

Diversidad natural de los baculovirus

DELIA MUÑOZ Y PRIMITIVO CABALLERO

1. Introducción	96
2. Diversidad genética	99
2.1. Deleciones	100
2.2. Transposiciones	101
2.3. Recombinación	102
3. Diversidad fenotípica	104
3.1. Patogenicidad	104
3.2. Velocidad de acción	107
3.3. Espectro de huéspedes	109
3.4. Otras características	111
4. Bibliografía	112

1. Introducción

Los baculovirus poseen un elevado potencial para el control selectivo de plagas de insectos. Ya en 1981, Ignoffo desarrolló el primer formulado bioinsecticida que utilizó un baculovirus como materia activa para la lucha contra *Helicoverpa zea* en los Estados Unidos de América. Desde entonces se han comercializado distintos productos que utilizan cepas determinadas de baculovirus efectivas en la lucha contra algunas plagas tanto en los ecosistemas agrícolas (MOSCARDI, 1999) como en los forestales (MARTIGNONI, 1984). Entre los de más reciente aparición destacan Spod-X® (KOLODNY-HIRSCH *et al.*, 1993), específico para *Spodoptera exigua*, Spodopterin® que actúa contra varias especies del género *Spodoptera*, Carpovirusine® empleado contra *Carpocapsa* (*Cydia*) *pomonella*, y Gemstar®, contra *Helicoverpa zea* (MOSCARDI, 1999). Aunque los cuatro se están utilizando con éxito en distintas zonas agrícolas del mundo, hasta el momento sólo es posible el control de un limitado número de especies, todas pertenecientes al orden Lepidoptera. Sin embargo, la gran diversidad existente entre los baculovirus, permite predecir que los baculovirus puedan ser empleados contra un mayor número de especies plaga. Los nucleopoliedrovirus (NPVs) y granulovirus (GVs) se han aislado de más de 500 especies de insectos, de los cuales, aproximadamente el 80% se han aislado de insectos lepidópteros. Pero también existen cepas aisladas de otros órdenes de insectos, como dípteros, himenópteros, tisanuros, tricópteros, y de otras clases de artrópodos, como los crustáceos. Esto se conoce como diversidad interespecífica, que se ha venido definiendo por el huésped de origen de un baculovirus desde los comienzos de la baculovirología, cuando se ignoraba la existencia de la infección cruzada que existe entre muchos miembros de esta familia viral. Así, el NPV de *Autographa californica* (AcMNPV), es capaz de iniciar infecciones productivas en más de 50 especies distintas de lepidópteros de la familia Noctuidae, mientras el NPV de *S. exigua* (SeMNPV) sólo es infeccioso para su huésped homólogo. Entre los GVs conocidos, la infección cruzada es menos frecuente que entre los NPVs, pero también se produce, como ocurre con el GV de *Xestia c-nigrum* (XeniGV; GOTO *et al.*, 1992) o *Agrotis segetum* (AsGV; ZETHNER, 1980). En las últimas décadas ha habido numerosas peticiones para basar la clasificación de los baculovirus en su genotipo en lugar de en su huésped de origen (MILLER Y DAWES, 1978; SMITH Y SUMMERS, 1979; FEDERICI Y HICE, 1997), siendo una cuestión que todavía queda por resolver.

Además de la diversidad interespecífica, entre los baculovirus también se da la diversidad intraespecífica. Son numerosas las especies de las que, independientemente del huésped de origen, se han aislado distintas cepas virales que se distinguen mínimamente en su genotipo, pero que pueden poseer características fenotípicas que difieren significativamente. La existencia de esta diversidad ha quedado patente con la caracterización de distintos aislados geográficos de un mismo virus, y sobre todo con las distintas variantes genotípicas presentes dentro de un mismo aislado. El conocimiento de la diversidad natural, inter e intraespecífica, presente entre los baculovirus contribuirá a establecer una mejor clasificación de esta

familia de virus. Pero sobre todo va a ser de especial importancia para el diseño de bioinsecticidas, cuyas materias activas deberán incluir las cepas con mejor potencial para su aplicación en un determinado ecosistema.

La caracterización genotípica de las distintas especies (Figura 1a) o de los distintos genotipos (Figura 1b y 1c) de un baculovirus se ha venido realizando tradicionalmente mediante el análisis del ADN genómico viral con endonucleasas de restricción (REN). Con determinadas endonucleasas, los genotipos muestran uno o varios fragmentos de ADN de tamaño característico, son los fragmentos marcadores. En poblaciones heterogéneas (Figura 1c, carril 1), los marcadores de cada genotipo aparecen como fragmentos submolares, es decir, con menor intensidad que los fragmentos comunes a todos los genotipos, reflejando la proporción relativa que cada uno de ellos representa en la población donde se encuentran. En cambio, cuando el genotipo está puro, no se observan fragmentos submolares y todos los fragmentos aparecen con igual intensidad (Figura 1c, carriles 2 y 3).

Las técnicas de purificación en placa, desarrolladas durante los años 70, permitieron el clonaje de las variantes genotípicas presentes en los aislados silvestres. Se basan en la infección de un cultivo celular con diluciones apropiadas de viriones brotados (BVs) tales que se asegura que la mayoría de las pocas células que son inicialmente infectadas, han recibido un solo BV y replican un único genotipo. La progenie viral producida en estas células se expandirá a las células vecinas iniciando nuevas infecciones y formando eventualmente una placa donde todos los virus procederán del mismo genotipo inicial. La expansión de las nuevas generaciones de BVs a células más lejanas, donde se puede estar replicando un genotipo distinto, se evita cubriendo el cultivo celular con una capa de agar mezclada con todos los nutrientes necesarios para las células, en lugar de con un volumen fluido. Utilizando esta técnica, Lee y Miller (1978) purificaron, a partir de un aislado silvestre de AcMNPV, cinco variantes genotípicas diferentes cuyos genomas presentaban cambios mínimos con respecto al aislado de campo. Desde entonces se han clonado los genotipos presentes en otros aislados virales utilizando el mismo método, como los MNPVs de AgMNPV (CROIZIER Y RIBEIRO, 1992), *Choristoneura fumiferana* (CfMNPV; ARIF Y DOERFLER, 1984), *Helicoverpa zea* (HzSNPV; CORSARO Y FRASER, 1987), *Lymantria dispar* (LdMNPV; CUSACK Y MCCARTHY, 1989), *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV; KNELL Y SUMMERS, 1981), *Spodoptera exempta* (SpexMNPV; BROWN *et al.*, 1985), *Spodoptera littoralis* (SIMNPV; CHERRY Y SUMMERS, 1985; CROIZIER *et al.*, 1986), *Spodoptera litura* (SpltMNPV; MAEDA *et al.*, 1990), y *Pannolis flammea* (PfMNPV; WEITZMAN *et al.*, 1992).

La falta de líneas celulares capaces de soportar la replicación de los GVs y de muchos NPVs, potenció el desarrollo de las técnicas de clonaje *in vivo*. En 1985, Crook *et al.* purificaron totalmente un genotipo y parcialmente un segundo de un aislado de campo del GV de *Carpocapsa pomonella* (CpGV) infectando larvas neonatas con dosis muy bajas de cuerpos de oclusión (OBs; occlusion bodies) con el fin de obtener infecciones originarias de un único OB. Posteriormente, Smith y Crook (1988) clonaron y construyeron el mapa de restricción de ocho genotipos distintos de un aislado silvestre del GV de *Artogeia rapae* (ArGV). Así mismo,

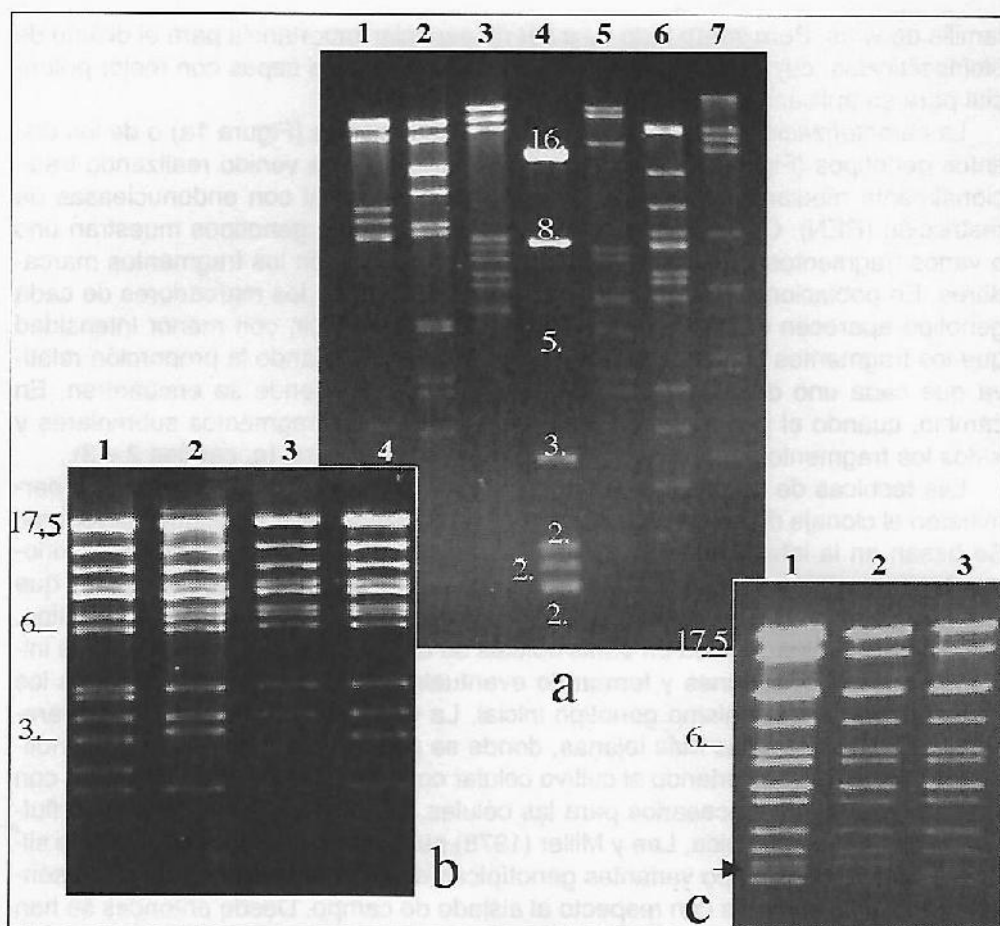


Figura 1. (a) Perfiles de restricción con *Bgl*II (carriles 1-3) y *Pst*I (carriles 5-7) del ADN genómico de SIMNPV (carriles 1 y 5), SeMNPV (carriles 2 y 6) y SfMNPV (carriles 3 y 7). En el carril cuatro se incluyen los marcadores de peso molecular en kb. **(b)** Perfiles de restricción con *Bgl*II de 4 aislados geográficos del SeMNPV recolectados en Estados Unidos (carril 1), Tailandia (carril 2) Azuaga, España (carril 3) y El Ejido, España (carril 4). A la izquierda de la fotografía se incluyen los marcadores de peso molecular. **(c)** Perfiles de restricción con *Xba*I del aislado silvestre de SeMNPV de Almería, España (Se-SP2, carril 1), y de dos de sus variantes genotípicas purificadas mediante clonaje *in vivo*, SP2A (carril 2) y SP2B (carril 3). La flecha señala los fragmentos marcadores.

demonstraron la posibilidad de aplicar la misma metodología a los MNPVs. Para ello infectaron larvas de primer estadio con dosis muy bajas de OBs, en torno a la dosis que mata al 10% de las larvas tratadas (DL_{10}), de forma que solo o mayoritariamente fuera uno el genotipo responsable de la infección de todo el organismo. Manipularon varios cientos de larvas neonatas y requirieron pases adicionales de la progenie en larvas de estadios más avanzados, para su posterior caracteriza-

ción. Una modificación de este método fue publicado por Muñoz *et al.* en 1998 (ver Figura 5 del capítulo 14). Para el clonaje de las siete variantes de SeMNPV, utilizaron diluciones de la hemolinfa de larvas infectadas entre 48 y 72 horas antes. Es esta hemolinfa, donde se encuentran mayoritariamente BVs, la que se diluye apropiadamente para infectar *per os* un elevado número de larvas del cuarto estadio, que pudieron ser analizadas individualmente. En definitiva, el clonaje de genotipos, tanto mediante técnicas *in vitro* o *in vivo*, ha revelado la gran heterogeneidad genotípica existente en los aislados silvestres de los baculovirus. Su significado biológico, en cuanto a diferencias en la infectividad o virulencia, es objeto de estudio en la actualidad.

2. Diversidad genética

La plasticidad genómica es característica de todos los sistemas biológicos, siendo más patente en el caso de los virus, que tienen periodos de generación más cortos y una mayor progenie en cada ciclo de replicación o pase. A pesar del grado de fiabilidad inherente al proceso de replicación de los genomas de ADN, se producen continuamente variaciones en su secuencia de nucleótidos (mutaciones puntuales). Además, debido a la recombinación hay una determinada probabilidad de variabilidad genómica en cada ciclo de replicación, manifestándose en el ADN viral como deleciones, reagrupaciones, inversiones, repeticiones y adquisición de ADN del huésped o de organismos que se encuentren en él. La existencia de estas alteraciones genómicas entre los baculovirus ha quedado demostrada por la presencia de las variantes genotípicas, detectadas por análisis REN en muchos aislados naturales de baculovirus.

Parece ser que existen algunas regiones genómicas más susceptibles a la variabilidad. La secuenciación del genoma total del SNPV de *Helicoverpa armigera*, que se ha conseguido mediante la técnica del *shotgun* a partir de un ADN molde extraído de un genotipo clonado *in vivo*, ha revelado la existencia de alrededor de 100 puntos calientes de microheterogeneidad (J. VLAK, comunicación personal). Aunque se hubiera partido del ADN obtenido a partir de un genotipo purificado, durante la replicación del genoma viral se producen mutaciones en su secuencia, obteniéndose siempre una progenie que no es genéticamente idéntica a su ADN parental. Las regiones homólogas (*hrs*) con una gran tendencia a sufrir reorganizaciones, son un ejemplo de zonas donde se produce una alta frecuencia de mutaciones. Están formadas por secuencias de ADN repetidas un cierto número de veces, lo que podría facilitar la recombinación interna, dando lugar a nuevos genotipos con distinto número de repeticiones (MAJIMA *et al.*, 1993). García-Maruniak *et al.* (1996) fueron los primeros en observar variaciones en el número de repeticiones de una de las *hrs* del genoma de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), entre dos genotipos pertenecientes a dos aislados de este virus. Así mismo, los cuatro genotipos purificados de una cepa española del SeMNPV se distinguen en el número de repeticiones que forman parte de la *hr1* (Muñoz *et al.*, 1999). Las *hrs* juegan un

importante papel en la regulación de la transcripción viral, y muy probablemente también en la replicación del ADN (ver Capítulo 5), y cualquier variación en estas regiones podría producir cambios importantes a nivel fenotípico. Por otra parte, en el SNPV de *Helicoverpa zea* (HzSNPV) se ha detectado una región repetida con tripletes ricos en A y T (rich A and T, repeat region, RAT) dentro de la pauta de lectura abierta (ORF, open reading frame) HOAR. Esta región podría constituir otra zona caliente de variabilidad pues el análisis de cuatro aislados de *Helicoverpa sp.* confirmó una alta incidencia de mutación en esta región (LE *et al.*, 1997).

2.1. Delecciones

Las delecciones que ocurren en las poblaciones naturales de NPVs son, por lo general, de fragmentos del genoma pequeños y determinados y no afectan a su capacidad de replicación. Por ejemplo, tres de las variantes genotípicas aisladas de una cepa de ArGV tienen en común una delección de 80 bp en la misma región genómica (SMITH Y CROOK, 1988), y de forma similar ocurre con algunas de las variantes genotípicas del MNPV de AgMNPV (CROIZIER Y RIBEIRO, 1992), de AcMNPV (LEE Y MILLER, 1978) o de SeMNPV (MUÑOZ *et al.*, 1999). En el caso de la variante genotípica US2D de la cepa del SeMNPV aislada en Florida, la delección genómica es algo mayor, de 2.5 kbp respecto a la variante tipo, pero la ausencia de este fragmento no le impide la replicación autónoma (MUÑOZ *et al.*, 1998) por no afectar a genes esenciales para la replicación viral. Lo mismo ocurre con los genotipos que carecen del *egt* y que se encuentran en el aislado silvestre de California del SeMNPV (J. VLAK, comunicación personal).

Las delecciones también pueden afectar a regiones genómicas mucho mayores. En la progenie viral generada después de varios pases sucesivos *in vitro* del AcMNPV, se han identificado genotipos mutantes con delecciones de hasta el 50% del contenido génico (CROIZIER *et al.*, 1985; CUSACK Y MCCARTHY, 1989; HELDENS *et al.*, 1996; KOOL *et al.*, 1991; KRELL, 1996; LEE Y KRELL, 1992 y 1994). Estos mutantes se han denominado partículas defectivas interferentes (defective interfering particles, DIPs), y su replicación es dependiente de la presencia de genotipos intactos en la misma célula ya que las delecciones involucran genes esenciales para la replicación autónoma del virus. Al final del proceso de producción, los DIPs, que se replican más rápidamente por tener un genoma más pequeño, suelen ser más abundantes que los genotipos intactos y la progenie resulta ser una mezcla de virus competentes y DIPs parásitos con una actividad insecticida muy reducida (KOOL *et al.*, 1991). Su generación está probablemente provocada por el propio ambiente, en condiciones en las que la probabilidad de co-infección de una célula por varios virus es elevada (multiplicidad de infección, *moi*, alta) y donde los virus no tienen necesidad de expresar todo su potencial génico, limitándose a mantener únicamente los elementos más esenciales para su replicación. Además de en AcMNPV, también se han descrito mutantes defectivos en SeMNPV, con la diferencia que éstos se seleccionan después de un único pase *in vitro* (HELDENS *et al.*, 1996).

Recientemente se ha demostrado que también existen genotipos con grandes

deleciones en algunas poblaciones naturales de baculovirus. En concreto, una cepa silvestre del SeMNPV aislada en Florida posee dos genotipos defectivos con deleciones del 14 y 21% del contenido génico respectivamente en relación al genotipo más abundante (Muñoz *et al.*, 1998). Como ocurre con los DIPs, estos mutantes deletados deben ser complementados por genotipos intactos mientras se replican, y actúan como genotipos parásitos reduciendo la patogenicidad de las poblaciones donde están presentes. El mismo fenómeno se ha observado recientemente en otro aislado geográfico del SeMNPV, en el que está presente un mutante con una deleción afectando al 32% del genoma viral (K. ZIMMERMANN, comunicación personal). A diferencia de lo que ocurre con los DIPs, cuyo genoma va acortándose gradualmente conforme aumenta el número de pases, los mutantes deletados naturales tienen un genoma de tamaño estable y no parece que el número de pases en larvas lo haga disminuir. La supervivencia de estos mutantes en las poblaciones naturales podría explicarse por la existencia de cuerpos de oclusión conteniendo múltiples viriones, como ocurre con los NPVs. Los genotipos no viables se pueden co-occluir junto con los genotipos intactos que les complementan y mediante co-infección y co-replicación pueden propagarse y sobrevivir en condiciones naturales (JEHLE, 1996). El significado ecológico de las variantes parásitas en las poblaciones naturales de los baculovirus no está claro todavía.

2.2. Transposiciones

Los transposones son elementos genéticos móviles que se encuentran presentes en los genomas eucariotas, procariotas y virales. La gran homología observada entre algunos de los genes de los baculovirus (*egt*, *sod*) y los genomas de los insectos sugiere que alguno de estos virus ha podido adquirir, durante su evolución, genes del huésped a través de mecanismos de transposición (POSEE Y ROHRMANN, 1997).

Los primeros fenómenos de transposición en los genomas de los baculovirus se observaron al analizar la progenie viral obtenida de infecciones seriadas *in vitro*. Fraser *et al.* (1985) encontraron mutantes de AcMNPV y GmMNPV con inserciones derivadas del genoma de las células huésped. Se localizaban en regiones particulares del genoma viral y daban lugar a un fenotipo de pocos poliedros denominado FP (few polyhedra phenotype; FP). Posteriormente se han identificado en AcMNPV y SfMNPV genotipos mutantes con otros elementos transponibles, siempre derivados del pase múltiple en cultivo celular (MILLER Y MILLER 1982; FRIESEN Y NISSEN, 1990), y que también originaban el fenotipo FP. Todos estos mutantes se caracterizaban por una baja producción de OBs por célula en relación con la que se da en los genotipos salvajes, una mejora en la propagación en cultivo celular por el aumento en la producción de BVs en detrimento de los viriones ocluidos (ODVs) y una reducida infectividad en larvas, consecuencia de una oclusión deficiente. La mayoría de estos transposones se encontraron insertados en una región concreta del genoma de los baculovirus, afectando al gen viral tardío *p25* (ORF Ac61), que actúa incrementando la síntesis y localización nuclear de la poliedrina y parece

tener un papel regulador en el cambio que se produce de BVs a ODVs. Este fenómeno podría favorecer la replicación de estos mutantes respecto al genotipo silvestre en las condiciones de replicación en cultivo celular, resultando en un aumento de la producción de BVs.

El escape de transposones del huésped a los baculovirus no sólo se produce en las condiciones de crecimiento artificial del cultivo *in vitro*, también se ha observado durante la infección de granulovirus en larvas. En sus experimentos, encaminados originalmente a la búsqueda de recombinantes entre dos granulovirus de *Carpocapsa pomonella* (CpGV) y *Cryptophlebia leucotreta* (ClGV), Jehle *et al.* (1995) coinfectaron larvas de *C. leucotreta per os* con una mezcla de ambos virus. Los genotipos originados en la progenie viral de estas infecciones mixtas se aislaron mediante clonaje *in vivo* y se caracterizaron con endonucleasas de restricción. De los 194 genotipos clonados *in vivo*, se identificaron dos mutantes de CpGV con sendas inserciones producidas ambas por un elemento transponible de tipo II. En un mutante, el transposón procedía del genoma de *C. leucotreta* y en otro del de *C. pomonella*, y en ambas ocasiones la transposición no tuvo efectos observables a nivel morfológico o biológico pues se había producido en regiones no codificantes del genoma (JEHLE *et al.* 1995 y 1998). Sin embargo, estudios recientes de competición entre los virus silvestres y los que llevan estas transposiciones, indican que los últimos tienen alguna ventaja replicativa sobre los primeros (ARENDS Y JEHL, 2000). Es posible que las inserciones por transposones del huésped ocurran con frecuencia en diferentes lugares del genoma pero en ocasiones puede llegar a ser muy difícil identificarlas por la ausencia de efectos fenotípicos tan claros como el FP.

La transposición puede conducir a la destrucción de algunos genes de baculovirus, pero es posible que también pueda constituir un mecanismo implicado en la regulación de la expresión viral de genes y en la transcripción (BEAMES Y SUMMERS, 1990; FRIESEN Y NISSEN, 1990; SCHETTER *et al.*, 1990; JEHL *et al.*, 1995).

Por último, el alto grado de homología entre ciertos genes de los baculovirus y genes de bacterias parásitas de insectos, como ocurre con el *chiA*, sugiere la existencia de un flujo de genes entre ambos tipos de organismos (HAWTIN *et al.*, 1995).

2.3. Recombinación

La recombinación puede que sea uno de los mecanismos más importantes en el fenómeno de la especiación en los baculovirus. La presencia de distintos grupos de genes en las diferentes especies de baculovirus, cuyos genomas representan en conjunto un rico reservorio de genes, sugiere la recombinación como el mecanismo que permite compartirlas. La alta frecuencia relativa de recombinantes que se obtienen *in vivo*, calculada en 6.6% (MERRYWEATHER *et al.*, 1994), y sobre todo *in vitro* (CROIZIER Y RIBEIRO, 1992), apoya esta idea.

Se han identificado virus recombinantes entre genotipos estrechamente relacionados tanto en aislados de campo como en la progenie de infecciones mixtas. Croizier y Ribeiro (1992) clonaron 13 variantes genotípicas de un aislado silvestre

del AgMNPV que difieren en algunos de los cinco marcadores moleculares que los distinguen. La co-infección *in vitro* con distintos pares de los genotipos clonados produjo progenies virales con abundancia de genotipos nuevos resultantes de la recombinación entre los dos parentales. En estas co-infecciones, la tasa de recombinantes aumentaba conforme se incrementaba la *moi* (número de viriones por célula), es decir, el número de células co-infectadas. También se han obtenido recombinantes *in vivo*. Las coinfecciones de larvas de *Galleria mellonella* mediante inyección con viriones brotados de AcMNPV y el NPV de *G. mellonella* (GmMNPV), que hoy se considera una variante genotípica de AcMNPV (BLISSARD *et al.*, 1999), dan lugar a una progenie viral mezcla entre virus parentales y recombinantes (CROIZIER *et al.*, 1980).

Los fenómenos de recombinación son, con seguridad, mucho más frecuentes que lo que nos es posible detectar. Es muy probable que la selección natural y la existencia de una inhibición directa entre virus impida en muchas ocasiones la expresión de virus recombinantes ya formados. Croizier *et al.* (1988) observaron que la progenie viral de larvas de *Rachiplusia ou* infectadas con AcMNPV y el NPV de *R. ou* (RoNPV), ambos capaces de multiplicarse separadamente en larvas, está formada únicamente por AcMNPV. Para entender mejor este fenómeno cotransfectaron las larvas con el ADN intacto de RoMNPV, que llamaron virus receptor, y el ADN fragmentado de AcMNPV, o virus donante. Bajo estas condiciones, sólo la presencia de genomas parentales intactos o recombinantes permitía el establecimiento de una infección y de hecho, en sus experiencias, la progenie viral estuvo formada por un 100% de recombinantes. La eliminación del virus receptor pudo deberse a interferencias durante su multiplicación, por parte de genes o productos génicos del donante, antes de producirse la recombinación. Es posible que la inserción de genes del donante bien adaptado a *R. ou* confiera una ventaja selectiva a los virus recombinantes.

Desde un punto de vista práctico, la recombinación entre los ADNs virales de AcMNPV y del nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori* (BmNPV), en el locus de la helicasa, es más interesante, pues produce una progenie viral con un espectro de huéspedes ampliado respecto a cada uno de los parentales tomados individualmente (CROIZIER *et al.*, 1994; KONDO Y MAEDA, 1991; MAEDA *et al.*, 1993).

También se han detectado recombinantes originados en larvas infectadas *per os* simultáneamente con cepas distintas del SeMNPV en proporción 1:1. Los recombinantes se observaron en 4 de las 9 larvas co-infectadas junto con los parentales y, en algunos casos, después de varios pases sucesivos en larvas, los primeros reemplazaron a los segundos (MUÑOZ *et al.*, 1997). Probablemente, durante el proceso de coinfección se originaron una gran variedad de virus recombinantes, pero la gran presión selectiva a la que estuvieron sometidos sólo permitió la supervivencia de aquellos con ventajas selectivas sobre el resto de genotipos presentes en la población constituyente de la progenie viral.

En general, los NPVs con espectros de huéspedes solapados, están más estrechamente relacionados y es más probable que entre ellos ocurra un intercambio genético. Podría ser el caso de los virus infectivos para especies del género

Spodoptera, que comparten una gran homología genómica (KISLEV, 1985) y tienen espectros de huéspedes solapados (MAEDA *et al.*, 1990). De hecho, se han obtenido virus recombinantes de las cotransfecciones en larvas con los genomas del MNPV de *Spodoptera littoralis* (SpliMNPV) y del MNPV de *Spodoptera litura* (SpliNPV; G. CROIZIER, comunicación personal).

3. Diversidad fenotípica

Algunos cambios genómicos que se producen en el ADN viral son silenciosos y no les confieren ninguna ventaja ni desventaja selectiva (ANDREWS *et al.*, 1980), mientras otros conllevan cambios en su fenotipo. Sin embargo, las consecuencias en la actividad biológica derivadas de la heterogeneidad genética no han recibido mucha atención y excepto genes como los que codifican la EGT, asociada a la velocidad de acción (O'REILLY Y MILLER, 1991), la helicasa (CROIZIER *et al.*, 1994) o el HRF-1 (THIEMM *et al.*, 1996), asociados al espectro de huéspedes, y la catepsina y la quitinasa (HAWTIN *et al.*, 1995), esenciales para la destrucción del tegumento de las larvas, todavía son pocos los casos en los que se ha establecido una relación directa gen-actividad biológica.

Los factores que influyen más profundamente en la interacción virus-huésped en campo son la patogenicidad, que expresa la cantidad de inóculo viral letal para el insecto, la velocidad de acción, el espectro de huéspedes y la producción de OBs por larva. Todos ellos pueden determinarse mediante bioensayos para evaluar la actividad biológica de los baculovirus, aunque también se ha prestado atención a la capacidad de liberar los OBs del interior de las larvas muertas, al peso que alcanzan éstas cuando están infectadas (MUÑOZ *et al.*, 2000), o a la fecundidad y fertilidad de individuos que han estado en contacto con el virus pero han sobrevivido a la infección (PERELLE Y HARPER, 1986). La mayoría de los estudios de actividad biológica se han llevado a cabo con aislados de campo, formados por mezclas de genotipos distintos, pero en los últimos años se está tendiendo a evaluar la actividad biológica de genotipos purificados con el fin de seleccionar aquellos con mejor potencial bioinsecticida. Sin embargo, el que los genotipos minoritarios no sean eliminados parece indicar que la heterogeneidad es importante para la supervivencia del virus y sugiere que los aislados de campo, de población heterogénea, son también modelos muy válidos para estudiar la actividad biológica.

3.1. Patogenicidad

La adquisición de una dosis efectiva es un factor crítico para el éxito de cualquier insecticida. En los insecticidas químicos que actúan por contacto, por ejemplo, ésta se consigue cuando el insecto se mueve por la superficie vegetal tratada. En cambio, la dosis efectiva de un baculovirus sólo se consigue cuando el insecto ingiere una cantidad de virus suficiente para iniciar una infección sistémica (BLACK *et al.*, 1997). Éste es un proceso complejo que está afectado por factores externos

(entre ellos la climatología o la radiación ultravioleta) que afectan a la estabilidad del virus, a su distribución espacial, etc., pero sobre todo por factores intrínsecos al sistema virus-insecto. El estado de desarrollo del insecto, por ejemplo, influye de manera determinante, y por regla general, conforme avanza el desarrollo larvario, se incrementa mucho la dosis efectiva (BRIESE, 1986, ALY Y YOUNG, 1991; ESCRIBANO *et al.*, 1999). En cuanto al virus, para el desarrollo de un bioinsecticida es muy importante no sólo seleccionar el virus más adecuado para cada plaga (Tabla 1), sino la variante genotípica que mejores resultados produce.

AcMNPV fue el primer baculovirus del que se aislaron variantes genotípicas puras que posteriormente pudieron compararse en términos de DL_{50} (ANDREWS *et al.*, 1980). El clonaje no disminuyó ni aumentó la patogenicidad de las variantes ya que los valores de la DL_{50} de la cepa silvestre y de sus 5 genotipos, oscilantes entre 10 y 21 OBs por larva neonata, no fueron significativamente distintos entre las 6 muestras. Resultados similares se obtuvieron al comparar la DL_{50} de la cepa silvestre AcMNPV-13 con tres variantes obtenidas por purificación en placa, aunque en este caso el genotipo AcMNPV-S1 resultó ser significativamente menos patogénico que la cepa silvestre (VAIL *et al.*, 1982). Sin embargo, existen poblaciones de baculovirus donde sí se ha demostrado la existencia de genotipos con diferente grado de patogenicidad. La severa reducción en eficacia de los aislados virales de AgMNPV utilizados para el control de *A. gematalis* en distintas zonas de Brasil, hace sospechar de la presencia de genomas con baja infectividad en los aislados naturales del AgMNPV. Ribeiro *et al.* (1997) analizaron la composición genotípica de la cepa AgMNPV-Ds, utilizada en los tratamientos. Se trataba de un ais-

Tabla 1. Patogenicidad expresada en valores de DL_{50} de los genotipos Se-SP2A de SeMNPV, SI-M2 de SIMNPV y Sf-2 de SfMNPV para larvas en estadio L_2 de *S. exigua*, *S. littoralis* y *S. frugiperda*. Se indican los límites de confianza al 95% y la potencia respecto a la DL_{50} de SI-M2 en *S. frugiperda* y de Sf-2 para *S. littoralis*, y sus respectivos límites de confianza al 95%.

Virus	Huésped	DL_{50} OB/ L_2	Potencia	Lím. Confianza 95%	
				Inf.	Sup.
Se-SP2A	<i>S. exigua</i>	38	-	-	-
SI-M2	<i>S. exigua</i>	21.8	11567	6384	20830
	<i>S. littoralis</i>	56.2	4486	2447	7769
	<i>S. frugiperda</i>	2.5×10^5	1	-	-
Sf-2	<i>S. exigua</i>	157	30676	13683	73000
	<i>S. littoralis</i>	2.9×10^6	1	-	-
	<i>S. frugiperda</i>	1554	1927	891	4259

lado heterogéneo formado por 10 variantes genotípicas con diferente capacidad para replicarse y matar a su huésped de origen, *A. gemmatilis*, y a su huésped alternativo, *Diatrea saccharalis*. En base a los valores de las DL_{50} , se pudieron distinguir tres grupos de variantes con distintos grados de patogenicidad en *A. gemmatilis*, y el mismo patrón de variación se observó en *D. saccharalis*, aunque en este huésped la infectividad observada fue en general mucho menor (RIBEIRO *et al.*, 1997). En otro estudio más reciente se compararon los valores de la DL_{50} de los genotipos del aislado silvestre obtenido en 1979 de AgMNPV (AgMNPV-79), que resultó ser una mezcla de seis variantes genotípicas distintas, y de la preparación comercial 1985 (AgMNPV-85), formada por once genotipos (MARUNIAK *et al.*, 1999). Los genotipos de AgMNPV-85 mostraron mayor heterogeneidad y nuevos marcadores en comparación con el AgMNPV-79 y presentaron diferencias significativas en cuanto a su patogenicidad para las líneas celulares de *S. frugiperda* y *A. gemmatilis*.

La heterogeneidad genotípica y sus consecuencias en la actividad biológica han sido ampliamente estudiadas en SeMNPV. Caballero *et al.* (1992) compararon la patogenicidad de cuatro aislados silvestres procedentes de Tailandia, California (USA), Almería y Badajoz (ambos españoles). Los valores de sus respectivas DL_{50} no difirieron mucho entre sí a excepción del de la cepa de Badajoz, que fue significativamente mayor (casi cuatro veces) que el de la cepa con menor DL_{50} . En un estudio similar entre cuatro cepas japonesas silvestres, una cepa tailandesa también silvestre y una variante genotípica purificada en placa y procedente de uno de los aislados de campo de Japón, ésta última no dio un valor significativamente distinto del de la cepa silvestre de procedencia, pero sí se encontraron diferencias significativas entre algunos de los aislados de campo, que en un caso llegaron a ser de hasta siete veces (HARA *et al.*, 1995). También se observaron diferencias significativas en la patogenicidad de cuatro variantes genotípicas presentes en el aislado de campo SeMNPV-SP2 y purificadas *in vivo* (Muñoz *et al.*, 1999). En otra cepa de este mismo virus aislada en Florida (SeMNPV-US2), y que constituye la materia activa del insecticida comercial Spod-X, se detectó la presencia de siete variantes genotípicas distintas (Muñoz *et al.* 1998). Dos de ellas, que no han podido ser purificadas *in vivo*, contenían grandes deleciones que les impiden la multiplicación autónoma y que les convierten en variantes parásitas de la población viral ya que hacen disminuir su patogenicidad global. De las variantes restantes, dos mostraron una inserción y una deleción respectivamente en su genoma respecto a la variante tipo, y no dieron resultados significativamente distintos en cuanto a patogenicidad, pero sí diferían en otros parámetros de actividad biológica (Muñoz *et al.*, 2000).

Las mayores variaciones de patogenicidad entre aislados geográficos se han detectado en el NPV de *Lymantria dispar* (LdMNPV) (MAGNOLER, 1970; SHAPIRO *et al.*, 1984). Pero aunque las diferencias de actividad biológica entre aislados han estado bien documentadas, hasta 1991 no había datos de la variabilidad intrínseca de un aislado determinado. Fueron Shapiro y Robertson (1991) quienes compararon la actividad biológica de varias muestras obtenidas de tres aislados distin-

tos de LdMNPV observando variaciones en actividad biológica del orden de 15, 20 y 17.5 veces entre sus muestras. De los tres aislados, el Abington, con los valores más bajos de DL_{50} , fue 102 veces más patogénico que el de mayor DL_{50} , revelando un buen potencial para su uso en programas de lucha contra plagas. La purificación *in vitro* de 17 genotipos de la cepa Abington de LdMNPV y su posterior caracterización en términos de DL_{50} mostró a su vez grandes diferencias entre las variantes genotípicas.

Del NPV de *Helicoverpa armigera* (HaMNPV) se han aislado cepas silvestres en diferentes regiones geográficas. Algunos de estos aislados han mostrado diferencias significativas en cuanto a patogenicidad. Por ejemplo, el estudio más reciente, donde se comparan las DL_{50} de dos aislados españoles y un aislado ruso, revela que el valor de la DL_{50} de uno de los aislados españoles es seis veces menor que el de la cepa rusa (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

Sobre PfiMNPV también se han publicado estudios similares. Se compararon los valores de las DL_{50} de dos variantes genotípicas aisladas de una cepa silvestre del PfiMNPV en el huésped heterólogo *Mamestra brassicae* (WEITZMAN *et al.*, 1992). Aunque las diferencias no eran tan grandes como se esperaba, la variante PfiMNPV-A mostró valores más bajos de DL_{50} que la variante PfiMNPV-B. Esto puede explicar la mayor abundancia de la primera respecto a la segunda en la progenie viral que se obtiene al multiplicar el aislado silvestre en este huésped, cuando ocurre lo contrario en su huésped homólogo. En un estudio más reciente se han comparado cuatro de los 24 genotipos que componen un aislado silvestre de PfiMNPV, observándose diferencias significativas entre ellos (HODGSON *et al.*, 2000).

Recientemente se ha publicado un estudio encaminado a seleccionar un nucleopoliedrovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* en México y Honduras (ESCRIBANO *et al.*, 1999). En el mismo se compararon cuatro cepas de NPV, aisladas de larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas, procedentes de Estados Unidos, Nicaragua y Argentina. Los resultados de los bioensayos mostraron que el aislado de Nicaragua y el de Estados Unidos tenían los mejores valores de patogenicidad sobre larvas de segundo estadio de *Spodoptera frugiperda* procedentes de una colonia hondureña.

Todas estas diferencias que se producen en la patogenicidad entre distintos genotipos de un mismo virus señalan la importancia de realizar un análisis previo de las distintas cepas de un determinado baculovirus antes de diseñar un bioinsecticida. Sin embargo, también es importante anotar que distintas poblaciones del huésped, recolectadas en distintas regiones, difieren con frecuencia en su susceptibilidad al virus (BRIESE Y MENDE, 1981; FUXA, 1987), lo que hace necesaria la experimentación en campo bajo las condiciones donde se quiere aplicar una determinada materia activa.

3.2. Velocidad de acción

Una de las mayores desventajas de los baculovirus es el tiempo que tardan en matar a sus huéspedes. Aunque existen baculovirus cuyos valores de tiempo letal

medio (TL_{50}) están entorno a los 3-4 días, como es el caso del SeMNPV (CABALLERO *et al.*, 1992), en otros, entre los que se encuentran algunos aislados de LdMNPV, éstos alcanzan las 3 semanas, lo que los hace inviables como bioinsecticidas. Sin duda, la velocidad de acción es la propiedad de los baculovirus que ha recibido mayor atención por parte de la comunidad científica, que mediante la ingeniería genética intenta construir baculovirus recombinantes más rápidos desde finales de la década de los 80, bien mediante la delección de genes como el *egt* (O'REILLY Y MILLER, 1991), por la inserción de genes que regulan aspectos clave de la fisiología (MAEDA, 1989) o el desarrollo (HAMMOCK *et al.*, 1990) de los insectos, o bien insertando genes que codifican toxinas específicas de insectos (CARBONELL *et al.*, 1988; STEWART *et al.*, 1991; HARRISON Y BONNING, 2000, entre otros, ver capítulo 8). Sin embargo, datos recientes revelan la existencia de variantes con diferente velocidad de acción dentro de los aislados silvestres de los baculovirus. Entre ellos se cuentan los genotipos purificados de la cepa Abington del LdMNPV, que muestran una variación de sus valores de TL_{50} de entre 9.8 y 18.7 días para larvas de *L. dispar* de segundo estadio (Tabla 2) (LYNN *et al.*, 1993). En SeMNPV se han purificado genotipos de distintos aislados con diferentes valores de velocidad de acción. Los que están presentes en la cepa de Florida del SeMNPV muestran valores de TL_{50} oscilantes entre 94 y 116 horas para larvas de *S. exigua* de segundo estadio (MUÑOZ *et al.*, 2000). Entre ellos, el genotipo denominado US2D no sólo fue el más lento, sino que parecía desaparecer a lo largo de sucesivos pases en larvas infectadas inicialmente con una mezcla en proporciones iguales de tres genotipos, a pesar de producir la mayor cantidad de progenie viral. Probablemente, los

Tabla 2. Velocidad de acción expresada en valores de tiempo medio para morir (MTD) de los genotipos Se-SP2A de SeMNPV, SI-M2 de SIMNPV y Sf-2 de SfMNPV para larvas en estadio L_2 de *S. exigua*, *S. littoralis* y *S. frugiperda*. Se indican las dosis de OBs/larva suministradas y el porcentaje de mortalidad obtenido para esas dosis.

Virus	Huésped	Dosis OBs/larva	% Mort.	MTD (h) \pm EE (LC 95%)
Se-SP2A	<i>S. exigua</i>	27	67.0	81.5 \pm 2.21
SI-M2	<i>S. exigua</i>	234	67.1	169.0 \pm 3.8
	<i>S. littoralis</i>	148	69.9	175.7 \pm 3.2
	<i>S. frugiperda</i>	8.6 $\times 10^6$	67.1	112.2 \pm 7.0
Sf-2	<i>S. exigua</i>	990	61.3	200.3 \pm 7.5
	<i>S. littoralis</i>	6.6 $\times 10^6$	57.4	348.3 \pm 8.6
	<i>S. frugiperda</i>	3511	54.7	89.6 \pm 3.4

genotipos más rápidos pueden completar antes su ciclo de infección, generan partículas virales que inician infecciones nuevas en otros tejidos y desplazan al genotipo más lento, que no representa más del 3% de la población viral en el aislado silvestre del que se purificó (Muñoz *et al.*, 1998). En el aislado de California se han detectado genotipos naturales sin *egt* que probablemente tengan incrementada su velocidad de acción respecto al resto de los genotipos presentes en el mismo aislado (J. VLAK, comunicación personal), tal y como ocurre con los recombinantes de AcMNPV sin *egt* generados mediante ingeniería genética. Estos recombinantes no sólo han demostrado ser hasta un 30% más rápidos que los genotipos silvestres de los que proceden (O'REILLY Y MILLER, 1991), sino que además se ha observado que el daño producido por larvas infectadas con estos virus puede reducirse hasta en un 60% en algunos casos (TREACY *et al.*, 1997).

3.3. Espectro de huéspedes

Un factor importante a tener en cuenta en los baculovirus es conocer cómo se acopla el espectro de huéspedes de un virus al complejo de plagas existente en un cultivo determinado (Tabla 3). En algunos virus, como LdMNPV o SeMNPV, el espectro de huéspedes está confinado a una sola especie o a un reducido grupo de especies estrechamente relacionadas entre sí. El caso opuesto lo protagonizan AcMNPV y sus variantes genotípicas (AnfaNPV, GmNPV, RoMNPV, HeviMNPV y TnMNPV) con espectros de huéspedes relativamente amplios. Estos virus tienen rangos de huéspedes similares entre sí pero exhiben diferentes valores de DL_{50} para cada huésped. De ahí que se pueda establecer una distinción entre el espectro de huéspedes biológico, que comprendería a todas las especies que pueden

Tabla 3. Espectro de huéspedes que exhiben algunos baculovirus para varias especies de lepidópteros plaga.

	S. <i>eridania</i>	S. <i>exigua</i>	S. <i>frugiperda</i>	H. <i>virescens</i>	H. <i>zea</i>	T. <i>ni</i>
<i>A. Californica</i> MNPV	++	++++	++	++++	+	++++
<i>H. virescens</i> MNPV	+	+++	++	++++	++	++++
<i>T. ni</i> MNPV	-	+++	-	++	-	++++
<i>S. exigua</i> MNPV	-	++++	-	-	-	-
<i>H. zea</i> MNPV	-	-	-	++++	++++	+
<i>H. armigera</i> MNPV	-	+++	-	-	++++	++

- no permisivo a la infección

++++ muy permisivo a la infección

Tabla 4. Valores de productividad (por 10⁷ OBs/larva) de 10 genotipos de AgMNPV purificados en placa en larvas de *Anticarsia gemmatalis* y *Diatrea saccharalis*.

Genotipo	<i>D. saccharalis</i>	<i>A. gemmatalis</i>
2A	1265	121
33B	1072	128
7A	1334	131
9A	1229	99
2B	1096	91
1B	690	63
15B	851	125
18A	497	124
10B	538	64
15A	84	6

ser infectadas en el laboratorio, y el espectro de huéspedes económico, que está restringido a aquellas especies que pueden ser controladas de forma efectiva mediante la aplicación de cantidades de virus económicamente aceptables (BLACK *et al.*, 1997). Lo ideal para el control biológico es encontrar un baculovirus natural cuyo espectro de huéspedes económico incluya las plagas que necesiten tratarse, lo que puede ser posible gracias a la extraordinaria diversidad que se da entre los baculovirus.

La investigación del espectro de huéspedes de los baculovirus ha sido tradicionalmente tediosa, sobre todo por la dificultad en determinar cuándo se produce una verdadera infección cruzada. Pero gracias a la aparición de técnicas de análisis molecular, como la digestión de ADN con endonucleasas de restricción, se han conseguido confirmar las identidades del inóculo y de la progenie virales, lo que está prestando una gran ayuda a este tipo de estudios. Por ejemplo, se ha demostrado que tres cepas de MNPV aisladas de tres especies distintas de *Choristoneura*: *C. fumiferana*, *C. occidentalis* y *C. retiniana*, y con perfiles REN casi idénticos, comparten un espectro de huéspedes contra *C. fumiferana* (ARIF *et al.*, 1986). Otro estudio similar llevado a cabo con GVs es el de Goto *et al.* (1992), donde se presentan los perfiles de restricción de varios GVs aislados de 5 especies distintas de noctuidos y comprueban que todos son variantes genotípicas del mismo virus a pesar de haber sido aislados de cinco huéspedes diferentes, como *Xestia*, *Autographa*, *Celaena*, *Pseudaletia*, *Aletia* e *Hydraecia*. Por ahora existen pocos más datos detallados sobre el espectro de huéspedes de los baculovirus, la mayoría provenientes de los que afectan a lepidópteros, por lo que lo único que se puede concluir es que parece que existe una tendencia entre los baculovirus de los limántridos, a tener un espectro de huéspedes restringido a una sola especie. Entre los baculovirus de noctuidos no existe una tendencia generalizada en la amplitud del espectro de huéspedes, y mientras los baculovirus de las distintas especies de

Spodoptera presentan también espectros muy estrechos, los del grupo de *A. californica* son, como ya se ha mencionado anteriormente, muy amplios.

Hasta la fecha no existen datos sobre el espectro de huéspedes de las distintas variantes genotípicas que componen un aislado natural, pero es muy probable que existan diferencias a este nivel. La presencia de un genotipo defectivo de CfMNPV (CfDEFNPV) en la población silvestre así lo sugiere. Este genotipo, del que ya se conoce la secuencia genómica completa (LAUZON *et al.*, 2000), es incapaz de infectar larvas *per os* por sí solo por no poder atravesar el mesenterón, pero sí es capaz de pasar esta barrera con la ayuda de un genotipo no defectivo (LI *et al.*, 2000). Además, diversos trabajos sobre los mecanismos moleculares que gobiernan el espectro de huéspedes han demostrado que la adición o cambios en un único gen pueden alterar algunas de las propiedades del espectro de huéspedes de un baculovirus. Quizás, el caso más significativo sea el de AcMNPV y BmNPV, con un grado de homología en su secuencia de más del 90% (GOMI *et al.*, 1999), pero con un espectro de huéspedes no completamente solapado. Cambios mínimos en la secuencia de nucleótidos del gen de la helicasa de BmNPV amplían el espectro de huéspedes de AcMNPV a la línea celular Bm4 de *B. mori* (CROIZIER *et al.*, 1994; MAEDA *et al.*, 1993). El gen *hrf-1* de LdMNPV es otro ejemplo de como puede incrementarse el espectro de huéspedes de AcMNPV a una línea celular derivada de *L. dispar* mediante la incorporación de este gen al genoma de AcMNPV (THIEMM *et al.*, 1996) y estudios muy recientes indican que el aumento del nivel de expresión de otro gen, el *ie 1*, posibilita la expansión del espectro de huéspedes de AcMNPV a *S. littoralis* (LU *et al.*, 2000).

3.4. Otras características

Otro rasgo a tener en cuenta en la selección de un baculovirus para su aplicación como bioinsecticida es la cantidad de OBs que es capaz de generar en cada individuo infectado. Desde las primeras observaciones de la existencia de genotipos generados *in vitro* que producen el fenotipo FP, la productividad es una característica a la que se está dando cada vez más importancia por la influencia que tiene, por ejemplo, en el establecimiento de una epizootia en campo, o en el coste que supone su producción a gran escala. Los genotipos con baja productividad no sólo se generan *in vitro*, sino que también se ha observado que pueden coexistir junto a otros genotipos en las poblaciones silvestres de AgMNPV (RIBEIRO *et al.*, 1997, ver Tabla 4), LdMNPV (LYNN *et al.*, 1993; SHAPIRO *et al.*, 1984), PfMNPV (PAUL, 1997), SeMNPV (HARA *et al.*, 1995; MUÑOZ *et al.*, 2000) y SfMNPV (HAMM Y STYER, 1985) y que pueden obtenerse por recombinación *in vivo* entre AcMNPV y RoMNPV, como el AR-66 (VAIL *et al.*, 1982).

La productividad de un genotipo parece que está en estrecha relación con su velocidad de acción. El genotipo US2D del SeMNPV que, como ya se vio, es más lento que otros genotipos del mismo aislado, genera una cantidad de progenie viral significativamente mayor que los genotipos más rápidos (MUÑOZ *et al.*, 2000). Resultados similares se obtienen de los recombinantes de AcMNPV que se están

construyendo con valores reducidos de TL_{50} (KUNIMI *et al.*, 1996), o entre las variantes genotípicas purificadas de PfmNPV (HOGDSON *et al.*, 2000).

También se han registrado diferencias en el grado de melanización y de lisis. Existen genotipos purificados de HzSNPV (CORSARO Y FRASER, 1987), SfMNPV (HAMM Y STYER, 1985) y SeMNPV (MUÑOZ *et al.*, 2000) que no son capaces de licuar las larvas al final del proceso infeccioso, lo que supone una menor capacidad para iniciar una nueva ronda de infección y, por lo tanto, en una reducida transmisión horizontal.

4. Bibliografía

- ALY, A. Y Y. YOUNG. 1991. *Influence of larval age and temperature on effectiveness of a nuclear polyhedrosis virus in the soybean looper, Pseudoplusia includens (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean*. Biological control 1:334-338.
- ANDREWS, R. E., D. D. SPENCE, Y L. K. MILLER. 1980. *Virulence of cloned variants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Appl. Environ. Microbiol. 39:932-933.
- ARENDS, H. M. Y J. A. JEHL. 2000. *Impact of transposon TCp3.2 and Tc14.7 integration on Cydia pomonella granulovirus*. XXXIIIrd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Guanajuato, México.
- ARIF, B. M. Y W. DOERFLER. 1984. *Identification and localization of reiterated sequences in the Choristoneura fumiferana MNPV genome*. EMBO J. 3:525-529.
- ARIF, B. M., Z. GUANGYU Y P. JAMIESON. 1986. *A comparison of three granulosis viruses isolated from Choristoneura spp.* J. Invertebr. Pathol. 48:180-186.
- BEAMES, B. Y M. D. SUMMERS. 1990. *Sequence comparison of cellular and viral copies of host cell DNA insertions found in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Virology 174:354-363.
- BLACK, B. C., L. A. BRENNAN, P. M. DIERKS Y I. E. GARD. 1997. *Commercialization of baculoviral insecticides*, p. 341-387. En: L. K. Miller (ed.), The Baculoviruses. Plenum Press, N. Y., Estados Unidos.
- BLISSARD, G. W., B. BLACK, N. E. CROOK, R. KEDDIE, R. D. POSSEE, G. F. ROHRMANN, D. A. THEILMANN Y L. E. VOLKMAN. 1999. *Family Baculoviridae*, pp. 104-113. 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 y R. B. Wickner (eds.), Virus taxonomy: classification and nomenclature. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Viena, Austria.
- BRIESE, 1986. *Insect resistance to baculoviruses*, p. 237-266. En: R. Granados y B. Federici (ed.) Biology of baculoviruses. Vol. 2 CRC Press, Boca Raton, Estados Unidos.
- BRIESE, D. T. Y H. A. MENDE. 1981. *Differences in susceptibility to a granulosis virus between field populations of the potato moth, Phthorimaea operculella (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae)*. Bull. Entomol Res. 71:11-17.
- 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.
- CABALLERO, P., D. ZUIDEMA, C. SANTIAGO-ÁLVAREZ Y J. M. VLAK. 1992. *Biochemical and biological characterization of four isolates of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*. *Biocontr. Sci. Technol.* **2**:145-157.
- CARBONELL, L. F., M. R. HODGE, M. D. TOMALSI Y L. K. MILLER. 1988. *Synthesis of a gene coding for an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors*. *Gene* **73**:409-418.
- 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.
- CORSARO, B. G. Y M. J. FRASER. 1987. *Characterization of genotypic and phenotypic variation in plaque-purified strains of HzSNPV Elkar isolate*. *Interviol.* **28**:185-191.
- 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**:48-57.
- CROIZIER, G., L. CROIZIER, G. BAICHE Y J. CHAUFAX. 1985. *Évolution de la composition génétique et du pouvoir infectieux du baculovirus de Mamestra brassicae L. au cours de 25 multiplications successives sur les larves de la noctuelle du chou*. *Entomophaga* **30**:365-374.
- CROIZIER, G., L. CROIZIER, J. M. QUIOT Y D. LERECLUS. 1988. *Recombination of Autographa californica and Rachiplusia ou nuclear polyhedrosis viruses in Galleria mellonella L.* *J. Gen. Virol.* **69**:177-185.
- CROIZIER, G., D. GODSE Y J. M. VLAK. 1980. *Sélection des types viraux dans les infections doubles à Baculovirus chez les larves de Lépidoptère*. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **t 290**.
- CROIZIER, G. Y H. C. P. RIBEIRO. 1992. *Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in Anticarsia gemmatilis nuclear polyhedrosis virus populations*. *Virus Res.* **26**:183-196.
- CROIZIER, G., J. M. QUIOT, S. PARADIS Y K. BOUKHOUDMI-AMIRI. 1986. *Comparaison de la composition génétique de trois isolats du baculovirus de la polyedrose nucléaire du lépidoptère Spodoptera littoralis*. *Entomophaga* **31**:385-392.
- CROOK, N. E., R. A. SPENCER, C. C. PAYNE Y D. J. LEISY. 1985. *Variation in Cydia pomonella granulosus virus isolates and physical maps of the DNA from three variants*. *J. Gen. Virol.* **66**:2423-2430.
- CUSACK, T. Y W. J. MCCARTHY. 1989. *Effects of serial passage on genetic homogeneity of a plaque variant of Lymantria dispar nuclear polyhedrosis virus (Hamden LDP-67)*. *J. Gen. Virol.* **70**:2963-2972.
- 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. Y R. H. HICE. 1997. *Organization and molecular characterization of genes in the polyhedrin region of the Anagrapha falcifera multinucleocapsid NPV*. Arch. Virol. **142**:333-348.
- FIGUEIREDO, E., D. MUÑOZ, A. ESCRIBANO, A. MEXIA, J. M. VLAKE Y P. CABALLERO. 1999. *Biochemical identification and comparative insecticidal activity of nucleopolyhedrovirus isolates pathogenic for Heliothis armigera (Lep., Noctuidae) larvae*. J. Appl. Entomol. **123**:165-169.
- FRASER, M. J., G. E. SMITH Y M. D. SUMMERS. 1985. *Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus*. Virology **145**:356-361.
- FRIESEN, P. D. Y M. S. NISSEN. 1990. *Gene organization and transcription of TED, a lepidopteran retrotransposon integrated within the baculovirus genome*. Mol. Cel. Biol. **10**:3067-3077.
- FUXA, J. R. 1987. *Spodoptera frugiperda susceptibility to nuclear polyhedrosis virus isolates with reference to insect migration*. Environ. Entomol. **16**:218-227.
- GARCÍA-MARUNIAK, A., O. H. O. PAVAN Y J. E. MARUNIAK. 1996. *A variable region of Anticarsia gemmatilis nuclear polyhedrosis virus contains tandemly repeated DNA sequences*. Virus Res. **41**:123-132.
- GOMI, S., K. MAJIMA Y S. MAEDA. 1999. *Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. J. Gen. Virol. **80**:1323-1337.
- 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 noctuid species*. J. Gen. Virol. **73**:1491-1497.
- HAMM, J. J. Y E. L. STYER. 1985. *Comparative pathology of isolates of Spodoptera frugiperda nuclear polyhedrosis virus in S. frugiperda and S. exigua*. J. Gen. Virol. **66**: 1249-1261.
- HAMMOCK, B. D., B. C. BONNING, R. D. POSSEE, T. N. HANZLIK Y S. MAEDA. 1990. *Expression and effects of juvenile hormone esterase in a baculovirus vector*. Nature **344**:458-461.
- 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.
- HARRISON, R. L. Y B. C. BONNING. 2000. *Use of scorpion neurotoxins to improve the insecticidal activity of Rachiplusia ou multicapsid nucleopolyhedrovirus*. Biol. Contr. **17**:191-201.
- HAWTIN, R. E., K. ARNOLD, M. D. AYRES, P. M. A. ZANOTTO, S. C. HOWARD, G. W. GOODAY, L. H. CHAPPEL, P. A. KITTS, L. A. KING Y R. D. POSSEE. 1995. *Identification and preliminary characterization of a chitinase gene in the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus genome*. Virology **212**:673-685.
- HELDENS, J. G. M., E. A. VAN STRIEN, A. M. FELDMANN, P. KULCSÁR, D. MUÑOZ, D. J. LEISY, D. ZUIDEMA, R. W. GOLDBACH Y J. M. VLAKE. 1996. *Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus deletion mutants generated in cell culture lack virulence in vivo*. J. Gen. Virol. **77**: 3127-3134.
- HOGSDON, D. J., R. S. HAILS Y J. S. CORY. 2000. *Phenotypic variation between genotypic variants of a nucleopolyhedrosis virus attacking pine beauty moth,*

- Panolis flammea. XXXIIIrd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Guanajuato, México.
- IGNOFFO, C. M. 1981. *Living microbial insecticides*, p. 2-31. En: J. R. Norris y M. H. Richmond (ed.), *Essays in Applied Microbiology*. John Wiley, N. Y. Estados Unidos.
- JEHLE, J. A. 1996. *Transmission of insect transposons into baculovirus genomes: an unusual host-pathogen interaction*, pp. 81-97. En: L. Tomiuk, K. Wohrmann y A. Sentker (eds.), *Transgenic organisms-biological and social implications*. Birkhauser Verlag, Basel, Suiza.
- JEHLE, J. A., E. FRITSCH, A. NICKEL, J. HUBER Y H. BACKHAUS. 1995. TC14.7: A novel lepidopteran transposon found in *Cydia pomonella granulosis virus*. *Virology* 207:369-379.
- JEHLE, J. A., A. NICKEL, J. M. VLAK Y H. BACKHAUS. 1998. *Horizontal escape of the novel Tc-1-like lepidopteran transposon TCp3.2 into Cydia pomonella granulovirus*. *J. Mol. Evol.* 46:215-224.
- KISLEV, N. 1985. *DNA homology relationships between Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus and other baculoviruses*. *Intervirology* 24:50-57.
- KNELL, J. D. Y M. D. SUMMERS. 1981. *Investigation of genetic heterogeneity in wild isolates of Spodoptera frugiperda nuclear polyhedrosis virus by restriction endonuclease analysis of plaque-purified variants*. *Virology* 112:190-197.
- KOLODNY-HIRSCH, D. M., D. L. WARKENTIN, B. ALVARADO-RODRÍGUEZ Y R. KIRKLAND. 1993. *Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral insecticide for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae)*. *J. Econ. Entomol.* 86:314-321.
- KOOL, M., J. W. VONCKEN, F. L. J. VAN LIER, J. TRAMPER Y J. M. VLAK. 1991. *Detection and analysis of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties*. *Virology* 183:739-746.
- 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.
- KRELL, P. 1996. *Passage effect of virus infection in insect cells*. *Cytotechnol.* 20:125-137.
- KUNIMI, Y., J. R. FUXA Y B. D. HAMMOCK. 1996. *Comparison of wild type and genetically engineered nuclear polyhedrosis viruses of Autographa californica for mortality, virus replication and polyhedra production in Trichoplusia ni larvae*. *Entomol. Exp. Appl.* 81:251-257.
- LAUZON, H. A. M., P. B. JAMIESON, P. K. KRELL Y B. M. ARIF. 2000. *Gene organization and sequencing of the CfDEFNPV genome, a defective nucleopolyhedrovirus of Choristoneura fumiferana*. XXXIIIrd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Guanajuato, México.
- LE, T. H., T. Q. WU, A. ROBERTSON, D. BULACH, P. COWAN, K. GOODGE Y D. TRIBE. 1997. *Genetically variable triplet repeats in a RING-finger ORF of Helicoverpa species baculoviruses*. *Virus Res.* 49:67-77.
- LEE H. Y. Y P. J. KRELL. 1992. *Generation and analysis of defective genomes of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. *J. Virol.* 66:4339-4347.

- LEE, H. Y. Y P. J. KRELL. 1994. *Reiterated DNA fragments in defective genomes of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus are competent for AcMNPV-dependent DNA replication*. Virology **202**:418-427.
- LEE, H. H. Y L. K. MILLER. 1978. *Isolation of genotypic variants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **27**:754-767.
- LI, X., J. BARRETT, A. PANG, R. J. KLOSE, P. J. KRELL Y B. ARIF. 2000. *Characterization of an overexpressed spindle protein during a baculovirus infection*. Virology **268**:56-67.
- LU, L., Q. DU Y N. CHEJANOVSKY. 2000. *Expansion of the Autographa californica nucleopolyhedrovirus host range to Spodoptera littoralis*. XXXIIIrd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Guanajuato, México.
- LYNN, D. E., M. SHAPIRO Y E. M. DOUGHERTY. 1993. *Selection and screening of cloning isolates of the Abington strain of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **62**:191-195.
- MAEDA, S. 1989. *Increased insecticidal effect by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **165**:1177-1183.
- MAEDA, S., S. G. KAMITA Y A. KONDO. 1993. *Host range expansion of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (NPV) following recombination of a 0.6-kilobase-pair DNA fragment originating from Bombyx mori*. J. Virol. **67**:6234-6247.
- 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.
- MAGNOLIER, A. 1970. *Susceptibility of gypsy moth larvae to Lymantria sp. nuclear and cytoplasmic viruses*. Entomophaga **15**:407-412.
- MAJIMA, K., R. KOBARA Y S. MAEDA. 1993. *Divergence and evolution of homologous regions of Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. **67**:7513-7521.
- MARTIGNONI, M. E. 1984. *Baculovirus: an attractive biological alternative*, pp. 55-67. En: W. Y. Garner y J. Harvey (eds.), Chemical and biological controls in forestry. American Chemical Society, Washington, DC. Estados Unidos.
- MARUNIAK, J. E., A. GARCIA MARUNIAK, M. L. SOUZA, P. M. A. ZANOTTO Y F. MOSCARDI. 1999. *Physical maps and virulence of Anticarsia gemmatilis nucleopolyhedrovirus genomic variants* Arch. Virol. **144**:1991-2006.
- MERRYWEATHER-CLARKE, A. T., L. M. HINS Y R. D. POSSEE. 1994. *Recombination between genetically modified and unmodified Autographa californica nuclear polyhedrosis virus in Trichoplusia ni larvae*. Acta Virol. **38**:311-315.
- MILLER, L. K. Y K. P. DAWES. 1978. *Restriction endonuclease analysis to distinguish two closely related nuclear polyhedrosis viruses, Autographa californica MNPV and Trichoplusia ni MNPV*. Appl. Environ. Microbiol. **35**:411-421.
- MILLER, D. W. Y L. K. MILLER. 1982. *A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element*. Nature **299**:562-564.
- MOSCARDI, F. 1999. *Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera*. Ann. Rev. Entomol. **44**:257-289.
- MUÑOZ, D., J. I. CASTILLEJO Y P. CABALLERO. 1998. *Two naturally occurring deletion*

- mutants are parasitic genotypes in a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus strain. *Appl Environ. Microbiol.* **64**:4172-4177.
- MUÑOZ, D., R. MURILLO, P. KRELL, J. M. VLAK Y P. CABALLERO. 1999. Four in vivo cloned genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. *Vir. Res.* **59**:61-74.
- MUÑOZ, D., I. RUIZ DE ESCUDERO Y P. CABALLERO. 2000. Phenotypic characteristics and relative proportions of three genotypic variants from the *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. *Entomol. Exp. Appl.* **97**:275-282.
- MUÑOZ, D., J. M. VLAK Y P. CABALLERO. 1997. In vivo recombination between two strains of the genus nucleopolyhedrosis in its natural host, *Spodoptera exigua*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3025-3031.
- O'REILLY, D. R. Y L. K. MILLER. 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *BioTechnol.* **9**:1086-1089.
- PAUL, R. D. 1997. *Evolution and interaction of insect pathogens*, Ph.D. thesis, University of Reading, England, Reino Unido.
- PERELLE, A. H. Y J. D. HARPER. 1986. An evaluation of the impact of sublethal dosages of nuclear polyhedrosis virus in larvae on pupae, adults, and adult progeny of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *J. Invertebr. Pathol.* **47**:42-47.
- POSSEE, R. D. Y G. F. ROHRMANN. 1997. *Baculovirus genome organization and evolution*, p. 109-133. *En*: L. K. Miller (ed.), *The baculoviruses*, Plenum Press, N. Y., Estados Unidos.
- RIBEIRO, H. C. T., O. H. O. PAVAN Y A. R. MUOTRI. 1997. Comparative susceptibility of two different hosts to genotypic variants of the *Anticarsia gemmatilis* nuclear polyhedrosis virus. *Entomol. Exp. Appl.* **83**:233-237.
- SCHETTER, C., C. OELLIG Y W. DOERFLER. 1990. An insertion of insect cell DNA in the 81-map-unit segment of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **64**:1844-1850.
- SHAPIRO, M. Y J. L. ROBERTSON. 1991. Natural variability of three geographic isolates of gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* **84**:71-75.
- SHAPIRO, M., J. L. ROBERTSON, M. G. INJAC, K. KATAGIRI Y R. A. BELL. 1984. Comparative infectivities of gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nucleopolyhedrosis virus isolates from North America, Europe and Asia. *J. Econ. Entomol.* **77**:153-156.
- SMITH, I. R. L. Y N. E. CROOK. 1988. In vivo isolation of baculovirus genotypes. *Virology* **166**:240-244.
- 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 *Sma*I, *Kpn*I, *Bam*HI, *Sac*I, *Xho*I, and *Eco*RI. *J. Virol.* **30**:828-838.
- STEWART, L. M. D., M. HIRST, M. LÓPEZ-FERBER, A. T. MERRYWEATHER, P. J. CAYLAY Y R. D. POSSEE. 1991. Construction of an improved insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* **352**:85-88.
- THIEMM, S. M., X. DU, M. E. QUENTIN Y M. M. BERNER. 1996. Identification of a bacu-

- lovirus gene that promotes Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line.* J. Virol. **70**:2221-2227.
- TREACY, M. F. ALL, J.N. Y GHIDIN, G.M. 1997. *Effect of ecdysteroid UDP-glucosyl-transferase gene deletion on efficacy of a baculovirus against Heliothis virescens and Trichophisia ni (Lepidoptera: Noctuidae).* J. Econ. Entomol. **90**:1207-1214.
- VAIL, P. V., J. D. KNELL, M. D. SUMMERS Y D. K. COWAN. 1982. *In vivo infectivity of baculovirus isolates, variants, and natural recombinants in alternate hosts.* Environ. Entomol. **11**:1187-1192.
- WEITZMAN, M. D., R. D. POSSEE Y L. A. KING. 1992. *Characterization of two variants of Panolis flammea multiple nucleocapsid nuclear polyhedrosis virus.* J. Gen. Virol. **73**: 1881-1886.
- ZETHNER, O. 1980. *Contol of Agrotis segetum (Lep.: Noctuidae) [on] root crops by granulosis virus.* J. Econ.Entomol. **25**: 27-35.