

Estructura y clasificación de los baculovirus

PRIMITIVO CABALLERO, TREVOR WILLIAMS Y MIGUEL LÓPEZ-FERBER

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 16 |
| 2. Estructura y composición de los baculovirus | 17 |
| 2.1. La nucleocápsida | 17 |
| 2.2. Los viriones | 19 |
| 2.3. Los cuerpos de inclusión | 21 |
| 3. Clasificación y sistemática de los baculovirus | 24 |
| 3.1. La familia Baculoviridae | 24 |
| 3.2. El género <i>Nucleopolyhedrovirus</i> | 25 |
| 3.3. El género <i>Granulovirus</i> | 28 |
| 4. Características taxonómicas | 30 |
| 4.1. Caracteres morfológicos | 30 |
| 4.2. Caracteres bioquímicos, serológicas y genéticas | 31 |
| 4.3. Caracteres fenotípicos | 36 |
| 5. Conclusiones | 37 |
| 6. Bibliografía | 37 |

P[caāæ/æ āāæāā } Å^Åāæ āāæOæ || cāāæ/æāæ āāæ[Åāæ^ææ
&æ āāæāā } Å^Å } &^} dāæ } Å/Åāā Å^ā/ÅOVXÅ } Åāā ā^ā } c/Åā^885 } K
@q • Åāæ Åāæ[] |ā^ē |* ÅāæÅ^ [|o Åāæ[] |ā^'|^ [|dā • ā } āāā •^•q Åāæ || cāāæ

1. Introducción

Las enfermedades producidas por virus están entre las infecciones de invertebrados más ampliamente estudiadas. Actualmente se conocen más de 1.100 virus patógenos de invertebrados que afectan a un importante número de especies, muchas de las cuales son insectos pertenecientes a más de 12 órdenes (MARTIGNONI E IWAI, 1986). Muchos de estos virus han sido clasificados en 15 familias (ADAMS Y MCCLINTOCK, 1991), pero otros muchos todavía permanecen sin clasificar. Algunas de estas familias, como por ejemplo las familias Baculoviridae, Polydnaviridae y Ascoviridae, sólo contienen virus que son específicos de artrópodos y principalmente de insectos.

Una práctica frecuente con los nuevos virus descubiertos ha sido denominarlos con el mismo nombre del huésped del que fueron aislados por primera vez. En la medida en que se ha ido profundizando en el conocimiento de las características morfológicas, genéticas y bioquímicas de los virus, se han podido identificar diferencias entre grupos de virus que han permitido establecer un sistema de clasificación fundamentado en las características propias del virus. Para impulsar y desarrollar este sistema de clasificación se creó, en 1966, el Comité Internacional de Nomenclatura de Virus que más tarde, en 1974, pasó a llamarse Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Este comité ha recogido los avances producidos en el desarrollo del sistema de clasificación en sucesivos informes, el último de los cuales acaba de ser publicado (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000).

En la taxonomía de virus, la morfología de la partícula infecciosa o virión es un importante carácter morfológico que sirve para asignar el virus a un determinado grupo. Los virus de las familias Baculoviridae, Entomopoxviridae y Reoviridae son únicos debido a la presencia de un cuerpo de inclusión (OB; occlusion body) proteico en el cual uno o más viriones, en una determinada fase de su desarrollo, son incluidos al azar. Los OBs protegen a los viriones cuando son liberados al medio ambiente tras la desintegración del cadáver del huésped.

La familia Baculoviridae es la más numerosa y ampliamente estudiada de todos los grupos de virus patógenos de insectos. Esta familia agrupa a virus de DNA de doble cadena cuyos viriones tienen forma de bastón y, como se ha dicho, están característicamente incluidos en OBs (VOLKMAN *et al.*, 1995). La familia consta de dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (los nucleopoliedrovirus o virus de la poliedrosis nuclear, NPV) y *Granulovirus* (los granulovirus o virus de la granulosis, GV). La infección de los huéspedes ocurre *per os*. En el tubo digestivo de los insectos, donde se dan condiciones alcalinas (pH 9-11), se disuelve la proteína que compone los OBs y se liberan los viriones que se unen a la membrana de las células epiteliales del mesenteron. Los viriones invaden las células, por un proceso de fusión de membranas, y el DNA viral se replica en el núcleo de la célula produciendo, al final del proceso, grandes cantidades de OBs (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986).

Una de las principales razones para estudiar los baculovirus ha sido su considerable potencial para ser utilizados como agentes de control en la lucha contra plagas. Todos los virus de esta familia se caracterizan por tener un estrecho espectro

de huéspedes, y una elevada patogenicidad y virulencia que son características ideales para un bioinsecticida. El cuerpo de inclusión que los caracteriza los hace estables durante largos periodos (JACQUES, 1985) y facilita su aplicación mediante pulverizaciones convencionales. Además, el uso insecticida de los baculovirus, debido a su estrecho espectro de huéspedes (GRÖNER, 1986) y a la ausencia de otros posibles efectos perjudiciales, no parece entrañar riesgos ambientales mayores.

2. Estructura y composición de los baculovirus

2.1. La nucleocápsida

En todos los baculovirus la estructura básica de la nucleocápsida es la misma y su función es la de transportar la información genética del virus, en una forma altamente compactada, hasta la célula huésped (FEDERICI, 1986). Dicha estructura consiste en una vaina o cápsida cilíndrica, tapada en ambos extremos (base y tapa), cuyo interior constituye el núcleo donde se encuentra el ADN genómico enrollado y condensado (Figura 1). Las nucleocápsidas tienen un diámetro medio comprendido entre 30 y 60 nm y una longitud de entre 250 y 300 nm, aunque la longitud está sujeta a variación entre distintos virus ya que parece ser proporcional al tamaño de sus genomas (FEDERICI, 1986; TANADA Y HESS, 1991).

El tamaño del genoma puede oscilar entre 80 y 180 kilopares de bases (kb) y está organizado en una única molécula circular de ADN, de doble cadena, que contiene entre 100 y 200 genes algunos de los cuales se encuentran repetidos (AYRES *et al.*, 1994; AHRENS *et al.*, 1997; IJEL *et al.*, 1999; GOMI *et al.*, 1999; KUZIO *et al.*, 1999; HAYAKAWA *et al.*, 1999). La forma altamente condensada en que se encuentra el ADN genómico en el núcleo es posible gracias a una proteína básica, rica en arginina, denominada P6.9, la cual se une al ADN neutralizando sus residuos ácidos (FUNK *et al.*, 1997). El ADN purificado de los baculovirus es capaz de iniciar la infección y producir virus viable, por transfección de células susceptibles cultivadas *in vitro* (POTTER Y MILLER, 1980) o por inyección intrahemocélica de larvas susceptibles (CROIZIER *et al.*, 1988). Esto sugiere que, al contrario de lo que ocurre con otros virus de animales, las proteínas asociadas con las nucleocápsidas u otras estructuras del virus no son esenciales para su replicación.

El modelo actualmente aceptado de la estructura de la cápsida consiste en una serie de anillos apilados perpendicularmente que configuran la forma cilíndrica (FEDERICI, 1986). Todos los anillos están formados por un número constante de subunidades proteicas (BURLEY *et al.*, 1982) y entre un anillo y el siguiente hay una separación aproximada de 4.5 nm (BEATON Y FILSHIE, 1976). El componente más abundante de esta estructura es la proteína VP39, codificada por la pauta de lectura abierta 89 (ORF89; opening reading fragment 89) del nucleopolyhedrovirus de *Autographa californica* AcMNPV (RUSSELL *et al.*, 1991), la cual se encuentra distribuida por toda la superficie de la cápsida sin formar parte de estructuras especializadas. Otros componentes minoritarios son la proteína P24, codificada por la

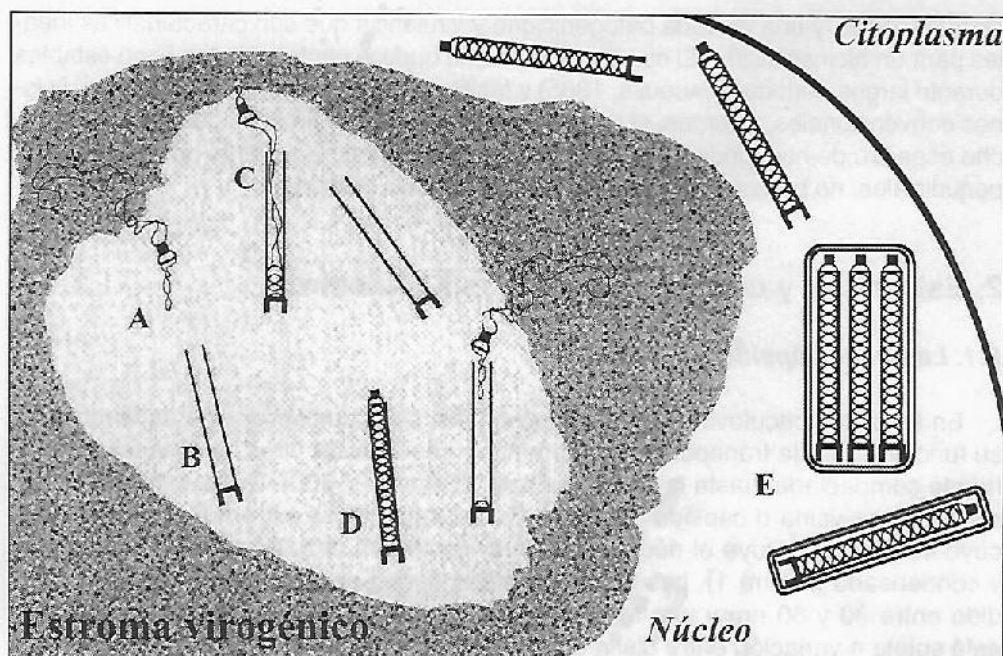


Figura 1. Estructura y morfogénesis de la nucleocápsida y el virión de los baculovirus. (A) Asociación de la tapa y la nucleocápsida en el estroma virogénico. (B) Cápsida vacía en el estroma virogénico. (C) Empaquetamiento de la nucleoproteína en la vaina de la cápsida a través de la estructura de la tapa. (D) Nucleocápsida completa. (E) Virión formado (nucleocápsida con envuelta).

ORF129 de AcMNPV (GOMBART *et al.*, 1989); la proteína P80, codificada por la ORF104 de AcMNPV (MÜLLER *et al.*, 1990); y la fosfoproteína PP78/83, codificada por la ORF9 de AcMNPV (AYRES *et al.*, 1994). Esta última, que se encuentra localizada de forma exclusiva en la base de la cápsida (FUNK *et al.*, 1997), resulta ser un componente esencial tanto para la estructura conservada de la nucleocápsida como para la viabilidad del virus (POSSEE *et al.*, 1991). La proteína VP39 y la fosfoproteína PP78/83 intervienen activamente en el desplazamiento de la nucleocápsida a través de la célula huésped gracias a su asociación con los filamentos de actina (CHARLTON Y VOLKMAN, 1995) (ver el Capítulo 2 de este libro).

Asociada con las cápsidas purificadas también hay una proteína con actividad kinasa que cataliza la fosforilación de la proteína básica P6.9 del núcleo (WILSON Y CONSIGLI, 1985a). Se ha propuesto que esta enzima se activa cuando la nucleocápsida queda alineada con los poros de la membrana nuclear, fosforilando la P6.9 y produciendo el desempaquetamiento del ADN y su liberación en el núcleo de la célula huésped para iniciar la replicación (WILSON Y CONSIGLI, 1985b; MILLER *et al.*, 1983).

2.2. Los viriones

Los viriones son los principales elementos infecciosos de los baculovirus tanto en la dispersión del virus entre los individuos de una población como entre los distintos órganos y tejidos dentro de un mismo huésped. El virión maduro se forma cuando la nucleocápsida adquiere, en un momento determinado de la replicación del virus, una envuelta o membrana que tiene una estructura trilaminar típica compuesta por una capa de lípidos entre dos capas de proteínas (FEDERICI, 1986). Dicha membrana, y por tanto las proteínas, lípidos y ácidos grasos que la componen, puede proceder de dos orígenes distintos que van a dar lugar a dos tipos de viriones diferentes (Figura 2). Algunas nucleocápsidas permanecen en la misma célula en la que han sido sintetizadas y, en tal caso, adquieren una membrana sintetizada *de novo* (STOLTZ *et al.*, 1973), dando lugar a la formación de viriones que, posteriormente, quedan incluidos en cuerpos o matrices de proteínas codificados por el virus. A estos viriones, se les conoce como viriones derivados de cuerpos de inclusión (ODV; occlusion derived virus) (WOOD *et al.*, 1993). Otras nucleocápsidas, una vez han sido sintetizadas, se mueven y abandonan la célula huésped. En este caso, la nucleocápsida adquiere la membrana a partir de la membrana del citoplasma de la célula huésped cuando la atraviesa por puntos concretos donde se encuentra insertada una glicoproteína (GP64 en AcMNPV) codificada por el virus (BLISSARD Y ROHRMANN, 1990). A los viriones que se forman de esta manera se les denomina viriones brotados (BV; budded virus) y se encuentran libres en la cavidad hemocélica de los huéspedes infectados (Figuras 2 y 3). La razón por la cual las nucleocápsidas adquieren una membrana de uno u otro origen no está clara.

Las nucleocápsidas de los ODV y BV tienen la misma estructura y también parecen compartir la mayoría de las proteínas identificadas como componentes estructurales de la cápsida con excepción de la proteína ODV-EC27. Ésta es la única proteína estructural de la cápsida que parece ser específica de los ODV y que no está presente en la cápsida de los BV (BRAUNAGEL *et al.*, 1996a). Aunque la función de esta proteína aún no ha sido determinada, se piensa que puede estar implicada en la ausencia de movilidad de las nucleocápsidas y, por consiguiente, en la membrana que van a adquirir que, como hemos visto, determina el tipo de virión que se va a formar.

Los viriones ODV y BV contienen el mismo genoma pero difieren en su estructura y en la composición en lípidos, ácidos grasos y proteínas de su membrana (BRAUNAGEL Y SUMMERS, 1994). Esto no sólo es un reflejo de su distinta morfogénesis sino que, además, es un indicio de las diferentes funciones que ambos tipos de viriones cumplen en el ciclo biológico de los baculovirus.

Morfológicamente, los viriones ODV pueden ser de dos tipos distintos: los que contienen una sola nucleocápsida por virión, denominados viriones simples (S; single-nucleocapsid), y los que contienen un número variable de nucleocápsidas por virión, denominados viriones múltiples (M; multiple-nucleocapsid) (Figura 2). Los ODV, ya sean de uno u otro tipo, están presentes en todos los baculovirus conocidos. Son los elementos infecciosos responsables de la transmisión horizontal del

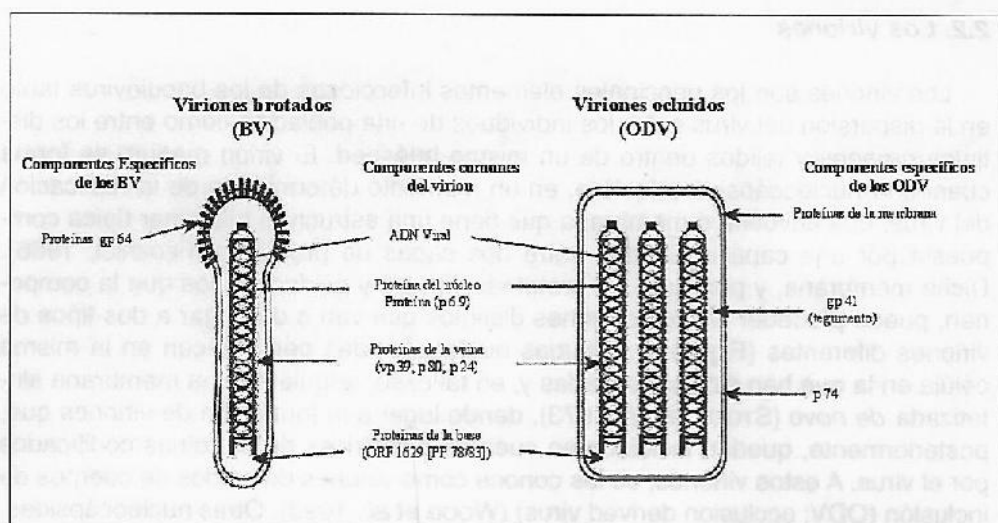


Figura 2. Los dos tipos de viriones de los baculovirus: viriones brotados (BV; budded virus) y viriones incluidos (ODV; occlusion derived virus) y localización de las proteínas estructurales comunes y específicas en el virus prototipo AcMNPV.

virus entre los individuos susceptibles de una población, así como de iniciar la infección primaria en las células epiteliales del mesenteron (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986) (ver Capítulo 2 de este libro).

La membrana de los ODV contiene proteínas únicas (FUNK *et al.*, 1997) que juegan un papel definitivo en la inclusión de estos viriones en cuerpos proteicos y, al parecer, son determinantes para que se lleve a cabo la infección primaria. La proteína P74, cuya función está mejor caracterizada que la de otras proteínas, se sabe que está involucrada en la unión y la fusión de las membranas del virión y la célula huésped para que se produzca la entrada de las nucleocápsidas. Esta proteína resulta ser esencial para que los ODV puedan producir la infección de las células del epitelio del mesenteron pero no es necesaria para la infección *in vitro* (Kuzio *et al.*, 1989). Otras proteínas codificadas por el virus y asociadas con la membrana de los ODV son: la ODV-E66, codificada por la ORF46 de AcMNPV; la ODV-E25 (también conocida como P25), codificada por la ORF94 de AcMNPV; la ODV-E56, codificada por la ORF148 de AcMNPV (BRAUNAGEL *et al.*, 1996b), la ODV-E18 y ODV-E-35, codificadas por las ORF143 y ORF144 de AcMNPV y la ODV-EC27 codificada por la ORF144 de AcMNPV (FUNK *et al.*, 1997). Esta última es la única proteína estructural que aparece tanto en las nucleocápsidas como en la membrana de los ODV y, como se ha dicho antes, es específica de los ODV y no está presente en los BV. Por otra parte, la P25 parece ser una proteína esencial ya que no es posible obtener mutantes del AcMNPV en los que se ha deletado la ORF94 (FUNK *et al.*, 1997).

Entre la nucleocápsida y la membrana de los ODV hay una zona, que aparece perfectamente definida en observaciones al microscopio electrónico (KAWAMOTO Y

KUMADA, 1977), a la que se denomina tegumento y que es donde se cree que se localiza la proteína GP41 (LIU Y MARUNIAK, 1995) cuya función es todavía desconocida.

Característicamente los BV contienen una sola nucleocápsida y son todos morfológicamente iguales (Figura 2). Estos viriones, a diferencia de lo que ocurre con los ODV, son elementos infecciosos que sólo se producen en los baculovirus poliórganotróficos; es decir, en aquellos en los que, además de infectar las células epiteliales del mesenteron, infectan las células de la cavidad hemocélica (FEDERICI, 1997). Los BV entran a las células por endocitosis (VOLKMAN Y GOLDSMITH, 1985) y son los principales responsables de diseminar la infección entre los órganos y tejidos de la cavidad hemocélica del huésped así como en los cultivos de células *in vitro* (MONSMA *et al.*, 1996). El modo de penetración de los BV en la célula huésped, al igual que su papel como elemento infeccioso, dependen del origen y composición proteica de su membrana. El origen, como ya se ha dicho antes, es la membrana del citoplasma de la célula de la que brota y una glicoproteína (GP64 en los virus AcMNPV, BmNPV o OpMNPV, Ld130 en el virus de LdMNPV y equivalentes en otros baculovirus), insertada en ella, que está codificada por uno de los genes del virus (Figura 3) (BUSSARD Y ROHRMANN, 1990; IJKE *et al.*, 2000). Su composición proteica estará, por tanto, en función de la célula huésped en la que se sintetiza la nucleocápsida pero, en cambio, una proteína de fusión como por ejemplo la proteína GP64 o Ld130, está presente en todos los baculovirus secuenciados (FUNK *et al.*, 1997). Esta proteína aparece, típicamente, concentrada en uno de los extremos del virión dando lugar a una estructura específica en forma de espiga o peplomer (VOLKMAN, 1986). La espiga es la que confiere especificidad tisular al virión, está involucrada en la entrada del virión en la célula por endocitosis y resulta ser una proteína esencial para la propagación del virus de una célula a otra (MONSMA *et al.*, 1996).

2.3. Los cuerpos de inclusión

Todos los baculovirus sintetizan al final del proceso infeccioso grandes cantidades de poliedrina o granulina, según el género del virus, las cuales son proteínas que cristalizan formando una matriz o cuerpo de inclusión (OB) con forma de poliedro irregular (poliedrina) o de gránulo (granulina). En los OBs, durante su morfogénesis, quedan incluidos uno o varios viriones ODV, dependiendo del tipo de virus, lo cual les permite preservar su capacidad infecciosa fuera del huésped (Figura 4). Los OBs son insolubles en agua y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos (BENZ, 1986) y también a tratamientos físicos como la congelación, la desecación o la liofilización (JACQUES, 1985), todas las cuales son características que les confieren persistencia en el medio. En cambio, los OBs son solubles en soluciones alcalinas, como las que se dan en el tubo digestivo de algunos insectos (pH 9-11) (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986), lo cual facilita la liberación de los viriones de los OBs para que puedan iniciar una infección. La estructura y los componentes de los OBs han sido objeto de detallados estudios que han sido recogidos en varias revisiones (VLAK Y ROHRMANN, 1985; ROHRMANN, 1986, 1992).

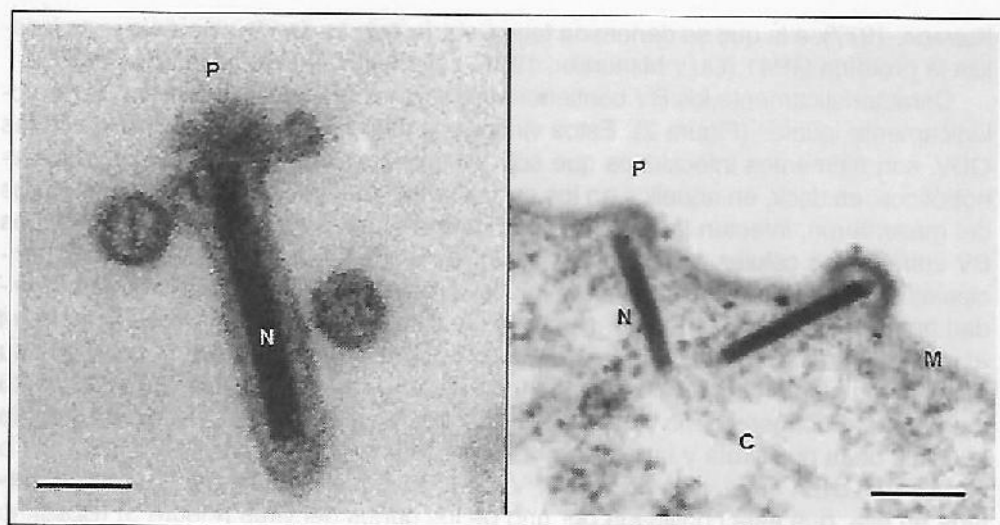


Figura 3. Viriones brotados (BV; budded virus). (A) Observación en coloración negativa de virus brotados de SphiNPV. Barra: 50 nm. (B) Gemación a través de la membrana citoplásmica de los viriones del NPV de *Spodoptera littoralis*. La posición de la proteína de fusión en la membrana sirve como marcador para la localización de la nucleocápsida. P: peplomer. N: nucleocápsida. C: citoplasma. M: membrana citoplásmica. Barra 100 nm.

La poliedrina y granulina son proteínas de alrededor de 245 aminoácidos (29 kDa), para la mayoría de los virus, y constituyen el principal componente de los poliedros o de los gránulos, respectivamente. Son dos proteínas muy conservadas de los baculovirus (FUNK *et al.*, 1997), aunque cada proteína es distinta y difieren unas de otras en su composición cualitativa y cuantitativa de aminoácidos (MARUNIAK, 1986). Los genes de la poliedrina y la granulina han sido secuenciados en un buen número de virus (ROHRMANN, 1992); los más próximos presentan una homología del 97 al 99% en su secuencia de aminoácidos, mientras que en los más alejados la homología es sólo de un 70% (CHOU *et al.*, 1996). Entre las poliedrinas y las granulinas la homología de aminoácidos es de un 50% (ROHRMANN, 1992).

La estructura básica de la matriz proteica es esencialmente la misma en los poliedros y gránulos. Consiste en un entramado de moléculas de proteína (poliedrina o granulina), cada una de las cuales forma un nódulo cúbico con seis caras salientes, en el que cada molécula está orientada de manera que contacta con las seis moléculas vecinas (HARRAP, 1972). La forma en que cristalizan las proteínas no ha sido establecida, pero se ha sugerido que puede ser el resultado de puentes de sal formados por grupos de aminoácidos con grupos carboxílicos (VLAK Y ROHRMANN, 1985) o bien que pueden estar implicados cationes divalentes (WHITT Y MANNING, 1988).

Tanto los poliedros como los gránulos reciben el nombre genérico de cuerpos de inclusión (OB; occlusion bodies) porque, característicamente durante su morfo-

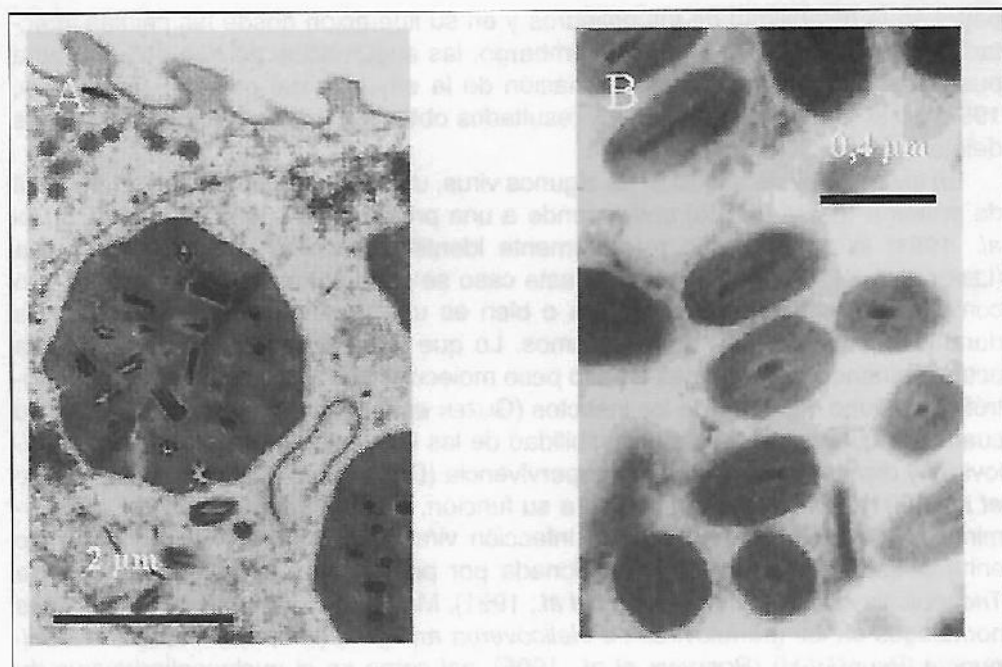


Figura 4. Ultraestructura, observada al microscopio electrónico de transmisión, del cuerpo de inclusión (OB; occlusion body) de un nucleopoliedrovirus (A) y un granulovirus (B) mostrando las nucleocápsidas incluidas.

génesis, quedan incluidos en su interior viriones (Figura 4). Además de los viriones, cuya membrana tiene una gran afinidad tanto con la poliedrina como con la granulina (BLISSARD Y ROHRMANN, 1990), aleatoriamente, pueden quedar incluidas nucleocápsidas desnudas, cápsidas vacías o parcialmente llenas, u otras moléculas presentes en las células infectadas (HESS *et al.*, 1984). Esto, sin embargo, no distorsiona la estructura típica de la matriz (BERGOLD, 1963).

Recubriendo a los poliedros maduros se encuentra una capa densa a los electrones que, en un principio, se pensaba que estaba formada exclusivamente por carbohidratos (MINION *et al.*, 1979). Posteriormente, se ha podido comprobar que otro importante componente de esa capa es una fosfoproteína (PP34), producto de un gen ya identificado en varios virus (GOMBART *et al.*, 1989; BJORNSON Y ROHRMANN, 1992), cuya ausencia produce OBs de menor tamaño y con pequeños cráteres en su superficie (GROSS *et al.*, 1994).

Otro componente que también se encuentra formando parte de los poliedros es la proteína P10 (QUANT-RUSSELL *et al.*, 1987), la cual es el producto de un gen (la ORF137 en AcMNPV) expresado a muy alto nivel en la fase más tardía del proceso infeccioso. Aún no está claro si esta proteína es un componente esencial de los poliedros o si sólo es atrapada al azar durante el proceso de inclusión de los viriones. Hay evidencias que indican que la proteína P10 desempeña un importante

papel en la estabilidad de los poliedros y en su liberación desde las células infectadas (VAN OERS *et al.*, 1993). Sin embargo, las sugerencias de que esta proteína pueda estar involucrada en la formación de la envuelta del poliedro (ROHRMANN, 1992) no son consistentes con los resultados obtenidos en estudios con mutantes deletados (VAN OERS *et al.*, 1993).

En los cuerpos de inclusión de algunos virus, una pequeña parte de la masa total de proteína (hasta un 5%) corresponde a una proteína de 104 kDa (HASHIMOTO *et al.*, 1991) la cual ha sido recientemente identificada como una metaloproteasa (LEPORE *et al.*, 1996). Tampoco en este caso se tiene certeza de si se trata de un componente estructural de los OBs o bien es una proteína que queda atrapada durante la morfogénesis de los mismos. Lo que sí se sabe es que esta proteína actúa digiriendo las proteínas de alto peso molecular que forman la membrana peritrofica del tubo digestivo de los insectos (GIJZEN *et al.*, 1995; LEPORE *et al.*, 1996), lo cual hace que aumente la susceptibilidad de las larvas a las infecciones por baculovirus y disminuya su tiempo de supervivencia (DERKSEN Y GRANADOS, 1988; GALLO *et al.*, 1991). Precisamente, debido a su función, a esta proteína se le da la denominación de factor sinérgico de la infección viral (VEF, viral enhancing factor), o enhancina. La proteína VEF fue clonada por primera vez en el granulovirus de *Trichoplusia ni* (TnGV) (HASHIMOTO *et al.*, 1991). Más tarde se han encontrado genes homólogos en los granulovirus de *Helicoverpa armigera* (HaGV) y *Pseudaletia unipuncta* (PsunGV-H) (ROELVINK *et al.*, 1995), así como en el nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar* (LdMNPV) (Bischoff y Slavicek, 1997).

Tanto en los poliedros (Kozlov *et al.*, 1975) como en los gránulos (TWEETEN *et al.*, 1978) se encuentra asociada una proteasa alcalina, cuyas propiedades son similares a las proteasas aisladas del tubo digestivo de los insectos (RUBINSTEIN Y POLSON, 1983). Esta proteasa produce una rápida digestión de la poliedrina o granulina, una vez han sido disueltas, favoreciendo la liberación de los viriones incluidos. Hay evidencias que sugieren que esta proteasa no es un componente de los OBs y que más bien es producto de una contaminación derivada del tubo digestivo de los insectos. Por un lado, se ha podido comprobar que si a las larvas infectadas se les elimina el tubo digestivo, antes de purificar el virus, se consiguen OBs casi exentos de proteasa (NAGATA Y TANADA, 1983) y, por otro lado, se tiene la certeza de que los OBs de los baculovirus producidos *in vitro* no contienen la proteasa (ZUMMER Y FAULKNER, 1979).

3. Clasificación y sistemática de los baculovirus

3.1. La familia Baculoviridae

Los baculovirus son un grupo de virus patógenos de artrópodos que deben su nombre (baculo) a la forma de varilla o bastón (*baculum* = bastón) de sus viriones. La clasificación actual de la familia Baculoviridae (BLISSARD *et al.*, 2000) incluye a todos aquellos virus cuyos viriones presentan una estructura como la descrita ante-

riormente y que, además, en un momento determinado del ciclo biológico, son incluidos en matrices de naturaleza proteica u OBs como los descritas en el apartado anterior. La familia está dividida en los géneros *Nucleopolyhedrovirus* (comúnmente denominados nucleopoliedrovirus o NPVs) y *Granulovirus* (comúnmente denominados granulovirus o GVs) (Figura 5). Ambos géneros se diferencian por la morfología (forma, tamaño y estructura) de sus OBs y también en aspectos citopatológicos que son de interés taxonómico y fáciles de observar al microscopio óptico. Por ejemplo, en los NPVs la morfogénesis de los OBs tiene lugar en el núcleo de la célula infectada, mientras que, en los GVs esta morfogénesis ocurre una vez que se ha producido la rotura de la membrana nuclear de la célula infectada (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986; Crook, 1991). Clasificaciones anteriores también situaban dentro de esta familia a virus no incluidos (NOV, nonoccluded viruses) cuyos viriones tienen las mismas características morfológicas y estructurales que las descritas para los baculovirus (BILIMORIA, 1986; FRANCKI *et al.*, 1991).

En el género *Nucleopolyhedrovirus* los OBs de las distintas especies de virus pueden variar entre 0,5 y 15 μm de diámetro, aunque el tamaño medio más frecuente oscila entre 0,8 y 2 μm , y su forma puede ser un cubo, un dodecaedro, un tetraedro o, más generalmente, suelen tener formas irregulares (Figuras 6A, B, y C) (FEDERICI, 1986). Cada OB típicamente contiene muchos viriones y, dependiendo del tipo de viriones ODV, se reconocen dos tipos morfológicos: aquellos que sólo contienen ODVs de tipo simple, que son conocidos como SNPVs, y los que contienen ODVs de tipo múltiple que abreviadamente se les denomina MNPVs (Figura 4A). La existencia de estos tipos morfológicos se ha utilizado anteriormente para establecer dos subgéneros dentro del género *Nucleopolyhedrovirus* (FRANCKI *et al.*, 1991). Sin embargo, la existencia de estos morfotipos (SNPV y MNPV) actualmente no parece tener ningún significado filogenético.

En el género *Granulovirus* los OBs de las distintas especies suelen ser de tamaños bastante homogéneos, oscilan entre 160-300 nm de ancho por 300-500 nm de largo, y generalmente son de forma granular (se asemejan a óvalos) (Figura 6D). Cada OB contiene un sólo virión de tipo simple (Figura 4B), aunque existen algunas excepciones como luego veremos.

3.2. El género *Nucleopolyhedrovirus*

Los nucleopolyhedrovirus (NPVs) han sido aislados de más de 400 especies pertenecientes en su mayor parte al orden Lepidoptera, y en menor medida a los ordenes Hymenoptera, Diptera, Coleoptera, Thysanura y Trichoptera, de la clase Insecta, y en algunas especies pertenecientes al orden Decapoda de la clase Crustacea (VOLKMAN *et al.*, 1995). Aquí conviene señalar que el espectro de huéspedes de los MNPVs está limitado a especies del orden Lepidoptera mientras que los SNPVs se han aislados de una diversidad de huéspedes mucho mayor.

La mayoría de los NPVs aislados han sido identificados atendiendo a las características morfológicas de los OBs, los síntomas groseros de la infección (cambio de color del tegumento, aparición de diarreas, cese de la alimentación, retraso del

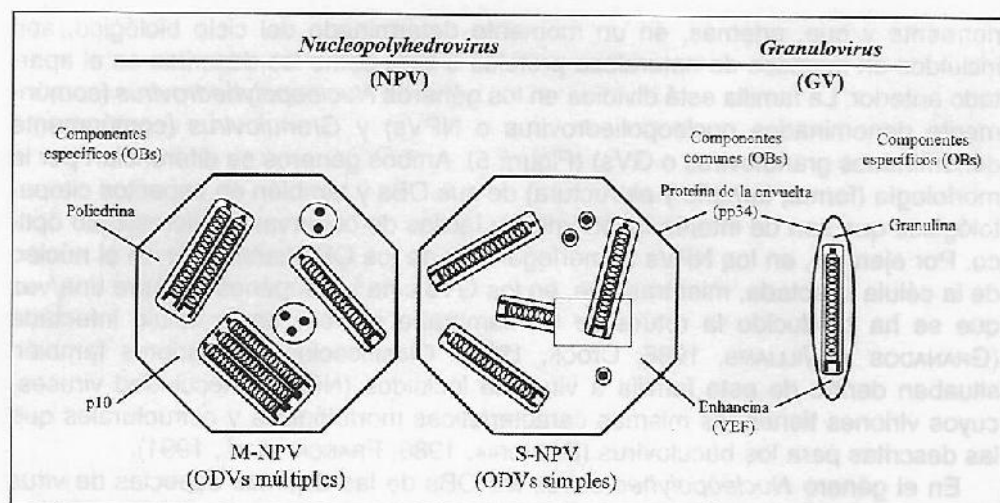


Figura 5. Representación esquemática de las características morfológicas y composición proteica de los cuerpos de inclusión (OBs) de los géneros *Nucleopolyhedrovirus* y *Granulovirus* de la familia Baculoviridae. Los nucleopolyhedrovirus que contienen viriones ODVs de tipo múltiple se denominan (MNPV) y los que contienen ODVs de tipo simple se denominan SNPV.

crecimiento, oscurecimiento del tegumento, muerte con licuación de los tejidos internos, etc.) y las especies huéspedes de las que han sido aislados (BILIMORIA, 1986). En un principio se pensaba que los baculovirus sólo podían infectar a un solo huésped y que, en consecuencia, no se producían infecciones cruzadas (GRÖNER, 1986). Por esta razón, para denominar a los baculovirus se hizo uso del nombre binomial en latín (nombre científico) del huésped del cual eran aislados. Sin embargo, hoy se sabe que la especificidad de los baculovirus no se restringe a un solo huésped y que un mismo huésped puede ser infectado por dos o más baculovirus distintos. Un claro ejemplo lo constituyen los NPVs de *Autographa californica*, *Mamestra brassicae* y *Anagrapha falcifera* que son infecciosos para especies pertenecientes a varias familias del orden Lepidoptera (GRÖNER, 1986; HOSTETTER y PUTLER, 1991), mientras que el espectro de huéspedes de la mayoría de los NPVs se limita a pocas especies de un mismo género. Los NPVs con especificidad absoluta, para un solo huésped, son más bien la excepción que la regla y sólo de alguno de ellos, como el NPV de *Spodoptera exigua*, se disponen de estudios detallados que permiten confirmar dicha especificidad (GRÖNER, 1986; CABALLERO *et al.*, 1992b).

Esta circunstancia introduce una importante inconsistencia al sistema adoptado para denominar a los baculovirus por las siguientes razones: 1) el mismo virus puede ser aislado de más de una especie huésped y, por tanto, se le asignaría más de un nombre y 2) dos o más virus pueden ser aislados de una misma especie huésped y, en consecuencia, dos virus distintos tendrían el mismo nombre. Por

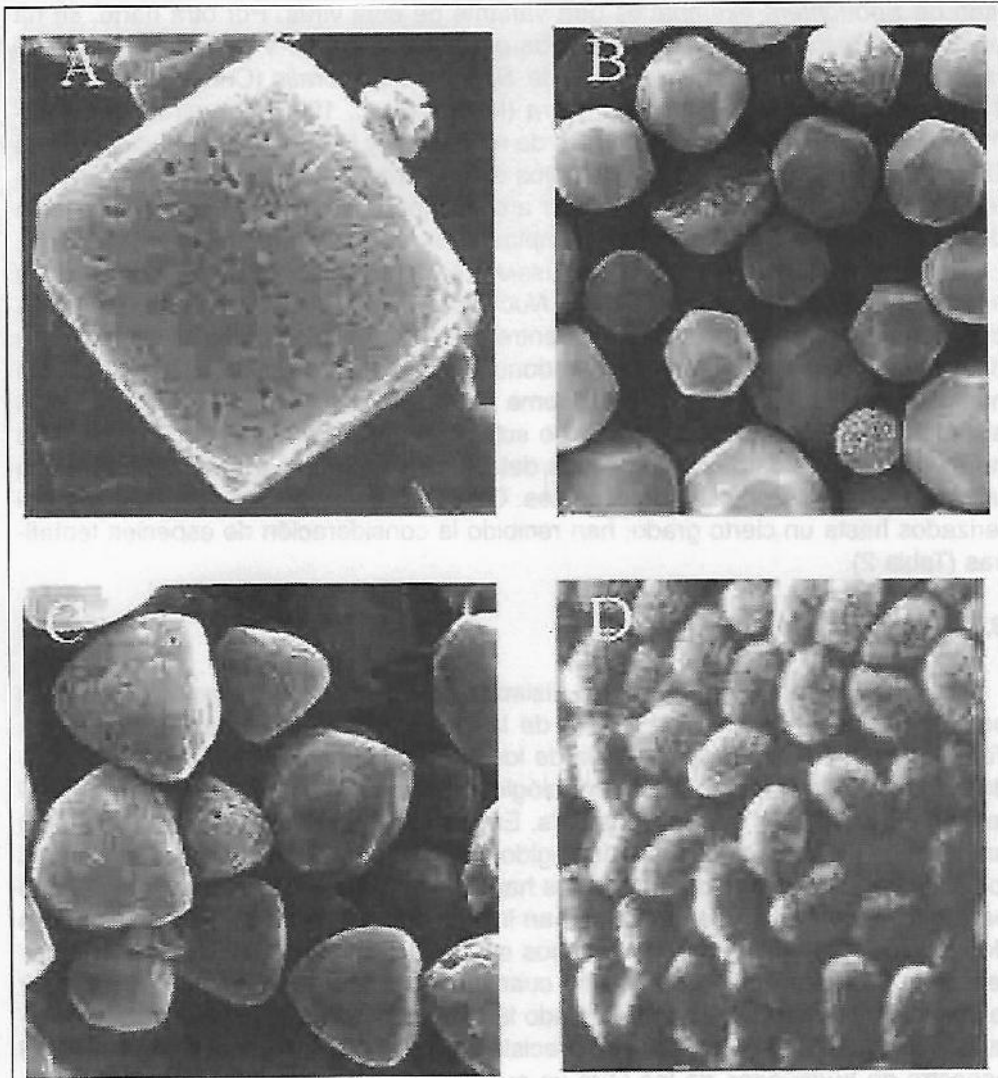


Figura 6. Cuerpos de inclusión (OB; occlusion body) de los baculovirus, observados al microscopio electrónico de barrido. La forma de los nucleopoliedrovirus varía según la especie de virus: cúbicos para AcMNPV (A), icosaédricos para BmNPV (B) o piramidales en el caso de SplNPV (C). Las marcas que se observan en la superficie de los poliedros corresponden a las huellas de viriones que se han desprendido. Los granulovirus son más homogéneos tanto en la forma como en el tamaño de sus OBs; los de esta figura (D) corresponden al granulovirus de la polilla de la patata, *Phthorimaea operculella*.

ejemplo, los NPVs aislados de *Autographa californica*, *Galleria mellonella*, y *Trichoplusia ni* se ha demostrado que son variantes de una sola especie de virus (SMITH Y SUMMERS, 1979). Cochran *et al.* (1986) también consideran que el NPV ais-

lado de *Spodoptera exempta* es otra variante de este virus. Por otra parte, se ha podido demostrar que distintos aislados geográficos del NPV de *Agrotis segetum* (ALLAWAY Y PAYNE, 1983) y del NPV de *Spodoptera littoralis* (CHERRY Y SUMMERS, 1985), y del NPV de *Spodoptera litura* (MAEDA *et al.*, 1990) son virus completamente distintos en base a sus perfiles de restricción y la falta de hibridación de sus DNA genómicos. Estos simples ejemplos demuestran que la utilización de este sistema de nomenclatura puede conducir a confusión en la taxonomía y clasificación de los baculovirus y que debe ser cambiado por un método más fiable.

En el último informe del ICTV (BLISSARD *et al.*, 2000) sólo se aceptaron doce especies definidas dentro del género *Nucleopolyhedrovirus* (Tabla 1). Estas especies son perfectamente distinguibles entre sí por datos tales como su espectro de huéspedes, perfiles de ADN con endonucleasas de restricción y secuencia de nucleótidos de fragmentos o del genoma entero. Sin embargo, la mayoría de los aislados de NPVs todavía no han sido suficientemente caracterizados o bien aún no se dispone de datos comparativos detallados que permitan definir parámetros utilizables en la descripción de especies. Otros siete aislados, que han sido caracterizados hasta un cierto grado, han recibido la consideración de especies tentativas (Tabla 2).

3.3. El género Granulovirus

Los granulovirus (GVs) han sido aislados de más de 100 especies todas ellas pertenecientes al orden Lepidoptera de la clase Insecta (Volkman *et al.*, 1995). También en este género, la mayoría de los aislados conocidos han sido identificados sólo por sus características morfológicas que, como se ha dicho anteriormente, son muy similares en todos los GV. En general, se admite que los GV tienen un espectro de huéspedes más restringido que los NPVs. Sin embargo, en los GV los estudios de espectro de huéspedes han sido muy limitados ya que se ha hecho para muy pocos virus y, en general, han incluido un reducido número de especies de insectos. En la mayoría de los casos en los que se ha podido verificar la existencia de infección cruzada, no se ha cuantificado la dosis requerida para producir la infección y tampoco se ha confirmado la identidad del virus causante de la mortalidad (CROOK, 1991). Esta falta de precisión dificulta nuestro conocimiento real del espectro de huéspedes de los GV ya que en algunos casos se ha podido comprobar que en lugar de replicarse el virus utilizado como inóculo se replica el virus homólogo del insecto (CROOK, 1991). No obstante, se tiene constancia de que algunos GV entre los cuales cabe incluir a los de *Cydia pomonella*, *Heliothis armigera*, y *Scotogramma trifolii* tienen un espectro de huéspedes que abarca especies pertenecientes a dos o más géneros (CROOK, 1991).

Hasta la fecha, sólo un limitado número de GV han sido comparados por técnicas con un mayor poder discriminatorio como pueden ser la serología, el análisis de péptidos estructurales, hibridación de ADN y análisis del genoma con enzimas de restricción. Estos estudios han permitido establecer cinco especies en el género y una variante (Tabla 3).

Tabla 1. Especies descritas en el género *Nucleopolyhedrovirus* y abreviaturas utilizadas.

| Nombre de la especie | Abreviatura |
|--------------------------------------|-------------|
| <i>Anticarsia gemmatilis</i> MNPV | (AgMNPV) |
| <i>Autographa californica</i> MNPV | (AcMNPV) |
| <i>Anagrapha falcifera</i> NPV | (AnfaMNPV) |
| <i>Galleria mellonella</i> MNPV | (GmMNPV) |
| <i>Rachiplusia ou</i> MNPV | (RoMNPV) |
| <i>Spodoptera exempta</i> MNPV | (SpexMNPV) |
| <i>Trichoplusia ni</i> MNPV | (TnMNPV) |
| <i>Bombyx mori</i> NPV | (BmNPV) |
| <i>Choristoneura fumiferana</i> MNPV | (CfMNPV) |
| <i>Helicoverpa zea</i> SNPV | (HzSNPV) |
| <i>Lymantria dispar</i> MNPV | (LdMNPV) |
| <i>Mamestra brassicae</i> MNPV | (MbMNPV) |
| <i>Neodiprion sertifer</i> NPV | (NeseNPV) |
| <i>Orygia pseudotsugata</i> MNPV | (OpMNPV) |
| <i>Spodoptera exigua</i> MNPV | (SeMNPV) |
| <i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV | (SfMNPV) |
| <i>Trichoplusia ni</i> SNPV | (TnSNPV) |

Tabla 2. Especies tentativas en el género *Nucleopolyhedrovirus* y abreviaturas utilizadas.

| Nombre de la especie | Abreviatura |
|----------------------------------|-------------|
| <i>Aedes sollicitans</i> NPV | (AesoNPV) |
| <i>Orygia pseudotsugata</i> SNPV | (OpSNPV) |
| <i>Penaeus monodon</i> NPV | (PemoNPV) |
| <i>Panolis flammea</i> NPV | (PafNPV) |
| <i>Spodoptera littoralis</i> NPV | (SpliNPV) |
| <i>Spodoptera litura</i> NPV | (SpltNPV) |
| <i>Tipula paludosa</i> NPV | (TipaNPV) |

Tabla 3. Especies descritas en el género *Granulovirus* y abreviaturas utilizadas.

| Nombre de la especie | Abreviatura |
|---------------------------------|----------------|
| <i>Artogeia rapae</i> GV | (ArGV) |
| <i>Pieris brassicae</i> GV | (PbGV, ArGV-1) |
| <i>Cydia pomonella</i> GV | (CpGV) |
| <i>Plodia interpunctella</i> GV | (PiGV) |
| <i>Trichoplusia ni</i> GV | (TnGV) |
| <i>Xestia c-nigrum</i> GV | (XecnGV) |

4. Características taxonómicas

Las larvas infectadas por baculovirus exhiben un conjunto de síntomas característicos que empiezan a manifestarse uno o varios días después de haberse iniciado la infección. Los primeros síntomas que se aprecian son cambios de color del tegumento y del comportamiento de larvas. Éstas pueden distribuirse de una manera atípica sobre el sustrato alimenticio y pueden llegar a abandonarlo (VASCONCELOS *et al.*, 1996). Las larvas pierden el apetito y poco después cesan de alimentarse por lo que crecen más lentamente. La muerte se produce por desintegración de los tejidos y órganos y poco después se oscurece el tegumento. En las larvas muertas o moribundas el tegumento es generalmente muy frágil y se rompe con facilidad, liberando el contenido líquido con millones de OBs (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986).

Muchos de estos síntomas son comunes a la mayoría de los baculovirus y, por lo tanto, no son relevantes para discriminar entre virus por debajo del rango taxonómico de familia. Las identificaciones a nivel de género se basan en características morfológicas, mientras que las identificaciones específicas requieren del conocimiento de características bioquímicas, genéticas, serológicas y biológicas.

4.1. Caracteres morfológicos

En virología de insectos, las características morfológicas constituyen una herramienta útil para la identificación de los virus hasta un cierto rango taxonómico. Por observaciones al microscopio óptico es fácil separar los virus patógenos de insectos no incluidos, de los que se conocen unas diez familias, de los virus incluidos que se encuentran agrupados en las familias Baculoviridae, Reoviridae y Entomopoxviridae (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000). A veces, los OBs de virus pertenecientes a distintas familias pueden ser muy parecidos tanto en su forma como en su tamaño y, en tal caso, su distinción requiere de consideraciones adicionales. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, con los NPVs de la familia Baculoviridae y los virus de la poliedrosis citoplásmica (CPVs) de la familia Reoviridae. La distinción de los NPVs y CPVs es posible, por observación al microscopio óptico, ya que los OBs se localizan en el núcleo de las células infectadas, si se trata de un NPV, y en el citoplasma si la infección ha sido originada por un CPV. Adicionalmente los OBs de los NPVs y CPVs pueden ser distinguidos por tinción diferencial (POINAR Y THOMAS, 1984; BILIMORIA, 1986). Los OBs de los entomopoxvirus suelen tener grandes y con formas esferoidales u ovoidales que son fácilmente distinguibles de los NPVs y de los GVs. Una forma inequívoca de distinguir entre las tres familias es mediante observación de cortes ultrafinos de los OBs al microscopio electrónico de transmisión (BILIMORIA, 1986).

Dentro de la familia Baculoviridae, los GVs y NPVs se distinguen fácilmente por la forma y tamaño de sus OBs. En los NPVs, los OBs son perfectamente visibles al microscopio óptico por su tamaño (0,5 y 15 μm de diámetro) y, en contraste de fases, producen un brillo característico por ser altamente refráctiles. En los GVs, en

cambio, el tamaño de los OBs (0,16-0,3 μm de ancho por 0,3-0,5 μm de largo) está en el límite de resolución del microscopio óptico. En campo oscuro, se observan como pequeños puntos brillantes, los cuales tienen un rápido movimiento browniano, mientras que en contraste de fases aparecen como pequeños puntos grises. La observación de células infectadas también resulta útil en el diagnóstico de baculovirus ya que si la infección es por un NPV las células conservan la membrana nuclear, y los OBs se localizan en el núcleo, mientras que si es por un GV la membrana nuclear se rompe antes de la morfogénesis de los OBs (FEDERICI, 1997). En las células infectadas por GVs es frecuente, además, observar vesículas esféricas repletas de OBs en movimiento (CROOK, 1991). El microscopio electrónico de barrido también es una herramienta útil que permite hacer un diagnóstico fiable de los NPVs y los GVs por simple observación de sus OBs; mientras que, el microscopio electrónico de transmisión resulta imprescindible para diferenciar los SNPVs de los MNPVs (ADAMS Y MCCLINTOCK, 1991).

Los GVs son relativamente homogéneos en cuanto a la forma y tamaño de sus OBs por lo que esta característica morfológica no tiene utilidad para discriminar entre los distintos virus pertenecientes a este género. En algunos aislados de los GVs de *Plodia interpunctella*, *Archips argyrospila* y *Plutella xylostella* se han descrito OBs con formas atípicas que contienen dos o más viriones los cuales, a su vez, contienen múltiples nucleocápsidas (CROOK, 1991). Sin embargo, estas formas atípicas no parecen ser una característica específica del virus sino que más bien se trata de aberraciones morfológicas causadas por las células en las que se replica el virus. Los NPVs difieren más entre sí tanto por su forma como por su tamaño y, en ocasiones, se han descrito formas características para los OBs de determinados NPVs. Sin embargo, estas diferencias no son recomendables para ser utilizadas como un criterio fiable en la identificación de NPVs. La microscopía electrónica tampoco es una técnica válida para diferenciar entre los NPVs de un mismo morfotipo (SNPVs o MNPVs).

4.2. Caracteres serológicos, bioquímicos y genéticos

El conocimiento de características adicionales de los baculovirus incluye la serología y el análisis de las proteínas estructurales (electroforesis en geles de poliacrilamida, secuencia de aminoácidos) y del ADN genómico (digestión con enzimas de restricción, hibridación de ADN y secuencia de nucleótidos).

En la identificación y clasificación de los baculovirus se han empleado diversas técnicas serológicas cuya utilidad ha sido objeto de varias revisiones (MAZZONE Y TIGNER, 1978; HARRAP Y PAYNE, 1979; BILIMORIA, 1986). La posibilidad de utilizar técnicas serológicas simples para la identificación de baculovirus ha sido demostrada en distintas situaciones incluyendo el caso de baculovirus tan estrechamente relacionados como los NPVs de *Spodoptera littoralis*, *S. exempta* y *S. frugiperda* (HARRAP *et al.*, 1977). Aunque los estudios serológicos han sido útiles para la identificación y clasificación de los baculovirus en el pasado, actualmente prácticamente no se utilizan.

La primera aproximación para conocer las proteínas estructurales de los baculovirus implica la separación de las mismas por su peso molecular. El sistema más ampliamente utilizado para este fin, y el de mayor resolución, es la electroforesis en gel de poliacrilamida, según el método descrito por Laemmli (1970), conocido como SDS-PAGE. Haciendo uso de este método se ha puesto de manifiesto que los viriones de los baculovirus contienen entre 15 y 30 proteínas estructurales (CIBULSKY *et al.*, 1977; SUMMERS Y SMITH, 1978). Algunas de estas proteínas parecen estar muy conservadas en la mayoría de los baculovirus (FUNK *et al.*, 1997); otras, en cambio, son más específicas y ello hace que el SDS-PAGE sea útil para discriminar entre cepas de virus estrechamente relacionadas (MONROE Y MCCARTHY, 1984; ERLANDSON, 1990; CABALLERO *et al.*, 1992b; ESCRIBANO *et al.*, 1999). Haciendo uso de esta misma metodología algunos investigadores han sido capaces de demostrar que existen pequeñas diferencias en la movilidad electroforética de la poliedrina de algunos NPVs (CROIZIER Y CROIZIER, 1977) y de la granulina de algunos GVs (TWEETEN *et al.*, 1981). Estas diferencias, sin embargo, tienen un valor muy limitado en la identificación de baculovirus y tampoco sirven para establecer grupos de interés taxonómico.

El método más preciso, reproducible y ampliamente utilizado para la identificación de los baculovirus es el análisis del DNA genómico mediante: 1) la digestión con endonucleasas de restricción, 2) la construcción de mapas físicos, y 3) la secuencia de nucleótidos de partes del genoma o del genoma entero. Las endonucleasas de restricción (RENS) son enzimas bacterianas que reconocen secuencias específicas en las moléculas de ADN y las cortan produciendo fragmentos únicos de distintos tamaños. Estos fragmentos son separados por electroforesis en geles de agarosa y sus tamaños son determinados por su movilidad relativa durante la electroforesis (SOUTHERN, 1975). Los fragmentos son numerados en orden alfabético, de mayor a menor tamaño, produciendo un determinado perfil de restricción que suele ser característico para cada virus con cada enzima. El tamaño total del genoma se puede obtener sumando el tamaño de todos los fragmentos generados. En otras palabras, con pocas excepciones, para un mismo virus cada enzima produce un perfil distinto y una misma enzima produce perfiles diferentes en virus distintos (ver Figura 1 del Capítulo 4 de este libro).

La movilidad electroforética de los fragmentos generados por una misma enzima en dos virus distintos es un índice de la relación entre ambos virus: la misma o parecida movilidad sugiere proximidad filogenética mientras que distinta movilidad indica falta de relación. Este método ha sido aplicado a un amplio número de baculovirus y ha demostrado ser una poderosa y útil herramienta para la identificación y distinción de virus muy estrechamente relacionados (LEE Y MILLER, 1978; SMITH Y SUMMERS, 1978). Tal vez el ejemplo más clásico y mejor conocido de la utilidad del análisis REN en la identificación de baculovirus es el que ha servido para establecer la relación entre las diferentes cepas del NPV de *A. californica*, aislados de *T. ni*, *Rachopplusia ou*, y *G. mellonella* (MILLER Y DAWES, 1979; SMITH Y SUMMERS, 1979).

En las dos últimas décadas, el análisis REN ha sido ampliamente utilizado para comparar los NPVs (GETIG Y MCCARTHY, 1982; BROWN *et al.*, 1985; ERLANDSON, 1990;

SHAPIRO *et al.*, 1991; CABALLERO *et al.*, 1992b; HARA *et al.*, 1995; LAITINEN *et al.*, 1996; ESCRIBANO *et al.*, 1999) y los GVs (CROOK, 1981, 1986; HARVEY Y TANADA, 1985; VICKERS *et al.*, 1991; ZEDDAM *et al.*, 1999) aislados de un mismo huésped en poblaciones de distintos orígenes geográficos. Los aislados silvestres de un mismo huésped, con frecuencia, tienen una gran proximidad filogenética pero sus perfiles de restricción difieren lo suficiente como para ser considerados variantes genotípicas de un mismo virus (VICKERS *et al.*, 1991; ZEDDAM *et al.*, 1999). La comparación de quince aislados del GV de *Pieris brassicae* y *Artogeia rapae*, recogidos en cuatro continentes distintos, demostró que sólo tres aislados, todos ellos de la misma área geográfica, fueron indistinguibles mediante el análisis REN (CROOK, 1986). Vickers *et al.* (1991) analizaron ocho aislados geográficos del GV de *Phthorimaea operculella* y sólo encontraron tres genotipos diferenciables por su perfil de restricción. De igual modo, Shapiro *et al.* (1991) compararon 22 aislados silvestres del NPV de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV). Estos autores encontraron que el perfil de restricción permitió diferenciar 11 de entre 15 aislados de un mismo origen geográfico y que entre ellos guardaban una mayor relación que la que tenían con respecto a aislados procedentes de otros orígenes geográficos si bien todos ellos pueden ser considerados variantes genotípicas del SfMNPV. No obstante, entre los baculovirus silvestres aislados de un mismo huésped también se ha demostrado la presencia de NPVs (ALLAWAY Y PAYNE, 1983; CHERRY Y SUMMERS, 1985; MAEDA *et al.*, 1990) o GVs (HARVEY Y TANADA, 1985) completamente distintos aunque esto ocurre con una frecuencia mucho menor. Así mismo es poco frecuente que aislados de distintos orígenes geográficos de un mismo virus sean indistinguibles tal y como se ha señalado para varios aislados del GV de *Cydia pomonella* analizados con la endonucleasa *EcoRI* (CROOK *et al.*, 1985). Aquí conviene señalar que para determinar correctamente la relación entre dos aislados es necesario utilizar varios RENs ya que la obtención de perfiles idénticos con un enzima determinado no necesariamente indica una total identidad. En general, parece que la proximidad o lejanía filogenética de los aislados está estrechamente correlacionado con la separación que hay entre las áreas geográficas de las que proceden dichos aislados (VICKERS *et al.*, 1991).

En los baculovirus, además de la variación entre distintos aislados geográficos, cada aislado salvaje consiste, en general, en una mezcla de genotipos estrechamente relacionados (LEE Y MILLER, 1978; SMITH Y CROOK, 1988; MUÑOZ *et al.*, 1998, 1999) que se encuentra en distintas proporciones relativas. El análisis REN es muy útil para detectar mezclas de genotipos en un aislado de NPV o GV, lo cual se pone de manifiesto por la presencia de bandas submolares en los perfiles de restricción generados por algunas enzimas. Las bandas submolares serán patentes siempre y cuando la enzima que se utilice produzca distintas pautas de restricción en los genotipos que componen la mezcla y estos se encuentren en una proporción relativa suficiente como para ser detectados. Como puede deducirse la ausencia de bandas submolares no necesariamente indica que no haya mezcla de genotipos. Por otra parte, la presencia de bandas submolares tampoco es una prueba irrefutable de que haya mezcla de genotipos ya que dichas bandas pueden haberse producido por una digestión parcial del ADN genómico.

El análisis REN también se ha utilizado para determinar la homología entre variantes estrechamente relacionadas basándose en el porcentaje de fragmentos de restricción que tienen la misma movilidad electroforética en geles de agarosa haciendo uso de la fórmula ideada por Upholt (1977). Esta fórmula considera los cambios debidos a mutaciones puntuales producidas al azar pero, sin embargo, no tiene en cuenta otras fuentes de variación muy frecuentes en los baculovirus como por ejemplo las deleciones, inserciones, recombinaciones, transposiciones, etc. (ver Capítulos 3 y 4 de este libro). No obstante, en términos generales, los virus con perfiles de restricción muy similares también tienen un grado de homología muy elevado.

Como hemos visto, el análisis REN es de gran utilidad en la identificación de los baculovirus pero es insuficiente, por sí solo, para determinar con precisión el tamaño del genoma por varias razones: 1) la dificultad de estimar el tamaño de los fragmentos grandes, 2) la falta de detección de los fragmentos de pequeño tamaño y 3) la dificultad de identificar o interpretar fragmentos con la misma o similar movilidad electroforética (CROOK, 1991). La utilización conjunta del análisis REN, sobre todo haciendo uso de las digestiones dobles o múltiples, y la hibridación de DNA permiten superar estos inconvenientes. Los fragmentos de restricción separados en geles de agarosa pueden ser transferidos a membranas que luego son hibridadas con fragmentos de DNA marcados. Esto nos proporciona la información necesaria para ordenar los fragmentos en la posición real que ocupan en el genoma lo cual hace posible la construcción del mapa físico del virus. Un mapa físico es un diagrama a escala del tamaño real del genoma del virus en el que se localizan de forma bastante precisa los sitios de restricción. Dada la estructura circular del genoma de los baculovirus, Vlak y Smith, (1982) propusieron como punto cero del genoma el sitio de restricción más cercano al extremo 5' del gen de la poliedrina. La representación gráfica del genoma se puede hacer tanto de forma lineal como circular (Figura 7). El primer baculovirus para el que se construyó el mapa físico fue el AcMNPV (SMITH Y SUMMERS, 1979; MILLER Y DAWES, 1979) y, posteriormente, se han construido el de otros NPVs como por ejemplo *Spodoptera frugiperda* (LOH *et al.*, 1981; Maruniak *et al.*, 1984), *Heliothis zea* (KNELL Y SUMMERS, 1984), *Mamestra brassicae* (WIEGERS Y VLAK, 1984; POSSEE Y KELLY, 1988), *Orgyia pseudotsugata* (CHEN *et al.*, 1988), *Panolis flammea* (POSSEE Y KELLY, 1988), *Anticarsia gemmatilis* (JOHNSON Y MARUNIAK, 1989), *Spodoptera littoralis* (CROIZIER *et al.*, 1989), *Bombyx mori* (MAEDA Y MAJIMA, 1990; HASHIMOTO *et al.*, 1994) y *Spodoptera exigua* (HELDENS *et al.*, 1996). También se han construido los mapas físicos de varios GVs entre los que se encuentran los de *Pieris rapae* (DWYER Y GRANADOS, 1987), varios aislados de *Artogeia rapae* (SMITH Y CROOK, 1988a,b, 1993), *Cydia pomonella* (CROOK *et al.*, 1985), *Xestia c-nigrum* (GOTO *et al.*, 1992), *Cryptophlebia leucotreta* (JHELE *et al.*, 1992), *Trichoplusia ni* (HASHIMOTO *et al.*, 1991) y *Phthorimaea operculella* (TAHA *et al.*, 1999). La información contenida en un mapa físico es extraordinariamente relevante para la identificación y clasificación de baculovirus ya que examina todo el genoma y permite detectar cambios producidos por inserciones o deleciones, lo cual hace posible una identificación

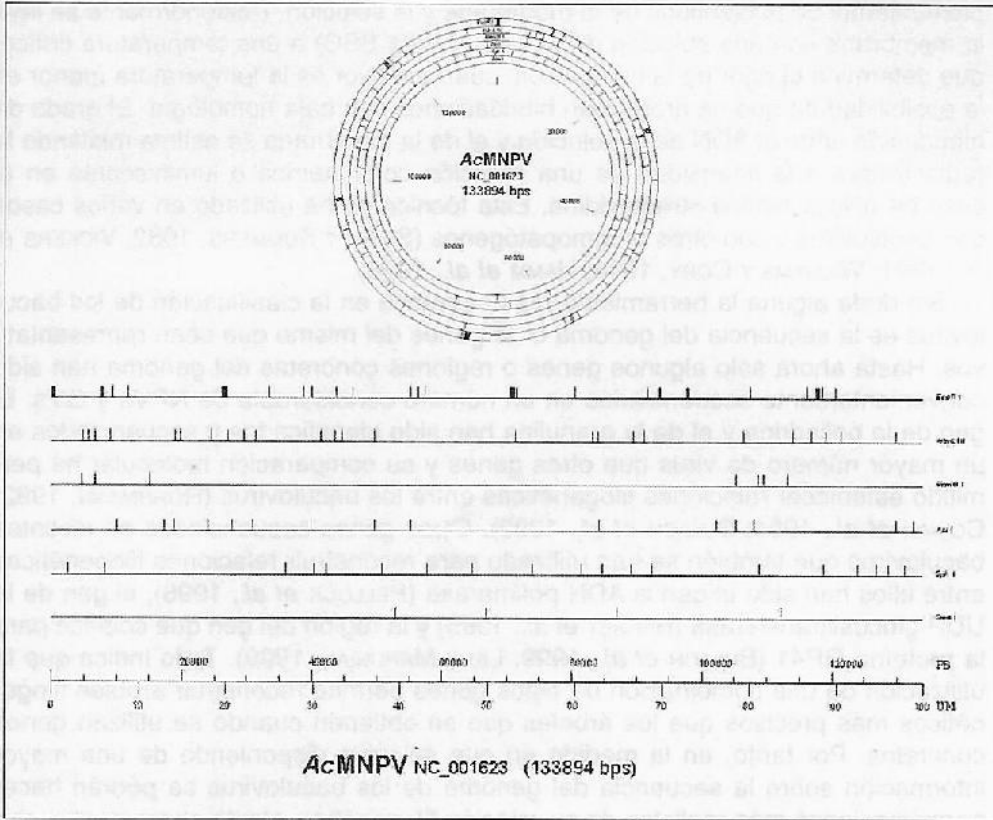


Figura 7. Mapa físico del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV), en forma circular y lineal, realizado para las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *SphI* y *SmaI*. Los cuadros negros indican la localización de las regiones homólogas (*homologous region*; HR) del AcMNPV y el primer sitio de restricción *EcoRI* en la HR1 se toma como el punto cero del mapa.

inequívoca de cepas muy estrechamente relacionadas. Esta aproximación ha sido utilizada, por ejemplo, para determinar la relación entre las variantes genotípicas presentes en los aislados salvajes tanto de NPVs (LEE Y MILLER, 1978; MUÑOZ *et al.*, 1998, 1999) como de GVs (SMITH Y CROOK, 1988a, 1988b; SMITH Y CROOK, 1993; LÉRY *et al.*, 1998). El mapa físico también se ha utilizado para explicar la importancia de la recombinación, entre dos o más variantes ya existentes, en la generación de nuevas variantes genotípicas (CROIZIER Y RIBEIRO, 1992).

El grado de homología entre dos baculovirus se puede estimar por la extensión de la hibridación entre sus genomas. Esto se determina colocando muestras de ADN genómico de uno o varios virus en una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incuba con una solución de ADN marcado radioactivamente o con una proteína como la biotina. Durante la incubación se hidridan las secuencias com-

plementarias de nucleótidos de la membrana y la solución. Posteriormente se lava la membrana con una solución de sales (llamada SSC) a una temperatura crítica, que determina el rigor de la hibridación; cuanto mayor es la temperatura menor es la posibilidad de que se produzcan hibridaciones con baja homología. El grado de hibridación entre el ADN de la solución y el de la membrana se estima midiendo la radiactividad o la intensidad de una reacción colorimétrica o luminiscente en el caso de utilizar biotina-streptavidina. Esta técnica se ha utilizado en varios casos con baculovirus y con otros entomopatógenos (SMITH Y SUMMERS, 1982; VICKERS *et al.*, 1991; WILLIAMS Y CORY, 1994; HAMM *et al.*, 1998).

Sin duda alguna la herramienta más poderosa en la clasificación de los baculovirus es la secuencia del genoma o de genes del mismo que sean representativos. Hasta ahora sólo algunos genes o regiones concretas del genoma han sido convenientemente secuenciadas en un número considerable de NPVs y GVs. El gen de la poliedrina y el de la granulina han sido identificados y secuenciados en un mayor número de virus que otros genes y su comparación molecular ha permitido establecer relaciones filogenéticas entre los baculovirus (ROHRMANN, 1992; COWAN *et al.*, 1994; BULACH *et al.*, 1999). Otros genes secuenciados en distintos baculovirus que también se han utilizado para reconstruir relaciones filogenéticas entre ellos han sido el gen la ADN polimerasa (PELLOCK *et al.*, 1996), el gen de la UDP-glucosiltransferasa (BARRET *et al.*, 1995) y la región del gen que codifica para la proteína GP41 (BULACH *et al.*, 1999; LIU Y MARUNIAK, 1999). Todo indica que la utilización de una combinación de estos genes permite reconstruir árboles filogenéticos más precisos que los árboles que se obtienen cuando se utilizan genes concretos. Por tanto, en la medida en que se vaya disponiendo de una mayor información sobre la secuencia del genoma de los baculovirus se podrán hacer aproximaciones más realistas de su relación filogenética. Hasta ahora se dispone de la secuencia completa de los NPVs de *Autographa californica* (AYRES *et al.*, 1994) *Orgyia pseudotsugata* (AHRENS *et al.*, 1997) *Spodoptera exigua* (IJKEL *et al.*, 1999), *Lymantria dispar* (KUZIO *et al.*, 1999), *Bombyx mori* (GOMI *et al.*, 1999), *Helicoverpa armigera* (CHEN *et al.*, 2001) y de los GV de *Xestia c-nigrum* (HAYAKAWA *et al.*, 1999) y *Plutella xylostella* (HASHIMOTO *et al.*, 2000). El estudio comparativo de estos genomas y de aquellos cuyas secuencias vayan siendo conocidas permitirá llevar a cabo estudios filogenéticos y el establecimiento de caracteres útiles para clasificación de los baculovirus (BULACH *et al.*, 1999) (ver Capítulo 3 de este libro).

4.3. Características fenotípicas

Las distintas características bioquímicas o genéticas de los virus, en muchas ocasiones, tienen un claro reflejo en sus características biológicas o de un modo más concreto en sus propiedades insecticidas. El conocimiento de tales características biológicas, sobre todo las relativas a la patogenicidad, virulencia y espectro de huéspedes de los aislados del virus, es también una herramienta de gran utilidad para la identificación y clasificación de los baculovirus. Para la obtención de este

conocimiento se requiere hacer uso o desarrollar métodos de bioensayo, basados en un adecuado diseño experimental, que nos permitan determinar de un modo rápido, preciso, y reproducible parámetros tales como la dosis letal, tiempo letal, etc. y el número de especies en las que el virus es capaz de replicarse y propagarse. Información detallada de estos métodos se encuentra en el Capítulo 7 de este libro.

Entre los distintos aislados de virus, con cierta frecuencia, se encuentran diferencias significativas de patogenicidad, virulencia y espectro de huéspedes (ver Capítulo 4 de este libro).

5. Conclusiones

Uno de los grandes retos al que se enfrenta el mundo de la virología, hoy en día, es precisamente definir en qué consiste una especie de virus. El ICTV adopta la siguiente definición: “una especie de virus es una clase politética de virus que constituye un linaje replicante el cual ocupa un nicho ecológico particular” (VAN REGENMORTEL *et al.*, 1997). El sistema politético se usa para asignar el estatus de especie a un grupo de cepas que comparten una gama de características físicas, biológicas y genéticas predeterminadas. Este sistema es apropiado para los virus debido a la variabilidad intrínseca en sus poblaciones; todas las cepas tienen que compartir la mayoría de las características que sirven de diagnóstico pero no necesariamente tienen que encontrarse todas las características en una sola cepa. Definir cuantitativamente estas características, con el objetivo de ofrecer un tipo de clave para la clasificación de aislamientos, es un proceso difícil porque apenas si se han identificado con certeza un número limitado de especies de baculovirus (BLISSARD *et al.*, 2000).

Sin duda alguna, las características estructurales, serológicas, biológicas y fenotípicas tendrán un papel taxonómico valioso. No obstante, las características fundamentales de los virus, como para todos los demás organismos, se determinan por la composición de su ácido nucleico y hace falta un gran número de estudios de las secuencias genéticas de estos virus para poder desarrollar una base de información y, de esta manera, definir los límites de variabilidad dentro de cada clase politética (especie) y entre las diferentes especies de los baculovirus.

6. Bibliografía

- ADAMS, J. R., y J. T. MCCLINTOCK. 1991. *Baculoviridae. Nuclear polyhedrosis viruses*. Part 1. Nuclear polyhedrosis viruses of insects, p. 87-204. En: J. R. Adams y J. R. Bonami (ed.), *Atlas of invertebrate viruses*. Academic Press, San Diego.
- AHRENS, C. H., R. RUSSELL, C. J. FUNK, J. T. EVANS, S. H. HARWOODS, y G. F. ROHRMANN. 1997. *The sequence of the Orgyia pseudotsugata multinucleocapsid nuclear polyhedrosis virus genome*. *Virology* 229:381-399.

- ALLAWAY, G. P., Y C. C. PAYNE. 1983. *A biochemical and biological comparison of three European isolates of nuclear polyhedrosis viruses from Agrotis segetum*. Arch. Virol. **75**:43-54.
- AYRES, M. D., S. C. HOWARD, J. KUZIO, M. LÓPEZ-FERBER, Y R. D. POSSEE. 1994. *The complete DNA sequence of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Virology **202**:586-605.
- BARRET, J. W., P. J. KRELL, Y B. M. ARIF. 1995. *Characterization, sequencing and phylogeny of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene from two distinct nuclear polyhedrosis viruses isolated from Choristoneura fumiferana*. J. Gen. Virol. **76**:2456-2477.
- BEATON, C. D. Y B. K. FILSHIE. 1976. *Comparative ultrastructural studies of insect granulosis and nuclear polyhedrosis viruses*. J. Gen. Virol. **31**:151-161.
- BENZ, G. A. 1986. Introduction: *Historical Perspectives*, p. 1-36. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*, Vol. 1. Academic Press, San Diego.
- BERGOLD, G. H. 1963. *The nature of nuclear polyhedrosis viruses*, p. 413-456. En: E. A. Steinhaus (ed.), *Insect pathology: an advanced treatise*, Vol 1. Academic Press, New York.
- BISCHOFF, D. S. Y J. M. SLAVICEK. 1997. *Molecular analysis of an enhancing gene in the Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus*. J. of Virol. **71**:8133-8140.
- BILIMORIA, S. L. 1986. *Taxonomy and identification of baculoviruses*, p. 37-60. En: R. R. Granados y B. A. Federici (eds.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*, Vol. 1. Academic Press, San Diego.
- BJORNSON, R. M., Y G. F. ROHRMANN. 1992. *Nucleotide sequence of the polyhedron envelope protein gene region of the Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus*. J. Gen. Virol. **73**:1499-1505.
- BLISSARD, G. W., Y G. F. ROHRMANN. 1990. *Baculovirus diversity and molecular biology*. Ann. Rev. Entomol. **35**:127-155.
- BLISSARD, G. W., B. BLACK, N. E. CROOK, R. KEDDIE, R. D. POSSEE, G. F. ROHRMANN, D. A. THIELMANN, Y L. E. VOLKMAN. 2000. *Family Baculoviridae*. En: M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (ed.), *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, New York.
- BRAUNAGEL, S. C., Y M. D. SUMMERS. 1994. *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus, PDV, and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles*. Virology **202**:315-328.
- BRAUNAGEL, S. C., H. HE, P. RAMAMURTHY, Y M. D. SUMMERS. 1996a. *Transcription, translation, and cellular localization of three Autographa californica nuclear polyhedrosis virus structural proteins: ODV-E18, ODV-E35, and ODV-EC27*. Virology **222**:100-114.
- BRAUNAGEL, S. C., D. M. ELTON, H. MA, Y M. D. SUMMERS. 1996b. *Identification and analysis of an Autographa californica nuclear polyhedrosis virus structural protein of the occlusion-derived virus envelope: ODV-E56*. Virology **217**:97-110.

- BROWN, S. E., J. E. MARUNIAK, Y D. L. KNUDSON. 1985. *Baculovirus (MNPV) genomic variants: characterization of Spodoptera exempta MNPV DNAs and comparison with other Autographa californica MNPV DNAs*. J. Gen. Virol. **66**:2431-2441.
- BULACH, D. M., C. A. KUMAR, A. ZAIA, B. LIANG, Y D. E. TRIBE. 1999. *Group II nucleopolyhedrovirus subgroups revealed by phylogenetic analysis of polyhedrin and DNA polymerase gene sequences*. J. Invertebr. Pathol. **73**:59-73.
- BURLEY, S. K., A. MILLER, K. A. HARRAP, Y D.C. KELLY. 1982. *Structure of the Baculovirus nucleocapsid*. Virology **120**:433-440.
- CABALLERO, P., D. ZUIDEMA, C. SANTIAGO-ALVAREZ, Y J. M. VLAK. 1992a. *Biochemical and biological characterization of four isolates of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*. Biocontr. Sci. Technol. **2**:145-157.
- CABALLERO, P., D. ZUIDEMA, C. SANTIAGO-ALVAREZ, Y J. M. VLAK. 1992b. *Epizootics caused by a nuclear polyhedrosis virus in populations of Spodoptera exigua*. Biocontr. Sci. Technol. **2**:35-38.
- CHARLTON, C. A., Y L. E. VOLKMAN. 1995. *Penetration of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf21 cells induces actin cable formation*. Virology **197**:245-254.
- CHEN, D. D., M. H. NESSON, G. F. ROHRMANN, Y G. S. BEAUDREAU. 1988. *The genome of the multicapsid baculovirus of Orgyia pseudotsugata: restriction map and analysis of two sets of GC-rich repeated sequences*. J. Gen. Virol. **69**:1375-1381.
- CHEN, X., W.F. IJKE, R. TARCHINI, X. SUN, H. SANDBRINK, H. WANG, S. PETERS, D. ZUIDEMA, R.K. LANKHORST, J.M. VLAK, Y Z. HU. 2001. *The sequence of the Helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus genome*. J. Gen. Virol. **82**:241-257.
- CHERRY, C. L., Y M. D. SUMMERS. 1985. *Genotypic variation among wild isolates of two nuclear polyhedrosis viruses isolated from Spodoptera littoralis*. J. Invertebr. Pathol. **46**:289-295.
- CHOU, C. M., C. J. HUANG, C. F. LO, G. H. KUO, Y C. H. WANG. 1996. *Characterization of Perina nuda nucleopolyhedrovirus (PenuNPV) polyhedrin gene*. J. Invertebr. Pathol. **67**:259-266.
- CIBULSKY, R. J., J. D. HARPER, Y R. T. GUDAUSKAS. 1977. *Biochemical comparison of virions proteins from five nuclear polyhedrosis viruses infecting plusiine larvae (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Invertebr. Pathol. **30**:303-313.
- COCHRAN, M. A., S. E. BROWN, Y D. L. KNUDSON. 1986. *Organization and expression of the baculovirus genome*, p. 239-258. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology, Vol. 1, Academic Press, San Diego.
- COWAN, P., D. BULLACH, K. GOODGE, A. ROBERTSON, Y D. E. TRIBE. 1994. *Nucleotide sequence of the polyhedrin gene region of Helicoverpa zea single nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus: placement of the virus in lepidopteran nuclear polyhedrosis virus group II*. J. Gen. Virol. **75**:3211-3218.
- CROIZIER, G., K. BOUKHOUDMI-AMIRI, Y L. CROIZIER. 1989. *A physical map of Spodoptera littoralis B-type nuclear polyhedrosis virus genome*. Arch. Virol. **104**:145-151.

- CROIZIER, G., L. CROIZIER, J. M. QUIOT, Y D. LERECLUS. 1988. *Recombination of Autographa californica and Rachiplusia ou nuclear polyhedrosis viruses in Galleria mellonella*. J. Gen. Virol. **69**:177-185.
- CROIZIER, G. Y H. C. T. RIBEIRO. 1992. *Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus wild populations*. Virus Res. **26**:183-196.
- CROOK, N. E. 1981. *Genetic variability and virulence characteristics of granulosis viruses isolated from Pieris spp.*, p. 291. En: Abstracts of the 5th international congress of virology, Strasbourg, Francia.
- CROOK, N. E. 1986. *Restriction enzyme analysis of granulosis viruses isolated from Artogeia rapae and Pieris brassicae*. J. Gen. Virol. **67**:781-787.
- CROOK, N. E. 1991. *Baculoviridae: subgroup B: comparative aspects of granulosis viruses*, p. 73-110. En: E. Kurstak (ed.), Viruses of invertebrates. Marcel Dekker Inc., New York.
- CROOK, N. E., R. A. SPENCER, C. C. PAYNE, Y D. J. LEISY. 1985. *Variation in Cydia pomonella granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants*. J. Gen. Virol. **66**:2423-2430.
- DERKSEN, A. C. G., Y R. R. GRANADOS. 1988. *Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity*. Virology **167**:242-250.
- DWYER, K. G., Y R. R. GRANADOS. 1987. *A physical map of the Pieris rapae granulosis virus genome*. J. Gen. Virol. **68**:1471-1476.
- ERLANDSON, M. A. 1990. *Biological and biochemical comparison of Mamestra configurata and Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus isolates pathogenic for the bertha armyworm, Mamestra configurata (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Invertebr. Pathol. **56**:47-56.
- ESCRIBANO, A., T. WILLIAMS, D. GOULSON, R. D. CAVE, J. W. CHAPMAN, Y P. CABALLERO. 1999. *Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas*. J. Econ. Entomol. **92**:1079-1085.
- FEDERICI, B. A. 1986. *Ultrastructure of baculoviruses*, p. 61-88. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology, Vol. 1. Academic Press, San Diego.
- FEDERICI, B. A. 1997. *Baculovirus pathogenesis*, p. 33-59. En: L. K. Miller (ed.), The baculoviruses. Plenum Press, New York.
- FRANCKI, R. I. B., C. M. FAUQUET, D. L. KNUDSON, Y F. BROWN. 1991. *Classification and nomenclature of viruses: fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Arch. Virol. Suppl. 2. Springer-Verlag, New York.
- FUNK, C. J., S. C. BRAUNAGEL, Y G. F. ROHRMANN. 1997. *Baculovirus structure*, p. 7-32. En: L. K. Miller (ed.), The baculoviruses. Plenum Press, New York.
- GALLO, L. G., B. G. CORSARO, P. R. HUGHES, Y R. R. GRANADOS. 1991. *In vivo enhancement of baculovirus infection by the viral enhancing factor of a granulosis virus of the cabbage looper Trichoplusia ni (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Invertebr. Pathol. **58**:203-210.

- GETTIG, R. R., Y W. J. MCCARTHY. 1982. *Genotypic variation among wild isolates of Heliothis spp. nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions.* Virology **117**:245-252.
- GIJZEN, M., P. ROELVINK Y R. R. GRANADOS. 1995. *Characterization of viral enhancing activity from Trichoplusia ni granulosis virus.* J. Invertebr. Pathol. **65**:289-294.
- GOMBAH, A. F., G. W. BLISSARD, G. F. ROHRMANN, Y G. S. BEAUDREAU. 1989. *A baculovirus polyhedral envelope-associated protein: gene location, nucleotide sequence, and immunocytochemical characterization.* Virology **169**:182-193.
- GOMI, S., K. MAJIMA, Y S. MAEDA. 1999. *Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus.* J. Gen. Virol. **80**:1322-1337.
- GOTO, C., Y. MINOBE, Y T. IZUKA. 1992. *Restriction endonuclease analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from Xestia c-nigrum and five other noctuids species.* J. Gen. Virol. **73**:1491-1497.
- GRANADOS, R. R., Y K. A. WILLIAMS. 1986. *In vivo infection and replication of baculoviruses*, p. 89-108. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*, Vol. 1. Academic Press, San Diego.
- GRÖNER, A. 1986. *Specificity and safety of baculoviruses.* p. 177-202. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*, Vol. 1. Academic Press, San Diego.
- GROSS, C. H., R. L. Q. RUSSELL, Y G. F. ROHRMANN. 1994. *The Orgyia pseudotsugata baculovirus p10 and polyhedron envelope protein genes: analysis of their relative expression levels and role in polyhedron structure.* J. Gen. Virol. **75**:1115-1123.
- HAMM, J. J., E. L. STYER, Y B. A. FEDERICI. 1998. *Comparison of field-collected ascovirus isolates by DNA hybridization, host range and histopathology.* J. Invertebr. Pathol. **72**:138-146.
- HARA, K., M. FUNAKOSHI, Y T. KAWARABATA. 1995. *In vivo and in vitro characterization of several isolates of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus.* Acta Virol. **39**:215-222.
- HARRAP, K. A. 1972. *The ultrastructure of nuclear polyhedrosis viruses. I. The inclusion body.* Virology **50**:114-123.
- HARRAP, K. A., Y C. C. PAYNE. 1979. *The structural properties and identification of insect viruses.* Adv. Virus Res. **25**:273-284.
- HARVEY, J., Y Y. TANADA. 1985. *Characterization of the DNAs of five baculoviruses pathogenic for the armyworm, Pseudaletia unipuncta.* J. Invertebr. Pathol. **46**:174-179.
- HASHIMOTO, Y., B. G. CORSARO, Y R. R. GRANADOS. 1991. *Location and nucleotide sequence of the gene encoding the viral enhancing factor of the Trichoplusia ni granulosis virus.* J. Gen. Virol. **72**:2645-2651.
- HASHIMOTO, Y., T. HAYAKAWA, Y. UENO, T. FUJITA, Y. SANO, Y T. MATSUMOTO. 2000. *Sequence analysis of the Plutella xylostella granulovirus genome.* Virology. **275**:358-372.
- HASHIMOTO, Y., Y. KANAMORI, Y. HAYAKAWA, S. G. KAMITA, S. MAEDA, Y T. MATSUMOTO. 1994. *Physical mapping of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus, strain D1:*

- identification of novel interspersed homologous regions. *J. Appl. Entomol. Zool.* **29**:442-447.
- HAYAKAWA, T., R. KO, K. OKANO, S. SEONG, C. GOTO, Y. S. MAEDA. 1999. Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum granulovirus* genome. *Virology* **262**:277-297.
- HELDENS, J. G. M., E. A. VAN STRIEN, A. M. FELDMANN, P. KULCSAR, D. MUÑOZ, D. J. LEISY, D. ZUIDEMA, R. W. GOLDBACH, Y. J. M. VLAK. 1996. *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus deletion mutants generated in cell culture lack virulence in vivo. *J. Gen. Virol.* **77**:3127-3134.
- HESS, R. T., L. A. FALCON Y T. J. MORRIS. 1984. Electron microscope observations on the specificity of inclusion bodies of insect polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* **43**:1-10.
- HOSTETTER, D. L., Y P. PUTLER. 1991. A new broad spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* **20**:1480-1488.
- IJEL, W. F. J., M. WESTENBERG, R. W. GOLBACH, J. M. VLAK Y D. ZUIDEMA. 2000. A novel baculovirus envelope fusion protein with a proprotein convertase cleavage site. *Virology* **275**:30-41.
- IJEL, W. F. J., E. A. VAN STRIEN, J. G. M. HELDENS, R. BROER, D. ZUIDEMA, R. W. GOLBACH, Y. J. M. VLAK. 1999. Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *J. Gen. Virol.* **80**:3289-3304.
- JACQUES, R. P. 1985. Stability of insect viruses in the environment, p. 285-360. En: K. Maramorosch y K. E. Sherman (ed.), *Viral insecticides for biological control*. Academic Press, New York.
- JEHLE, J. A., H. BACKHAUS, E. EVANS, Y. J. HUBER. 1992. Physical map of the *Cryptophlebia leucotreta granulosis* genome and its relationship to the genome of *Cydia pomonella granulosis virus*. *J. Gen. Virol.* **73**:1621-1626.
- JOHNSON, D. W., Y J. E. MARUNIAK. 1989. Physical map of *Anticarsia gemmatilis nuclear polyhedrosis virus* (AgMNPV-2) DNA. *J. Gen. Virol.* **70**:1877-1883.
- KAWAMOTO, F., Y N. KUMADA. 1977. Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the oriental tussock moth, *Euproctis subflava*. *Virology* **77**:867-871.
- KNELL, J. D., Y M. D. SUMMERS. 1984. A physical map for the *Heliothis zea* SNPV genome. *J. Gen. Virol.* **65**:445-450.
- KOZLOV, E. A., N. M. SIDOROVA, Y S. B. SEREBRYANI. 1975. Proteolytic cleavage of polyhedral protein during dissolution of inclusion bodies of the nuclear polyhedrosis viruses of *Bombyx mori* and *Galleria mellonella* under alkaline condition. *J. Invertebr. Pathol.* **25**:97-102.
- KUZIO, J., R. JACQUES, Y P. FAULKNER. 1989. Identification of p74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. *Virology* **173**:759-763.
- KUZIO, J., M. N. PEARSON, S. H. HARWOOD, C. J. FUNK, J. T. EVANS, J. M. SLAVICEK, Y G. F. ROHRMANN. 1999. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology* **253**:17-34.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- LAITINEN, A. M., I. S. OTVOS, Y D. B. LEVIN. 1996. Genotypic variation among wild iso-

- lates of douglas-fir tussock moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* **89**:640-647.
- LEE, H. H., Y L. K. MILLER. 1978. Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **27**:754-767.
- LEPORE, L. S., P. R. ROELVINK, Y R. R. GRANADOS. 1996. Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease. *J. Invertebr. Pathol.* **68**:131-140.
- LÉRY, X., S. ABOL-ELA, Y J. GIANNOTTI. 1998. Genetic heterogeneity of *Phthorimaea operculella* granulovirus: restriction analysis of the wild-type isolates and clones obtained in vitro. *Acta Virol.* **42**:13-21.
- LIU, J. C., Y J. E. MARUNIAK. 1995. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the gp41 gene of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **76**:1443-1450.
- LIU, J. C., Y J. E. MARUNIAK. 1999. Molecular characterization of genes in the GP41 region of baculoviruses and phylogenetic analysis based upon GP41 and polyhedrin genes. *Virus Res.* **64**:187-196.
- LOH, L. C., J. J. HAMM, Y E. HUANG. 1981. *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome: physical maps for restriction endonucleases BamHI and HindIII. *J. Virol.* **38**:922-931.
- MAEDA, S. Y K. MAJIMA. 1990. Molecular cloning and physical mapping of the genome of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Gen. Virol.* **71**:1851-1855.
- MAEDA, S., Y. MUKOHARA, Y A. KONDO. 1990. Characteristically distinct isolates of the nuclear polyhedrosis virus from *Spodoptera litura*. *J. Gen. Virol.* **71**:2631-2639.
- MARTIGNONI, M. E., Y P. J. IWAI. 1986. A catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks, 4th edition, General Technical Report PNW-195, U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland, USA.
- MARUNIAK, J. E., S. E. BROWN, Y D. L. KNUDSON. 1984. Physical maps of SfMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. *Virology* **136**:221-234.
- MARUNIAK, J. E. 1986. *Baculovirus structural proteins and proteins synthesis*, p. 129-146. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology*, Vol. 1. Academic Press, San Diego.
- MAZZONE, H. M., Y G. H. TIGNOR. 1978. *Insect viruses: serological relationships*. *Adv. Virus Res.* **20**:237-243.
- MILLER, L. K., Y K. P. DAWES. 1979. Physical map of the DNA genome of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **29**:1044-1055.
- MILLER, L. K., M. J. ADANG, Y D. BROWNE. 1983. Protein kinase activity associated with the extracellular and occluded forms of the baculovirus *Autographa californica* NPV. *J. Virol.* **46**:275-278.
- MINION, F. C., L. B. COONS, Y J. R. BROOME. 1979. Characterization of the polyhedral envelope of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* **34**:303-307.
- MONROE, J. E., Y W. J. MCCARTHY. 1984. Polypeptide analysis of genotypic variants of occluded *Heliothis* spp. baculoviruses. *J. Invertebr. Pathol.* **43**:32-40.
- MONSMA, S. A., A. G. P. OOMENS Y G. W. BLISSARD. 1996. The gp64 envelope fusion

- protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection.* J. Virol. **70**:4607-4616.
- MÜLLER, R., M. N. PEARSON, R. L. Q. RUSSELL, Y G. F. ROHRMANN. 1990. *A capsid-associated protein of the multicapsid nuclear polyhedrosis virus of Orgyia pseudotsugata: Genetic location, sequence, transcriptional mapping, and immunocytochemical characterization.* Virology **176**:133-144.
- MUÑOZ, D., J. I. CASTILLEJO Y P. CABALLERO. 1998. *Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of Spodoptera exigua.* Appl. and Environ. Microbiol. **64**:4372-4377.
- MUÑOZ, D., R. MURILLO, P. J. KRELL, J. M. VLAK, Y P. CABALLERO. 1999. *Four genotypic variants of a Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region.* Virus Res. **59**:61-74.
- MURPHY, F. A., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, S. A. GHABRIAL, A. W. JARVIS, G. P. MARTELLI, M. A. MAYO, Y M. D. SUMMERS. 1995. *Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Springer-Verlag, New York.
- NAGATA, M., Y Y. TANADA. 1983. *Origin of an alkaline protease associated with the capsule of a granulosis virus of the armyworm, Pseudaletia unipuncta (Haworth).* Arch. Virol. **76**:245-256.
- PELLOCK, B. J., A. LU, R. B. MEAGHER, M. J. WEISE, Y L. K. MILLER. 1996. *Sequence, function and phylogenetic analysis of an ascovirus DNA polymerase gene.* Virology **216**:146-157.
- POINAR, G. O., Y G. M. THOMAS. 1984. *Laboratory guide to insect pathogens and parasites.* Plenum Press, New York.
- POTTER, K. N., Y L. K. MILLER. 1980. *Transfection of two invertebrate cell lines with DNA of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.* J. Invertebr. Pathol. **36**:431-432.
- POSSEE, R. D., Y D. C. KELLY. 1988. *Physical maps and comparative DNA hybridization of Mamestra brassicae and Panolis flammea nuclear polyhedrosis virus genomes.* J. Gen. Virol. **69**:1285-1298.
- POSSEE, R. D., T. P. SUN, S. C. HOWARD, M. D. AYRES, M. HILL-PERKINS, Y K. L. GEARING. 1991. *Nucleotide sequence of the Autographa californica nuclear polyhedrosis 9.4 kbp EcoRI -I (Eco RI -I) and -R (polyhedrin gene) region.* Virology **185**:229-241.
- QUAANT-RUSSELL, R. L., M. N. PEARSON, G. F. ROHRMANN, Y G. S. BEAUDREAU. 1987. *Characterization of baculovirus p10 synthesis using monoclonal antibodies.* Virology **160**:9-19.
- ROELVINK, P.W., B.G. CORSARO Y R.R. GHANADOS. 1995. *Characterization of the Helicoverpa armigera and Pseudaletia unipuncta granulovirus enhancing genes.* J. Gen. Virol. **76**:2693-2705.
- ROHRMANN, G. F. 1986. *Polyhedrin structure.* J. Gen. Virol. **67**:1499-1513.
- ROHRMANN, G. F. 1992. *Baculovirus structural proteins.* J. Gen. Virol. **73**:749-761.
- RUBINSTEIN R., Y A. POLSON. 1983. *Midgut and viral associated proteases of Heliothis armigera.* Interviol. **19**:16-21.
- RUSSELL, R. L. Q., M. N. PEARSON, Y G. F. ROHRMANN. 1991. *Immunoelectron microscopic examination of Orgyia pseudotsugata multicapsid nuclear polyhedrosis*

- virus-infected Lymantria dispar cells: time course and localization of major polyhedron-associated proteins.* J. Gen. Virol. **72**:275-283.
- SHAPIRO, D. I., J. R. FUXA, H. D. BRAYMER, Y D. P. PASHLEY. 1991. *DNA restriction polymorphism in wild type isolates of Spodoptera frugiperda nuclear polyhedrosis virus.* J. Invertebr. Pathol. **58**:96-105.
- SMITH, I. R. L., Y N. E. CROOK. 1988a. *Physical maps of the genomes of four variants of Artogetia rapae granulosis virus.* J. Gen. Virol. **69**:1741-1747.
- SMITH, I. R. L., Y N. E. CROOK. 1988b. *In vivo isolation of baculovirus genotypes.* Virology **166**:240-244.
- SMITH, I. R. L., Y N. E. CROOK. 1993. *Characterization of new baculovirus genotypes arising from inoculation of Pieris brassicae with granulosis viruses.* J. Gen. Virol. **74**:415-424.
- SMITH, G. E., Y M. D. SUMMERS. 1978. *Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases.* Virology **89**:517-527.
- SMITH, G. E., Y M. D. SUMMERS. 1979. *Restriction maps of five Autographa californica MNPV variants, Trichoplusia ni MNPV, and Galleria mellonella MNPV DNAs with endonucleases SmaI, KpnI, BamHI, SacI, XhoI, and EcoRI.* J. Virol. **30**:828-838.
- SOUTHERN, E. M. 1975. *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J. Mol. Biol. **98**:503-517.
- STOLTZ, D. B., C. PAVAN, Y A. B. D. CUNHA. 1973. *Nuclear polyhedrosis virus: a possible example of de novo intranuclear membrane morphogenesis.* J. Gen. Virol. **19**:145-150.
- SUMMERS, M. D., Y G. E. SMITH. 1978. *Baculovirus structural polypeptides.* Virology **84**:390-402.
- TANADA, Y., Y R. T. HESS. 1991. *Baculoviridae. Granulosis viruses*, p. 227-257. En: J. R. Adams y J. R. Bonami (ed.), *Atlas of invertebrate viruses*. Academic Press, San Diego.
- TWEETEN, K. A., L. A. BULLA, Y R. A. CONSIGLI. 1978. *Characterization of an alkaline protease associated with a granulosis viruses of Plodia interpunctella.* J. Virol. **26**:702-711.
- TWEETEN, K. A., L. A. BULLA, Y R. A. CONSIGLI. 1981. *Applied and molecular aspects of insect granulosis viruses.* Microbiol. Rev. **45**:379-408.
- UPHOLT, W. B. 1977. *Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests.* Nucleic Acids Res. **4**:1257-1265.
- VAN OERS, M. M., J. T. M. FLIPSEN, C. B. E. M. REUSKEN, E. L. SLIWINSKY, R. W. GOLDBACH, Y J. M. VLAK. 1993. *Functional domains of the p10 protein of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus.* J. Gen. Virol. **74**:563-574.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., D. H. L. BISHOP, C. M. FAUQUET, M. A. MAYO, J. MANILOFF, Y C. H. CALISHER. 1997. *Guidelines to the demarcation of virus species.* Arch. Virol. **142**:1505-1518.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, E. B. CARSTENS, M. K. ESTES, S. M. LEMON, J. MANILOFF, M. A. MAYO, D. J. MCGEOCH, C. R. PRINGLE, Y R. B. WICKNER. 2000. *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, New York.

- VASCONCELOS, S. D., J. S. CORY, K. R. WILSON, S. M. SALT, Y R. S. HAILS. 1996. *Modified behavior in baculovirus-infected lepidopteran larvae and its impact on the spatial distribution of inoculum*. Biol. Contr. **7**:299-306.
- VICKERS, J. M., J. S. CORY, Y P. F. ENTWISTLE. 1991. *DNA characterization of eight geographic isolates of granulosus virus from the potato tuber moth Phthorimaea operculella (Lepidoptera: Gelechiidae)*. J. Invertebr. Pathol. **57**:334-342.
- VLAK, J. M., Y G. E. SMITH. 1982. *Orientation of the genome of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus: a proposal*. J. Virol. **41**:1118-1121.
- VLAK, J. M., Y G. F. ROHRMANN. 1985. *The nature of polyhedrin*, p. 489-542. En: K. Maramorosh y K. E. Sherman (ed.), *Viral insecticides for biological control*. Academic Press, Orlando, Florida.
- VOLKMAN, L. E. 1986. *The 64k envelope protein of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **131**:103-118.
- VOLKMAN, L. E., Y P. A. GOLDSMITH. 1985. *Mechanism of neutralization of budded Autographa californica nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis*. Virology **143**:185-195.
- VOLKMAN, L. E., G. W. BLISSARD, P. FRIESEN, B. A. KEDDIE, R. D. POSSEE, Y D. A. THIELMANN. 1995. *Baculoviridae*, p. 104-113. En: F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Matelli, M. A. Mayo y M. D. Summers (ed.), *Virus taxonomy: sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer-Verlag, New York.
- WHITT, M. A., Y J. S. MANNING. 1988. *A phosphorylated 34-kd protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body*. Virology **163**:33-42.
- WIEGERS, F. P., Y J. M. VLAK. 1988. *Physical map of the DNA of a Mamestra brassicae nuclear polyhedrosis virus variant isolated from Spodoptera exigua*. J. Gen. Virol. **65**:2011-2019.
- WILLIAMS, T., Y J. S. CORY. 1994. *Proposals for a new classification of iridescent viruses*. J. Gen. Virol. **75**:1291-1301.
- WILSON, M. E., Y R. A. CONSIGLI. 1985a. *Characterization of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosus virus infecting Plodia interpunctella*. Virology **143**:516-525.
- WILSON, M. E., Y R. A. CONSIGLI. 1985b. *Functions of a protein kinase activity associated with purified capsids of the granulosus virus infecting Plodia interpunctella*. Virology **143**:526-535.
- WOOD, H. A., T. K. MUNKENBERCK, T. R. VID Y P. R. HUGHES. 1993. *Per os infectivity of preoccluded virions from polyhedrin-minus recombinant baculoviruses*. J. Invertebr. Pathol. **62**:64-67.
- ZEDDAM, J. L., A. POLLET, S. MANGOENDIHARJO, T. H. RAMAADHAN, Y M. LÓPEZ-FERBER. 1999. *Occurrence and virulence of a granulosus virus Phthorimaea operculella (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia*. J. Invertebr. Pathol. **74**:48-54.
- ZUMMER, M., Y P. FAULKNER. 1979. *Absence of protease in baculovirus polyhedral bodies propagated in vitro*. J. Invertebr. Pathol. **33**:383-384.