

Resistencia de lepidópteros a los nucleopoliedrovirus: el caso de *Anticarsia gemmatalis*-AgMNPV

DANIEL R. SOSA-GÓMEZ Y FLÁVIO MOSCARDI

1. Introducción	453
2. El concepto de resistencia	453
3. Factores relacionados con el desarrollo de la resistencia	454
3.1. Factores genéticos	455
3.2. Factores ecológicos	457
4. Mecanismos de resistencia	458
5. Diferencias de susceptibilidad entre poblaciones naturales	461
6. Resistencia de la oruga de la soja al AgMNPV	461
7. Estabilidad de la resistencia	464
8. Resistencia cruzada y múltiple	464
8.1. Resistencia cruzada entre los baculovirus y otros entomopatógenos ..	465
8.2. Resistencia cruzada a los insecticidas químicos y a los baculovirus	466
9. Factores que alteran la susceptibilidad al baculovirus	466
9.1. El estadio del insecto	466
9.2. Densidad poblacional	467
9.3. La dieta	468

9.4. Substancias químicas	468
9.5. Otros agentes biológicos	469
10. Alteraciones de los parámetros biológicos relacionados a la resistencia ..	469
11. Dificultades en la detección de la resistencia en condiciones de campo ..	470
12. Manejo de la resistencia a baculovirus	471
13. Conclusiones	472
14. Bibliografía	473

1. Introducción

En esta revisión serán abordados los aspectos generales de la resistencia de las larvas de lepidópteros a los baculovirus y especialmente el caso de la oruga de la soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, a su nucleopoliedrovirus (AgMNPV). Los estudios sobre resistencia son de gran relevancia en los programas de control microbiano. Estos estudios tienen como objetivo la comprensión de los mecanismos que regulan la manifestación de la resistencia, así como el establecimiento de los patrones de su desarrollo, con vistas a minimizar los problemas derivados de esta resistencia en el control eficiente de la plaga.

Los estudios sobre resistencia de *A. gemmatalis* a su baculovirus fueron inicialmente realizados en el laboratorio de Patología de Insectos de la Embrapa - Centro Nacional de Investigaciones de la Soja (Embrapa Soja), en Londrina, PR, Brasil. A partir de 1991, se desarrolló un programa de seguimiento e investigación para determinar si se desarrolla resistencia contra AgMNPV en las larvas de *A. gemmatalis* y, si este fuera el caso, delinear las estrategias a adoptar para permitir el manejo adecuado de los casos de resistencia.

El programa más importante de control de poblaciones de insectos mediante baculovirus, en función del área tratada, es el desarrollado en Brasil para el control de *A. gemmatalis* (MOSCARDI, 1989; MOSCARDI Y SOSA-GÓMEZ, 1996; MOSCARDI, 1999). Desde 1989/90 la aplicación de baculovirus ha oscilado en torno a 1.000.000 ha (MOSCARDI Y SOSA-GÓMEZ, 1993), excepto la zafra 1997/98, en que el uso del AgMNPV alcanzó aproximadamente 1.400.000 ha (F. MOSCARDI, datos sin publicar). A lo largo de los quince años de desarrollo del programa han aparecido algunos fracasos en el control de *A. gemmatalis*, cuyas causas han sido analizadas por Moscardi (1999). A partir de las zafas de 1991/92 se encontraron casos de control infructuosos: 1991/92 en las regiones de Passo Fundo, estado de Río Grande del Sur (L. A. Jacobsen, com. pers.), 1993/94 en Ibiporã (L. MORALES, com. pers.) y en Bela Vista del Paraíso, en el estado de Paraná (D.R. SOSA-GÓMEZ, obs. pers.).

Debido a la extensión del área tratada y a la mayor frecuencia de uso del AgMNPV en los últimos años en Brasil, el seguimiento de la evolución de los niveles de susceptibilidad en las poblaciones naturales se hace cada vez más importante, especialmente en los lugares que poseen mayor frecuencia de aplicación de este virus (MOSCARDI Y SOSA-GÓMEZ, 1992).

2. El concepto de resistencia

La definición clásica de resistencia es la propuesta por el comité de Especialistas en Insecticidas de la Organización Mundial de la Salud. En los sistemas que involucran patógenos e insectos esa definición debe ser ligeramente modificada, ya que el insecticida no es un agente químico, sino biológico. En este caso, la resistencia a patógenos puede definirse como "el desarrollo de la habilidad

para tolerar dosis del inóculo que habitualmente provocarían la enfermedad o la muerte en la mayor parte de los individuos en una población normal de la misma especie" (World Health Organization, 1957; OMOTO Y ALVES, 1998). En esta definición de tipo operacional, se comparan la población en estudio con una población de referencia, en condiciones iguales. Los aspectos relacionados con las diferencias de susceptibilidad entre estadios larvarios, así como las diferencias de susceptibilidad debido a factores nutricionales o del ambiente no entran, por consiguiente, en el campo de la resistencia y serán considerados en segundo plano.

Désde un punto de vista analítico, la resistencia puede ser definida de forma absoluta y no por comparación como en la definición anterior. En este caso, la resistencia de una célula a un virus es la capacidad de esta célula para no permitir una replicación eficaz del virus o, en una formulación equivalente, la incapacidad de la célula para permitir una replicación eficaz del virus. Este tipo de definición más general pone de manifiesto la continuidad que existe entre los estudios de resistencia y de especificidad de huéspedes, y la validez de la extrapolación de las conclusiones obtenidas en los análisis moleculares de los factores determinantes de la especificidad de huéspedes al problema de desarrollo de resistencias.

Por otro lado, la situación que observamos en este momento en un sistema virus-huésped refleja toda una historia evolutiva, con adquisición de resistencias por parte del huésped y con la adquisición de genes capaces de vencer estas resistencias por parte del virus. La comparación de los genomas de diferentes virus y de sus huéspedes respectivos desde una perspectiva evolutiva puede iluminar los fenómenos de desarrollo de resistencias inducidos por el hombre.

3. Factores relacionados con el desarrollo de la resistencia

La aparición de individuos resistentes en una población está condicionada por múltiples factores, no solo genéticos, sino también ecológicos, dependiendo además íntimamente de los métodos de dispersión del inóculo y de las características del agente utilizado (Tabla 1).

Briese y Podgwaite (1985) sugieren que los factores que determinan la respuesta de un insecto en particular pueden ser agrupados en tres tipos: aquellos relacionados con el genotipo del huésped, con su desarrollo y con el medio ambiente. Probablemente, a estos factores se pueden añadir aquellos relacionados con el comportamiento. Sin embargo, la contribución de cada uno de esos factores es difícil de determinar. Se han publicado estudios relacionados a la contribución del comportamiento sobre la resistencia a insecticidas y a hongos entomopatógenos (BOUCIAS *et al.*, 1996; NEVES Y ALVES, 1998), pero no relacionados a baculovirus. Aún más, en muchos de los casos involucrando insecticidas, la influencia del comportamiento sobre la resistencia no ha sido corroborada (ROUSH Y DALY, 1990).

Como ya se indicó anteriormente, en esta revisión nos ocuparemos solamente de los factores de resistencia intrínsecos, dejando aparte aquellos relacionados con el desarrollo del insecto.

Tabla 1. Factores que influyen en el desarrollo de resistencia a virus en poblaciones de insectos en campo.

A. Factores Genéticos

1. Frecuencia de alelos resistentes
2. Número de alelos resistentes
3. Dominancia dos alelos resistentes
4. Expresividad e interacciones de los alelos resistentes
5. Histórico de exposición a otros virus (epizootias naturales o inducidas)
6. Integración del genoma resistente con otros factores de "ajuste" al medio ambiente

B. Factores biológicos o ecológicos

1. Número de generaciones por año
2. Descendencia por generación
3. Monogamia, poligamia o partenogénesis
4. Aislamiento, movilidad y migración
5. Monofagia, polifagia
6. Supervivencia fortuita, la presencia de refugios

C. Factores Operacionales

1. Afinidad del patógeno utilizado con los que ocurren naturalmente
 2. Persistencia del patógeno en el ambiente (formulación)
 3. Momento de utilización
 4. Grado de la presión de selección
 5. Estadio expuesto
 6. Modo de aplicación
 7. Aplicaciones limitadas en el espacio
 8. Aplicaciones limitadas en el tiempo
-

Adaptado de Georgiou y Taylor, (1986)

3.1. Factores genéticos

De forma similar a lo que ocurre con otras sustancias como los insecticidas químicos, el desarrollo de la resistencia depende del potencial o reserva de variabilidad preexistente en la población, así como del nivel de generación de esta variabilidad (por mutación o por flujo de genes provenientes de otras poblaciones). Existen poblaciones en las que aparecen individuos resistentes y poblaciones en las que no hay aparición de resistencias.

El análisis genético de la resistencia a virus ha sido relativamente poco estudiado en los insectos, salvo en el caso de la mosca *Drosophila melanogaster*, en la cual, gracias a las posibilidades de análisis genético, las interacciones con el rhabdovirus Sigma han sido disecadas (BRUN Y PLUS, 1980). Hasta el momento se han aislado siete genes, llamados refractarios (*ref*), en los que ciertos alelos impiden la multiplicación del virus (alelos no permisivos). Los diferentes genes *ref* ocasionan un bloqueo de la replicación del virus en diferentes momentos de su ciclo, y los alelos no

permisivos pueden actuar como alelos dominantes, co-dominantes o recesivos (Contamine, com. pers).

En el caso de la resistencia al virus Sigma, cada uno de los genes *ref* origina una resistencia dicotómica (resistente o sensible), que es el reflejo de un control monogénico del carácter. Este no es necesariamente el caso para otros tipos de resistencia. En muchos ejemplos de resistencia a insecticidas o a diversos productos químicos, los niveles de resistencia de los individuos aumentan de forma continua con la selección, lo cual implica un control multigénico de este carácter. En la Sección 3 se analizarán algunos de los mecanismos implicados en las resistencias.

Los alelos resistentes pueden estar selectivamente desfavorecidos en ausencia del agente de resistencia o tener un comportamiento neutro. En el caso de los genes *ref* no se ha observado una disminución evidente de la eficacia biológica de los individuos portadores de alelos restrictivos. En función del patrimonio genético de la población, puede haber respuesta a una presión de selección de resistencia o no. Diferentes poblaciones de laboratorio de *Helicoverpa zea* y *Heliothis virescens*, han sido utilizadas para analizar el desarrollo de resistencias. Ignoffo y Allen (1972) y Kaomini y Roush (1988) no detectaron aumento de los niveles de resistencia al baculovirus, mientras que para *A. gemmatilis* ha sido posible obtener varias poblaciones resistentes a su baculovirus (Fuxa *et al.*, 1993). En estos casos, la evolución de los niveles de resistencia es cuantitativa, lo cual implica que el control genético subyacente es de tipo multigénico.

La velocidad de colonización de una población por parte de los genotipos resistentes es función de la diferencia de eficacia biológica de los individuos resistentes con respecto a la de los individuos sensibles. Esta diferencia es función de la presión de selección ejercida sobre la población. Como hemos dicho antes, en el caso de desarrollo de una resistencia con control multigénico, la respuesta a presión de selección es de tipo cuantitativo: el nivel de resistencia de cada individuo o de cada grupo se puede medir. La composición genética es en parte responsable de esta resistencia, el resto es el fruto de las interacciones con el ambiente. Sólo la parte de resistencia debida a la composición genética será transmitida a la descendencia.

Comparando la evolución de la resistencia entre dos generaciones, se puede deducir la parte de resistencia debida al patrimonio genético. Esta parte se denomina heredabilidad (h^2), y se define como el cociente entre la respuesta a la selección y la presión de selección aplicada (FALCONER, 1970). Valores altos de este parámetro indican una respuesta rápida de la población y una reserva de variabilidad importante. A medida que los valores de resistencia llegan al máximo posible en la población considerada, la variabilidad genética para ese carácter disminuye, la respuesta a la selección disminuye en consecuencia y nos encontramos con valores bajos de h^2 . La estimación de los valores de h^2 en una población puede ser útil para el manejo de las resistencias, como sugiere Tabashnik (1994). Sin embargo, estos valores sólo se pueden medir en el laboratorio y su utilización para predecir la evolución de la respuesta (R) en el campo debe hacerse con precaución, ya que el diferencial de selección (S) es difícil de determinar.

3.2. Factores ecológicos

Una vez que un genotipo resistente aparece en una población, ya sea por mutación, recombinación o por migración a partir de otras poblaciones, la colonización de la población, que puede llevar a la fijación del genotipo resistente, depende de los factores ecológicos, tales como la presión de selección y la tasa de migración. En el caso de los baculovirus, la intensidad de la presión de selección viene dada por la frecuencia de las epizootias, ya sean naturales o inducidas artificialmente, y por la concentración del inóculo viral.

Las aplicaciones de insecticidas microbianos, en comparación con las epizootias naturales, ejercen mayor presión de selección para el desarrollo de resistencia, tanto por las dosis utilizadas como por la frecuencia de tratamiento (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1998). Las aplicaciones del AgMNPV contra la primera generación de orugas generalmente en poblaciones poco densas, solo o en combinación con herbicidas pos-emergentes son frecuentes en los cultivos de soja. Esta práctica puede ser considerada como factor de selección de la resistencia en el campo. En efecto, las larvas se encuentran expuestas al virus durante todo su desarrollo y además, la probabilidad de que una larva ingiera el virus es muy elevada, considerando que se utiliza la dosis de $1,5 \times 10^{11}$ cuerpos poliédricos de inclusión (CPI)/ha sobre plantas de soja pequeñas (reducida área foliar) (Tabla 1).

En contraste, las epizootias naturales no ocurren cuando la mayoría de los individuos de la población son jóvenes, o cuando la densidad de individuos está por debajo de un límite. La diferencia entre estos dos tipos de situaciones puede explicar un aumento de la presión de selección para genotipos resistentes.

Normalmente, la resistencia se desarrolla más rápidamente cuanto mayor sea la mortalidad provocada por el factor inductor (que es la traducción de la presión de selección), el grado de aislamiento de la población (tasa de inmigración reducida) y la capacidad de recuperar su densidad de equilibrio después del inicio de los tratamientos con baculovirus. Sin embargo, sin la presencia del gen o genes de resistencia no habrá desarrollo de la misma.

El desarrollo de la resistencia es también función del número de ciclos de reproducción y de la capacidad reproductora de los individuos resistentes comparada con la de los individuos sensibles. Cuando más rápido sea el ciclo vital del insecto, y mayor su capacidad reproductora, más rápidamente un genotipo resistente será capaz de colonizar la población. En consecuencia, los insectos multivoltinos pueden desarrollar resistencia más rápidamente que los univoltinos, por ser blanco de un mayor número de ciclos de presión de selección en un periodo dado.

Se cree que los insectos con hábitos polífagos tienden a desarrollar resistencia más lentamente que los monófagos. Los polífagos habitan en diversas especies vegetales, entre las que algunas pueden no ser alcanzadas por los tratamientos, actuando como refugio para individuos emigrantes susceptibles. Por otro lado, las especies que presentan reproducción sexual tienen ventajas en las respuestas a las alteraciones del ambiente, especialmente si estas alteraciones ocurren en rápida sucesión; pero este aspecto debe ser mejor estudiado (GEORGHIOU Y TAYLOR, 1986).

El aspecto ecológico más importante en la limitación del desarrollo de resistencia es la inmigración de los individuos susceptibles. Así, después del tratamiento, con elevadas dosis de baculovirus, solamente sobrevivirán algunos individuos portadores de genotipos resistentes. Si consideramos que el alelo resistente es recesivo, el genotipo resistente tendrá que ser homocigoto (rr). En el caso de inmigración intensa de individuos susceptibles las progenies resultantes serán susceptibles homocigotas (SS) y heterocigotas (rS), que pueden ser controladas con tratamientos posteriores (poligamia, Tabla 1). Si existen pocos o ningún inmigrante, entonces la reproducción entre individuos « rr » supervivientes aumentará la proporción de esta combinación genotípica en la población. Cuando el alelo resistente es dominante, los heterocigotos son resistentes, la importancia de la inmigración es mínima y la evolución de la población hacia la resistencia es rápida. En los casos en los que la base genética sea multigénica, las mismas consideraciones pueden ser utilizadas, teniendo en cuenta que cada locus aporta una pequeña parte de la resistencia máxima posible. Esta ganancia de resistencia (medida por h^2) será seleccionada en cada ciclo de multiplicación del insecto (GEORGHIOU Y TAYLOR, 1986).

Se consideran factores operacionales aquellos dependientes del hombre, como el momento de aplicación, la dosis, la frecuencia de las aplicaciones y la formulación del bioinsecticida. Por lo general, las poblaciones de *A. gemmatilis* son controladas con una sola aplicación de baculovirus. En cada generación, las larvas están expuestas de manera uniforme y con poca frecuencia al inóculo viral. Se debe considerar sin embargo, que después de la aplicación puede haber efecto de reposición del virus, proveniente de las orugas infectadas en el campo, que controlaría las generaciones subsiguientes. Otros factores, como la existencia de refugios, o zonas no tratadas que pueden servir de fuente de genotipos sensibles para la inmigración, también puede ser manipulada. Así el método de la dominancia efectiva consiste en aplicar dosis elevadas para permitir la supervivencia de pocos genotipos « rr », cuya resistencia se diluye a través de la cópula con individuos susceptibles inmigrantes. Sin embargo, esta estrategia puede llevar a un desarrollo más rápido a la resistencia, en el caso en que el flujo de inmigrantes sea bajo o cuando exista(n) carácter(es) de resistencia dominante(s), como se ha discutido anteriormente. Además de la dosis, también la persistencia (dependiente de la formulación o de las características inherentes al propio virus) puede ser un factor determinante de resistencia, ya que la exposición a residuos con actividad insecticida durante periodos extensos elimina los individuos más susceptibles (provenientes de la inmigración, por ejemplo).

4. Mecanismos de resistencia

La resistencia a un virus por parte de una larva puede descomponerse en dos aspectos fundamentales: una resistencia generalizada de todas las células de esta larva, que se transforman en no permisivas para el virus, o una resistencia locali-

zada en las estructuras responsables de la entrada del virus en el organismo, es decir, del tubo digestivo en el caso de los baculovirus en los que la infección se adquiere *per os*. Dentro del primer caso, la restricción, es decir el punto de bloqueo de la replicación viral, puede situarse a tres niveles fundamentales: 1) la entrada en la célula. 2) la replicación del genoma viral y el ensamblaje de la progenitura viral y 3) la liberación de esta progenie que servirá para infectar otras células.

Existen ejemplos de cada uno de los tipos de bloqueo en diferentes sistemas virales. Así, la desaparición del receptor del virus transforma unas células sensibles en resistentes, e inversamente, la introducción del receptor para un virus dado puede transformar células resistentes en sensibles. El punto de bloqueo para la replicación del virus Sigma en las cepas homocigotas para el alelo restrictivo *ref2PP* (resistentes al virus Sigma) de *D. melanogaster* se sitúa en una fase posterior a la entrada del virus (BRUN Y PLUS, 1980; WAYNE *et al.*, 1996). Por otro lado, la inaptitud del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) para replicarse en las células de *B. mori*, es debida a un bloqueo que ocurre una vez que la replicación del genoma viral ha empezado (ARGAUD, LÓPEZ FERBER Y CROIZIER, datos sin publicar). La modificación de la helicasa viral permite superar este obstáculo (KONDO Y MAEDA, 1991; CROIZIER *et al.*, 1994; KAMITA Y MAEDA, 1997; ARGAUD *et al.*, 1998).

Otro mecanismo utilizado por las células para proteger al resto del organismo es la muerte celular, por apoptosis o por inhibición de las vías de biosíntesis proteica. Los dos mecanismos son utilizados por ciertas células de lepidópteros para protegerse de la infección por baculovirus (DU Y THIEM, 1997). En paralelo, ciertos baculovirus han desarrollado métodos para sobrepasar esta resistencia; tal es el caso de la adquisición por parte de ciertos baculovirus del gen antiapoptótico *p35* (CLEM *et al.*, 1991; MILLER, 1997) o la del gen *hrf-1* por parte del NPV de *Lymantria dispar* (THIEM *et al.*, 1996; MAZZACANO *et al.*, 1999).

Finalmente, el tercer nivel de resistencia es la liberación de la progenie en condiciones en las que sea capaz de infectar otras células del organismo. Uno de los sistemas de resistencia a baculovirus (y a otras infecciones virales) bien documentado en los lepidópteros es el desprendimiento de las células intestinales en el lumen como consecuencia de la infección (BRIESE, 1986). Este mecanismo impide en algunos casos la infección del resto del organismo (WASHBURN *et al.*, 1999).

En la literatura, se han relatado diversos mecanismos de resistencia para diferentes virus entomopatógenos (BRIESE, 1986). Sin embargo, hasta el momento los mecanismos involucrados en el sistema de resistencia de *A. gemmatalis* para AgMNPV no han sido determinados. Actualmente hay programas de investigación sobre este tema.

Algunos baculovirus se transmiten a través de los huevos (BIRD, 1961); este no parece ser el caso de AgMNPV en su huésped (FUXA Y RICHTER 1993), en el cual, la vía principal de infección es la ingestión de los cuerpos de inclusión (OBs). Parece poco probable que durante el proceso anterior a la infección de las células epiteliales del intestino medio, existan mecanismos importantes de defensa contra el virus, como alteraciones en la fase de disolución de los OBs inmediatamente

anterior a la infección primaria de las células del intestino. Por lo tanto, es posible que los principales mecanismos de defensa contra la infección de las partículas virales impliquen a las células que sirven para el tránsito antes de la infección sistémica, es decir, fundamentalmente los tejidos del intestino medio (BRIESE, 1986).

Algunos de los posibles mecanismos de resistencia en el intestino son:

- a) La presencia de sustancias con acción antiviral en el fluido digestivo, como por ejemplo las que inactivan los viriones derivados del poliedro (PDV) en la luz del intestino del gusano de seda, *B. mori* L. (BRIESE, 1986).
- b) Dificultad para atravesar la membrana peritrófica (MP). Aunque no existen estudios sobre la MP de *A. gemmatilis*, se sabe que los poros de algunas especies de lepidópteros miden de 21 a 29 nm de diámetro y que las partículas infecciosas de los baculovirus miden entre 40 a 60 nm por 200 a 400 nm (TANADA Y KAYA 1993). Sin embargo, ciertos baculovirus tienen la capacidad de degradar la MP (LEPORE *et al.*, 1996, BOUCIAS Y PENDLAND, 1998). Una de las principales funciones de la MP es de actuar como una barrera contra agentes infecciosos y se puede considerarla como un obstáculo clave contra los microorganismos, aunque los virus, por su lado, han evolucionado mecanismos para sobrepasar la barrera y lograr la infección del huésped (LEHANE, 1997; WANG Y GRANADOS, 1998).
- c) Alteraciones en los receptores de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino, que dificultan la fijación de las partículas virales, perturbando el proceso de infección primaria.
- d) Inhibición de la replicación viral en las células epiteliales del intestino medio.
- e) Eliminación rápida de las células del intestino infectadas, a través de las heces, llevando a una reducción de los niveles de infección secundaria. Las células regenerativas originan nuevas células reconstituyendo el epitelio del intestino. Esto no ocurre en las cepas sensibles, en las cuales el número de células infectadas aumenta continuamente (INOUE Y MIYAGAWA, 1978). Resultados preliminares indican que en las fases iniciales de la infección en poblaciones resistentes al AgMNPV hay una reducción en el número de células intestinales infectadas. Esto puede ser debido al aumento de la tasa de renovación celular en el intestino o a una disminución de la capacidad del virus de entrar en las células intestinales. Cuando el virus extracelular es administrado directo en la hemolinfa de insectos resistentes, la infección parece ser similar a la que ocurre en linajes susceptibles indicando, de esta forma, que el mecanismo de resistencia debe ocurrir en la entrada del virus a través del intestino (B.M. RIBEIRO com. pers.).
- f) Destrucción o inactivación del virus en la hemolinfa. Reeson *et al.* (1998) sugieren que la producción de la enzima fenoloxidasas en la oruga *Spodoptera exempta* (Walker) está relacionada con la resistencia a su baculovirus.
- g) David (1978) indica que las diferencias entre las poblaciones resistentes y susceptibles de *Pieris brassicae* (L.), inoculadas con infecciones de viriones libres en la hemolinfa persistían, indicando que existen mecanismos o factores de resistencia además de aquellos envueltos a nivel del epitelio del intestino medio. Es probable que existan otros mecanismos asociados a la migración de las partícu-

- las virales, o barreras en el sistema traqueal, que es utilizado como vía de acceso en la diseminación de la infección para otros tejidos (ENGELHARD *et al.*, 1994).
- h) Finalmente, como ya se indicó, las células de los tejidos susceptibles de ser infectados, en general el cuerpo graso, pueden hacerse resistentes a la multiplicación viral.

5. Diferencias de susceptibilidad entre poblaciones naturales

Las interacciones entre las presiones de selección del virus y las tasas de inmigración de los huéspedes susceptibles pueden resultar en susceptibilidades diferentes entre poblaciones geográficas de una misma especie (BRIESE, 1986). Así, la observación de diferencias de susceptibilidad entre poblaciones naturales de diferentes orígenes permite prever que la manifestación de la resistencia puede ocurrir en estas poblaciones.

Las diferencias en los niveles de susceptibilidad a baculovirus entre poblaciones naturales de insectos han sido estudiadas por diversos autores (FUXA, 1993) (Tabla 2). Por ejemplo, se determinó que poblaciones de distinto origen geográfico de la palomilla de la patata, *Phthorimaea operculella* (Zeller) en Australia, presentaron diferencias de susceptibilidad de hasta 11,6 veces cuando fueron inoculadas con su granulovirus (BRIESE Y MENDE, 1981). Fuxa (1987) observó diferencias de los valores de la CL_{50} que variaron de 0,9 a 16,1 CPI por oruga de primer estadio, lo que representa diferencias de susceptibilidad de 18 veces entre poblaciones naturales de *S. frugiperda* colectadas en América del Norte, Central y de América del Sur.

A partir de 1991 se han realizado en Brasil estudios sobre la evolución de la resistencia en poblaciones de campo de *A. gemmatilis* expuestas a aplicaciones de baculovirus (SOSA-GÓMEZ Y MOSCARDI, 1994; ABOT *et al.*, 1995). Los estudios realizados en la Embrapa Soja, comparando la susceptibilidad entre poblaciones de *A. gemmatilis* provenientes de la región de Dourados (MS), Passo Fundo y Tapejara (RS) y Rancho Alegre y Londrina (PR), no comprobaron diferencias en la susceptibilidad de las poblaciones al AgMNPV. Sin embargo, por otro lado, se observa una correlación positiva significativa entre las CL_{50} y el número de años en que las áreas fueron expuestas al virus. Teniendo en cuenta la tendencia de aumento de la CL_{50} a través de los años, los autores indican la necesidad de realizar muestreos en las áreas donde el AgMNPV fue aplicado con frecuencia (ABOT *et al.*, 1995).

6. Resistencia de la oruga de la soja al AgMNPV

La resistencia es un fenómeno dinámico, resultante de las interacciones entre las poblaciones del insecto huésped y el virus; ambas pueden presentar variabilidad intraespecífica. Dos poblaciones de insectos pueden presentar respuestas de intensidad diferente a un mismo virus y, aún más, a diferentes cepas del mismo. El

Tabla 2. Diferencias de susceptibilidad al baculovirus entre poblaciones de insectos provenientes de campo.

Virus	Huésped	Número de poblaciones	Factor de resistencia	Referencia
GV	<i>Phthorimaea operculella</i>	16	11,6	Briese y Podgwaite (1985)
GV	<i>Pieris rapae</i>	2	sin diferencias	Martignoni y Schmid (1961)
NPV	<i>Spodoptera frugiperda</i>	13	18,8	Fuxa (1987)
NPV	<i>Anticarsia gemmatilis</i>	6	sin diferencias	Fuxa <i>et al.</i> (1993) Abot <i>et al.</i> (1995)

fenómeno de susceptibilidad diferencial a varios aislados del virus ya ha sido observado en numerosas especies de lepidópteros, entre ellas *A. gemmatilis* (BERINO, 1995).

En los estudios realizados simultáneamente por Embrapa Soja, en Brasil, y por la Universidad de Louisiana, EUA, se comprobó que, en laboratorio en condiciones de aislamiento y presión de selección elevada (una exposición constante a una CL_{80}), es posible obtener poblaciones de *A. gemmatilis* resistentes al AgMNPV en tres a cuatro generaciones (ABOT *et al.*, 1996). Niveles de resistencia elevados también han sido observados en otros sistemas huésped-baculovirus, pero en ninguno de estos fueron tan elevados como en el sistema *A. gemmatilis*- AgMNPV (Tabla 3). Es interesante destacar que estos elevados niveles de resistencia se obtuvieron tras un proceso de selección durante un mayor número de generaciones y con una presión de selección mayor que la aplicada en otras especies.

Las poblaciones de *A. gemmatilis* en Brasil presentaron una respuesta diferente a la de las poblaciones de los EUA. El factor de resistencia (FR) (cociente entre las CL_{50} de la población resistente y de la población sensible) fue de más de dos mil veces en la población seleccionada en laboratorio, proveniente de Sertanópolis (PR), mientras que en la población americana solo se obtuvo un FR de aproximadamente 5 (Figura 1).

En estudios posteriores, Fuxa y Richter (1998) continuaron con la presión de selección en poblaciones estadounidenses de *A. gemmatilis* y, aún así, los niveles de resistencia obtenidos no fueron comparables a los de las poblaciones de Brasil. Los elevados niveles de resistencia obtenidos con *A. gemmatilis* en Brasil ($FR > 3.000$; MOSCARDI, 1998, 1999), se deben a la elevada presión de selección aplicada durante 16 generaciones y tal vez al hecho de que en Brasil, el insecto ya estaba expuesto naturalmente al AgMNPV al contrario que en los Estados Unidos, donde este virus no está presente naturalmente. Esta exposición durante largos periodos posiblemente haya sido la causa de la acumulación de una gran reserva de variabilidad para la resistencia al baculovirus. Actualmente, las poblaciones mantenidas en la Embrapa Soja se encuentran en la 65ª generación y los niveles de resistencia son aun mayores que los publicados.

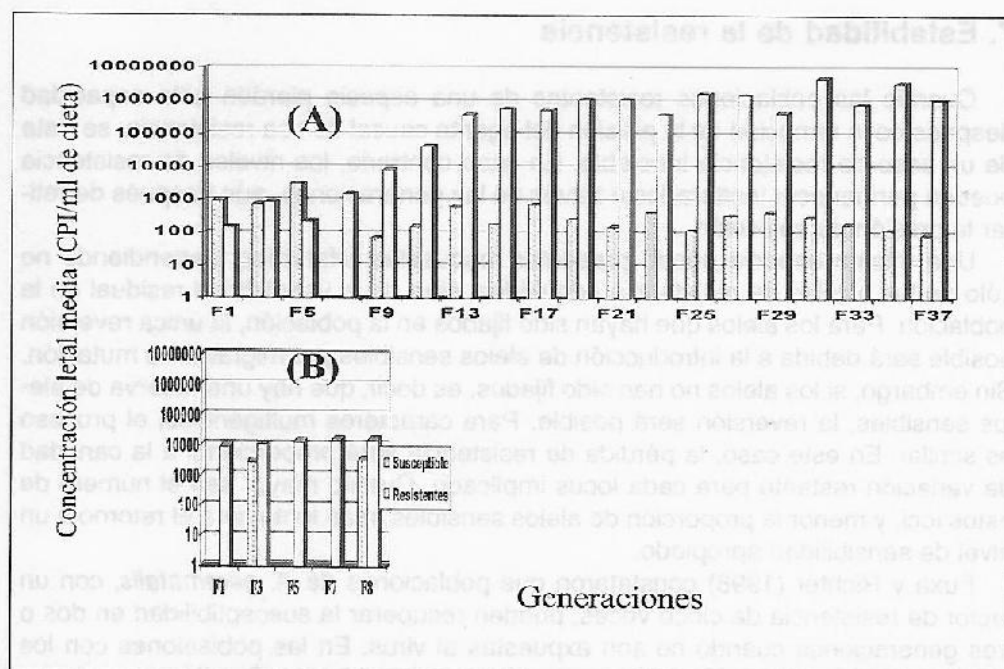


Figura 1. Evolución de la concentración letal media, expresada en OBs por ml de dieta, de poblaciones de *A. gemmatilis* de Sertanópolis, Paraná, Brasil (A) y de los Estados Unidos (B), después de aplicar presión de selección mediante inoculaciones con nucleopoliedrovirus.

Tabla 3. Casos de resistencia a baculovirus detectados en poblaciones de insectos plaga y después en estudios de laboratorio.

Virus	Huésped	FR ¹	Número de gens.	Porcentaje de mortalidad ²	Referencia
NPV	<i>Anticarsia gemmatilis</i>	>3000	16	68-90	Moscardi (1999)
GV	<i>Phthorimaea operculella</i>	140	6	34-71	Briese y Mende (1983)
GV	<i>Cydia pomonella</i>	7 a 8	7	51-90	Briese (1986)
NPV	<i>Spodoptera frugiperda</i>	3,2	7	79	Fuxa et al. (1988)

¹ FR=Factor de resistencia;

² El porcentaje de mortalidad refleja el grado de presión de selección en las poblaciones de insectos experimentales.

7. Estabilidad de la resistencia

Cuando las poblaciones resistentes de una especie pierden esta capacidad después de la remoción de la presión del agente causal de esa resistencia, se trata de un caso de resistencia inestable. En caso contrario, los niveles de resistencia pueden permanecer inalterados a través de las generaciones, aún después de retirar la presión de selección.

Una misma especie puede presentar respuestas diferentes, dependiendo no sólo de los niveles de resistencia adquiridos, sino de la variabilidad residual en la población. Para los alelos que hayan sido fijados en la población, la única reversión posible será debida a la introducción de alelos sensibles por migración o mutación. Sin embargo, si los alelos no han sido fijados, es decir, que hay una reserva de alelos sensibles, la reversión será posible. Para caracteres multigénicos, el proceso es similar. En este caso, la pérdida de resistencia será proporcional a la cantidad de variación restante para cada locus implicado. Cuanto mayor sea el número de estos loci, y menor la proporción de alelos sensibles, más lento será el retorno a un nivel de sensibilidad apropiado.

Fuxa y Richter (1998) constataron que poblaciones de *A. gemmatilis*, con un factor de resistencia de cinco veces, pueden recuperar la susceptibilidad en dos o tres generaciones cuando no son expuestas al virus. En las poblaciones con los niveles de resistencia más elevados, como los obtenidos en Brasil, con un factor de resistencia de alrededor de 2.500 veces, recuperaron niveles de susceptibilidad aceptables ($FR=5$) después de sólo 12 generaciones (ABOT, 1997) (Figura 2). Por otro lado, cuando poblaciones de *A. gemmatilis* oriundas de Dourados (MS) y Sertanópolis (PR), con elevados niveles de resistencia, fueron cruzadas con las respectivas colonias susceptibles, la resistencia fue totalmente quebrada en cuatro cruzamientos (ABOT, 1993, MOSCARDI, 1999). Estos datos indican que hay una variabilidad residual en la mayor parte de los alelos implicados, ya que el retorno a la sensibilidad es posible.

El conocimiento de la inestabilidad de la resistencia puede orientar sobre las estrategias a ser adoptadas en el manejo de la resistencia en campo. En presencia de inestabilidad, puede ser más apropiado adoptar medidas dentro del concepto de manejo por moderación o por ataque múltiple (OMOTO Y ALVES, 1998). Por otro lado, esta resistencia puede ser rápidamente "diluída" cuando la población resistente es cruzada y/o sometida al cruzamiento con poblaciones susceptibles (FUXA *et al.*, 1993; ABOT, 1993).

8. Resistencia cruzada y múltiple

Se denomina resistencia cruzada la resistencia desarrollada contra un agente debido a la selección por resistencia contra otro agente. Los estudios de resistencia cruzada son útiles, porque orientan en la identificación de los mecanismos de resistencia y permiten caracterizar la amplitud del espectro (específico o general)

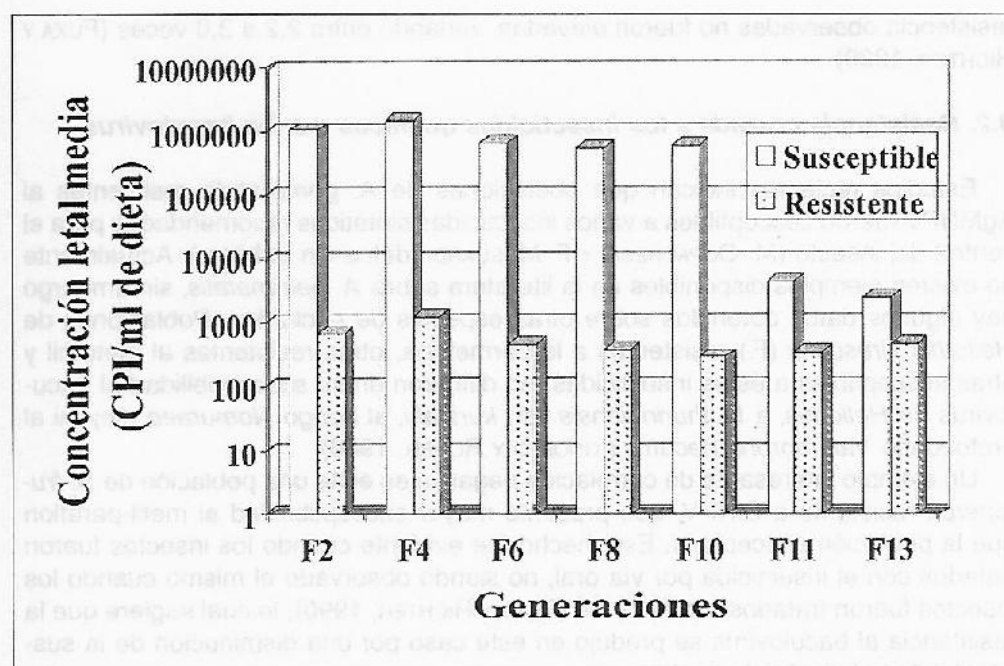


Figura 2. Concentración letal media de AgMNPV, expresada en OBs por ml de dieta, en poblaciones de *A. gemmatalis* resistentes, después de retirar la presión de selección y el testigo susceptible.

de resistencia cruzada (SCOTT, 1990). Otros autores también definen resistencia múltiple como aquella que ocurre cuando existen diferentes mecanismos de resistencia en un mismo individuo, manifestándose por diferentes agentes de control (químicos y biológicos). La existencia de resistencia cruzada permite suponer que el mecanismo implicado en su generación es el mismo.

8.1. Resistencia cruzada entre los baculovirus y otros entomopatógenos

Existen pocos estudios de resistencia cruzada con virus entomopatógenos. En el caso de *A. gemmatalis*, existe un solo ejemplo, en el cual las poblaciones resistentes al AgMNPV mantuvieron su susceptibilidad a *Bacillus thuringiensis* (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1992), indicando que este patógeno puede ser usado como una alternativa de control.

La selección de poblaciones de *S. frugiperda* resistentes al NPV de *S. frugiperda* puede afectar la susceptibilidad de esta especie a otros agentes de mortalidad. Así, la población resistente al SfMNPV fue poco susceptible tanto al SfGV, el granulovirus originario de la misma especie, como a AcMNPV, aunque las tasas de

resistencia observadas no fueron elevadas, variando entre 2,2 a 3,0 veces (FUXA Y RICHTER, 1990).

8.2. Resistencia cruzada a los insecticidas químicos y a los baculovirus

Estudios recientes indican que poblaciones de *A. gemmatilis* resistentes al AgMNPV fueron susceptibles a varios insecticidas sintéticos recomendados para el control del insecto (M. COPACHESKI Y F. MOSCARDI, datos sin publicar). Actualmente no existen ejemplos disponibles en la literatura sobre *A. gemmatilis*, sin embargo hay algunos datos obtenidos sobre otras especies de noctuidos. Poblaciones de *Heliothis virescens* (F.) resistentes a la permetrina, otras resistentes al metomil y otras susceptibles a estos insecticidas, no difirieron en su susceptibilidad al baculovirus de *Heliothis*, a *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, al hongo *Nomuraea rileyi* ni al protozoario *Vairimorpha necatrix* (IGNOFFO Y ROUSH, 1986).

Un ejemplo interesante de correlación negativa es el de una población de *S. frugiperda* resistente a SfMNPV, que presentó mayor susceptibilidad al metil-paration que la población susceptible. Este hecho fue evidente cuando los insectos fueron tratados con el insecticida por vía oral, no siendo observado el mismo cuando los insectos fueron tratados tópicamente (FUXA Y RICHTER, 1990), lo cual sugiere que la resistencia al baculovirus se produjo en este caso por una disminución de la susceptibilidad al nivel del intestino.

9. Factores que alteran la susceptibilidad al baculovirus

Además de la resistencia *sensu stricto*, tal y como la hemos descrito anteriormente, otros factores pueden interferir en la manifestación de la susceptibilidad de insectos a la enfermedad. Las poblaciones de huéspedes sometidas a estrés por frío, falta de alimento, alimento inadecuado o por ciertas sustancias químicas, presentan mayor susceptibilidad a los baculovirus o pueden presentar mortalidad debida a la manifestación de infecciones virales preexistentes en estado latente. Existen diversos factores que afectan la susceptibilidad a la enfermedad. A continuación serán mencionados algunos ejemplos:

9.1. El estadio del insecto

La reducción de la sensibilidad observada a lo largo del desarrollo ontogénico no se considera una resistencia verdadera, pero será tratado en esta sección por la importancia que posee desde el punto de vista del control de las poblaciones en el campo. La susceptibilidad puede ser mayor inmediatamente antes y después de cada ecdisis y decrecer considerablemente durante el período intermediario (ENGELHARD Y VOLKMAN, 1995). Estos autores observaron que la reducción en la sensibilidad es debida a una mayor dificultad de paso de la barrera intestinal. Los cambios del nivel de resistencia, dentro del ciclo de cada individuo, pueden ser contro-

lados por las variaciones de hormonas de manera que individuos en diapausa presentan una tolerancia considerable en comparación con individuos que no están en diapausa (BRIESE Y PODGWAITE, 1985). De la misma manera, la tolerancia a enfermedades es probablemente mayor en el estado de pupa (MIKHAILOV *et al.*, 1992). En *A. gemmatalis* la reducción de la susceptibilidad ocurre en progresión lineal con el desarrollo (Figura 3) (BOUCIAS *et al.*, 1980, MOSCARDI, 1983). Por lo tanto, el control deberá ser realizado cuando las orugas se encuentran en los tres primeros estadios larvales, momento en el que la susceptibilidad al virus es elevada.

9.2. Densidad poblacional

Recientemente, Reeson *et al.* (1998) observaron que poblaciones de *Spodoptera exempta* (Walker) criadas en altas densidades eran más tolerantes a su NPV que las criadas en condiciones de aislamiento. Paralelamente, las poblaciones criadas en altas densidades presentaron una melanización acentuada de la cutícula en los últimos estadios larvales, lo que parece estar relacionado con un incremento en los niveles de fenoloxidasa, lo cual conferiría a los individuos un mecanismo de defensa más efectivo contra infecciones. La coloración oscura, llamada polimorfismo de fase, también se observa en poblaciones de campo de *A. gemmatalis* cuando se encuentran en alta densidad. Recientemente, poblaciones

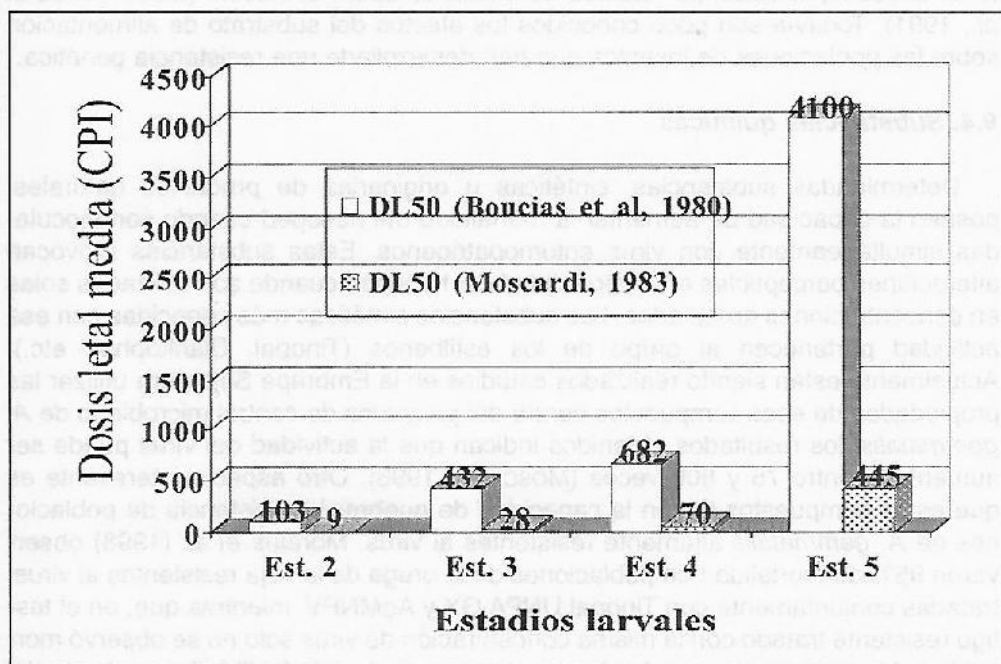


Figura 3. Dosis letal media en OBs para los diferentes estadios larvales de *A. gemmatalis*.

que presentan ese fenómeno fueron seleccionadas en laboratorio y están siendo comparadas con orugas que presentan coloración verde, con la finalidad de averiguar su susceptibilidad diferencial al AgMNPV, a otros patógenos y a insecticidas químicos (F. MOSCARDI, datos sin publicar).

9.3. La dieta

Se ha observado que las larvas de *A. gemmatilis* alimentadas con diferentes plantas huésped presentan diferentes niveles de susceptibilidad al AgMNPV. Estas diferencias pueden ser debidas en parte a la calidad de las hojas con las cuales se alimentaron. Los insectos alimentados con *Vigna luteola* (Jacq.) Benth fueron menos susceptibles al virus que aquellos alimentados con soja, *Glycine max* L. o *Rhynchosia minima* (L.) (PENG *et al.*, 1997). De manera semejante, Richter *et al.* (1987) observaron que la susceptibilidad de *S. frugiperda* a su baculovirus difiere cuando los insectos se alimentan de plantas huéspedes diferentes; así, la susceptibilidad al virus fue mayor cuando los insectos se alimentaron de soja, *Cynodon dactylon* (L.), *Lolium multiflorum* Lam. o *Sorghum bicolor* (L.), que cuando se alimentan de maíz [*Zea mays* (L.)], *Panicum romasum* L. o *Brachiaria decumbens* Staph. Estas diferencias pueden ser debidas a diversas interacciones durante el proceso de infección, como interferencias en el pH, en la fijación de proteínas, en la velocidad de tránsito del alimento por el intestino (PENG *et al.*, 1997) o al aumento de la susceptibilidad, por efectos de antibiosis sobre el insecto (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1991). Todavía son poco conocidos los efectos del sustrato de alimentación sobre las poblaciones de insectos que han desarrollado una resistencia genética.

9.4. Sustancias químicas

Determinadas sustancias, sintéticas u originarias de productos naturales, poseen la capacidad de aumentar la mortalidad del huésped cuando son inoculadas simultáneamente con virus entomopatógenos. Estas sustancias provocan alteraciones perceptibles en la mortalidad del huésped cuando son utilizadas solas en concentraciones apropiadas. Las sustancias sintéticas más conocidas con esa actividad pertenecen al grupo de los estilbenos (Tinopal, Blankophor, etc.). Actualmente están siendo realizados estudios en la Embrapa Soja para utilizar las propiedades de esos compuestos dentro del programa de control microbiano de *A. gemmatilis*; los resultados obtenidos indican que la actividad del virus puede ser aumentada entre 75 y 800 veces (MOSCARDI, 1998). Otro aspecto interesante es que estos compuestos tienen la capacidad de quebrar la resistencia de poblaciones de *A. gemmatilis* altamente resistentes al virus. Morales *et al.* (1998) observaron 95% de mortalidad en poblaciones de la oruga de la soja resistentes al virus, tratadas conjuntamente con Tinopal UNPA GX y AgMNPV, mientras que, en el testigo resistente tratado con la misma concentración de virus solo no se observó mortalidad. Aparentemente, ese fenómeno está asociado a la facilidad de entrada del virus en las células del intestino medio. Ha sido comprobado que el calcofluor

puede inhibir la formación de la membrana peritrófica en varias especies de lepidópteros (*Trichoplusia ni*, *Lymantria dispar*, *Helicoverpa zea*, *Pseudaletia unipuncta* e *Hyphantria cunea*) siendo este uno de los caminos para mejorar el control de diversas especies plagas (WANG Y GRANADOS, 1999).

El ácido bórico también presenta propiedades semejantes, favoreciendo la mortalidad de las orugas cuando es aplicado conjuntamente con el virus. La reducción de la concentración letal media, CL_{50} , para *A. gemmatilis* es aproximadamente de 4 veces se observa también una reducción del tiempo letal medio, LT_{50} de 13,7 días para 7,4 días dependiendo de la concentración de ácido bórico (MORALES *et al.* 1997).

Estudios de las interacciones que involucran factores sinérgicos y poblaciones resistentes son escasos. Entre los casos mejor conocidos de acción sinérgica en los que están implicados baculovirus y poblaciones de insectos plagas, se encuentra el de los *virus enhancin factors* (*vef*) o enhancinas (ver Capítulo 10). Tanada *et al.* (1973) observaron la existencia de un factor sinérgico de la infección de NPV en el cuerpo de inclusión del granulovirus (GV) de *Pseudaletia unipuncta* (Haworth), cuando se inocularon los dos virus simultáneamente. Posteriormente, los *vef* presentes en ciertos GV fueron clonados y caracterizados (HASHIMOTO *et al.*, 1991; Roelvink *et al.*, 1995). Actualmente, existen evidencias de que ese factor es una metaloproteasa (LEPORE *et al.*, 1996) producida por algunos baculovirus, tanto GV como NPV (KUZIO *et al.*, 1999). Los *vef* poseen la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana peritrófica PM y, por lo tanto, facilitar la penetración de las partículas virales (LEPORE *et al.*, 1996; WANG Y GRANADOS, 1998).

Hoffmann-Campo y Moscardi (datos sin publicar) observaron que el flavonoide rutina, presente en algunos genotipos de soja resistentes a orugas defoliadoras también ocasionó la quiebra de resistencia en poblaciones de *A. gemmatilis* altamente resistente al virus, cuando se inoculó simultáneamente con éste.

9.5. Otros agentes biológicos

La infección por otros patógenos puede quebrar la resistencia al AgMNPV. Así, se observó que poblaciones de *A. gemmatilis*, con elevada resistencia a baculovirus vieron su susceptibilidad al virus aumentada substancialmente cuando fueron infectadas por el protozoario *Thelophania* sp. (SOSA-GÓMEZ Y MOSCARDI, 1994). Se desconocen las respuestas de poblaciones resistentes afectadas por otros enemigos naturales, aunque se sabe que algunas especies de lepidópteros parasitados por himenópteros presentaron menor susceptibilidad al baculovirus (BEEGLE Y OATMAN, 1974, SANTIAGO-ÁLVAREZ Y CABALLERO, 1990).

10. Alteraciones de los parámetros biológicos relacionados a la resistencia

De la misma manera que ocurre con los insecticidas, el desarrollo de resistencia a los baculovirus en una población determinada puede resultar en un costo bio-

lógico para los individuos de esta población, es decir, en una reducción de su "aptitud" biológica. Entre los insectos en los que se ha observado un tal costo de la resistencia a baculovirus se encuentran *S. frugiperda* y *A. gemmatilis*.

Los efectos más prominentes reportados en los parámetros biológicos son una reducción en el número de huevos por hembra, una menor viabilidad de estos huevos, así como una tasa de desarrollo reducida mas notable durante el estado de pupa (FUXA Y RICHTER, 1998). Según estos autores, la reducción de la eficacia biológica acarrió la extinción de una colonia resistente de *A. gemmatilis* después de 16 generaciones. En trabajos realizados en el laboratorio de la Embrapa Soja con esta especie, no se observaron diferencias importantes entre las poblaciones resistentes y susceptibles, salvo una disminución en el peso de las pupas en la población resistente. La población resistente fue ligeramente superior a la población susceptible en el período de oviposición y la longevidad, sin observarse diferencias en fertilidad (ABOT, 1997). Hasta mayo de 2000, estas diferencias en las poblaciones resistentes mantenidas bajo presión de selección en la Embrapa Soja después 65 generaciones, no se comprometieron en el mantenimiento de la colonia.

La discrepancia en los datos obtenidos entre los dos estudios sugiere que no se pueden realizar inferencias a partir de una población para su aplicación a otras poblaciones, requiriendo un estudio particular para cada población geográfica. Los parámetros evaluados indican una mayor adaptabilidad de las poblaciones de Brasil que de las de EUA seleccionadas por resistencia a baculovirus, lo cual es un indicio de la necesidad de tener más cautela con el manejo de la resistencia en Brasil.

11. Dificultades en la detección de la resistencia en condiciones de campo

Cuando existe potencial para el desarrollo de resistencia, es necesaria una evaluación sistemática de la incidencia y grado del problema para asegurar un control adecuado de la plaga. Una de las dificultades principales para la identificación de la resistencia en condiciones de campo es la variabilidad de los bioensayos, que puede ocultar las fases iniciales del desarrollo de resistencia, cuando la incidencia (frecuencia de los genotipos resistentes) es baja. La técnica de bioensayo debe ser cuidadosamente estandarizada. Idealmente se debe trabajar con dosis exactas de OBs ingeridos, en lugar de concentraciones de virus en el alimento.

Los resultados obtenidos en laboratorios diferentes pueden indicar grandes diferencias debido a las variaciones que pueden ocurrir cuando se trabaja con concentraciones y con poblaciones del huésped mantenidas en diferentes condiciones. Estas variaciones ocurren en función del método utilizado en el proceso de inoculación, sea por incorporación del virus en la dieta, aplicación sobre la superficie de la dieta o sobre hojas, etc. Sin embargo, cuando se trabaja con un gran número de larvas, la rapidez del método de bioensayo puede ser un punto crítico, y puede ser ventajoso el uso de un mayor número de larvas sacrificando en parte la precisión de cada medida.

En el inicio de los trabajos de resistencia realizados en la Embrapa Soja, durante los bioensayos, por ejemplo, se llegaron a inocular 8.000 a 10.000 larvas por día. Una variación de respuesta en los bioensayos también puede ser debida a la variabilidad natural de las poblaciones, de magnitud normalmente desconocida. Se define como variabilidad natural la diferencia numérica en la respuesta que se detecta cada vez que un bioensayo es realizado con una raza o cohorte del insecto, sea en una o más generaciones (ROBERTSON *et al.*, 1995). Las variaciones esperadas en los bioensayos durante los estudios de resistencia pueden ser minimizadas mediante el uso de la tasa de resistencia que considera el cociente entre la concentración letal media (CL_{50}) de la población resistente y de la población susceptible, proveniente de bioensayos realizados el mismo día con las poblaciones respectivas mantenidas en condiciones idénticas.

La existencia de una población heterogénea en respuesta a la infección también enmascara la presencia de individuos resistentes. El estrés producido en las poblaciones de los insectos plaga debido a la transferencia desde el campo al laboratorio provoca una selección involuntaria que puede causar distorsiones en los resultados obtenidos en el laboratorio. Debido a lo anterior, se recomienda que los bioensayos sean realizados con insectos criados durante dos o tres generaciones en el laboratorio, una vez adaptados a la dieta y a las condiciones de multiplicación.

Una etapa inicial de un programa para la evaluación del desarrollo de resistencia de un insecto a un agente de control consiste en el seguimiento de las poblaciones. Para ello, se ha propuesto la utilización de una dosis discriminadora (DL_{95} o DL_{99}) para determinar la presencia de individuos resistentes con mayor precisión y con menor consumo de material. En las etapas iniciales de la manifestación de la resistencia la frecuencia de individuos resistentes es normalmente muy baja y cuanto menor la frecuencia de individuos resistentes mayor tiene que ser el tamaño de la muestra (ROUSH Y MILLER, 1986).

12. Manejo de la resistencia a baculovirus

Hasta el momento, no se han verificado casos de resistencia a baculovirus debidos al uso de estos agentes en el campo como bioinsecticidas. En bioensayos realizados con poblaciones de *A. gemmatilis*, provenientes de áreas inmediatamente después del tratamiento con baculovirus, no fueron observadas diferencias significativas cuanto a su CL_{50} , comparada con la de poblaciones susceptibles (D.R. SOSA-GÓMEZ Y F. MOSCARDI, datos sin publicar). Se pueden prever estrategias para impedir o retardar la ocurrencia de casos de resistencia, adoptando medidas racionales que alteren la probabilidad del desarrollo de resistencia, posibilitando el control de la plaga. Las medidas posibles consisten básicamente en la reducción de la presión selectiva en el espacio y/o en el tiempo para evitar la selección de los genotipos mas resistentes.

Una vez determinado que existe potencial para el desarrollo de resistencia, las estrategias a ser adoptadas pueden ser:

- 1) Utilizar las dosis mínimas efectivas para el control de las poblaciones de la plaga.
- 2) Alternar el baculovirus con otras tácticas de control, como la utilización de *B. thuringiensis*, con el cual no ocurre resistencia cruzada (SOSA-GÓMEZ *et al.*, 1992) o de reguladores de crecimiento.
- 3) La utilización del virus en conjunto con otros agentes de control con efecto de sinergismo o aditivo, tales como insecticidas sintéticos en dosis reducidas (SHAPIRO Y BELL, 1982; MOSCARDI Y SOSA-GÓMEZ, 1992; SILVA, 1995).
- 4) La utilización de interacciones con genotipos de plantas resistentes, cuyo componente más importante es la resistencia por antibiosis.
- 5) Proveer refugios. La aplicación en mosaico, o sea, la alternancia de áreas tratadas y no tratadas proporciona un refugio espacial. Los refugios temporales consisten en dejar periodos sin tratar a través del tiempo, lo que normalmente ya se hace, debido a que las aplicaciones de baculovirus se realizan una vez por ciclo de la soja, aunque como se ha mencionado anteriormente, el virus es capaz de persistir y dispersarse en el medio ambiente y mantener una presión de selección en las poblaciones de insectos plaga, aunque probablemente ésta sea menor que la que experimentan durante la aplicación de un baculovirus bioinsecticida. La eficacia de los refugios no ha sido verificada extensivamente aunque existe evidencia teórica y empírica que sí funcionan (TABASHNIK, 1994; LIU Y TABASHNIK, 1997).
- 6) Utilizar dosis masivas para eliminar la mayor parte de los individuos, dejando solo algunos resistentes, los cuales por cruzamientos con los susceptibles inmigrantes, pueden generar una F_1 de individuos susceptibles. Sin embargo, para el éxito de este método es necesario verificar que hay una inmigración de individuos susceptibles hacia las áreas tratadas y que la determinación genética del carácter es de tipo recesivo. Considerando las observaciones realizadas en los bioensayos, es probable que individuos resistentes en el último estadio larval sobrevivan en gran número, a las aplicaciones de dosis muy elevadas invalidando esta estrategia, principalmente cuando las aplicaciones son dirigidas contra poblaciones que ya colonizan el campo desde hace tiempo, siendo heterogéneas. En este contexto, es importante que la aplicación del virus sea realizada cuando la mayoría (90%) de las larvas todavía se encuentran en los estadios iniciales, o sea, desde el primero al tercero estadio de desarrollo.

13. Conclusiones

Aunque en condiciones de laboratorio el fenómeno de resistencia haya sido detectado mediante presión de selección por AgMNPV en poblaciones de *A. gemmatilis*, no existen indicios de que ocurra resistencia al AgMNPV en campo. Sin embargo, se debe vigilar y limitar los métodos que aumentan el riesgo de su aparición. Así las aplicaciones preventivas de AgMNPV, realizadas con el virus aisladamente o mezclado con herbicidas postemergentes, deberán ser evaluadas. A tra-

vés de esta práctica se aumenta la frecuencia y el periodo de exposición de las poblaciones del insecto al baculovirus y estas aplicaciones dirigidas contra poblaciones muy bajas del huésped pueden ser realizadas sin necesidad. Esta práctica se ha hecho común para reducir los costes operacionales.

La utilización de dosis masivas del AgMNPV parece ser una estrategia viable para el manejo de eventual resistencia, por las razones semejantes a las expuestas por Tabashnik (1994) y debido a que *A. gemmatalis* puede desarrollar resistencia al AgMNPV en pocas generaciones. Los estudios de seguimiento de la resistencia deberán recibir mayor énfasis dado el incremento del área tratada con virus y en aquellas regiones en que el control ha sido practicado de forma constante. En el futuro serán necesarios estudios de resistencia sobre los virus transformados (transgénicos) que expresan genes heterólogos con actividad insecticida.

14. Bibliografía

- ABOT, A.R. 1993. *Avaliação da resistência de Anticarsia gemmatalis Hübner 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) ao seu vírus de poliedrose nuclear, Baculovirus anticarsia*. Curitiba: UFPR, Brasil, Tesis de Maestría.
- ABOT, A.R. 1997. *Parâmetros para a produção massal do vírus de poliedrose nuclear da lagarta da soja, Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)*. Curitiba: UFPR, Brasil, Tesis de Doctorado.
- ABOT, A.R., F. MOSCARDI, J.R. FUXA, D.R. SOSA-GÓMEZ Y A.R. RICHTER. 1995. *Susceptibility of populations of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) from Brazil and United States to nuclear polyhedrosis virus*. J. Entomol. Sci. **30**:62-69.
- ABOT, A.R., F. MOSCARDI, J.R. FUXA, D.R. SOSA-GÓMEZ Y A.R. RICHTER. 1996. *Development of resistance by Anticarsia gemmatalis from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure*. Biol. Contr. **7**:126-130.
- ARGAUD, O., L. CROIZIER, M. LÓPEZ-FERBER Y G. CROIZIER. 1998. *Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of Autographa californica nucleopolyhedrovirus are required to kill Bombyx mori larvae*. J. Gen. Virol. **79**:931-935.
- BEEGLE, C.C. Y E.R. OATMAN. 1974. *Differential susceptibility of parasitized and nonparasitized larvae of Trichoplusia ni to a nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **24**:188-195.
- BERINO, E.C.S. 1995. *Determinação da atividade biológica de isolados geográficos e temporais de VPN de Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae)*. Porto Alegre:UFRGS, Brasil, Tesis de Maestría.
- BIRD, F.T. 1961. *Transmission of some insect viruses with particular reference to ovarian transmission and its importance in the development of epizootics*. J. Invertebr. Pathol. **3**:352-380.
- BOUCIAS, D.G. Y J.C. PENDLAND. 1998. *Principles of insect pathology*. Kluwer Acad. Pubs., Norwell, MA.
- BOUCIAS, D.G., C. STOKES, G. STOREY Y J.C. PENDLAND. 1996. *The effects of imida-*

- clopid* on the termite *Reticulitermes flavipes* and its interaction with the myco-pathogen *Beauveria bassiana*. Pflanzen. Nachricht. Bayer **49**:103-144.
- BOUCIAS, D.G., D.W. JOHNSON Y G.E. ALLEN. 1980. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*, larvae. Environ. Entomol. **9**:59-61.
- BRIESE, D.T. 1986. Insect resistance to baculoviruses, p. 237-263. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), The biology of baculoviruses, Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL.
- BRIESE, D.T. Y H.A. MENDE. 1981. Differences in susceptibility to a granulosis virus between populations of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bull. Entomol. Res. **71**:11-18.
- BRIESE, D.T. Y H.A. MENDE. 1983. Selection for increased resistance to a granulosis virus in the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bull. Entomol. Res. **73**:1-9.
- BRIESE, D.T. Y J.D. PODGWAITE. 1985. Development of viral resistance in insect populations, p. 360-398. En: K. E. Maramorosch y K. E. Sherman (eds.), Viral insecticides for biological control. Academic Press, Orlando, FL.
- BRUN, G. Y N. PLUS. 1980. The viruses of *Drosophila*, p. 625-702. En: M. A. Ashburner y T. R. F. Wright (ed.), The genetics and biology of *Drosophila*. Academic Press, London.
- CLEM, R.J., M. FECHHEIMER Y L.K. MILLER. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. Science **254**:1388-1390.
- CROIZIER, G., L. CROIZIER, O. ARGAUD Y D. POUDÉVIGNE. 1994. Extension of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**:48-52.
- DAVID, W.A.L. 1978. The granulosis virus of *Pieris brassicae* (L.) and its relationship with its host. Adv. Virus Res. **22**:112-161.
- DU, X. Y S.M. THEIM. 1997. Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis. J. Virol. **71**:7866-7872.
- ENGELHARD, E.K. Y L.E. VOLKMAN. 1995. Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Virology **209**:384-389.
- ENGELHARD, E.K., L.N. KAM-MORGAN, J.O. WASHBURN Y L.E. VOLKMAN. 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**:3224-3227.
- FALCONER, D.S. 1970. Introducción a la genética cuantitativa. Compañía editorial continental, México D.F.
- FUXA, J.R. 1987. Spodoptera frugiperda susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration. Environ. Entomol. **16**:218-223.
- FUXA, J.R. 1993. Insect resistance to viruses, p. 197-209. En: S.N. Thompson, B.A. Federici y N.E. Beckage (ed.), Parasites and pathogens of insects, Vol. 2: pathogens. Academic Press, NY.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1990. Response of nuclear polyhedrosis virus-resistant

- Spodoptera frugiperda larvae to other pathogens and to chemical insecticides. J. Invertebr. Pathol. **55**:272-277.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1993. Lack of vertical transmission in *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus, a pathogen not indigenous to Louisiana. Environ. Entomol. **22**:25-431.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1998. Repeated reversion of resistance to nucleopolyhedrovirus by *Anticarsia gemmatalis*. J. Invertebr. Pathol. **71**:159-164.
- FUXA, J.R., A.R. ABOT, F. MOSCARDI, D.R. SOSA-GÓMEZ Y A.R. RICHTER. 1993. Selection for *Anticarsia gemmatalis* resistance to NPV, and susceptibility of field populations to the virus. Resist. Pest Managemt. **5**:39-41.
- FUXA, J.R., F.L. MITCHELL Y A.R. RICHTER. 1988. Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. Entomoph. **33**:55-63.
- GEORGHIOU, G.P. Y C.E. TAYLOR. 1986. Factors influencing the evolution of resistance, p. 157-169. En: National Research Council (ed.), Pesticide resistance: strategies and tactics for management. National Academy Press, Washington, D.C.
- 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.
- IGNOFFO, C.M. Y G.E. ALLEN. 1972. Selection for resistance to a nucleopolyhedrosis virus in laboratory populations of the cotton bollworm, *Heliothis zea*. J. Invertebr. Pathol. **20**:187-192.
- IGNOFFO, C.M. Y R.T. ROUSH. 1986. Susceptibility of permethrin- and methomyl-resistant strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) to representative species of entomopathogens. J. Econ. Entomol. **79**:334-337.
- INOUE, H. Y M. MIYAGAWA. 1978. Regeneration of midgut epithelial cells the silkworm, *Bombyx mori*, infected with viruses. J. Invertebr. Pathol. **32**:373-380.
- KAMITA, S.G. Y S. MAEDA. 1997. Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion. Gene. **190**:173-179.
- KAOMINI, M. Y R.T. ROUSH. 1988. Absence of response to selection for resistance to nucleopolyhedrosis virus in *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). J. Entomol. Sci. **23**:379-382.
- KONDO, A. Y S. MAEDA. 1991. Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. **65**:3625-3632.
- 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.
- LEHANE, M.J. 1997. Peritrophic matrix structure and function. Ann. Rev. Entomol. **42**:525-550.
- 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.

- LIU, Y.B. Y B.E. TABASHNIK. 1997. *Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to Bacillus thuringiensis*. Proc. R. Soc. Lond. B **264**:605-610.
- MARTIGNONI, M.E. Y P. SCHMID. 1961. *Studies on the resistance to virus infections in natural populations of Lepidoptera*. J. Invertebr. Pathol. **3**:62-74.
- MAZZACANO, C.A., X. DU Y S.M. THIEM. 1999. *Global protein synthesis shutdown in Autographa californica nucleopolyhedrovirus-infected Ld652Y cells is rescued by tRNA from uninfected cells*. Virology **260**:222-231.
- MIKHAILOV, V.S., E.A. ZEMSKOV Y E.B. ABRAMOVA. 1992. *Protein synthesis in pupae of the silkworm Bombyx mori after infection with nuclear polyhedrosis virus: resistance acquired during pupal period*. J. Gen. Virol. **73**:3195-3202.
- MILLER, L.K. 1997. *Baculovirus interaction with host apoptotic pathways*. J. Cell Physiol. **173**:178-182.
- MORALES, L., F. MOSCARDI, D.R. SOSA-GÓMEZ, F. PARO Y I. SOLDORIO. 1997. *Enhanced activity of Anticarsia gemmatilis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus by boric acid in the laboratory*. An. Soc. Entomol. Brasil **26**:115-120.
- MORALES, L., F. MOSCARDI, D.R. SOSA-GÓMEZ, F. PARO Y I. SOLDORIO. 1998. *Aumento da atividade do vírus de poliedrose nuclear de Anticarsia gemmatilis por branqueadores ópticos*, p. 179. En: Simpósio de controle biológico, 6. Sessão de pôsteres. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz, Brasil.
- MOSCARDI, F. 1983. *Utilização de Baculovirus anticarsia para o controle da lagarta da soja, Anticarsia gemmatilis*. Comunicado Técnico No. 23. Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Brasil.
- MOSCARDI, F. 1989. *The use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, Anticarsia gemmatilis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **4**:51-56.
- MOSCARDI, F. 1998. *Resistance of Anticarsia gemmatilis to its nucleopolyhedrosis-virus (AgNPV) and evaluation of substances that enhance viral activity*, p. 421-425. En: Simpósio de controle biológico, 6. Conferências e mesas redondas. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz.
- MOSCARDI, F. 1999. *Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera*. Ann. Rev. Entomol. **44**:257-258.
- MOSCARDI, F. Y D.R. SOSA-GÓMEZ. 1992. *Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil*, p. 98-109. En: L.G. Copping, M.B. Green y R.T. Rees (ed.), Pest management in soybean. SCI-Elsevier Applied Science, Essex, Inglaterra.
- MOSCARDI, F. Y D.R. SOSA-GÓMEZ. 1993. *A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil*, p.115-119. En: I. Buxton, D.R. Shibles, R.A. Forsberg, B. L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen y R.F. Wilson (ed.), International Crop Science. Crop Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- MOSCARDI, F. Y D.R. SOSA-GÓMEZ. 1996. *Progress in implementing soybean IPM in Brazil and biotechnological perspectives to improve the programme*, p. 98-112. En: G.J. Persley (ed.), Biotechnology and integrated pest management. CAB International.
- NEVES, P. Y S.B. ALVES. 1998. *Patologia e controle do cupim de montículo*

- Cornitermes cumulans (Kollar, 1832) (Isoptera: Termitidae) com fungos, p. 88-92. En: Simpósio de controle biológico, 6. Conferências e mesas redondas. Rio de Janeiro. Fundação Oswaldo Cruz.
- OMOTO, C. Y S.B. ALVES. 1998. Mecanismos de defesa de insetos contra entomopatógenos, p. 55-73. En: S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, Brasil.
- PENG, F., J.R. FUXA, S.J. JOHNSON Y A.R. RICHTER. 1997. Susceptibility of *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae), reared on four host plants, to a nuclear polyhedrosis virus. Environ. Entomol. 26:973-977.
- REESON, A.F, K. WILSON, A. GUNN, R.S. HAILS Y D. GOULSON. 1998. Baculovirus resistance in the noctuid *Spodoptera exempta* is phenotypically plastic and responds to population density. Proc. Roy. Soc. London B 265:1787-1791.
- RICHTER, A.R., J.R. FUXA Y M. ABDEL-FATTAH. 1987. Effect of host plant on the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus. Environ. Entomol. 16:1004-1006.
- ROBERTSON, J.L., H.K. PREISLER, S.S. NG, L.A. HICKLE Y W.D. GELERTNER. 1995. Natural variation: A complicating factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. J. Econ. Entomol. 88:1-10.
- ROELVINK, P.W., B.G. CORSARO Y R.R. GRANADOS. 1995. Characterization of the *Helicoverpa armigera* and *Pseudaletia unipuncta* granulovirus enhancin genes. J. Gen. Virol. 76:2693-2705.
- ROUSH, R.T. Y J.C. DALY. 1990. The role of population genetics in resistance research and management, p. 97-152. En: R.T. Roush y B.E. Tabashnik (ed.), Pesticide resistance in arthropods. Chapman and Hall, NY.
- ROUSH, R.,T. Y G.L. MILLER. 1986. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. J. Econ. Entomol. 79:293-298
- SANTIAGO-ALVAREZ, C. Y P. CABALLERO. 1990. Susceptibility of parasitized *Agrotis segetum* larvae to a granulosis virus. J. Invertebr. Pathol. 56:128-131.
- SCOTT, J.G. 1990. Investigating mechanisms of insecticide resistance: Methods, strategies, and pitfalls, p. 39-57. En: R.T. Roush y B.E. Tabashnik (ed.), Pesticide resistance in arthropods. Chapman and Hall, NY.
- SHAPIRO, M. Y R.A. BELL. 1982. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantridae) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. Ann. Entomol. Soc. Am. 75:346-349.
- SILVA, M.T.B. 1995. Associação de Baculovirus anticarsia com subdosagens de inseticidas no controle de lagartas de *Anticarsia gemmatilis* (Hübner, 1818). Ciência Rural. 25:353-358.
- SOSA-GÓMEZ, D.R., A.R. ABOT, F. MOSCARDI, F.E. PARO, Y I. SOLDORIO. 1992. Susceptibilidade de diferentes instares de *Anticarsia gemmatilis* ao *Bacillus thuringiensis* e avaliação da resistência cruzada em populações resistentes ao Baculovirus anticarsia, p. 193. En: Simpósio de controle biológico, 3. Resumos. Jaguariúna-CNPDA.
- SOSA-GÓMEZ, D.R., R.M. PEREIRA Y S.B. ALVES. 1998. Impacto ambiental de entomopatógenos, p. 1075-1095. En: S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, Brasil.

- SOSA-GÓMEZ, D.R., S.B. ALVES Y L.C. MARCHINI. 1991. *Variation in the susceptibility of Bombyx mori to nuclear polyhedrosis virus when reared on different mulberry genotypes*. J. App. Entomol. **111**:318-320.
- SOSA-GÓMEZ, D.R. Y F. MOSCARDI. 1994. *Desenvolvimento de resistência de insetos a Baculoviruses*, p. 85-90. En: Simpósio de controle biológico, 4. Conferências e Mesas Redondas. Pelotas. Embrapa CPCT.
- TABASHNIK, B.E. 1994. *Evolution of resistance to Bacillus thuringiensis*. Ann. Rev. Entomol. **39**:47-79.
- TANADA, Y. Y H.K. KAYA. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, NY.
- TANADA, Y., M. HIMENO Y E.M. OMI. 1973. *Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear-polyhedrosis virus of the armyworm*. J. Invertebr. Pathol. **21**:31-40.
- THIEM, S.M., X. DU, M.E. QUENTIN Y M.M. BERNER. 1996. *Identification of baculovirus gene that promotes Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line*. J. Virol. **70**:2221-2229.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1998. *Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval Trichoplusia ni and its role in limiting baculovirus infection*. J. Invertebr. Pathol. **72**:57-62.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1999. *Disruption of the insect midgut defense system by specific targeting of the peritrophic membrane*. XXXII Meeting. Society of Invertebr. Pathol. Program & Abstract. University of California at Irvine. August 22-27. p. 78.
- WASHBURN, J.O., E.H. LYONS, E.J. HAAS-STAPLETON Y L.E. VOLKMAN. 1999. *Multiple nucleocapsid packaging of Autographa californica nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic infection in Trichoplusia ni*. J. Virol. **73**:411-416.
- WAYNE, M.L., D. CONTAMINE Y M. KREITMAN. 1996. *Molecular population genetics of ref(2)P, a locus which confers viral resistance in Drosophila*. Mol. Biol. Evol. **13**:191-199.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1957. *Expert committee on insecticides*. W.H.O. Technical report series No. **125**.