

# Capacidad insecticida de los baculovirus

JORGE E. IBARRA Y M<sup>a</sup> CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

1. Introducción .....	204
2. Características deseables de un bioinsecticida .....	204
3. Ventajas y limitaciones de los baculovirus .....	205
4. Patogenicidad y virulencia .....	207
5. Medición de la capacidad insecticida en el laboratorio .....	208
5.1. El bioensayo .....	208
5.2. Análisis Probit .....	208
5.3. Estimadores Medios .....	209
5.4. Ejemplos de técnicas de bioensayo .....	210
5.5. Control de heterogeneidad .....	212
6. Validación de la capacidad insecticida .....	214
6.1. Evaluación en el invernadero .....	214
6.2. Evaluación en el campo .....	214
7. Determinación del rango de huéspedes .....	216
8. Evaluación de bioseguridad .....	218
9. Evaluación de los baculovirus recombinantes .....	219
10. Bibliografía .....	220

## 1. Introducción

A pesar de que las enfermedades causadas por los baculovirus se registraron desde 1527, no fue hasta 1936 cuando se propuso su uso como agentes de control de plagas (BENZ, 1986). Las características de patogenicidad y virulencia propias de muchos baculovirus, hacen de ellos importantes agentes de control (potenciales y validados) contra muchas plagas de importancia económica. En la actualidad, el uso de los baculovirus como agentes de control se diversifica gradualmente y en forma constante, y se trabaja asiduamente para aminorar los inconvenientes que éstos presentan tanto en el proceso de producción, como en su lento efecto y su persistencia en el campo.

En el presente capítulo se discuten las diferentes características biológicas que los baculovirus presentan como agentes de control, así como las técnicas para validar su uso y su potencialidad en el manejo integrado de plagas.

## 2. Características deseables de un bioinsecticida

El éxito de los baculovirus como agentes de control de plagas depende de sus características intrínsecas. Dichas características les confieren propiedades antropológicamente útiles, que permiten su uso como agentes de control. La utilidad de los entomopatógenos, en general, como agentes de control microbiano de plagas, en forma de bioinsecticidas, depende su efectividad y facilidad de manejo. Cuantas más características deseables confluyan en un entomopatógeno dado, mayor será su éxito. Dentro de las características deseables en cualquier bioinsecticida, destacan las siguientes: a) alta virulencia, que cause infecciones agudas en su huésped; b) alta capacidad para transmitirse; c) elevada persistencia en el campo; d) capacidad para producirse masivamente en forma eficiente y económica; e) espectro de huéspedes limitado; f) alto grado de bioseguridad, tanto hacia el medio ambiente como hacia el hombre y los animales domésticos y silvestres; g) larga vida de anaquel; h) capacidad para aplicarse en el campo con equipo convencional; i) susceptible de ser mejorado por ingeniería genética; entre otras.

Cabe hacer mención que estas características se aplican, en su mayoría, a aquellos entomopatógenos que se desarrollen como bioinsecticidas de tipo inundativo, ya que los utilizados con la técnica "inoculativa" del control biológico clásico, sería deseable que presentaran, primordialmente, las tres primeras características, además de las siguientes: a) una amplia adaptabilidad a diversos ambientes; b) una alta capacidad para provocar epizootias naturales y c) constituirse en el factor clave que regula las fluctuaciones poblacionales de la plaga. Los baculovirus comparten muchas de estas características deseables, que los colocan dentro de los entomopatógenos con mayor potencialidad como agentes de control; sin embargo, también poseen algunas características que limitan su uso.

### 3. Ventajas y limitaciones de los baculovirus

El éxito o fracaso de los baculovirus como agentes de control microbiano de plagas se basa en las ventajas y desventajas que éstos presentan. Dentro de las primeras destaca el hecho de que los miembros de la familia Baculoviridae sólo se han encontrado infectando a organismos del phylum Arthropoda, mayoritariamente a los de la clase Insecta (GRÖNER, 1986). Ninguna otra familia de virus entomopatógenos presenta esta característica, lo que permite desarrollarlos con un menor número de restricciones de bioseguridad.

Adicionalmente, al igual que muchos otros virus, la gran mayoría de las cepas de los baculovirus presentan un reducido espectro de huéspedes. Esta cualidad implica que las diversas cepas de baculovirus pueden utilizarse como bioinsecticidas contra muchas especies de insectos, sin afectar a las plantas y a los vertebrados incluyendo al hombre, a los insectos benéficos que son parasitoides y depredadores de las plagas o a otros insectos benéficos como las abejas. Sin embargo, desde el punto de vista práctico y comercial, la alta especificidad de la mayoría de las cepas de baculovirus también podría constituir una desventaja, ya que el mercado de cada cepa es muy estrecho, por lo que el atractivo de desarrollo industrial se reduce, principalmente, a aquellas especies de plagas de gran importancia económica (YEARIAN Y YOUNG, 1982).

Otra ventaja de los baculovirus se basa en la persistencia que éstos presentan en los ambientes naturales (principalmente en el suelo y la hojarasca), lo cual constituye la fuente de inóculo para generaciones subsiguientes de la plaga. Esta persistencia en el medio ambiente permite prolongar el efecto de una aplicación o el establecimiento del baculovirus como factor regulador de las poblaciones del insecto huésped. Este último fenómeno se presenta cuando el baculovirus provoca epizootias naturales y es un factor dependiente de la densidad poblacional de su huésped (KALMAKOFF Y CRAWFORD, 1982). No obstante, a pesar de la persistencia de los inóculos en el ambiente, después de una aspersión de baculovirus en el campo quedan muy pocos residuos. Uno de los factores naturales más importantes que limitan los residuos de los baculovirus en los agroecosistemas son los rayos ultravioleta del sol, de ahí que sea crucial la apropiada formulación de los baculovirus, cuando se utilizan como bioinsecticidas.

Adicionalmente, el desarrollo de resistencia de los insectos hacia los baculovirus es poco probable. A pesar de que existen muy pocos estudios relacionados con este fenómeno, se sabe que depende de la duración de la presión de selección, así como de la variación genética del huésped (KAOMINI Y ROUSH, 1988). Más que desarrollo de resistencia, se ha descrito principalmente una variación intraespecífica de la susceptibilidad de los huéspedes a la infección con baculovirus, como en el caso del gusano de seda *Bombyx mori* infectado con su nucleopoliedrovirus (NPV), la mariposa blanca de la col *Pieris brassicae* infectada con granulovirus (GV) (BRIESE Y PODGWAITE, 1985), y la palomilla café de la manzana *Epiphyas postvittana* infectada con un NPV (BRIESE *et al.*, 1980). Cabe hacer notar que, aunque se detectaron diferencias en susceptibilidad a estos baculovi-

rus, éstas también podrían deberse a la manipulación de las cepas en el laboratorio.

Interesantemente, cuando se cruzaron las especies *Heliothis virescens* y *H. subflexa*, la primera susceptible a su propio NPV y la segunda resistente al mismo, la progenie resultante mostró los mismos niveles de susceptibilidad de la primera (KAOMINI Y ROUSH, 1988). Sin embargo, resultados de investigación recientes indican que la posibilidad de desarrollo de resistencia por parte de sus huéspedes es posible (ver Capítulo 12). Hasta la fecha, los insectos resistentes a los insecticidas químicos no han presentado resistencia cruzada con los baculovirus (HUBER, 1986; ROBERTS *et al.*, 1991).

Además de las características mencionadas anteriormente, los baculovirus también causan epizootias (naturales o inducidas) en las poblaciones de los insectos, las cuales en ocasiones llegan a regular en forma natural sus poblaciones. Esta característica ha sido ampliamente aprovechada en algunos programas de control biológico de plagas, mediante la inducción de epizootias artificiales (HUBER, 1986). Las epizootias causadas por los baculovirus se han utilizado eficazmente en el control de diversas plagas forestales como la palomilla gitana *Lymantria dispar*, en los bosques de Estados Unidos y Canadá (Capítulo 11), así como también en plantaciones de palma de coco que han sido protegidas del escarabajo de la palma *Oryctes rhinoceros*, mediante la aplicación de un virus previamente clasificado como un baculovirus (HUBER, 1986).

Sin embargo, los baculovirus poseen algunas desventajas que limitan su uso como agentes de control biológico de plagas. Una de las principales limitaciones se presenta en los procesos de producción. Como todos los virus, los baculovirus se reproducen exclusivamente en el interior de su huésped o en células cultivadas *in vitro*. En la actualidad, todos los bioinsecticidas a base de baculovirus son producidos en las larvas de su huésped, las cuales deben ser criadas en grandes cantidades (ver Capítulo 9). Esto propicia que los costos de producción aumenten significativamente, principalmente a causa de la mano de obra intensiva que se requiere (SHAPIRO, 1986). Sin embargo, esta limitación podría ser menos onerosa en los países en vías de desarrollo, donde se ha llegado incluso a emplear la colecta de larvas enfermas en el campo, para su subsecuente aspersión. Además, el desarrollo de sistemas de producción *in vivo* que mejoran la relación costo-beneficio, implementados por compañías comerciales como Crop Genetics International y AgriVirion, ha repercutido en la disminución del costo de producción de los baculovirus (WOOD, 1996).

Por otro lado, las técnicas de producción en cultivos *in vitro* de células de insecto, aún no han logrado disminuir los costos de producción generados por los medios de cultivos utilizados para el crecimiento de las líneas celulares (MURHAMER, 1996). A pesar de que existen más de 200 líneas celulares establecidas a partir de más de 70 especies de insectos (GRANADOS *et al.*, 1987), todas ellas requieren de costosos medios artificiales y condiciones especiales de cultivo. Adicionalmente, el escalamiento de los volúmenes de producción aún está limitado a 50 lt, lo que restringe significativamente su producción a nivel industrial. Afortunadamente, el dise-



ño de nuevos bioreactores y la obtención de medios de cultivos libres de suero permite prever que estas limitantes serán superadas eventualmente (ver Capítulo 8).

A pesar de las desventajas ya mencionadas, sin duda alguna la limitación que más ha influido en el empleo de los baculovirus como bioinsecticidas la constituye su lento modo de acción. Un insecto infectado puede promediar hasta 7 días en morir, dentro de un intervalo que va de 5 a 15 días, dependiendo del insecto y la cepa viral (WOOD Y GRANADOS, 1991). Durante el proceso de infección, el insecto continúa su alimentación y, por ende, el daño al cultivo. Esto restringe el desarrollo sólo a aquellos baculovirus que posean un alto grado de virulencia y/o que ataquen a plagas de alta importancia económica. Sin embargo, el reciente avance en la biología molecular de los baculovirus ha propiciado la obtención de cepas recombinantes con mayores niveles de virulencia, al introducir a su genoma, genes que expresan factores que aumentan su virulencia (BONNING Y HAMMOCK, 1992) (ver Capítulo 8).

#### 4. Patogenicidad y virulencia

Con el objeto de comprender adecuadamente la capacidad cuantitativa de los baculovirus como agentes de control de plagas, es necesario establecer la diferencia entre dos conceptos básicos, sujetos frecuentemente a confusión: la patogenicidad y la virulencia. Primeramente, es importante hacer notar que las definiciones de las que son objeto los fenómenos naturales, si bien nos ayudan a entender y comunicar la idea de un concepto, en muchas ocasiones causan confusión por su antropocentrismo, principalmente cuando nos aferramos a discriminar fenómenos dentro o fuera de un término dado, sin percatarnos que los límites del término son producto de nuestro propio artificio. Los conceptos de patogenicidad y virulencia no escapan al antropocentrismo.

En este libro seguiremos las definiciones siguientes. La patogenicidad se entiende como la capacidad de provocar una enfermedad, y al factor que posee esta capacidad se le denomina patógeno; mientras que la virulencia se define como el grado de patogenicidad o de daño fisiológico que una cepa o especie de patógeno causa a su huésped (STEINHAUS Y MARTIGNONI, 1970).

De esta forma, los NPV que infectan a insectos no lepidópteros u otros artrópodos, poseen alta patogenicidad pero baja virulencia, ya que en su mayoría son monoorganotrópicos; mientras que los NPV que atacan a los lepidópteros y los GV del grupo II (por ejemplo, el granulovirus de *Cydia pomonella*, CpGV) poseen alta patogenicidad y alta virulencia, ya que causan un daño total al individuo infectado, principalmente debido a su capacidad poliorganotrópica. De ahí que el principal objetivo de desarrollar virus recombinantes que expresen toxinas heterólogas, es el de aumentar su virulencia pero no su patogenicidad. Sin embargo, es precisamente en este punto donde el antropocentrismo de los términos que inventamos nos impiden trascender la semántica, a costa del entendimiento de los fenómenos biológicos.

La patogenicidad y la virulencia son conceptos estrechamente ligados, ya que forman parte de un mismo fenómeno biológico. De ahí que, a pesar de que la patogenicidad se considera una característica cualitativa de un patógeno, y la virulencia es una característica cuantitativa, es difícil separar tajantemente ambos conceptos dentro de un fenómeno patológico completo.

## **5. Medición de la capacidad insecticida en el laboratorio**

### **5.1. El bioensayo**

El bioensayo se puede definir como cualquier método que mida alguna propiedad de un agente, en términos de respuesta biológica. Es decir, el bioensayo toma a los organismos vivos como aparatos de medición, y establece el parámetro biológico que utilizará (mortalidad, longevidad, fertilidad, crecimiento, atracción, etc.) para relacionar el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo. En patología, el fenómeno causal es siempre un patógeno y el efecto normalmente se mide en términos de mortalidad o de algún otro daño fisiológico. En los bioensayos donde se prueban los efectos de diversas cepas de baculovirus sobre determinadas especies de insectos, el efecto se mide normalmente en términos de mortalidad, como si fuera un insecticida químico.

De esta forma, para determinar cuantitativamente el efecto letal de un baculovirus, es necesario llevar a cabo bioensayos en los que se prueben una serie de dosis (o concentraciones) del baculovirus que se requiere evaluar. Dichas dosis o concentraciones se cuantifican normalmente con la ayuda de hematocitómetros, en los cuales se realiza un conteo de los poliedros o gránulos presentes en una solución madre, a partir de la cual se efectuarán las distintas diluciones en soluciones acuosas con detergentes, que corresponden a cada dosis o concentración. Esta serie de dosis deberá correlacionarse con la mortalidad causada por cada una de ellas, de tal forma que se pueda establecer una ecuación de regresión que estime la relación entre las dos variables, y consecuentemente determinar el nivel de letalidad de la cepa en cuestión.

### **5.2. Análisis Probit**

Las múltiples experiencias para correlacionar las diferentes dosis de un agente con los porcentajes de mortalidad que producen, nos muestran que éstas no son del tipo lineal simple. Teóricamente, la relación entre dosis y porcentaje de mortalidad se establece por una línea sigmoidea extendida; es decir, la sección de la curva correspondiente a las dosis máximas y a las mortalidades máximas se extiende a la derecha, provocando que la curva se muestre asimétrica. Un primer intento de regularizar la curva se obtiene al transformar a logaritmos las dosis probadas en el bioensayo. Si bien el resultado sigue siendo una curva sigmoidea, ésta se hace simétrica en sus regiones asintóticas.

Una curva sigmoidea simétrica también representa la respuesta acumulada de una población con distribución normal. En otras palabras, la distribución de mortalidad de una población puede ahora representarse por el área acumulada contenida en una campana o curva de Gauss, en donde el 50% del área (la media) coincide con el punto medio de la curva y con 0 (cero) unidades de desviación estándar. Si equiparamos la mortalidad con el área acumulativa de las desviaciones estándar de una curva normal, entonces podemos representar aritméticamente a los porcentajes de mortalidad, lo cual significa que la curvatura causada por la distribución de la mortalidad puede transformarse en una línea recta si a su vez se transforman los porcentajes en unidades de desviaciones estándar. Con esta transformación, el 50% de mortalidad se convertiría en 0, por lo que las mortalidades menores al 50% estarían representadas por unidades negativas.

Por esta razón, Bliss (1934) sugirió arbitrariamente "correr" la escala 5 unidades, de tal forma que el 0 (cero) correspondiera a 5, el 1 al 6, el -1 al 4, y así sucesivamente. Con esta modificación, convenientemente se evita trabajar con números negativos. Estas unidades son las llamadas unidades Probit, y al análisis de regresión entre las dosis transformadas a logaritmos y los porcentajes de mortalidad transformados a unidades Probit, se le conoce como análisis Probit, el cual relaciona las variables mediante la técnica de máxima similitud por pruebas de bondad de ajuste consecutivas, en vez de utilizar la técnica de mínimos cuadrados, propia de un análisis de regresión normal (FINNEY, 1952).

### 5.3. Estimadores Medios

El parámetro más importante resultante de un análisis Probit es el estimador medio, al cual se le conoce generalmente como Dosis Letal Media ( $DL_{50}$ ) o sea la dosis que teóricamente debe matar al 50% de la población sometida a tratamiento. Sin embargo, una dosis representa una determinada cantidad del agente que se evalúa (ejemplo, número de poliedros o gránulos) que es administrada por cualquier vía a cada uno de los individuos (HUGHES y WOOD, 1981). Ésta es una técnica muy utilizada en la cuantificación de la eficiencia de cepas de baculovirus, donde un volumen determinado de una suspensión del baculovirus o de dieta es ingerido totalmente por cada individuo tratado, o bien un volumen preciso es inyectado a cada individuo (ver más adelante). La utilización de un inóculo específico se refleja en la alta precisión del análisis. Por otro lado, los individuos sometidos a tratamiento también pueden exponerse a concentraciones de poliedros o gránulos, ya sea distribuidos en la superficie u homogeneizadas en las dietas (naturales o artificiales), las cuales consumen *ad libitum*, o bien las larvas son sumergidas a suspensiones del virus (ver más adelante), desconociendo, en todos estos casos, la cantidad específica de inóculo que ingiere cada individuo. En este tipo de ensayos, el estimador medio no es una  $DL_{50}$  sino una  $CL_{50}$  o Concentración Letal Media.

Debido a que una de las principales desventajas de los baculovirus es su relativamente lento modo de acción, un estimador medio muy socorrido en la determinación de la eficiencia de las cepas de baculovirus es el  $TL_{50}$  o Tiempo Letal Medio.

Este parámetro es también de gran utilidad en la cuantificación del efecto de baculovirus recombinantes, ya que el principal objetivo de éstos es la disminución del tiempo que una infección requiere para matar a su huésped. Para estimar este parámetro, en vez de dosis o concentraciones, las relaciones se establecen entre la mortalidad y el tiempo transcurrido entre la administración del patógeno y la muerte del individuo (MARCUS Y EAVES, 2000).

Cuando se establece una relación tiempo-mortalidad, la variable independiente está representada por el intervalo de tiempo utilizado en el bioensayo, mientras que la variable dependiente la constituye el número acumulativo de insectos que muere en cada intervalo de tiempo medido. Algunos autores consideran que para estimar eficientemente este parámetro, es importante excluir del análisis a los insectos sobrevivientes al finalizar el bioensayo, ya que se considera que éstos pudieron estar fuera de la acción del patógeno o bien, presentar cierto grado de resistencia hacia el mismo (FARRAR Y RIDGWAY, 1998). Debido a esto, existen algunas inconsistencias al utilizar este parámetro como estimador de virulencia, ya que las poblaciones sobrevivientes podrían causar la subestimación del parámetro, al tomar en consideración toda la población tratada y no sólo la población muerta.

Otro parámetro que se utiliza como estimador de virulencia en los baculovirus es el tiempo medio de sobrevivencia o  $TS_{50}$ . Este parámetro de virulencia podría considerarse como la contraparte del  $TL_{50}$ , ya que aquí se cuantifica el número de insectos que sobreviven (y no los que mueren) a la exposición del baculovirus, en un intervalo de tiempo determinado. No obstante, algunos autores consideran que la diferencia de este parámetro con respecto al del  $TL_{50}$ , radica en que en los bioensayos donde se estima el  $TS_{50}$ , los insectos sólo se exponen al baculovirus al inicio del bioensayo, y posteriormente se retiran a dietas libres del patógeno durante el resto del periodo de incubación. Por lo tanto, éstos autores consideran que en la estimación del  $TL_{50}$ , los insectos permanecen expuestos al patógeno durante todo el periodo de incubación del tratamiento (HUGHES *et al.*, 1997). Independientemente de estos criterios, al igual que en el caso del  $TL_{50}$ , las poblaciones sobrevivientes al bioensayo también pueden afectar la relación tiempo-sobrevivencia, ya que, de igual manera que el anterior, subestimaría el parámetro medio (FARRAR Y RIDGWAY, 1998).

Otro estimador medio es la  $DE_{50}$  o Dosis Efectiva Media, el cual no mide la mortalidad sino algún efecto deletéreo (por ejemplo, la reducción de fertilidad, decremento de peso, desarrollo lento, etc.) causado por la infección; sin embargo, éste prácticamente no es utilizado para medir la eficiencia de las cepas de los baculovirus.

#### **5.4. Ejemplos de técnicas de bioensayo**

Existe una gran diversidad de técnicas utilizadas en la cuantificación del efecto letal de los baculovirus. Algunas de ellas se basan en la contaminación de la superficie de la dieta, la integración a la dieta de las diferentes diluciones del baculovirus, el suministro oral directo al insecto (con sus distintas modalidades) o la inyección intrahemocélica de la dosis o concentración viral por evaluar.



Sin duda alguna, la forma más rutinaria de los bioensayos con baculovirus se basa en la contaminación de la superficie de la dieta. En esta técnica se emplean dos modalidades, en la primera los insectos tratados son expuestos a la dieta contaminada durante todo el periodo de evaluación del bioensayo; en la segunda, los insectos se exponen al virus depositado en la superficie de la dieta sólo por algunas horas, al inicio del bioensayo, para posteriormente transferirse a dieta no contaminada. Habitualmente, la contaminación de la superficie de la dieta se efectúa mediante la adición de una suspensión viral previamente cuantificada, sobre recipientes (cajas de Petri, vasos, etc.) que contengan la dieta artificial o natural de los insectos (MILKS, 1997). Posteriormente se permite la evaporación de la suspensión, antes de colocar a los insectos bajo ensayo. Se pueden utilizar contenedores múltiples o individuales, dependiendo de los hábitos caníbales del insecto. La cuantificación de la mortalidad de los insectos tratados se efectúa al final de un periodo preestablecido de bioensayo, mediante el conteo de los individuos muertos en los contenedores inoculados con el virus, así como en los testigos, a los cuales sólo se les suministra agua (IGNOFFO, 1965).

Cuando se utiliza esta metodología, las concentraciones de los virus se expresan como la cantidad de unidades virales por unidad de superficie o de peso de la dieta, comúnmente expresado como poliedros (o gránulos) por  $\text{mm}^2$ ,  $\text{cm}^2$ , gramo, etc. de dieta natural o artificial (IGNOFFO, 1965). Las principales ventajas de esta técnica se basan en su simplicidad y rapidez, además de que es muy similar al proceso natural de infección y que se pueden probar insectos prácticamente de cualquier estadio larvario. No obstante, existen algunas limitaciones, como la variabilidad de la dosis ingerida por los insectos, además de la posible dispersión irregular del virus en la superficie de la dieta (MILKS, 1997).

Otra de las técnicas empleadas en los bioensayos efectuados con baculovirus es la incorporación de la dosis viral en dieta artificial. Es importante considerar la temperatura de la mezcla, ya que debe estar suficientemente caliente para evitar su gelificación, pero suficientemente fría para evitar la inactivación de los virus. Una temperatura entre 35 y 38°C sería la adecuada. Se pueden utilizar recipientes grandes que permitan probar un mayor número de insectos, o bien la dieta con el virus incorporado se puede cortar en fragmentos más pequeños, los cuales se proporcionan como raciones individuales a los insectos.

El uso de esta metodología ha permitido obtener resultados más reproducibles que los obtenidos con la contaminación de la superficie de la dieta. Además, la estandarización de las dimensiones de la superficie a probar es irrelevante, así como la homogeneidad de la dispersión sobre dicha superficie. También, este método permite efectuar bioensayos con cualquier estadio larvario. Una de las limitantes de este método es el mayor consumo de tiempo que el de la contaminación de la superficie de la dieta (IGNOFFO, 1964).

Una tercera metodología de bioensayo se basa en el suministro directo del virus al insecto. Esta técnica presenta varias modalidades, entre las que se encuentran la inyección *per os* de la dosis, el método de alimentación por gotas para larvas de estadios tardíos, el método de alimentación por gotas para larvas neonatas, el

método de inmersión de huevecillos, el método de tratamiento superficial de larvas y el método de inyección intrahemocélica. Para el primer caso, se suministra una dosis conocida del virus a través de la boca del insecto, con la ayuda de jeringas modificadas o micropipetas. Esta técnica proporciona datos altamente reproducibles, pero es muy tediosa (PASCHKE *et al.*, 1968).

Para el caso de la alimentación por gotas en larvas de estadios tardíos, las dosis se colocan en volúmenes pequeños (0,5-2  $\mu$ l) que se ofrecen individualmente a cada larva. Es conveniente suspender la alimentación a las larvas que se van a probar, 24 horas antes del bioensayo, para asegurar la ingestión del volumen suministrado (KLEIN, 1978).

El suministro de gotas a larvas neonatas se basa en la sincronización previa de la eclosión de las larvas. Las larvas recién eclosionadas son seleccionadas por su vigor y se colocan en discos, los cuales han sido tratados con vaselina para evitar el escape. En estos discos se colocan múltiples gotas de suspensiones virales, las cuales se tiñen previamente con algún colorante. Una vez que las larvas han ingerido una gota completa (manifestado por la coloración del intestino de la larva), estas se transfieren a dietas artificiales, hasta el término del bioensayo. Este método es altamente eficiente y reproducible, ya que se realiza un tratamiento sincronizado de una cantidad considerable de larvas, con una dosis definida del virus (HUGHES Y WOOD, 1981; KUNIMI Y FUXA, 1996).

Una de las dos últimas variantes de alimentación directa del virus aprovecha el hábito de algunos insectos de alimentarse del corion de sus huevecillos cuando eclosionan. Los huevecillos son previamente sumergidos en una suspensión de virus a una concentración definida, se dejan secar y posteriormente se incuban hasta la eclosión de las larvas, infectándose al ingerir el corion contaminado. El segundo método es muy similar, ya que aprovecha el hábito de algunas larvas de alimentarse de su propia exuvia después de la muda. Para ello, un poco antes de la muda, las larvas se sumergen en suspensiones del virus o se les baña con un volumen determinado de la suspensión, se dejan secar, y se colocan posteriormente en recipientes con dieta. Finalmente, el método de inyección intrahemocélica, consiste en introducir una dosis conocida de una suspensión viral, mediante una inyección en el hemocoele de larvas de estadios tardíos. La utilidad de este método es muy limitada, ya que es muy tedioso, consume mucho tiempo y causa daños físicos a los insectos. Además, sólo puede utilizarse con viriones liberados de los cuerpos de oclusión (ODV) o con viriones gemados presentes en la hemolinfa de los insectos (BV), lo que dificulta la cuantificación de las dosis inyectadas.

### **5.5. Control de heterogeneidad**

A pesar de que la variación inherente entre los individuos bajo ensayo es la causa principal de la variación de los estimadores medios, la estandarización de las condiciones de bioensayo es fundamental para obtener resultados uniformes. Es por eso que la comparación de los resultados sólo puede hacerse efectiva si los bioensayos se desarrollan bajo las mismas condiciones. Los siguientes son

algunos de los principales factores que pueden influir sobre los resultados de un bioensayo: la preparación del material de prueba, su almacenamiento, el estadio de desarrollo del insecto sobre el que se prueba, el tipo de dieta, el volumen de la dieta, el recipiente de bioensayo, la técnica para integrar el material de prueba a la dieta, el número de insectos por repetición, el número de dosis probadas en un bioensayo, el factor de dilución entre las dosis, el tiempo de exposición a la preparación del virus, si se manejan dosis o concentraciones, y los factores físicos ambientales (temperatura, humedad, fotoperíodo) (McLAUGHLIN *et al.*, 1984).

Tomando en cuenta las diversas fuentes de heterogeneidad que pueden influir en la validez de un bioensayo, es recomendable que cuando se realizan bioensayos con baculovirus, se consideren algunas características importantes para disminuir la variabilidad en los mismos. Es importante que se seleccionen aquellas larvas que logran adaptarse satisfactoriamente a la dieta, después de 24 hrs de haber eclosionado, escogiendo las más vigorosas y mejor desarrolladas. Se debe tomar como unidad de ensayo un número determinado de larvas por dosis que muestre resultados consistentes: un mínimo de 20 para poblaciones altamente homogéneas, disponiéndose de un testigo negativo en cada prueba para estimar el porcentaje de mortalidad natural.

Para la preparación de las dosis o concentraciones a probar, es importante diluir los poliedros o gránulos en soluciones diluidas de detergentes no iónicos para disminuir la aglomeración de los mismos. Asimismo, es recomendable que se tenga un estricto control sobre la temperatura del cuarto de incubación durante el tiempo que se realice el bioensayo, con el fin de evitar cambios bruscos de temperatura que interfieran con el efecto a medir.

Cuando se realizan bioensayos con baculovirus, es más recomendable utilizar dietas semisintéticas que las dietas naturales, debido a que en las primeras existe mayor homogeneidad que en las segundas. Además, los bioensayos efectuados sobre dieta artificial pueden integrar el material de prueba durante su preparación o bien distribuirse homogéneamente sobre éstas, para luego ser incubados en el cuarto de cría durante el tiempo de exposición.

Una vez analizados los resultados de los bioensayos, es posible determinar el grado de variación de los datos y su aceptabilidad. Existen diversos parámetros que indican la validez los resultados, por ejemplo: a) la mortalidad natural en los individuos testigo debe ser igual o menor al 10%; b) el valor de la  $\chi^2$ , en un bioensayo de 6 dosis, debe ser menor o igual a 5; c) de una serie de 6 dosis probadas, el valor de la  $CL_{50}$  estimada debe estar contenido entre la segunda y la cuarta dosis; d) por lo menos 4 de un total de 6 dosis probadas deben causar una mortalidad de entre 10 y 90%; e) el valor de la pendiente de la línea de regresión debe estar entre 1.5 y 6; f) el cociente entre el límite fiducial mayor y el menor ( $p = 0.95$ ) de la  $CL_{50}$  debe ser menor o igual a 2; g) deben realizarse por lo menos 3 repeticiones válidas, por separado; y h) el coeficiente de variación de la  $CL_{50}$  media (estimada a partir de las repeticiones) debe ser igual o menor a 20% (IBARRA Y FEDERICI, 1987).

## **6. Validación de la capacidad insecticida**

### **6.1. Evaluación en el invernadero**

Una vez que se ha probado la efectividad de una cepa de baculovirus bajo las condiciones controladas del laboratorio y con los análisis estadísticos más estrictos, será necesario validar su efectividad bajo las condiciones menos controladas pero más similares a las que estará sujeta en su utilización como bioinsecticida. De ahí que el siguiente paso en la validación de una cepa de baculovirus como agente de control sea el ensayo de su efectividad en el campo. En algunos casos, cuando se requiere de mayor precisión sobre las dosis a probar en el campo, o la efectividad de la cepa es dudosa, o la experimentación en el campo es costosa, etc., es recomendable realizar pruebas de efectividad bajo condiciones de invernadero. De esta forma se podrán afinar las condiciones en las que se probarán posteriormente en el campo o, inclusive, se podría determinar la ineficiencia de la cepa evaluada, por presentar datos negativos.

Las pruebas de invernadero normalmente se realizan con plantas cultivadas en "camas" o macetas, con el número de repeticiones y la uniformidad estadísticamente requeridos para cada tratamiento. Los tratamientos experimentales más frecuentemente probados bajo condiciones de invernadero son las diferentes dosis que podrían ser utilizadas bajo condiciones de campo, pero también se pueden probar diferentes coadyuvantes en la mezcla de aspersión, o diferentes tipos de aplicación, o los volúmenes del bioinsecticida requeridos para cada estado fenológico de la planta, o los residuos de la aplicación, etc. Normalmente, las plantas son infestadas artificialmente con la plaga, con un número de individuos similar o mayor al que habitualmente están sujetas en condiciones naturales. El análisis estadístico de los resultados es similar al utilizado en las pruebas de campo (ver más adelante).

### **6.2. Evaluación en el campo**

La evaluación de un producto a base de una cepa de baculovirus bajo condiciones de campo, al igual que las evaluaciones en el laboratorio, son muy similares a las técnicas utilizadas para evaluar la eficiencia de los insecticidas químicos. Las diferencias entre estas evaluaciones y las llevadas a cabo en el laboratorio son evidentes: 1) casi un nulo control de las condiciones ambientales del experimento; 2) mayor variabilidad de los individuos sujetos al experimento; 3) menor control de los factores bióticos que inciden sobre las plagas; 4) diferentes parámetros para medir la efectividad del insecticida; 5) diferencia en las técnicas estadísticas para analizar los datos experimentales; entre otras.

Las evaluaciones bajo condiciones de campo pueden llevarse a cabo en lotes pequeños del cultivo, cuando se trata de pruebas preliminares o se requiere llevar a cabo un control más eficiente de las condiciones del experimento. Por otro lado, cuando se pretende la validación de un producto de insecticida, se requieren de



áreas más extensas de prueba. En estos casos es recomendable aplicar el producto a superficies mayores a una hectárea, con el objeto de equipararlo a las condiciones comerciales reales. Normalmente, ambos tipos de experimentos requieren de una planificación adecuada, donde es necesario determinar con anticipación el tamaño de la parcela experimental, el tamaño de muestra más representativo de la plaga y la época del año más apropiada para el experimento.

Es necesario emplear las condiciones agronómicas reales del cultivo. En muchos casos, la unidad de parcela puede definirse como un número determinado de surcos (3-6), flanqueados por 2-3 surcos entre parcelas. La longitud de las parcelas experimentales puede variar, principalmente debido a la disponibilidad de terreno y del tamaño de las plantas individuales. Las unidades de muestra también varían con respecto al cultivo y a la plaga. La unidad más utilizada en las crucíferas es la planta completa (IBARRA Y AGUILAR, 1993), donde se cuantifican las larvas sobrevivientes. Debido a que el efecto insecticida de los productos a base de baculovirus varía significativamente entre los diferentes estadios del desarrollo larvario, es recomendable que las larvas sean clasificadas en tamaños (ejemplo, pequeñas y grandes, o pequeñas, medianas y grandes), con el objeto de analizar con mayor precisión el efecto insecticida.

La comparación del efecto entre los diferentes tratamientos (diferentes productos y/o diferentes dosis) con respecto tanto al testigo como al agente de control estándar, se realiza a través de análisis estadístico. En este caso, normalmente se efectúa un análisis de varianza entre las repeticiones de los diferentes tratamientos. Debido a que un experimento de campo normalmente presenta gran variabilidad entre las parcelas, es recomendable utilizar el mayor número de repeticiones posible (un mínimo de 5). Aún así, el Coeficiente de Variación entre las repeticiones de un tratamiento normalmente es elevado (comparado con los ensayos de laboratorio), por lo que un valor de 40% es aceptable. Una vez establecida la diferencia significativa entre las varianzas de los tratamientos, se debe realizar una prueba múltiple de medias (DMS, Tukey's, etc.), con el objeto de establecer las diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, y de esta forma inferir la aplicabilidad del producto probado.

Por otro lado, debido a que la infección de los baculovirus es *per os*, la aplicación de bioinsecticidas a base de éstos debe tener una cobertura amplia y completa, con el objeto de aumentar la posibilidad de infección de los individuos susceptibles. Para ello, es indispensable no sólo seguir las recomendaciones propuestas para la aplicación de insecticidas químicos, sino poner especial atención a la calibración de las boquillas, que asegure una buena cobertura del producto. Por otro lado, es importante que las aplicaciones se lleven a cabo durante las horas de menor incidencia del sol, ya que el peor "enemigo" de los baculovirus en el campo son los rayos U.V. del sol. De ahí la recomendación de añadir (ya sea durante la formulación o como aditivo de aplicación) algún protector U.V.

Es recomendable efectuar un muestreo de las larvas presentes en el campo, a diferentes periodos posteriores a la aplicación de un bioinsecticida viral. Esto puede proporcionar información valiosa con respecto a la tasa de infección de los

insectos tratados y también del posible impacto de otros agentes causantes de mortalidad, tales como parasitoides y depredadores que atacan a los insectos infectados.

En lo que respecta a las medidas de seguridad que se deben tomar durante y después de la aplicación, éstas son las que se utilizan normalmente cuando se aplican insecticidas microbianos, ya que los baculovirus poseen una alto grado de especificidad y no existe la posibilidad de infección hacia el hombre u otros vertebrados. Sin embargo, no se debe excluir la posibilidad de alguna reacción alérgica o de efectos secundarios de los componentes inertes utilizados en la formulación.

## 7. Determinación del espectro de huéspedes

Los baculovirus se han aislado únicamente de artrópodos, y en su mayoría a partir de insectos (Tabla 1). No existe evidencia de la presencia de estos agentes virales en plantas o animales vertebrados. Martignoni e Iwai en los años 70 publicaron una lista de 337 baculovirus aislados de insectos, de los cuales 280 se aislaron únicamente del orden Lepidóptera y el resto de los órdenes Hymenoptera, Coleoptera, Diptera, Neuroptera, Orthoptera y Trichoptera (FAULKNER, 1981). Más recientemente se han dado a conocer más de 600 especies de insectos que han sido infectadas por baculovirus (VLAK, 1992). Los baculovirus también se han encontrado en otros invertebrados distintos a los insectos, como es el caso de ocho baculovirus descritos en camarones peneidos del Golfo de México, Hawaii, Japón y América del Sur (COUCH, 1991), así como algunas especies de cangrejos y arácnidos.

De acuerdo a las evidencias acumuladas, existe una opinión generalizada de que las diferentes "especies" de baculovirus presentan un espectro de huéspedes muy restringido, encontrándose ejemplos de cepas específicas de una especie. Sin embargo, se han descrito casos de transmisión cruzada entre especies de diferentes familias de insectos, como el virus de *Bombyx mori* que infecta también a *Galleria mellonella* (STAIRS, 1991). Asimismo, existen casos excepcionales como los NPV de *Autographa californica* y de *Anagrapha falcifera*, que en forma natural presentan un espectro de huéspedes muy amplio, describiéndose infecciones (con muy diversos niveles de virulencia) en más de 30 especies de lepidópteros, pertenecientes a más de 10 familias (GRONER, 1986; HOSTETTER Y PUTTLER, 1991). La transmisión cruzada entre especies de diferentes órdenes de insectos nunca ha sido observada. Por otro lado, se ha demostrado que la especificidad de un baculovirus es menor a nivel de la infección de células de insectos cultivadas *in vitro* (VAIL *et al.*, 1973; MCINTOSH, 1991).

El espectro de huéspedes de cualquier virus es determinado por su habilidad para penetrar en las células y tejidos de uno o más huéspedes, replicarse en ellas y producir una nueva progenie viral infecciosa. Si bien en los baculovirus se ha sugerido que los peplómeros están constituidos de proteínas de reconocimiento específico hacia las células susceptibles, también se ha logrado introducir la partícula viral del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) en células no permisivas,

**Tabla 1.** Espectro de Huéspedes de los Baculovirus.

PHYLUM	CLASE	ORDEN
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera
		Diptera
		Coleoptera
		Hymenoptera
		Homoptera
		Thysanura
		Orthoptera
		Trichoptera
		Neuroptera
		Isoptera
	Arachnida	Araneae
		Acarina
	Crustacea	Decapoda

tanto de otros insectos (MORRIS Y MILLER, 1993) como de mamíferos (BOYCE Y BUCHER, 1996) (ver Capítulo 1 y 2). De esta forma se han podido expresar genes marcadores sólo bajo la regulación de promotores tempranos de baculovirus en células no permisivas de insectos (MORRIS Y MILLER, 1992). Más aún, se han logrado expresar genes reporteros de baculovirus, bajo la influencia de promotores de mamíferos, tanto en hepatocitos de ratas como de humanos (BOYCE Y BUCHER, 1996). Sin embargo, a pesar de que esto implica que los baculovirus pueden penetrar en células no sólo de insectos, sino también de mamíferos, y que algunos genes, bajo el control de promotores virales tempranos o celulares pueden expresarse, las etapas posteriores del ciclo viral están restringidas a la o a las líneas celulares derivadas de sus hospederos naturales.

La expansión del espectro de huéspedes en los baculovirus puede obtenerse mediante la recombinación de especies diferentes en líneas celulares. En los estudios realizados por Kondo y Maeda (1991) se logró aislar una cepa de baculovirus con una espectro de huéspedes más amplio al recombinar al AcMNPV con el BmNPV. Adicionalmente, se han identificado diversos genes que afectan el espectro de huéspedes de los baculovirus. Dentro de estos se encuentra el gen p143, que codifica para una helicasa, el cual es esencial para la replicación del DNA viral (LU Y CARTENS, 1991). Por otro lado, el gen *lef-7* participa estimulando la replicación del DNA viral, mientras que el *hfr-1* es un gen que impide la suspensión de la síntesis global de proteínas. A éste último se le ha relacionado con la expansión del espectro de huéspedes del AcMNPV, debido a que la presencia de dicho gen permite la replicación de este virus en líneas celulares no permisivas (THIEM *et al.*, 1996).

## 8. Evaluación de bioseguridad

En los últimos 40 años se han registrado un total de 26 especies diferentes de baculovirus ensayados en pruebas de bioseguridad sobre vertebrados, como ratas, ratones, perros, cobayos, monos y humanos. En las diferentes pruebas, los baculovirus fueron suministrados bajo diferentes rutas de infección, incluyendo la administración oral, inyecciones intravenosas, intracerebrales e intramusculares, y aplicaciones tópicas. En todos los casos probados, no se encontró ningún indicio de toxicidad, respuestas alérgicas o evidencias de patogenicidad provocadas por los baculovirus. Las pruebas realizadas se efectuaron con dosis que iban desde 10 hasta 100 veces las dosis que se aplican en un acre de cultivo tratado con baculovirus, y en ningún caso se detectó algún efecto deletéreo provocado por los baculovirus (BURGES *et al.*, 1980; DOLLER, 1985).

En estudios realizados con el baculovirus simple de *Helicoverpa zea* (HzSNPV), se determinó que la inoculación oral de ratas con este virus no presentó mortalidad relacionada con la infección viral, durante un periodo de 2 años. Asimismo, no se observó diferencia significativa entre la incidencia de neoplasias presente en las ratas tratadas con baculovirus y los individuos control (BARNES *et al.*, 1970). En estas pruebas se utilizaron dosis virales equivalentes a aquellas que se emplean para asperjar 100 acres de cultivo. Asimismo, ratones y cobayos tratados con el HzSNPV mediante inhalación, alimentación oral, o inyecciones intradérmicas, intraperitoneales o intracerebrales, permanecieron sanos después de los tratamientos.

Adicionalmente, se han realizado pruebas de bioseguridad sobre humanos tanto con evidencias directas como indirectas. En un estudio realizado con el HzSNPV, se administraron  $6 \times 10^9$  poliedros por vía oral individualmente a 10 hombres y 10 mujeres por un periodo de cinco días, sin encontrarse ningún efecto deletéreo posterior (HEIMPEL Y BUCHANAN, 1967). Asimismo, seis personas expuestas al proceso de producción del HzSNPV, durante un lapso de 26 meses, no presentaron ningún efecto deletéreo al término de este periodo. Cuando se tomaron muestras de sangre de estas personas, no se detectó infección por baculovirus, ni la presencia de antígenos o anticuerpos virales (HUANG Y SHAPIRO, 1977).

Uno de los aspectos más relevantes en el grado de bioseguridad de los baculovirus, se relaciona con el establecimiento de una cepa de baculovirus en el medio ambiente. Es sabido que los baculovirus pueden persistir en el suelo por muchos años, en áreas cubiertas o protegidas (HUBER, 1986). No obstante, esta persistencia no ha causado efectos deletéreos en el medio ambiente, en las áreas tratadas con cepas silvestres de baculovirus. Sin embargo, con el surgimiento de los baculovirus mejorados genéticamente, se plantean situaciones en donde es necesario evaluar la persistencia de estos virus, que portan genes heterólogos, en el medio.

Como en el caso de las cepas virales silvestres, es altamente probable que la persistencia de los baculovirus mejorados genéticamente no causen ningún efecto negativo en el medio ambiente. Más aún, de acuerdo a datos de laboratorio, es poco factible que el virus modificado reemplace en el medio ambiente, a la cepa silvestre. En estudios realizados con un VPNAc recombinante que presenta una esci-



sión en el gen *egt*, se ha estimado que este virus reduce el  $TL_{50}$  entre 1 y 2 días, en los insectos infectados. Esto trae como consecuencia que se disminuya en un 30% el número de poliedros producidos por las larvas infectadas (O'REILLY Y MILLER, 1991), disminuyendo la probabilidad de que el virus recombinante llegue a desplazar a la cepa silvestre de la población.

También se han efectuado diversas pruebas de bioseguridad en especies de invertebrados que no son objeto del tratamiento con baculovirus. En un estudio realizado con el AcMNPV que expresa el gen de la neurotoxina aislada del escorpión *Androctonus australis*, se suministraron como alimento larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas con el virus recombinante, a la avispa depredadora *Polistes metricus*. En ningún caso se observó efecto adverso alguno en fecundidad, desarrollo o comportamiento, en las avispas tratadas (McNITT *et al.*, 1995). Asimismo, larvas infectadas con el recombinante se hicieron parasitar con la avispa parasítica *Microplitis croceipes*, encontrándose una disminución en el tamaño de los adultos que emergieron de las larvas infectadas. No obstante, esta disminución en tamaño no provocó un incremento en la mortalidad de las avispas, y los adultos emergentes pudieron aparearse y parasitar a una nueva generación de insectos huéspedes (McCUTCHEN *et al.*, 1996). Adicionalmente, en evaluaciones de campo, se observó el efecto de este mismo recombinante sobre otros artrópodos diferentes al huésped original; sin embargo, la densidad poblacional de 18 diferentes artrópodos (entre los que se incluían insectos no lepidópteros y algunas arañas), no se vieron afectadas después de efectuarse aplicaciones semanales con dosis de  $2 \times 10^{12}$  OBs/ha (TREACY *et al.*, 1997).

## 9. Evaluación de los baculovirus recombinantes

Las primeras pruebas de campo con baculovirus recombinantes se efectuaron en 1986 en Inglaterra, mediante la liberación de un AcMNPV cuyo genoma se modificó mediante una delección de 80 pb en la secuencia del gen de la poliedrina, obteniéndose en consecuencia un virus no incluido (BISHOP, 1986; WOOD Y GRANADOS, 1991). En años posteriores se realizaron pruebas de campo adicionales con baculovirus modificados genéticamente, donde la mayoría de ellos sólo presentaban pequeñas modificaciones en sus genomas (generalmente delecciones de fragmentos específicos) (BISHOP *et al.*, 1988).

Nuevamente en Inglaterra, pero ya en 1994, se desarrolló uno de los primeros estudios de evaluación en campo de un baculovirus recombinante con un gen heterólogo integrado a su genoma (CORY *et al.*, 1994). Este virus recombinante era el AcST3, una cepa de AcMNPV que poseía la secuencia de la toxina AaHIT (STEWART *et al.*, 1991). Este experimento demostró que el virus recombinante reducía considerablemente el daño causado por el insecto plaga en el cultivo probado, pero desató una polémica en cuestión de bioseguridad.

De acuerdo a las normas que existen en diversos países, la liberación de un virus recombinante sigue una serie de etapas, en donde se debe tomar en consi-

deración la evaluación del impacto del virus liberado y los datos de eficiencia del virus. Primeramente, se debe iniciar la evaluación del impacto del virus recombinante liberado en áreas pequeñas (jaulas de campo), para posteriormente evaluar su efecto en áreas más extensas. Estas pruebas son esenciales para que se pueda permitir el registro del insecticida viral, en primer instancia, y su liberación comercial, en segunda instancia.

Por otro lado, como se indicó anteriormente, se ha demostrado experimentalmente que los virus recombinantes se producen en menores cantidades en los insectos infectados, cuando esta producción se compara con la obtenida con las cepas virales silvestres. En estudios previos se ha demostrado que el AcMNPV silvestre se produce de 1.25 a 2.42 veces más que el recombinante con el gen del AaHIT (IGNOFFO Y GARCÍA, 1996). Además, datos de este tipo se podrían considerar como un importante parámetro para evaluar la capacidad de permanencia en el medio ambiente de un virus recombinante, en comparación con la cepa parental silvestre.

Durante la liberación de un baculovirus recombinante, se efectúan pruebas de campo en lotes pequeños, los cuales son rodeados por barreras físicas que limitan la dispersión del virus hacia el medio ambiente. Con esto se logra evaluar la efectividad del virus liberado, evitando los posibles riesgos de dispersión (CORY *et al.*, 1994). El escalamiento posterior hacia áreas mayores permite efectuar una estimación más certera de la eficiencia del virus recombinante probado, así como evaluar más concluyentemente el posible efecto sobre organismos que no son objeto del tratamiento. La expansión del área probada permite obtener datos agronómicos más precisos, debido a que se pueden utilizar más variables que determinen la eficiencia insecticida del recombinante.

Las características principales que se deben evaluar en las cepas virales recombinantes son aquellas relacionadas con la modificación del espectro de huéspedes, las consecuencias de los efectos subletales, la identidad genética y la toxicidad del producto del gen heterólogo, principalmente como un nuevo factor de las cadenas alimenticias. La decisión de liberar un producto viral recombinante depende de la evaluación de la mayor diversidad de posibles riesgos, debido a que existen numerosos factores económicos, políticos, sociales y científicos que influyen en la aceptación o rechazo del producto probado.

## 10. Bibliografía

- BARNES, R.W., C.F. MIENECKE, W.C. McLANE AND C.S. RENHBORG. 1970. *Long term feeding and other toxicity-pathogenicity studies on rats using a commercial preparation of the nuclear-polyhedrosis virus of Heliothis zea*. J. Invertebr. Pathol. 16:112-115.
- BENZ, G.A. 1986. *Introduction: historical perspectives*, p. 1-35. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses*, Vol. I. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

- BISHOP, D.L.H. 1986. *UK release of genetically marked virus*. Nature **323**:496.
- BISHOP, D.L.H., P.F. ENTWISTLE, I.R. CAMERON, C.J. ALLEN AND R.D. POSSEE. 1988. *Field trials of genetically-engineered baculovirus insecticides*, p. 143-180. En: M. Sussman, M. Collins, F.A. Skinner y D.E. Stewart-Tull (ed.), The release of genetically-engineered microorganisms. Academic Press, London.
- BLISS, C.I. 1934. *The method of probits*. Science **79**:38-39.
- BONNING, B.C. Y B. HAMMOCK. 1992. *Development and potential of genetically engineered viral insecticides*. Biotech. Genetic Eng. Rev. **10**:455-489.
- BOYCE, F.M. Y N.L.R. BUCHER. 1996. *Baculovirus mediated gene transfer into mammalian cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**:2348-2352.
- BRIESE, D.T., H.A. MENDE, T.D.C. GRACE Y P.W. GEIER. 1980. *Resistance to a nuclear polyhedrosis virus in the light-brown apple moth Epiphyas postvittana (Lepidoptera: Tortricidae)*. J. Invertebr. Pathol. **36**:211-215.
- BRIESE, D.T. Y J.D. PODGWAITE. 1985. *Development of viral resistance in insect populations*, p. 361-397. En: K. Maramorosh y K.E. Sherman (ed.), Viral insecticides for biological control. Academic Press, Orlando, FL.
- BURGES, H.D., G. CROIZIER Y J. HUGER. 1980. *A review of safety tests on baculoviruses*. Entomoph **25**:329-340.
- CORY, J.S., M.L. HIRST, T. WILLIAMS, R.S. HAILS, D. GOULSON, B.M. GREEN, T.M. CARTY, R.D. POSSEE, P.J. CAYLEY Y D.H.L. BISHOP. 1994. *Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide*. Nature **370**:138-140.
- COUCH, J.A. 1991. *Baculoviridae. nuclear polyhedrosis viruses. Part 2. Nuclear polyhedrosis viruses of invertebrates other than insects*, p. 205-257. En J.R. Adams y J.R. Bonami (ed.), Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton, FL.
- DOLLER, G. 1985. *The safety on insect viruses as biological control agents*, p. 399-439. En: K. Maramorosh y K.E. Sherman (ed.), Viral insecticides for biological control. Academic Press, NY.
- FAULKNER, P. 1981. *Baculovirus*, p. 3-37. En: E.W. Davidson (ed.), Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. Allanheld, Osmun CO Publishers, Inc., Totowa, NJ.
- FARRAR, R.R. Y R.L. RIDGWAY. 1998. *Quantifying time-mortality relationships for nuclear polyhedrosis viruses when survivors are present*. Environ. Entomol. **27**:1289-1296.
- FINNEY, D.J. 1952. *Probit analysis*. 2nd. ed. Cambridge Univ. Press.
- GRANADOS, R.R., K.G. DWYER Y A.C.G. DERKSEN. 1987. *Production of viral agents in invertebrate cell culture*, p. 167-182. En: K. Maramorosh (ed.), Biotechnology in invertebrate pathology and cell culture. Academic Press, Inc. NY.
- GRÖNER, A. 1986. *Specificity and safety of baculoviruses*, p. 177-202. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), The biology of baculoviruses. Vol. I. CRC Press, Boca Raton, FL.
- HEIMPEL, A.M. Y L.K. BUCHANAN. 1967. *Human feeding tests using a nuclear polyhedrosis virus of Heliothis zea*. J. Invertebr. Pathol. **9**:55-57.
- HOSTETTER, D.L. Y B. PUTTLER. 1991. *A new broad host spectrum nuclear polyhe-*

- drosis virus isolated from a celery looper, Anagrapha falcifera (Kirby); (Lepidoptera: Noctuidae)*. Environ. Entomol. **20**:1480-1488.
- HUANG, H.C.M. Y M. SHAPIRO. 1977. *Physical and clinical examinations of personnel involved in production of the insect virus, Baculovirus Heliothis*. J. Kansas Entomol. Soc. **50**:200-202.
- HUBER, J. 1986. *Use of baculoviruses in pest management programs*, p. 181-202. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses*. Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
- HUGHES, P.R. Y H. A. WOOD. 1981. *A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses*. J. Invertebr. Pathol. **37**:154-159.
- HUGHES, P.R., A. WOOD, J.P. BREEN, S.F. SIMPSON, A.J. DUGGAN Y J.A. DYBAS. 1997. *Enhanced bioactivity of recombinant baculoviruses expressing insect-specific spider toxins in lepidopteran crop pests*. J. Invertebr. Pathol. **69**:112-118.
- IBARRA, J.E. Y B.A. FEDERICI. 1987. *An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes*. J. Am. Mosq. Control Assn. **3**:187-192.
- IBARRA, J.E. Y L. AGUILAR. 1993. *Pruebas de dos virus de la poliedrosis nuclear, para el control del falso medidor de la col, Trichoplusia ni, en brócoli*, p. 98-103. En: J. Leyva y J. Ibarra (ed.), *Memorias del XV Congreso Nacional de Control Biológico*. Sociedad Mexicana de Control Biológico, Cuautitlán, Edo. de México.
- IGNOFFO, C.M. 1964. *Bioassay technique and pathogenicity of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, Trichoplusia ni (Hubner)*. J. Insect Pathol. **6**:237-240.
- IGNOFFO, C.M. 1965. *The nuclear polyhedrosis virus of Heliothis zea (Boddie) and Heliothis virescens (Fabricius) IV. Bioassay of virus activity*. J. Invertebr. Pathol. **7**:315-318.
- IGNOFFO, C.M. Y C. GARCIA. 1996. *Rate of larval lysis and yield and activity on inclusion bodies harvested from Trichoplusia ni larvae fed a wild or recombinant strain of the nuclear polyhedrosis virus of Autographa californica*. J. Invertebr. Pathol. **68**:196-198.
- KALMAKOFF, J. Y J.M. CRAWFORD. 1982. *Enzootic virus control of Wiseana spp. in the pasture environment*, p. 435-448. En: E. Kurstak (ed.), *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker, New York.
- KAOMINI, M. Y R.T. ROUSH. 1988. *Absence of response to selection for resistance to nuclear polyhedrosis virus in Heliothis virescens (F.) (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Entomol. Sci. **23**:379-382.
- KLEIN, M. 1978. *An improved peroral administration technique for bioassay of nuclear polyhedrosis virus against Egyptian cotton worm, Spodoptera littoralis*. J. Invertebr. Pathol. **31**:134-136.
- 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.
- KUNIMI, Y. Y J.R. FUXA. 1996. *Volumes ingested by four species on noctuids with reference to peroral droplet bioassay of baculoviruses*. J. Invertebr. Pathol. **68**:310-311.



- LU, A. Y E.B. CARTENS. 1991. *Nucleotide sequence of a gene essential for viral DNA replication in the baculovirus Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Virology. **181**:336-347.
- MARCUS, R.F., AND D.M. EAVES. 2000. *Statistical and Computational Analysis of Bioassay Data*. pp. 249-293. In: Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. A. Navon and K.R.S. Ascher (Eds.) CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom.
- MCCUTCHEN, B.F., R. HERRMANN, K.M. HEINZ, M.P. PARELLA Y B.D. HAMMOCK. 1996. *Effects of recombinant baculoviruses on a nontarget endoparasitoid of Heliothis virescens*. Biol. Contr. **6**:45-50.
- MCINTOSH, A.H. 1991. *In vitro infectivity of a clonal isolate of Syngrapha falcifera (Celery Looper) multiple nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **57**:441-442.
- MCLAUGHLIN, R.E., H.T. DULMAGE, R. ALLS, T.L. COUCH, D.A. DAME, I.M. HALL, R.I. ROSE Y P.L. VERSOY. 1984. *U.S. standard bioassay for the potency assessment of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquito larvae*. Bull. Entomol. Soc. Am. **30**:26-29.
- MCNITT, L., K.E. ESPIELIE Y L.K. MILLER. 1995. *Assesing the safety of toxin-producing baculovirus biopesticides to a non-target predator, the social wasp Polistes metricus Say*. Biol. Contr. **5**:267-278.
- MILKS, M. 1997. *Ingestion time does not influence the suceptibility of Trichoplusia ni to a nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **70**:165-166.
- MORRIS, T. Y L.K. MILLER. 1992. *Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and non-permissive insect cell lines*. J. Virol. **66**:7397-7405.
- MORRIS, T. Y L.K. MILLER. 1993. *Characterization of productive and non productive AcMNPV infection in selected insect cell lines*. Virology **193**:339-348.
- MURHAMER, D.W. 1996. *Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture*. Appl. Biochem. Biotech. **59**:199-220.
- O'REILLY, D. Y L.K. MILLER. 1991. *Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene*. Biotechnol. **9**:1086-1089.
- PASCHKE, J.D., R.E. LOWE Y R.L. GIESE. 1968. *Bioassay of the nucleopolyhedrovirus and granulovirus viruses of Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. **10**:327.
- ROBERTS, D.W., J.R. FUXA, R. GAUGLER, M. GOETTEL, R. JACQUES Y J. MADDOX. 1991. *Use of pathogens in insect control*, p. 243-278. En: D. Pimentel (ed.), Handbook of pest management in agriculture. Second Edition. Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
- SHAPIRO, M. 1986. *In vivo production of baculoviruses*, p. 31-61. En: R.R. Granados y B.A. Federici. (ed.), The biology of baculoviruses. Vol.II. CRC Press, Boca Raton, FL.
- STAIRS, G.R. 1991. *Quantitative studies on the infection of Galleria mellonella with a nuclear polyhedrosis virus of Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. **57**:402-405.
- STEINHAUS, E.A. Y M.E. MARTIGNONI. 1970. *An abridged glossary of terms used in invertebrate pathology*. Second Edition. Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station U.S. Departament of Agriculture, Forest Service.

- STEWART, L.M., M. HIRST, M. LOPEZ FERBER, A.T. MERRYWEATHER, P.J. CAYLEY Y R.D. POSSEE. 1991. *Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene*. Nature **352**:85-88.
- THIEM, S.M., X. DU, M.E. QUENTIN Y M.M. BERNER. 1996. *Identification of a baculovirus gene that promotes Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in a non-permissive insect cell line*. J. Virol. **70**:2221-2229.
- TREACY, M.F., J. ALL Y C.F. KUKEL. 1997. *Invertebrate selectivity of a recombinant baculovirus: case study on AaHIT gene-inserted Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, p. 57-68. En: K. Bondari (ed.), *New developments in entomology*. Research Signpost, London.
- VAIL, P.V., D.L. JAY Y W.F. HINK. 1973. *Replication and infectivity of the nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper Autographa californica, produced in cells grown in vitro*. J. Invertebr. Pathol. **22**:231-237.
- VLAK, J.M. 1992. *The biology of baculovirus in vivo and in cultured insect cells*, p. 2-10. En J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (ed.), *Baculovirus and recombinant protein production processes*. Editiones Roche, Interlakend, Switzerland.
- WOOD, H.A. Y R.R. GRANADOS. 1991. *Genetically engineered baculoviruses as agents for pest control*. Annu. Rev. Microbiol. **45**:69-87.
- WOOD, H.A. 1996. *Genetically enhanced baculovirus insecticides*, p. 91-104. En: M. Gunasekaran y D.J. Weber (ed.), *Molecular biology of the biological control of pests and diseases of plants*. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- YEARIAN, W.C. Y S.Y. YOUNG. 1982. *Control of insect pests of agricultural importance by viral insecticides*, p. 387-423. En: E. Kurstak (ed.), *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker Inc., New York.