
CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS EXÓTICAS DE BACULOVIRUS SfNPV, CON ACTIVIDAD BIOINSECTICIDA HACIA UNA POBLACIÓN MEXICANA DEL GUSANO COGOLLERO DEL MAÍZ *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae)

Jonatan Carmen Rangel Núñez, Ma. Fernanda Vázquez Ramírez y Ma. Cristina Del Rincón Castro

RESUMEN

Se caracterizaron biológica y molecularmente tres cepas exóticas de baculovirus SfNPV, se estableció su CL_{50} , patrones de fragmentos de restricción y perfiles de proteínas. Los bioensayos se realizaron con cuerpos de oclusión (CO) en diferentes concentraciones sobre la superficie de la dieta artificial. Se probaron 20 larvas por concentración. Se determinó la CL_{50} de las cepas, obteniéndose una CL_{50} para SfNPV-Ar de $4,9 \times 10^4$ CO/ml; para SfNPV-Fx de $1,45 \times 10^5$ CO/ml; y para la cepa SfNPV-Ho de

$1,85 \times 10^5$ CO/ml. La cepa más virulenta resultó ser SfNPV-Ar con una CL_{50} 2,95 veces más baja que la de SfNPV-Fx y 3,75 veces menor que la cepa SfNPV-Ho. Los patrones obtenidos con las endonucleasas de restricción EcoRI, HindIII y BamHI demostraron que las tres cepas fueron diferentes. Los patrones de proteínas fueron muy similares para las tres cepas. Las cepas exóticas de los SfNPV poseen potencial para ser utilizados en México contra el gusano cogollero del maíz.

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF EXOTIC BACULOVIRUS STRAINS WITH ACTIVITY TO MEXICAN POPULATION OF FALL ARMYWORM *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae)

Jonatan Carmen Rangel Núñez, Ma. Fernanda Vázquez Ramírez and Ma. Cristina Del Rincón Castro

SUMMARY

Three exotic strains from Baculovirus SfNPV were biologically and molecularly characterized, and their LC_{50} , restriction fragment patterns and protein profiles were established. Bioassays were performed with occlusion bodies (CO) in different concentrations on the surface of the artificial diet. Twenty larvae per concentration were tested. The LC_{50} was of 4.9×10^4 CO/ml for SfNPV-Ar, of 1.45×10^5 CO/ml for SfNPV-Fx and of 1.85×10^5 CO/ml for strain SfNPV-Ho. The most virulent strain

was SfNPV-Ar, with a LC_{50} 2.95 times lower than SfNPV-Fx and 3.75 times below that of the strain SfNPV-Ho. The restriction fragment patterns with the enzymes EcoRI, HindIII and BamHI showed that the three strains were different. The protein patterns were very similar for all three strains. Exotic strains of SfNPV's have potential for use in Mexico against the fall armyworm.

Introducción

El maíz es el cultivo de mayor importancia en México, ocupando una superficie sembrada de 7.372.218,19ha (SIAP, 2012), siendo Sinaloa, Chiapas y Jalisco los estados con mayor superficie sembrada. El estado de Guanajuato ocupa el noveno lugar con el 5,17% de

la producción nacional (SIAP, 2012), de la cual el 80% son siembras de temporal. En este sistema de producción las plagas y las enfermedades son comunes y los métodos de control usados para solucionar estos problemas no siempre son los adecuados. Del complejo de plagas que atacan al maíz, el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae), es una de las de mayor importancia en zonas tropicales y subtropicales de América (Polaczyk *et al.*, 2000; Vergara *et al.*, 2001). Estudios realizados en México por Rodríguez y de León (2008) muestran que las pérdidas en el rendimiento, causadas por la presencia de la plaga en el

cultivo de maíz, oscilan entre 30 y 40%. La forma más común de controlar las plagas en los cultivos es a través del uso de productos químicos (Hruska y Gladstone, 1987). Si bien este método de control contribuye a mantener a las poblaciones de la plaga en niveles tolerables y reducir el daño que causan al rendimiento del

cultivo de maíz, oscilan entre 30 y 40%. La forma más común de controlar las plagas en los cultivos es a través del uso de productos químicos (Hruska y Gladstone, 1987). Si bien este método de control contribuye a mantener a las poblaciones de la plaga en niveles tolerables y reducir el daño que causan al rendimiento del

PALABRAS CLAVE / Baculovirus / Control Biológico / Lepidóptera / Maíz / México / *Spodoptera frugiperda* /

Recibido: 14/02/2014. Modificado: 14/04/2014. Aceptado: 21/04/2014.

Jonatan Carmen Rangel Núñez.
Ingeniero Agrónomo, Universidad de Guanajuato (UGTO), México. Auxiliar de Investigación, UGTO, México.

Ma. Fernanda Vázquez Ramírez.
Ingeniera Agrónoma, UGTO, México. Auxiliar de Investigación, UGTO, México.

Ma. Cristina Del Rincón Castro.
Bióloga y Doctora en Ciencias en Biotecnología de Plantas, CINVESTAV-IPN, Irapuato, México. Profesora-Investigadora, UGTO, México. Dirección: Departamento de Alimentos, Divi-

sión de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato Salamanca, UGTO. ExHacienda El Copal, Km. 9.0 Carr.Irapuato-Silao. 36500 Irapuato, Guanajuato. México. e-mail: cdelrincon@ugto.mx

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS EXÓTICAS DE BACULOVIRUS SfNPV COM ATIVIDADE BIOPESTICIDA PARA UM POPULAÇÃO MEXICANA DE ARMYWORM *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Jonatan Carmen Rangel Núñez, Ma. Fernanda Vázquez Ramírez e Ma. Cristina Del Rincón Castro

RESUMO

Foram caracterizados três cepas exóticas de Baculovirus SfNPV o nível biológico e molecular, e os seus padrões de fragmentos de restrição CL_{50} e perfis de proteínas foram estabelecidas. Os bioensayos foram realizados com corpos de oclusão (CO) em diferentes concentrações na superfície da dieta artificial. Vinte larvas para cada concentração foram testados. CL_{50} foi estimada para cada isolado, obtendo uma CL_{50} de $4,9 \times 10^4$ CO/ml para SfNPV-Ar; de $1,45 \times 10^5$ CO/ml para SfNPV-Fx; e de

$1,85 \times 10^5$ CO/ml para SfNPV-Ho. A isolada mais virulenta provou SfNPV-Ar com CL_{50} 2,95 vezes menor do que CL_{50} SfNPV-Fx e 3,75 vezes menor do que a tensão SfNPV-Ho. Os padrões de fragmentos de restrição com as enzimas EcoRI, HindIII e BamHI mostrou que as três isoladas eram diferentes. Os padrões de proteínas foram muito semelhantes para as três isolados. Estes isolados de SfNPV tem potencial para uso em México contra a lagarta do cartucho.

cultivo, su uso irracional ha provocado problemas tales como contaminación del suelo y mantos freáticos (Gill *et al.*, 1992), efectos tóxicos en animales y en el hombre (Huff y Haseman, 1991), genotipos resistentes (Lagunes-Tejeda y Villanueva-Jiménez, 1994) y aniquilación de los enemigos naturales de la plaga y de otros organismos, que ante la ausencia de sus reguladores naturales se convierten en plagas secundarias (Figueroa-Brito, 2002).

En el caso de *S. frugiperda* se tiene bien documentado el desarrollo de resistencia hacia los principales grupos toxicológicos usados para su control, tanto en México (Pacheco-Covarrubias, 1993) como en EEUU (Wood *et al.*, 1981; Georghiou y Mellon, 1983; Yu, 1992). Esta situación hace necesaria la búsqueda de alternativas para controlar a esta plaga, las cuales sean seguras para el hombre, otros mamíferos y para el medio ambiente. Una de las alternativas es el uso de depredadores, parasitoides y organismos entomopatógenos (bacterias, virus, hongos, nematodos y protozoarios; Del Rincón-Castro *et al.*, 2006), los cuales son seguros para el hombre y específicos para controlar a la plaga blanco (Molina-Ochoa *et al.*, 2004).

Los baculovirus son un grupo de entomopatógenos miembros de la familia Baculoviridae, los cuales se han aislado exclusivamente de artrópodos y mayoritariamente de insectos.

Son virus con forma de bastón, que miden de 20 a 50nm de diámetro y de 200 a 400nm de longitud (Vaughn, 1992). Contienen ADN de doble cadena, circular y super-enrollado, el cual se encuentra confinado en una nucleocápside (NC), con viriones incluidos en cuerpos de oclusión (CO) o poliedros (Volkman *et al.*, 1995). En la actualidad los baculovirus son clasificados en cuatro géneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gamabaculovirus* y *Deltabaculovirus*, clasificación que está basada en la evidencia filogenética, características biológicas y morfológicas (Jehle *et al.*, 2006). A su vez, estos cuatro géneros se dividen en dos grupos cuya clasificación depende de la morfología de su cuerpo de oclusión, pueden ser Nucleopoliedrovirus (NPV) o Granulovirus (GV).

Los baculovirus se han utilizado de manera extensiva para el control biológico de diversas plagas de lepidópteros a nivel mundial (Szewczyk *et al.*, 2011), con resultados extraordinarios en el caso del control del gusano de la soya *Anticarsia gemmatalis* en Brasil, ya que un baculovirus (AgNPV) aislado de ese insecto (Moscardi, 1999), se ha utilizado para el control de más de 2×10^6 ha de ese cultivo (Szewczyk *et al.*, 2011). De manera específica, se han aislado muchas cepas de baculovirus a partir de larvas de *S. frugiperda* (SfNPV) para el control del gusano cogollero del maíz en EEUU y América Latina, y se ha demostrado

desde hace varios años el elevado potencial que poseen para el control de esta plaga (Fuxa, 1987). En América Latina, existen diversos trabajos en que se ha realizado la evaluación de cepas de SfNPV contra poblaciones del gusano cogollero *S. frugiperda*, de tal manera que ya se han evaluado cepas exóticas de SfNPV aisladas en distintas regiones del Continente Americano, contra poblaciones españolas del gusano cogollero (Escribano *et al.*, 1999). Países como Argentina (Berretta *et al.*, 1998; Yasem de Romero *et al.*, 2009), Perú (Vásquez *et al.*, 2002), Brasil (Arce Gómez *et al.*, 1999) y Colombia (Gómez Valderrama *et al.*, 2010), ya han evaluado la efectividad, a nivel de laboratorio y en algunos casos a nivel de campo, de aislamientos de SfNPV nativos, con resultados muy variables, pero todos alentadores, debido a que el gusano cogollero muestra elevada susceptibilidad a los diferentes aislamientos nativos de esos países.

Sin embargo, en México, existen muy pocos trabajos a nivel de laboratorio relacionados con el uso de estos virus para el control del gusano cogollero. A nivel de campo, Williams *et al.* (1999) realizaron pruebas en maíz, con un aislamiento exótico de un SfNPV aislado en Nicaragua, demostrándose controles del orden del 40%, contra una población del gusano cogollero en Chiapas. Estos resultados preliminares, si bien no fueron espec-

taculares, sí sentaron las bases, en su momento, para considerar el uso de cepas de baculovirus como una alternativa para el control de la plaga en este país. Desafortunadamente, estas investigaciones no culminaron con la utilización como bioinsecticida de alguna cepa de los SfNPVs evaluados, ni se utilizan hoy en día como una alternativa real a nivel de campo en México.

Por otro lado, a finales de los 90 y principios del 2000, el gusano cogollero en México, a pesar de estar presente en los cultivos de maíz, no generaba pérdidas económicas de importancia considerable para los productores. Más recientemente, desde el año 2008 a la fecha, se ha observado un fuerte incremento de la presencia de esta peste en México, tanto así que en 2013 el país sufrió una crisis en el cultivo del maíz, ocasionada por un brote de esta plaga, lo cual redundó en cuantiosas pérdidas económicas por parte de los productores y en costos por control químico, que llegaron a USD 40×10^6 (CESAVEG, 2013). Los estados de la zona del bajío mexicano más afectados por la presencia del gusano cogollero en 2013 fueron Aguascalientes con 99.434,5ha infestadas, Michoacán con 29.984ha, Querétaro con 237.031,45ha y el Estado de Guanajuato, en el cual se observaron los mayores niveles de infestación por esta plaga, ya que ~480.000ha de maíz resultaron dañadas (CESAVEG, 2013). Esto ocasionó

que se tuviera que realizar en muchos casos hasta tres siembras de maíz, y que se realizaran hasta 13 aplicaciones de insecticidas químicos solo durante este año (CESAVEG, información personal).

Debido a ello, se considera de suma importancia tratar de retomar la alternativa de los baculovirus como agentes de control biológico, para implementar el uso de cepas de SfNPV aisladas del gusano cogollero, con actividad específica hacia una población mexicana de esta plaga. Como parte de un programa actual relacionado con la evaluación de cepas exóticas, la búsqueda de cepas nativas, y la caracterización de ambas a nivel biológico y molecular en México, este trabajo presenta los resultados de la caracterización y evaluación de tres cepas de SfNPV aisladas del gusano cogollero del maíz en Argentina, EEUU y Honduras.

Materiales y Métodos

Cepas

Se utilizaron tres cepas de baculovirus donadas por Trevor Williams, Instituto de Ecología, A.C. (INECOL), México, con actividad hacia *S. frugiperda*, denominadas SfNPV-Ar (aislada en Argentina), SfNPV-Fx (aislada en EEUU) y SfNPV-Ho (aislada en Honduras).

Establecimiento de la colonia de *S. frugiperda*

La colonia de *S. frugiperda* partió de larvas colectadas en campo de diferentes estadios, en la zona del bajío mexicano, en el municipio de Irapuato, Guanajuato, en un predio de las instalaciones de la División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato. A estas larvas, una vez que alcanzaron el estado de pupa, se les mantuvo bajo condiciones de insectario: 80% de humedad relativa, 25°C y 16:8h de luz:oscuridad, dentro de bolsas de papel estraza. Una vez que los adultos emergieron se les alimentó con una solución de

agua destilada con miel de maíz al 5%, la cual se colocó en un fragmento de algodón. Los huevecillos se colocaron en cajas de Petri hasta su posterior eclosión, las cuales contenían dieta artificial para *S. frugiperda*, elaborada con: agua destilada 1000ml; agar bacteriológico 12,5g; maíz 120g; levadura 50g; germen de trigo 5g; espiga de maíz molido 25g; ácido sórbico 2,5g; ácido ascórbico 5g; metilparaben (MPB) 3,125g; mezcla de sales 8,75g; frijol soya 62,5g; formaldehído 37% 3,125ml; antibiótico 0,75mg; y mezcla de vitaminas 18,75g. Después de la eclosión, las larvas se mantuvieron en dichas cajas hasta llegar al 2° estadio. Debido a los hábitos canibalísticos de esta plaga, posteriormente las larvas fueron colocadas individualmente en vasos de plástico con tapa que contenían dieta artificial hasta que puparon.

Multiplicación de las cepas virales

La multiplicación de las cepas virales se realizó en cajas de Petri a las cuales se les inocularon 500µl de una solución de cuerpos de oclusión (CO) que contenía 1×10^5 CO/ml. Posteriormente se colocaron de 8 a 10 larvas de 3er estadio por caja, las que fueron incubadas bajo condiciones de insectario por 5 días. Las larvas se colectaron y se procesaron en mortero de porcelana estéril, con 2ml de agua destilada estéril (ADE). El homogenado se filtró con una doble malla de organza, el filtrado se centrifugó a 13000rpm y 4°C durante 15min (Centrífuga Hermle, Z326K). La pastilla resultante se resuspendió con ADE, repitiendo el procedimiento dos veces más, para finalmente almacenar las muestras a 4°C.

Purificación de poliedros

Los poliedros se purificaron en gradientes continuos de sacarosa del 40-66% (peso/peso), se centrifugaron a 24000rpm y 4°C durante 1,5h, utilizando un rotor de columpio SW28 (Ultracentrífuga

Beckman Coulter, Optima L-100XP). Posteriormente se retiraron los restos de sacarosa con ADE a 15000rpm, 4°C por 15min. El procedimiento se repitió tres veces. La pastilla resultante se resuspendió nuevamente con 4ml ADE y se almacenó a 4°C.

Contaje de los poliedros

Los poliedros fueron cuantificados en cámara de Neubauer, con diluciones de 1:10 de cada una de las cepas. El conteo se realizó en un microscopio AxioLabA1 (Zeiss) con objetivo 40x, en el recuadro central de 5x5; de la suma total de los conteos se obtuvo un promedio, este se multiplicó por una constante de $2,5 \times 10^5$ y por el factor de dilución, y esto arrojó como resultado el número de COs por ml de muestra.

Bioensayos

Para la realización de los bioensayos se partió de stocks purificados y cuantificados de poliedros. Se emplearon seis concentraciones por cepa. Se usó como concentración inicial más alta la de $4,8 \times 10^5$ CO/ml para cada cepa. Se usaron factores de dilución de 0,5 a 0,75 para las cinco concentraciones restantes. Para cada concentración se preparó un volumen de 300µl, que se distribuyó en dos volúmenes de 150µl por cada caja de Petri, que contenía dieta artificial. Para los testigos negativos se emplearon 150µl de ADE. Se usaron en total 20 larvas por concentración, colocándose 10 larvas por caja de Petri, a las cuales se les colocaron previamente rejillas de plástico con 10 espacios. Se utilizaron 30 larvas para el testigo negativo de *S. frugiperda* de 1er estadio. Las larvas de los primeros estadios fueron manipuladas con pinceles finos (N° 1) para evitar infringirles daño mecánico. Los bioensayos se incubaron bajo condiciones de insectario por cinco días, y posteriormente se cuantificó la mortalidad mediante análisis Probit.

La CL₅₀ se estimó realizando un mínimo de tres repeticiones válidas que cumplieran con los parámetros estadísticos previamente establecidos (Ibarra y Federici 1987). Dichos parámetros fueron: 1) El valor de la pendiente de la línea de regresión debería tener un valor de 1,5 a 6. 2) El valor de χ^2 debería ser <5. 3) La división entre el límite fiducial mayor y menor debería ser <2. 4) La mortalidad natural en el testigo no debería exceder al 10%. 5) La CL₅₀ estimada debería ubicarse por lo menos dos valores debajo de la dosis probada más alta y dos valores arriba de la más baja. 6) La distribución de la mortalidad debería encontrarse entre un 90 y un 10% en de las concentraciones probadas. 7) Para estimar la CL₅₀ promedio deberían realizarse un mínimo de tres repeticiones válidas, es decir, que cumplieran con los puntos anteriores. 8) El coeficiente de variación entre las tres repeticiones utilizadas para estimar la CL₅₀ debería ser menor al 20%.

Purificación de viriones

Se utilizaron 5ml de CO (5×10^{10} CO/ml) de las diferentes cepas de SfNPV previamente purificados, se centrifugaron a 15000rpm 15min a 4°C, en una centrífuga Biofuge Stratos (Heraeus). La pastilla se resuspendió en 5ml de amortiguador TE (0,01M Tris HCl; 0,001M EDTA; pH 7,6), posteriormente se adicionaron 10ml de amortiguador alcalino (0,1M Na₂CO₃; 0,1M NaCl; pH 10,8) para disolver los CO y liberar los viriones. La suspensión se agitó durante 1h a temperatura ambiente y la reacción se detuvo con 5 o 15ml de amortiguador TE. Los viriones se purificaron mediante gradientes continuos de sacarosa del 20 al 60% p/p, centrifugando a 28000rpm por 1,5h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman XL-90 utilizando un rotor de columpio SW-40Ti. Al término de la corrida, se colectaron los viriones, se lavaron con amortiguador TE a 28000rpm por 40min a 4°C, y se almacenaron a -20°C hasta la posterior extracción del ADN.

Extracción de ADN viral y digestión con endonucleasas de restricción

Los viriones purificados se resuspendieron en 400µl de amortiguador de reacción para proteinasa K (0,01M Tris; 0,005M EDTA; 0,5% SDS) y se incubaron por 15min a 60°C. Posteriormente se adicionaron 100µl de proteinasa K (1mg·ml⁻¹) para una concentración final de 200µg·ml⁻¹, se incubó 2h a 37°C en baño de María. Luego se adicionaron 500µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó por 5min a 14000rpm; se colectó la fase acuosa y el ADN se precipitó por centrifugación con 500µl de isopropanol por 10min a 4°C. La pastilla resultante se resuspendió en 30µl de ADE. Se digirieron de 0,5 a 2µg de ADN con 10 U de las endonucleasas de restricción EcoRI, HindIII y BamHI incubando 2h a 37°C. La digestión se analizó por electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% en amortiguador TAE a 25V por 24h. Los fragmentos de restricción se observaron mediante tinción con GelRed™ Nucleic Acids (Biotium) y se visualizaron y fotografiaron bajo una lámpara UV con el sistema de fotodocumentación GelDoc EZ Imager (BioRad).

Patrones de proteínas

Para el análisis de proteínas de los CO de las tres cepas de SfNPV se utilizaron 100µl de CO purificados (5×10⁹ CO/ml) y se centrifugaron durante 3min a 13000rpm. La pastilla se resuspendió en 100µl de amortiguador de carga 2× (2% SDS; 40% glicerol; 5% β-mercaptoetanol; 0,001% azul de bromofenol; 0,0625M Tris-HCl; pH 8) y se hirvió por 10min. Posteriormente los patrones de proteínas fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida (concentración 3% y separación 10%), a 110V por 3h. Los geles se tiñeron con una

solución de Azul de Coomassie (Azul brillante de Coomassie 250mg; metanol 45ml; ácido acético glacial 9ml; agua destilada 46ml) por 30min a temperatura ambiente con agitación constante y se destiñeron en una solución de destinción (ácido acético 75ml, metanol 50ml, agua destilada 875ml), por 12h con agitación constante. Se fotografiaron con una lámpara de luz blanca en un sistema de fotodocumentación GelDoc EZ Imager (BioRad).

Resultados

Establecimiento de la colonia

La colonia de *S. frugiperda* se estableció exitosamente en el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Se obtuvieron mensualmente masas de huevecillos de diferentes densidades (Figura 1a), una población promedio de 1250 larvas de los diferentes estadios alimentadas con dieta artificial (Figura 1b), alrededor de 350 pupas (Figura 1c) y 350 adultos en bolsas de papel estraza (Figura 1d).

Amplificación del inóculo viral

Se amplificaron las tres cepas de SfNPV, usando larvas de 3^{er} estadio de *S. frugiperda*. Las concentraciones que se obtuvieron (CO/ml) para la caracterización biológica de cada una de las cepas fueron: 2,1×10⁷ para la cepa SfNPV-Ar; 1,1×10⁹ para la cepa SfNPV-Fx; y 1,945×10⁸ CO/ml para la cepa SfNPV-

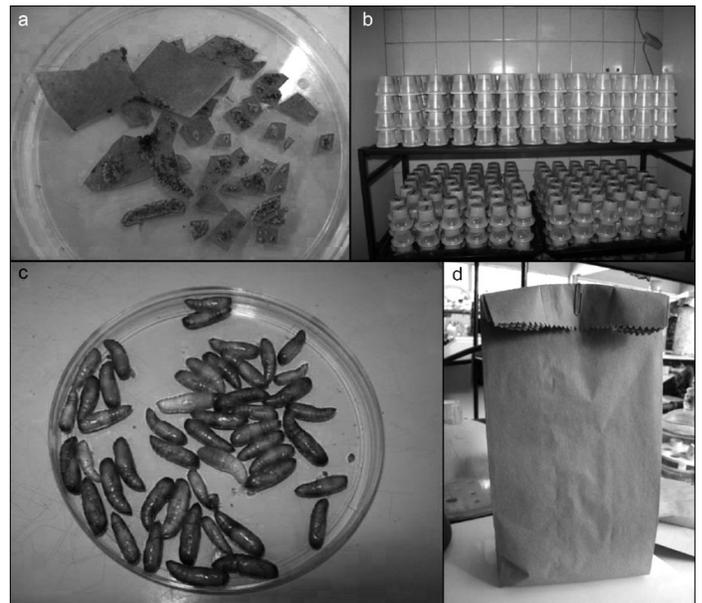


Figura 1. Establecimiento de la colonia de *S. frugiperda*. a: huevos, b: larvas de distintos estadios, c: pupas, y d: bolsas de papel estraza con adultos.

Ho. Las concentraciones obtenidas (CO/ml) de cada una de las cepas para la caracterización molecular fueron: para SfNPV-Ar 4,495×10⁸ CO/ml; 1,88×10⁸ para la cepa SfNPV-Fx y para la cepa SfNPV-Ho 2,755×10⁸.

Bioensayos

Se realizaron bioensayos con las tres cepas de baculovirus en días diferentes. El número de repeticiones varió para cada una de las cepas. Fue necesario realizar 30 repeticiones en días diferentes para la cepa SfNPV-Ar, 34 repeticiones para SfNPV-Fx y 35 repeticiones para SfNPV-Ho, hasta que se obtuvo como mínimo tres repeticiones válidas, que cumplieran con los parámetros estadísticos antes mencionados, para estimar la

CL₅₀. En la Tabla I se reportan las CL₅₀ promedio estimadas para las tres cepas en estudio y los parámetros estadísticos obtenidos posteriores a la evaluación de la mortalidad mediante el análisis Probit. Las CL₅₀ estimadas para las cepas SfNPV-Ar, SfNPV-Fx y SfNPV-Ho fueron de 49.181,30; 145.162,25; y 185.035,9 CO/ml, respectivamente. En base a las CL₅₀ estimadas, es evidente que la cepa más agresiva contra la población mexicana de *S. frugiperda* en la zona del Bajío fue SfNPV-Ar, ya que para ésta se obtuvo la menor CL₅₀, lo cual implica que se requiere una menor cantidad de CO para matar a las larvas probadas. Por otro lado, la cepa SfNPV-Fx presentó un nivel de virulencia moderado contra las larvas de *S. frugiperda*.

TABLA I
COMPARACIÓN DE CL₅₀ Y DATOS ESTADÍSTICOS DE BIOENSAYOS GLOBALES DE CEPAS DE BACULOVIRUS SfNPV, CON ACTIVIDAD HACIA *Spodoptera frugiperda*

Cepa	CL ₅₀ estimada CO/ml	Cociente LFS/LFI	P	X ²	MN (%)	Equilibrio de dosis	DM	LFS	LFI
SfNPV-Ar	49.181,30	3,29	1,72	4,5	10	Aceptado	Aceptado	90.584,29	27.493,17
SfNPV-Fx	145.162,2	3,43	1,45	4,8	10	Aceptado	Aceptado	270.050,3	78.554,43
SfNPV-Ho	185.035,9	3,32	2,06	1,4	6	Aceptado	Aceptado	337.348,3	101.582,8

CL₅₀: concentración letal media, LFS: limite fiducial superior, LFI: limite fiducial inferior, P: pendiente, MN: mortalidad natural.

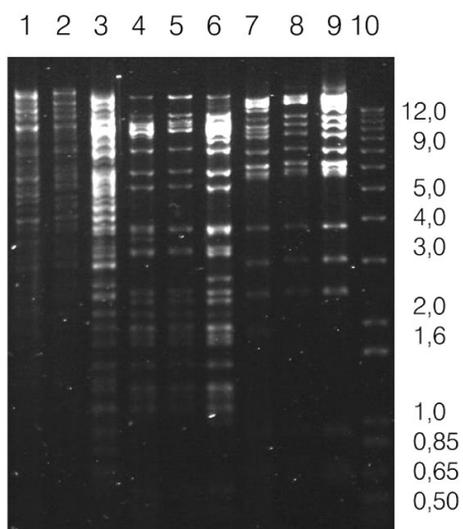


Figura 2. Patrones con endonucleasas de restricción de cepas de SfNPV. Carril 1: SfNPV-Ar (BamHI), carril 2: SfNPV-Fx (BamHI), carril 3: SfNPV-Ho (BamHI), carril 4: SfNPV-Ar (EcoRI), carril 5: SfNPV-Fx (EcoRI), carril 6: SfNPV-Ho (EcoRI), carril 7: SfNPV-Ar (HindIII), carril 8: SfNPV-Fx (HindIII), carril 9: SfNPV-Ho (HindIII) y carril 10: marcador de peso molecular en kb, Ladder 1 kb Plus (Invitrogen).

Finalmente la cepa SfNPV-Ho, fue la menos efectiva en el control del gusano cogollero en México, debido a su elevada CL_{50} estimada.

Patrones de restricción del ADN

En la Figura 2 se presentan los fragmentos de restricción obtenidos al digerir el ADN de las tres cepas de SfNPV con tres diferentes endonucleasas de restricción, BamHI, EcoRI y HindIII. Las tres cepas mostraron similitudes en sus patrones de restricción de ADN, pero patrones distintivos con las tres endonucleasas de restricción usadas. Los fragmentos de restricción obtenidos con la endonucleasa BamHI, mostraron que la cepa SfNPV-Ar posee un total de 22 bandas, de las cuales dos (12000 y 4700pb), no están presentes en las demás cepas (Figura 2, carril 1). La cepa SfNPV-Fx posee un total de 20 bandas, de las cuales dos (>12000 y 8000pb) no se encontraron en SfNPV-Ar ni en SfNPV-Ho (Figura 2, carril 2). Finalmente, la cepa SfNPV-Ho mostró

un total de 29 bandas, de las cuales nueve fueron exclusivas para ella (8800, 7900, 3.300, 2900, 2600, 2500 y 2200pb) ya que no se observaron en las otras dos cepas (Figura 2, carril 3). Los fragmentos que se obtuvieron con la endonucleasa de restricción EcoRI, mostraron que la cepa SfNPV-Ar presentó 21 fragmentos que oscilaron entre los 1650pb y de >12000pb, con dos fragmentos exclusivos (8500 y 3500pb) que están ausentes en las otras dos cepas (Figura 2, carril 4). La cepa SfNPV-Fx mostró 17 fragmentos de restricción (Figura 2, carril 5), no se observaron los dobletes de fragmentos de 3900 y 3300pb, que sí presentaron las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-Ho, sino que ésta presentó una sola banda en ambos casos. La cepa SfNPV-Ho mostró un total de 22 bandas cuyos pesos moleculares oscilaron entre los 1650 y >12.000pb, con cuatro tipos de fragmentos exclusivos ausentes en las otras dos cepas estudiadas (un doblete >12000pb, 8000, 3100 y 2800pb; Figura 2, carril 6).

En los fragmentos de restricción obtenidos con la endonucleasa HindIII, para la cepa SfNPV-Ar (Figura 2, carril 7) se observó un total de 13 bandas, de las cuales seis (1650, 6900, 8000, 9000 y 10000pb), fueron exclusivas para esta cepa. La cepa SfNPV-Fx mostró un total de 12 fragmentos, carece de la banda de 12000pb, la cual está presente en las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-Ho (Figura 2, carril 8). También se observó la presencia, en la cepa SfNPV-Ho, de un total de 14 bandas, de las cuales una de peso molecular >12000pb

no está presente en las otras dos cepas (Figura 2, carril 9).

Patrones de proteínas

El perfil de proteínas de las tres cepas estudiadas fue muy similar. Todas presentaron alrededor de 20 proteínas que fluctuaron entre los 220 y 10kDa. La cepa SfNPV-Ar mostró un total de 12 bandas cuyo peso molecular oscila entre los 10 y 220KDa (Figura 3, carril 1). La cepa SfNPV-Fx presentó un total de 16 bandas, de las cuales siete de ellas (70, 50, 48, 40, 15, 14 y 12kDa) se observan más claramente que en las otras dos cepas (Figura 3, carril 2). Para la cepa SfNPV-Ho (Figura 3, carril 3) se observan seis bandas, destacándose la presencia de una banda alrededor de los 28KDa, correspondiente a la proteína poliedrina. La hiperexpresión de esta proteína fue claramente visible en las tres cepas estudiadas y su peso molecular se estimó en ~28KDa. También fue posible observar la presencia de la proteína p10 en las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-Fx (Figura 3, carriles 1 y 2).

Discusión

En este trabajo se caracterizaron a diferentes niveles tres cepas exóticas de SfNPV, con actividad hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*. En lo relacionado con la caracterización biológica, existen diversos reportes relacionados con la evaluación de cepas de SfNPV contra el gusano cogollero, y es importante destacar las diferencias obtenidas entre éstos y los resultados obtenidos en el presente estudio. Para la realización de los bioensayos se usó la técnica de contaminación de la superficie de la dieta, una de las metodologías más usadas para que las larvas adquieran a los baculovirus, pues es la forma que más se asemeja a la forma natural en que las larvas adquieran el inóculo en el campo y es una técnica sumamente fácil de realizar (Hughes y

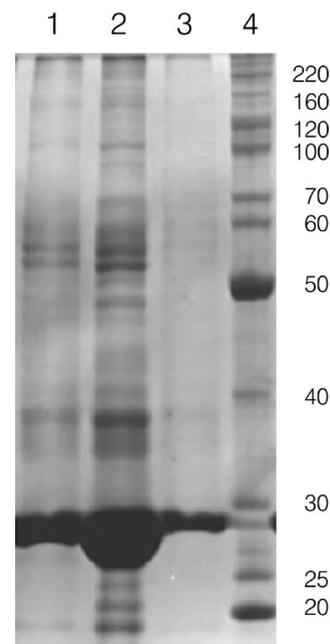


Figura 3. Perfiles de proteínas en SDS/PAGE de las cepas de SfNPV. Carril 1: SfNPV-Ar, carril 2: SfNPV-Fx, carril 3: SfNPV-Ho y carril 4: marcador de peso molecular en kDa, BenchMark (Invitrogen).

Wood, 1986), con la cual se estima una concentración letal media (CL_{50}) en lugar de una DL_{50} (dosis letal media). Se demostró que la cepa SfNPV-Ar fue la más efectiva contra la población mexicana de *S. frugiperda*, ya que presentó una baja CL_{50} ($4,9 \times 10^4$ CO/ml), la que fue 2,95 veces más agresiva que la cepa SfNPV-Fx ($1,45 \times 10^5$ CO/ml) y 3,75 veces más virulenta que la SfNPV-Ho ($1,85 \times 10^5$ CO/ml). Escribano *et al.* (1999), reportaron las CL_{50} de algunos virus SfNPV exóticos, probados contra una población de gusano cogollero de Honduras y estimaron una CL_{50} de $2,04 \times 10^5$ CO/ml para una cepa SfNPV aislada en Nicaragua, la cual fue considerada como la más virulenta en ese estudio. Asimismo, estimaron una CL_{50} de $2,21 \times 10^5$ CO/ml para una cepa de EEUU y una CL_{50} de $3,05 \times 10^6$ CO/ml para una cepa aislada en Argentina. No obstante estos valores bajos, en este trabajo, la CL_{50} obtenida de la cepa más agresiva (SfNPV-Ar), de $4,9 \times 10^4$ CO/ml, fue 4,16 veces menor que la CL_{50} del aislado nicara-

güense, el más agresivo reportado por Escribano *et al.* (1999); fue 4,5 veces menor que la cepa de EEUU y 62,24 veces menor que la cepa argentina. Los citados autores reportaron que la cepa argentina fue la menos virulenta de las tres cepas probadas, mientras que en el presente trabajo fue precisamente una cepa argentina la más agresiva. Por otro lado, la CL_{50} estimada para la cepa SfNPV-Fx en este trabajo fue 1,4 veces menor que la CL_{50} de la cepa nicaragüense, 1,5 veces más baja que la de la cepa norteamericana y 21 veces menor que la de la cepa argentina probadas por Escribano *et al.* (1999). Más aún, la CL_{50} de la cepa menos agresiva del presente estudio, SfNPV-Ho, resultó ser 1,1 veces menor que la cepa más agresiva reportada por Escribano *et al.* (1999); 1,19 veces menor que la cepa probada de EEUU y 16,48 veces menor que la cepa menos agresiva del estudio de los citados autores.

Por otro lado, Vázquez *et al.* (2002) estimaron valores de CL_{50} para una cepa SfNPV peruana, del orden de $4,9 \times 10^9$ CO/larva. Aparentemente estos valores serían muy similares a los obtenidos en el presente trabajo, solamente que la diferencia estriba en que esta CL_{50} se estimó por larva y no por ml. Tomando en cuenta que en los bioensayos practicados solo se adicionaban 150 μ l por caja de Petri de cada concentración, y con estos se alimentaban 10 larvas por caja, de haberse estimado la concentración por larva, esta hubiese sido significativamente más baja que la reportada en Vázquez *et al.* (2002). Adicionalmente, cabe aclarar que estos autores realizaron los bioensayos utilizando hojas de higuerrillas frescas y no mediante la contaminación sobre la superficie de la dieta artificial, como se realizó en este trabajo. En lo relacionado con la amplificación del inóculo viral, Vázquez *et al.* (2002), reportaron amplificaciones del orden de $4,9 \times 10^4$ hasta $1,8 \times 10^5$ CO/ml. En este trabajo se tu-

vieron amplificaciones muchos mayores en cuanto al número de CO/ml, ya que los valores fluctuaron entre $2,1 \times 10^7$ y $1,1 \times 10^9$ CO/ml. Esto permitiría inferir que tal vez alimentar a las larvas con dieta artificial resulta ser más eficiente para la reproducción del virus SfNPV, en comparación con la alimentación en dieta natural.

Yasem de Romero *et al.* (2009) evaluaron la virulencia de aislamientos de SfNPV argentinos y brasileños, estimando valores de CL_{50} del orden de $7,6 \times 10^4$ y $4,5 \times 10^5$ CO/ml utilizando colonias de *S. frugiperda* argentinas, y larvas de 3 y 5 días de eclosionadas. Asimismo, estimaron un valor de $5,9 \times 10^5$ (larvas de 3 días) y $1,5 \times 10^6$ (larvas de 5 días) CO/ml, para las cepas de SfNPV brasileñas. Estos autores no aclaran cual fue el estadio específico de cada bioensayo. No obstante, estos valores de CL_{50} fueron mayores a los valores reportados en el presente trabajo (1,6 veces, para la CL_{50} más baja) contra la población de *S. frugiperda* mexicana, lo cual demostró la alta susceptibilidad de esta plaga a los aislamientos exóticos probados, a pesar de ser aislados de regiones geográficas muy distantes.

Más recientemente, Gómez Valderrama *et al.* (2010) reportaron la actividad biológica de aislamientos nativos de SfNPV en Colombia, contra una población colombiana de *S. frugiperda*. Estos autores encontraron CL_{50} del orden de $2,2 \times 10^5$; 7×10^5 y $2,1 \times 10^6$ CO/ml para tres aislamientos de estos virus. Estos valores son mayores a los reportados en este trabajo, e indican una menor actividad de sus aislados con respecto los evaluados en este trabajo. Más aún, la cepa más agresiva del presente estudio fue 4,5 veces más virulenta que la cepa más agresiva del citado. Adicionalmente, los bioensayos fueron realizados con larvas neonatas, las que son más susceptibles a la infección con baculovirus. Los bioensayos del presente trabajo se realizaron con larvas de 1^{er}

estadio y aun así, las CL_{50} reportadas fueron menores.

Una característica esencial para identificar cepas de baculovirus es el análisis con enzimas de restricción. Una vez que se analizaron los patrones de fragmentos de restricción realizados con tres enzimas diferentes a cada una de las cepas de estudio, se determinó su originalidad. Las diferencias estribaron en la presencia o ausencia de dos o más fragmentos entre cada una de las cepas. Estudiando varias cepas de *S. frugiperda*, Smits y Vlák (1988) encontraron que pequeñas diferencias genotípicas entre cepas no influía en su actividad patológica. Aunque en este trabajo se encontraron pequeñas diferencias, presencia, peso o ausencia de dos o más bandas entre las cepas SfNPV-Ar y SfNPV-Ho, esto no coincidió con lo expuesto por Smits y Vlák (1988), pues entre estas dos cepas, las CL_{50} estimadas demostraron diferencias estadísticas, pues los límites fiduciales no se superpusieron (Tabla I), y la CL_{50} de SfNPV-Ar fue 3,75 veces más baja que la de SfNPV-Ho.

Por otro lado, entre las cepas SfNPV-Fx y SfNPV-Ho se obtuvieron las mayores diferencias en el número y peso de los fragmentos de restricción y sus CL_{50} no mostraron diferencias estadísticas, ya que los límites fiduciales se superponen (Tabla I). Es probable que a nivel genómico, estas diferencias pudieran estar influyendo en el nivel de virulencia observado en las CL_{50} de cada una de las cepas. Esta hipótesis podría sustentarse en el hecho que diferentes patrones de restricción podrían ser indicativos de diferencias en los genes involucrados en la virulencia de las cepas, pero se requieren realizar más estudios para corroborarlo. Adicionalmente, los resultados obtenidos en los patrones de fragmentos de restricción en este estudio guardan similitud con aquellos obtenidos por Escribano *et al.* (1999), pues entre cada una de las cepas

analizadas se encontraron pocas diferencias a nivel genómico, pero la diferencia en virulencia de las cepas fue estadísticamente significativa. En el caso de los trabajos realizados con las cepas de SfNPV peruanas (Vázquez *et al.*, 2002), argentinas (Yasem de Romero *et al.*, 2009) y colombianas (Gómez Valderrama *et al.*, 2010) no se puede establecer una conexión entre sus niveles de virulencia y sus diferencias o similitudes genotípicas, debido a que en esos reportes no se realizaron pruebas genotípicas para poder comparar a nivel de ADN a los diferentes aislamientos.

En este trabajo se analizaron las proteínas estructurales de los cuerpos de oclusión mediante geles desnaturantes de poliacrilamida. Se pudo detectar, en las tres cepas de SfNPVs estudiadas, patrones proteínicos muy similares, con pocas o nulas diferencias. Destacó la presencia de las dos proteínas mayoritarias estructurales de los baculovirus, la poliedrina y la p10, entre otras bandas de menor presencia. Ambas proteínas contribuyen a estabilizar los CO cuando éstos se encuentran fuera del insecto y son expuestos al medio ambiente (Adams y McClintock, 1991). Debido a ello, la presencia de las dos proteínas dentro de los CO permitió, por un lado, identificar a un virus como miembro de la familia Baculoviridae, y por el otro, contar con un criterio de identidad para relacionar a cepas de la misma especie (Jehle *et al.*, 2006). En este trabajo se observó que no existían diferencias significativas entre el peso molecular de la poliedrina y p10 de cada una de las cepas analizadas, y éste correspondió al peso molecular observado para otras proteínas de baculovirus de diferentes especies (Volkman *et al.*, 1995). Las similitudes observadas en estas dos principales proteínas estructurales de los baculovirus podría deberse a que ambas proteínas son codificadas por genes altamente conservados entre especies de baculovirus (Jehle *et*

al., 2006). Por otra parte, no necesariamente las similitudes a nivel de proteínas representan una similitud a nivel de ADN y/o de virulencia. Esto quedó evidenciado en este trabajo, ya que aunque las tres cepas mostraron similitudes en sus patrones de proteínas, en lo relacionado con los patrones de fragmentos de restricción a nivel de ADN y en sus niveles de virulencia se demostró que existen suficientes diferencias entre las tres cepas para reconocerlas como cepas distintas.

En base a los resultados obtenidos se puede afirmar que existen cepas de SfNPV exóticas aisladas en otros países americanos, distantes geográficamente de México, con alto potencial para ser usadas en programas de control biológico del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*, con el fin de ofrecer alternativas al uso de productos químicos en el campo. Dentro de las tres cepas de SfNPV estudiadas, se encontró una cepa con alto potencial bioinsecticida, la cepa SfNPV-Ar, la cual podría ser ensayada en programas de control biológico a nivel de campo en México, con el fin de observar su comportamiento bajo condiciones naturales, ya que en condiciones de laboratorio mostró claramente una alta virulencia hacia las larvas de primer estadio del gusano cogollero *S. frugiperda*.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por la Dirección de Investigación y Apoyo al Posgrado de la Universidad de Guanajuato (Proyecto 'Control biológico del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* en el cultivo del maíz utilizando baculovirus entomoptógenos') y por la Fundación Guanajuato Produce, A.C. (Proyecto 587/13 'Evaluación de virus en el control de la población del gusano cogollero en el Estado de Guanajuato'). Jonatan Carmen Rangel Núñez recibió beca de licenciatura por DAIP y CONACYT.

REFERENCIAS

- Adams JR, McClintock T (1991) Baculoviridae: nuclear polyhedrosis viruses of insects. En Adams JR, Bonamo JR (Eds.) *Atlas of Invertebrate Viruses*. CRC. Boca Ratón, FL, EEUU. pp. 87-204.
- Arce Gómez S, Moscardi F, Sosa Gómez DR (1999) Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a aislados geográficos de un virus de poliedrose nuclear. *Pesq. Agropec. Bras.* 34: 1539-1544.
- Berretta M, Ríos M, Sciocco de Cap A (1998) Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *J. Invertebr. Pathol.* 71: 280-282.
- CESAVEG (2013) *Reunion de Trabajo Nacional para Definir Estrategias de Control de Gusano Cogollero* Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato. México. www.cesaveg.org.mx/2012/cogollero.php (Cons. 11/02/2014).
- Del Rincón-Castro MC, Méndez-Lozano J, Ibarra JE (2006) Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Folia Entomol. Mex.* 45: 157-164.
- Escribano A, Williams T, Goulson D, Cave RD, Chapman JW, Caballero P (1999) Selection of a Nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J. Econ. Entomol.* 92: 1079-1085
- Figueroa-Brito R (2002) *Evaluación de extractos vegetales contra el gusano cogollero Spodoptera frugiperda Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México. 248 pp.
- Fuxa JR (1987) *Spodoptera frugiperda* susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration. *Environ. Entomol.* 16: 218-223.
- Georghiou GP, Mellon RB (1983) Pesticide resistance in time and space. En Georghiou GP, Saito T (Eds.) *Pest Resistance to Pesticides*. Plenum. Nueva York, EEUU. pp. 175-205.
- Gill S, Cowles EA, Pietrantonio PV (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.
- Gómez Valderrama JA, Guevara Agudelo EJ, Barrera Cubillos GP, Cotes Prado AM, Villamizar Rivero LF (2010) Aislamiento, identificación y caracterización de nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 63: 5511-5520.
- Hruska AJ, Gladstone C (1987) *El Costo del Gusano Cogollero Spodoptera frugiperda en el Maíz*. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias. Managua, Nicaragua. 25 pp.
- Hu Z, Luijckx T, Van Dinten LC, Van Oers MM, Hajos PJ, Bianchi JA, Van Lent JMW, Zuidema D, Vlack JM (1999) Specificity of polyhedrin in the generation of baculovirus occlusion bodies. *J. Gen. Virol.* 80: 1045-1053.
- Huff JE, Haseman JK (1991) Exposure to certain pesticide may pose real carcinogenic risk. *Chem. En. News* 69: 33-37.
- Hughes PR, Woods HA (1986) *In vivo* and *in vitro* bioassay methods for baculovirus. En Granados RR, Federici BA (Eds.) *The Biology of Baculovirus*. Vol II. CRC. Boca Ratón, FL, EEUU. pp. 1-30.
- Ibarra JE, Federici BA (1987) An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosquito Contr. Assoc.* 3: 187-192.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlack JM (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Arch. Virol.* 151: 1257-1266.
- Lagunes-Tejeda A, Villanueva-Jimenez JA (1994) *Toxicología y Manejo de Insecticidas*. 1ª ed. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. México. 264 pp.
- Molina-Ochoa J, Carpenter JE, Lezama-Gutierrez R, Foster JE, González-Ramírez M, Ángel-Sahagún CA, Fariás-Larios J (2004) Natural distribution of hymenopteran parasitoids of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in Mexico. *Flo. Entomol.* 87: 461-472.
- Moscardi F (1999) Assessment of the application of the baculoviruses for control of lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.
- Pacheco-Covarrubias JJ (1993) Monitoring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* populations from the Yaqui Valley, Son., Mexico. *Resist. Pest Manag. Newslett.* 5: 3-4.
- Polaczyk RA, da Silva RFP, Fiuza LM (2000) Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Braz. J. Microbiol.* 31: 165-167.
- Rodríguez M, De León C (2008) *El Cultivo del Maíz. Temas selectos*. 1ª ed. Colegio de Posgraduados - Mundi-Prensa. México. pp. 29-45.
- SIAP (2012) *Cierre de la Producción Agrícola Maíz de Grano*. México. Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera. México. www.siap.gob.mx/ (Cons. 25/01/2014).
- Smits PH, Vlck JM (1988) Selection of nuclear polyhedrosis viruses as biological control agents of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomophaga* 33: 299-308.
- Szewczyk B, Lobo de Souza M, Batista de Castro ME, Lara M, Moscardi F (2011) Baculovirus Biopesticides. Em Stoytcheva M (Ed.) *Pesticides -Formulations, Effects, Fate*. www.intechopen.com/books/pesticides-formulations-effects-fate/baculovirus-biopesticides
- Vásquez J, Zeddard JL, Tresierra AA (2002) Control biológico del "cogollero del maíz" *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) con el Baculovirus SFVPN, en Iquitos-Perú. *Folia Amaz.* 13: 25-39.
- Vaughn JL (1992) Virus and rickettsia diseases. En Cantwell GE (Ed.) *Insects Diseases*. Vol. 1. Dekker. Nueva York, EEUU. pp. 49-85.
- Vergara OH, Pitre H, Parvin D (2001) Economic evaluation of lepidopterous pest in intercropped sorghum and maize in Southern Honduras. *Trop. Agric.* 78: 190-199.
- Volkman LE, Blissard GW, Friesen P, Keddie BA, Posse RD, Thielman DA (1995) Baculoviridae. En Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Matelli GP, Mayo MA, Summers MD (Eds.) *Virus Taxonomy: Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*. Springer. Nueva York, EEUU. pp. 104-113.
- Williams T, Goulson D, Caballero P, Cisneros J, Martínez AM, Chapman JW, Roman DX, Cave R (1999) Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. *Biol. Contr.* 14: 67-75.
- Wood KA, Wilson BH, Graves JB (1981) Influence of host plant on the susceptibility of the fall armyworm to insecticides. *J. Econ. Entomol.* 74: 96-98.
- Yasem de Romero MG, Romero E, Sosa Gómez D, Willink E (2009) Evaluación de aislamientos de baculovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lep: Noctuidae), plaga clave del maíz en el noroeste argentino. *Rev. Ind. Agric. Tuc.* 86: 7-15.
- Yu SJ (1992) Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 675-691.