56
3/08/93	NO SIGNIFICATIVO				

\* Bioensayos que presentaron un mayor porcentaje de mortalidad en el testigo.

Continuación: APENDICE C

Respuesta Biológica de larvas de tercer instar temprano de *Trichoplusia ni* con VPNAg, con valores no significativos.

FECHA	Concentración (%)	No. de larvas	Muertos (Total)	Mortalidad (%)
5/08/93	Testigo	15	0	0
	0.01	15	3	20
	0.1	17	3	17.6
	1.0	16	8	50
	100	15	10	66.6
16/08/93	Testigo	17	1	5.8
	0.01	20	6	30
	0.1	18	5	27.7
	1.0	16	5	31.2
	100	14	2	14.2
17/08/93	Testigo	18	1	5.5
	0.001	16	7	43.7
	0.01	16	6	37.5
	0.1	18	6	33.3
	1.0	16	3	18.7
	100	17	0	0
25/08/93	Testigo	20	2	10
	0.0001	20	3	15
	0.001	20	6	30
	0.01	20	6	30
	0.1	20	2	10
	1.0	20	7	35
26/08/93	Testigo	20	7	35
	0.0001	20	3	15
	0.001	20	8	40
	0.01	20	8	40
	0.1	20	3	15
	1.0	20	3	15

RB con VPNAg contra larvas de <i>Trichoplusia ni</i> (Continuación)				
FECHA	Concentración (%)	No. de larvas	Muertos (Total)	Mortalidad (%)
31/08/93	Testigo	20	6	30
	0.0001	20	4	20
	0.001	20	3	15
	0.01	20	3	15
	0.1	20	8	40
	1.0	20	8	40
1/09/93	Testigo	20	0	0
	0.0001	20	2	10
	0.001	20	1	5
	0.01	20	1	5
	0.1	20	6	30
	1.0	20	2	10
8/09/93	Testigo	18	6	33.3
	0.0001	17	5	29.4
	0.001	17	4	23.5
	0.01	16	4	25
	0.1	17	9	52.9
	1.0	17	10	58.8
5/11/93	Testigo	20	3	15
	0.001	20	6	30
	0.01	20	8	40
	0.1	20	8	40
	1.0	13	8	61.5
4/11/95	Testigo	18	8	44.7
	0.001	17	2	11.7
	0.01	20	6	30
	0.1	18	5	27.7
	1.0	19	6	31.5

RB con VPNAg contra larvas de <i>Trichoplusia ni</i> (Continuación)				
FECHA	Concentración (%)	No. de larvas	Muertos (Total)	Mortalidad (%)
10/11/93	Testigo	20	0	0
	0.001	20	0	0
	0.01	20	0	0
	0.1	20	0	0
	1.0	20	0	0
4/01/94	Testigo	17	3	17.6
	0.00001	17	12	70.5
	0.0001	17	16	94.1
	0.001	17	14	82.3
	0.003	17	11	64.7
	0.01	17	15	88.2
	0.1	17	16	94.1
	1.0	17	17	100

APENDICE D

Ventana de respuesta biológica de VPNTn, VPNAg y VPNAc contra larvas de *Trichoplusia ni*

VIRUS	Concentración (%)	No. de larvas	Muertos (Total)	Mortalidad (%)
VPNTn	1.0	56	52	92.8
	0.1	55	35	63.6
	0.01	52	20	38.4
	0.001	58	13	22.4
VPNAg	1.0	40	40	100
	0.1	40	38	95.0
	0.01	40	35	87.5
	0.001	40	24	60.0
VPNAc	1.0	35	33	94.2
	0.1	34	21	61.7
	0.01	35	14	40.0
	0.001	34	4	11.7
	0.0001	33	1	3.0

### APENDICE E

#### Pruebas estadísticas ANOVA y prueba de Tukey

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F exp.	F Teórica
Tratamientos	11	512.5			
Efecto del VPN	2	85.75	43.875	7.7427	3.89
Efecto de la concentración	3	367.5	122.5	21.6179	3.49
Interacción entre los factores	6	59.25	9.875	1.7426	3.00
Error	12	68	5.6666		
Total	23	580.5			

Rechazar la  $H_0$  si  $F_{exp.}$  es mayor que  $F_{Teórica}$ .

- 1)  $H_A$ : El VPN sí influye en el porcentaje de mortalidad.
- 2)  $H_A$ : Si existe efecto de la concentración sobre el porcentaje de mortalidad.
- 3)  $H_0$ : No existe interacción entre el VPN y la concentración.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F exp.	F Teórica
Tratamiento	2	$3.2072 \times 10^{15}$	$1.6036 \times 10^{15}$	10.3304	5.14
Error	6	$9.314 \times 10^{14}$	$1.5523 \times 10^{14}$		
Total	8	$4.1386 \times 10^{15}$			

Si hay diferencia entre la agresividad de VPNT<sub>n</sub>, VPNA<sub>g</sub> y VPNA<sub>c</sub> sobre larvas de *Trichoplusia ni*.

A=VPNT<sub>n</sub> B=VPNA<sub>g</sub> C=VPNA<sub>c</sub>

A-B= $4.0446 \times 10^7$  A-C= $3.7633 \times 10^7$  B-C= $2.813 \times 10^6$  W= $3.12 \times 10^7$

La prueba de Tukey (Alfa=0.05) nos indicó que hubo mayor diferencia cuando se comparó: VPNT<sub>n</sub>-VPNA<sub>g</sub> y VPNT<sub>n</sub>-VPNA<sub>c</sub>.