

Baculovirus recombinantes en control integrado

MIGUEL LÓPEZ-FERBER Y M^a CRISTINA DEL RINCÓN CASTRO

1. Introducción	227
2. Modificaciones de espectro de huéspedes en baculovirus	228
2.1. La replicación de <i>AcMNPV</i> sobre <i>Bombyx mori</i>	229
2.2. La replicación de <i>BmNPV</i> en las células de Sf9	230
2.3. La replicación de <i>AcMNPV</i> en <i>Lymantria dispar</i>	230
2.4. Otros genes que limitan el espectro de huéspedes en <i>AcMNPV</i>	233
3. Modificaciones de eficacia biológica	233
3.1. Disminución de la dosis necesaria	234
3.2. Modificación del tipo de encapsidación	235
3.3. Disminución de la vida de la larva	236
3.3.1. Delección del gen <i>egt</i>	237
3.3.2. Inserción de la esterasa de la hormona juvenil	238
3.3.3. Inserción de hormonas proteicas	239
3.3.4. Inserción de toxinas	239
4. Baculovirus doblemente modificados	243
5. Los riesgos derivados de la utilización de virus recombinantes en control integrado	243
5.1. La contaminación del cultivo por las proteínas expresadas	244
5.2. La dispersión del baculovirus o del gen que contiene	245
5.2.1. Riesgos debidos a una dispersión del virus en el medio ambiente	245
5.2.2. Riesgos debidos a una dispersión del gen	245

5.3. La modificación de la persistencia como método de limitar los riesgos	246
6. Resistencia en los insectos hacia los baculovirus recombinantes	247
7. La decisión de utilizar los baculovirus recombinantes: ¿decisión científica o decisión política?	247
8. Bibliografía	248

1. Introducción

El modo de transmisión general de los baculovirus es a través del medio externo, sin presencia de vectores. Una consecuencia directa de este método es la necesidad de producción de grandes cantidades de virus que puedan persistir en el medio externo durante largos periodos de tiempo. Para ello, el virus se ha dotado de un fenotipo estable en el medio ambiente, el cuerpo de inclusión (OB), y, en consecuencia, de los genes necesarios para regular su producción. Los OBs no pueden ser liberados por exocitosis (gemación), lo que implica que al final del ciclo de infección, la célula debe romperse.

Los baculovirus utilizan un segundo fenotipo viral para invadir las células una vez dentro del huésped. Este segundo fenotipo, no incluido, se produce por gemación a partir de las células infectadas y se denomina virus brotado (*budded virus*, BV).

Se han descrito algunos casos de transmisión vertical, así como de infecciones persistentes causadas por baculovirus (HUGHES *et al.*, 1993, 1997), pero se sabe muy poco respecto a este modo de transmisión ni de su importancia para la perpetuación del virus (KUKAN, 1999).

Desde un punto de vista agronómico, las características de los baculovirus que condicionan su utilización como bioinsecticidas son tres:

- a) La existencia de un fenotipo viral (el OB) especializado en la transmisión horizontal del virus, el cual se produce en grandes cantidades, puede ser conservado fácilmente, es capaz de permanecer en la naturaleza durante largos periodos de tiempo, y permite una aplicación sencilla del inóculo viral en tratamientos insecticidas.
- b) La alta virulencia, con muerte del huésped y la liberación consecutiva de grandes cantidades de OB que facilitan la transmisión de la enfermedad.
- c) Finalmente, la complejidad del ciclo viral, con existencia de genes implicados en la regulación de la replicación del virus y en el control de la fisiología y el comportamiento del huésped implican una relativa lentitud en el desarrollo de la infección.

Estas tres características hacen de los baculovirus un sistema ideal para el control de las poblaciones de insectos en el medio natural. En efecto, la persistencia en el exterior del insecto facilita la aparición de epizootias cuando la densidad de larvas alcanza una determinada densidad de población.

Los baculovirus se han utilizado con éxito en el control de poblaciones de insectos en diferentes ecosistemas. Los éxitos más notables se han conseguido en los ecosistemas forestales dada su mayor estabilidad. Así, las poblaciones de *Orgyia pseudotsugata* en bosques de abeto han podido ser controladas con un producto a base de una cepa de NPV aislada de la misma plaga. Sus infecciones han disminuido notablemente el daño ocasionado en algunos bosques de los Estados Unidos, ya que se han logrado obtener niveles de protección superiores al 90% (CARTER, 1984 ; MARTIGNONI, 1999). Cabe también mencionar el evidente éxito del NPV aislado del diprionido *Neodiprion sertifer*, para el control de las larvas de este

himenóptero en los bosques de pino canadienses y europeos, ya que el efecto combinado del desarrollo de epizootias naturales y la aplicación de este virus como agente de control, ha resultado en la protección de miles de hectáreas de bosque en estas regiones (CARTER, 1984) (ver el Capítulo 12 de este libro, así como el artículo de revisión de Moscardi [1999]).

En los cultivos de plantas anuales, los inóculos virales, aunque puedan persistir en el suelo, muy a menudo no se encuentran al alcance de los huéspedes potenciales, lo que obliga a repetir los tratamientos (YOUNG Y YERIAN, 1979 ; FUXA Y RICHTER, 1996). En este caso, la regulación de las variaciones de población de fitófagos mediante baculovirus requiere una vigilancia detallada de las poblaciones susceptibles de causar daños.

Los baculovirus pueden considerarse como agentes de control integrado ideales, debido a su persistencia en el medio, a su especificidad y a la facilidad de producción de forma artesanal. Sin embargo, desde un punto de vista agronómico cabe hacer dos consideraciones: 1) en una época en la que la utilización de insecticidas de amplio espectro se ha generalizado, se puede decir que los baculovirus son demasiado específicos y 2) su acción es demasiado lenta como para garantizar una ausencia de daño sobre las plantas o sus productos, lo cual es un inconveniente en aquellos casos en los que el daño estético sea un condicionante del valor de mercado de un producto. Para disminuir estos inconvenientes de los baculovirus se ha contemplado la posibilidad de modificarlos genéticamente con objeto de aumentar su eficacia como agentes de control biológico en ciertos casos.

Desde un punto de vista teórico, se pueden considerar dos tipos de modificaciones: por un lado, disminuir su especificidad, es decir, ampliar su espectro de huéspedes y, por el otro, modificar los factores de eficacia insecticida del virus. En este sentido se deberán considerar la dosis necesaria para infectar al huésped y la velocidad a la cual lo mata, o al menos, el tiempo necesario para que deje de alimentarse y, por tanto, deje de producir daños.

La posibilidad de modificación del genoma de los baculovirus por ingeniería genética, realizada por primera vez por Smith *et al.* (1983), ha permitido el desarrollo de baculovirus recombinantes. Tales recombinantes pueden tener utilidad en múltiples situaciones, tales como la producción de proteínas recombinantes para la industria farmacéutica o el desarrollo de agentes de control biológico (MILLER *et al.*, 1983; MILLER, 1988).

2. Modificaciones de espectro de huéspedes en baculovirus

Las investigaciones para comprender el mecanismo de regulación del espectro de huéspedes se iniciaron hace ya bastante tiempo. En 1957, Steinhaus observó en el campo infecciones mixtas de dos virus diferentes en un mismo insecto (STEINHAUS, 1957). Asimismo Bird (1959) encontró que en larvas de *Choristoneura fumiferana*, infectadas con un NPV y un GV, existía una interferencia para la replicación de ambos virus, ya que la infección inicial de uno de ellos, interfería con la

infección del segundo, de manera que una célula podía ser infectada por un virus u otro, pero no por ambos. Sin embargo, no tenemos todavía una visión clara de los mecanismos generales implicados en esta regulación, si es que tal mecanismo general existe.

La idea de que el espectro de huéspedes podría estar regulado en la fase de entrada del virus en la célula, es decir, en la fase de unión al receptor, ha sido descartada rápidamente. En efecto, el receptor, todavía no identificado, está conservado no sólo entre los insectos, sino también en las células de vertebrados (LENTZ, 1990). Esta capacidad de entrada eficaz ha permitido el desarrollo de sistemas de transducción basados en baculovirus (BOYCE Y BUCHER, 1996 ; SHOJI *et al.*, 1997 ; PALOMBO *et al.*, 1998, CONDREAY *et al.*, 1999). Los promotores α se expresan prácticamente en todos los tipos celulares, ya sean de lepidópteros, de dípteros, o incluso de mamíferos (CARBONELL *et al.*, 1985). Sin embargo, la expresión de genes bajo el control de los promotores γ o δ depende del éxito de la infección (KNEBEL *et al.*, 1985 ; MORRIS Y MILLER, 1992). Carbonell *et al.*, (1985) analizaron la expresión del gen de la transferasa de grupos acetato al cloranfenicol (*chloramphenicol acetyl transferase*, CAT), bajo el control del promotor muy tardío del gen poliedrina (*polh*) en las infecciones abortivas de baculovirus en células de mamíferos. El bajo nivel de expresión detectado, del orden del 0,05%, cuando la infección se comparó con aquella obtenida en líneas celulares de insectos derivadas de lepidópteros y dípteros, se atribuyó en un principio a una baja actividad del promotor en el sistema heterólogo. Sin embargo, un análisis detallado mostró que no hay ninguna síntesis de CAT y que la actividad detectada esta asociada con las partículas víricas (CARBONELL Y MILLER, 1987). En contraste, el promotor de *p10*, (de tipo δ), puede ser transactivado en las células de mamíferos por ciertos genes de adenovirus (KNEBEL Y DOERFLER, 1987). Por otro lado, algunos genes virales son transcritos y traducidos, y las proteínas son activas cuando se expresan en células no permisivas. Este es el caso del gen *ie1*, el principal transactivador viral, que presenta un promotor de tipo α , cuyo producto, IE1 es activo en células de mamíferos (MURGES *et al.*, 1997). Estos resultados indican que la actividad de los promotores virales en células no permisivas depende del tipo de promotor: los promotores α y β pueden ser activos, pero la actividad de los promotores tardíos y muy tardíos (γ y δ) está restringida a las células permisivas.

2.1. La replicación de AcMNPV sobre *Bombyx mori*

El estudio a escala molecular de la modificación del espectro de huéspedes ha sido abordado en un sistema experimental modelo, compuesto de dos virus: el nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) y el nucleopoliedrovirus de *Bombyx mori* (BmNPV), los cuales tienen huéspedes no comunes. AcMNPV no es capaz de multiplicarse en las células de *B. mori* (KONDO Y MAEDA, 1991) y BmNPV se replica de forma mínima en las células IPLB-SF-21 ó IPLB-SF-9 derivadas de *Spodoptera frugiperda* habitualmente utilizadas para multiplicar AcMNPV (MARTIN Y CROIZIER, 1997). Además, se sabía por los análisis de hibridación crusa-

da, por la similitud de los genes de la poliedrina y por la conservación de sitios de restricción, que los dos genomas son relativamente homólogos, lo cual facilita los fenómenos de recombinación.

Los trabajos de los equipos de S. Maeda, en USA, y de G. Croizier, en Francia, han demostrado en primera instancia que es posible obtener virus capaces de replicarse en los dos huéspedes mediante recombinación entre los genomas virales (KONDO Y MAEDA, 1991; CROIZIER, 1995). Los virus así obtenidos, son mosaicos entre los dos parentales y son capaces de replicarse en los diferentes huéspedes de cada uno de los virus parentales, incluso con mejor eficacia que estos (Figura 1). Utilizando dos metodologías diferentes, estos dos equipos han podido demostrar que la modificación de un solo gen es suficiente para permitir la replicación de AcMNPV en las células de *B. mori*. La sustitución de un fragmento de la helicasa original del virus AcMNPV (*ORF95*, *p143*) por el fragmento homólogo de BmNPV, es suficiente para permitir una multiplicación correcta, es decir, para ampliar el espectro de huéspedes (MAEDA *et al.*, 1993; CROIZIER *et al.*, 1994).

La utilización de delecciones secuenciales y de mutagénesis dirigida ha permitido reducir la extensión del fragmento modificado a uno (KAMITA Y MAEDA, 1997) o dos (ARGAUD *et al.*, 1998) aminoácidos. La diferencia entre los resultados obtenidos por los dos equipos puede ser debida a la metodología utilizada (diferentes líneas celulares y cepas virales). El punto de bloqueo se sitúa al final de la replicación del genoma viral, probablemente en el momento de la individualización de los genomas (ARGAUD, CROIZIER Y LÓPEZ-FERBER, resultados no publicados).

Hay que tener presente, sin embargo, que a medida que la longitud de la región utilizada para generar el recombinante disminuye, la eficacia biológica de este virus sobre su huésped alternativo se reduce de forma paralela (Figura 2). Para obtener un virus realmente utilizable en los dos huéspedes es necesario utilizar regiones relativamente largas, intercambiar incluso la totalidad del gen *p143*.

2.2. La replicación de BmNPV en las células de Sf9

Por desgracia, el resultado obtenido en el modelo AcMNPV sobre las células de *B. mori* no es extrapolable: los datos obtenidos en nuestro laboratorio en el modelo complementario, es decir, la multiplicación de BmNPV en las células de *Spodoptera frugiperda*, que son el huésped habitual de laboratorio de AcMNPV, muestran que la helicasa no es responsable de esta especificidad, sino que hay un control multigénico (MARTIN, CROIZIER, CROIZIER, Y LÓPEZ-FERBER, datos no publicados).

2.3. La replicación de AcMNPV en *Lymantria dispar*

La infección de células de *Lymantria dispar* por AcMNPV no conduce a una virosis típica. Los primeros síntomas que se observan, si la multiplicidad de infección es suficiente, es la degradación y la muerte de las células, pero sin replicación del virus. Este efecto se puede disminuir si se añade un fragmento del genoma del nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar* (LdMNPV) (THIEM *et al.*, 1996). El gen

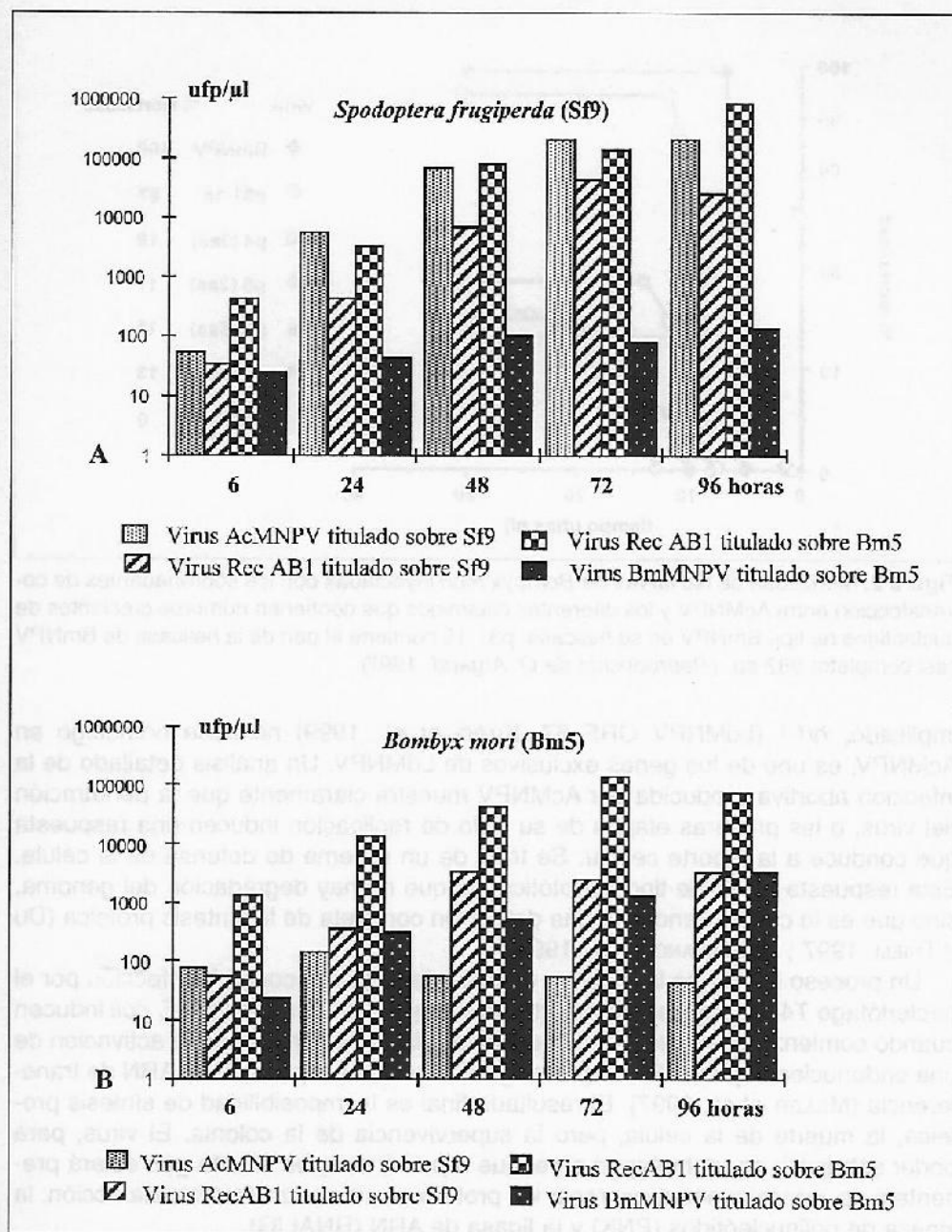


Figura 1. Cinética de aparición de los virus AcMNPV, RecAB1 y BmNPV en los cultivos de células Sf9 y Bm5. Las titulaciones se efectúan sobre las células Sf9 para AcMNPV y RecAB1 y sobre las células Bm5 para BmNPV y RecAB1. (Reproducido de L. Croizier, 1995).

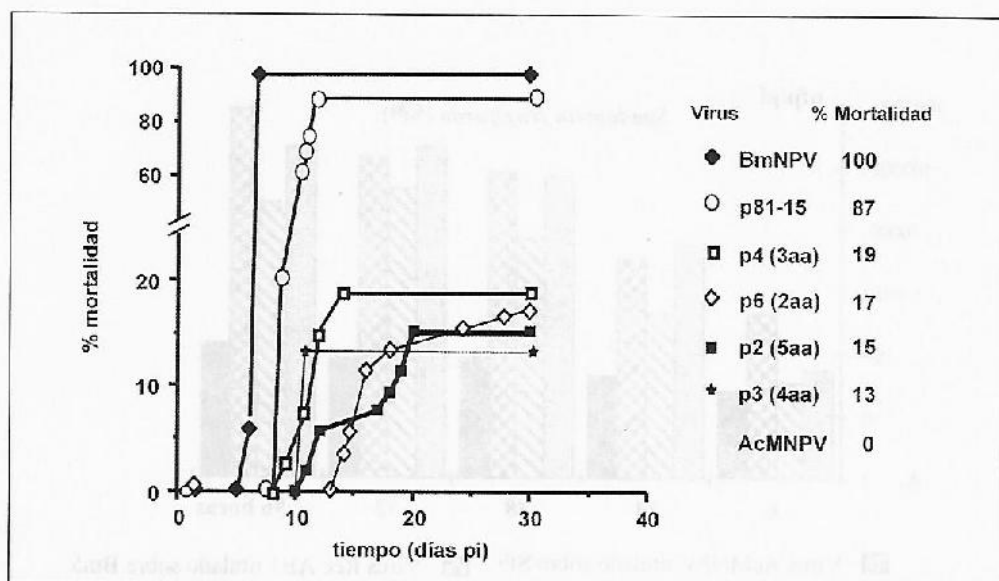


Figura 2. Mortalidad de las larvas de *Bombyx mori* inyectadas con los sobrenadantes de co-transfección entre AcMNPV y los diferentes plásmidos que contienen números crecientes de nucleótidos de tipo BmNPV en su helicasa. p81-15 contiene el gen de la helicasa de BmNPV casi completo: 982 aa. (Reproducido de O. Argaud, 1997).

implicado, *hrf-1* (LdMNPV ORF 67, Kuzio *et al.*, 1999) no tiene homólogo en AcMNPV, es uno de los genes exclusivos de LdMNPV. Un análisis detallado de la infección abortiva producida por AcMNPV muestra claramente que la penetración del virus, o las primeras etapas de su ciclo de replicación inducen una respuesta que conduce a la muerte celular. Se trata de un sistema de defensa de la célula. Esta respuesta no es de tipo apoptótico, ya que no hay degradación del genoma, sino que es la consecuencia de una detención completa de la síntesis proteica (Du y THIEM, 1997 ; MAZZACANO *et al.*, 1999).

Un proceso similar es la defensa de la bacteria *E. coli* contra la infección por el bacteriófago T4. El proceso de muerte celular que ciertas cepas de *E. coli* inducen cuando comienza una infección con el bacteriófago T4 consiste en la activación de una endonucleasa particular, la cual degrada de forma específica un ARN de transferencia (MILLER *et al.*, 1997). El resultado final es la imposibilidad de síntesis proteica, la muerte de la célula, pero la supervivencia de la colonia. El virus, para poder sobrevivir en un huésped en el que *a priori*, no sabe si este gen estará presente o no, necesita poder expresar las proteínas que contrarrestan esta acción: la kinasa de polinucleótidos (PNK) y la ligasa de ARN (RNALIG).

Un gen que puede tener estas dos actividades existe en ciertos aislados de AcMNPV. Se trata del gen 86, *pnk/pnl*. Este gen no está presente en todos las cepas virales (DURANTE *et al.*, 1998). Por el momento, no se sabe si podría sustituir la acción de *hrf-1* en las células de *L. dispar*.

2.4. Otros genes que limitan el espectro de huéspedes en AcMNPV

En AcMNPV han sido descritos otros dos genes que pueden ser considerados como factores que regulan el espectro de huéspedes: se trata de los genes *p35* y *hcf-1*. P35 es una proteína que inhibe la cadena apoptótica de la célula, al asociarse de forma estequiométrica con la caspasa 1 celular (ZOOB *et al.*, 1999). Su presencia es fundamental para la replicación del virus en las células de *S. frugiperda* (Sf21 ó Sf9), pero no se requiere para la replicación del virus en *Trichoplusia ni* (CLEM *et al.*, 1991). Desde este punto de vista, *p35* puede ser considerado como un gen de espectro de huéspedes.

Por otro lado, los genes virales requeridos para la activación de los promotores g y d de AcMNPV varían en función de las células infectadas. Así, el gen *hcf-1* (host cell-specific factor 1, factor 1 específico de célula huésped) de AcMNPV (ORF 70), es necesario en las células TN-368, derivadas del falso medidor de la col, *Trichoplusia ni*, pero no cuando se infectan células Sf21, (LU Y MILLER, 1995). HCF-1 interviene en la replicación del ADN viral, de forma que los orígenes de replicación propios del virus sean reconocidos. Otros dos genes de AcMNPV, *ie-2* y *lef-7*, que son necesarios para una replicación óptima en expresión transitoria sobre las células Sf-21, no son necesarios cuando se utilizan las células TN-368 (LU Y MILLER, 1996). En BmNPV (clon T3), no existe un equivalente de *hcf-1* (GOMI *et al.*, 1999).

La imagen que se obtiene de estos trabajos es compleja: el éxito de la infección de una larva por un baculovirus dado depende de la presencia en este virus de genes específicos. La adquisición de estos genes ha permitido la adaptación de un virus ancestral a diferentes insectos. Cada insecto establece un bloqueo en un punto distinto del ciclo viral. En consecuencia, para cada extensión del espectro de huéspedes se deberá estudiar el o los genes necesarios, sin que por el momento podamos definir una norma. Es posible que en ciertos casos los mecanismos de regulación sean simplemente incompatibles entre dos virus muy adaptados a sus huéspedes respectivos, en cuyo caso, todo intento de ampliación de espectro será infructuoso. Sin embargo, un tercer virus podría adaptarse a los dos huéspedes.

3. Modificaciones de eficacia biológica

El segundo tipo de modificaciones que se pueden idear sobre los baculovirus son aquellas que tienen por objetivo la mejora de la actividad del virus en su huésped habitual. Esta mejora puede ser de dos tipos: 1) disminución de la cantidad de poliedros necesaria para matar al insecto, lo cual se expresa en dosis letal media (DL_{50}) o concentración letal media (CL_{50}) y 2) disminución del tiempo necesario para matar las larvas, que expresamos en tiempo medio de supervivencia (TS_{50}) o en tiempo letal medio (TL_{50}), o al menos, para que éstas no ocasionen más daños en los cultivos, lo cual se expresa en tiempo medio de alimentación (*feeding time* 50, FT_{50}).

En teoría, cualquier gen que codifique una proteína capaz de interrumpir el desarrollo normal o de modificar el comportamiento de una larva, o que reduzca el daño causado por la alimentación de los insectos sobre un cultivo dado, se convierte en candidato para su expresión en un baculovirus recombinante, con vistas a su utilización en el control de plagas.

Para optimizar la utilización de un gen empleado para obtener un baculovirus recombinante, es necesario evaluar su mecanismo de acción y el comportamiento del virus recombinante después de la infección, para asegurarse de que el producto del gen utilizado ejerce su efecto en el sitio adecuado dentro del insecto. Siempre es preferible utilizar genes que actúen en células o tejidos del insecto que no sean aquellos en los que se inicia la infección. En efecto, si el gen expresado mata las células infectadas antes de replicarse y transmitirse a otras células dentro del huésped, la infección no sería masiva y la larva sobreviviría.

Los genes potencialmente más útiles, en la obtención de los baculovirus mejorados genéticamente, son, por un lado, aquellos que codifican para enzimas y hormonas que interfieren en el desarrollo normal del insecto y, por el otro lado, aquellos que codifican para neurotoxinas específicas hacia los insectos.

3.1. Disminución de la dosis necesaria

La susceptibilidad de los insectos a la infección por baculovirus es mayor en los primeros estadios larvarios y disminuye de forma exponencial a medida que la larva se desarrolla. Se ha intentado establecer una relación de la dosis necesaria para matar un insecto con el tamaño de la larva, el número de células presentes, el espesor de la membrana peritrófica, etc. Dada la ausencia de conocimientos sobre los determinantes moleculares de la virulencia, hay pocos estudios precisos sobre las posibilidades de mejora en este aspecto. Además, la DL_{50} de las larvas neonatas para los baculovirus mejor adaptados puede llegar a 1 poliedro (como SeMNPV sobre las larvas de *Spodoptera exigua*).

El tratamiento de larvas en estadios larvarios más avanzados requiere cantidades de poliedros mucho mayores; en general se observa que la dosis necesaria aumenta de forma significativa a medida que la larva se desarrolla. Este aumento, en función del virus y del huésped considerados, puede ser de un factor 5 a 10 entre dos estadios larvarios sucesivos (ROVESTI *et al.*, 2000). En estos casos, una disminución importante de la DL_{50} reviste un gran interés económico. Una de las líneas de investigación que se han abordado, es facilitar la entrada de los viriones en las células de la pared intestinal, es decir, facilitar el paso de la membrana peritrófica. Los experimentos del grupo de Tanada sobre las infecciones mixtas entre nucleopoliedrovirus (NPV) y granulovirus (GV) en *Pseudaletia unipuncta*, permitieron el descubrimiento de un factor contenido en el GV de *P. unipuncta* (PuGV), que aumenta la susceptibilidad al NPV. Este factor de tipo proteico codificado por el virus, fue denominado factor sinérgico (*sinergistic factor*, SF) (TANADA *et al.*, 1973). El SF es capaz de potenciar las infecciones en varios NPV y en varios huéspedes (ver la revisión de TANADA, [1985]). Una acción del mismo tipo, es decir, aumentar la

susceptibilidad a un baculovirus, puede observarse cuando se utilizan otros granulovirus, como los GV de *S. exigua*, SeGV (STODDART, 1980, citado en TANADA, 1985), o de *T. ni* (TnVG); sin embargo, no todos los GV presentan este efecto sinérgico. Derksen y Granados (1988) analizaron los efectos de la infección por baculovirus sobre la membrana peritrófica de las larvas, observando que esta membrana se degrada parcialmente a causa de factores proteicos presentes en los gránulos o en los poliedros de ciertos baculovirus (como TnGV o AcMNPV). Estos autores los denominaron factores sinérgicos virales (*virus enhancing factors*, VEF) o "enhancinas". En 1991, el gen que codifica el VEF de TnGV fue clonado y secuenciado por el grupo de Granados (HASHIMOTO *et al.*, 1991). El análisis por hibridación mostró que genes homólogos al gen *vef* se encuentran en varios GVs, entre ellos PuGV, pero no se detectó ningún gen homólogo en el genoma de AcMNPV. El mismo equipo publicó en 1995 la secuencia de los genes homólogos a *vef* en PuGV y en el granulovirus de *Helicoverpa armigera*, HearGV (ROELVINK *et al.*, 1995).

La acción sinérgica de SF depende de un aumento de la adhesión de los virus a las células (TANADA, 1985). Sin embargo, el mecanismo observado para el VEF de TnGV es una degradación de la membrana peritrófica y no está condicionado a una adhesión a las células (WANG *et al.*, 1994). La disparidad de estas observaciones, así como la presencia de actividades de degradación de la membrana peritrófica en virus en los que no se ha encontrado ningún gen homólogo al gen *vef*, como AcMNPV, hacen pensar en la existencia de varias familias de factores sinérgicos, una de las cuales es la de los VEF.

En 1996, Lepore *et al.* demostraron que los VEF presentan una actividad metaloproteasa. Aunque en un principio se pensaba que solo los granulovirus poseían VEF, se ha observado que dos genes homólogos se encuentran en LdMNPV, *Ld65* y *Ld160* (BISCHOFF Y SLAVICEK, 1997 ; KUZIO *et al.*, 1999). Los VEF de LdMNPV presentan una homología limitada a nivel proteico con los otros VEF, pero los sitios característicos para la actividad metaloproteasa están conservados.

El VEF de TnGV se clonó en el genoma de un AcMNPV modificado (BacPAK6), bajo el promotor de *p10*. El virus recombinante obtenido (BacVEFPol) presentó una CL_{50} de 0,196 OB/mm², la cual es 2,1 veces menor a la del AcMNPV silvestre (0,413 OB/mm²). Asimismo, presentó una TL_{50} de 64 h la cual fue 1,3 veces menor a la del AcMNPV silvestre (82 h) y que significó una disminución del 22% en el tiempo requerido para matar a las larvas de *T. ni* (DEL RINCÓN-CASTRO, 1997) (Tabla 1).

3.2. Modificación del tipo de encapsidación

En un trabajo reciente Washburn *et al.* (1999) han demostrado que el número de viriones necesarios, para obtener un mismo nivel de mortalidad, es mucho mayor en el caso de viriones que presentan una sola nucleocápsida que cuando se usan viriones que contienen múltiples nucleocápsidas. Este hecho está en relación con el mecanismo de regeneración de las células del epitelio del mesenterón, que puede ser utilizado por los insectos como sistema de defensa. En efecto, para poder iniciar las infecciones secundarias (de las células de las tráqueas, en gene-

Tabla 1. Valores de las CL₅₀ y los TL₅₀ del BacVEFPol y AcMNPV silvestre para larvas de *Trichoplusia ni*.

Virus	CL ₅₀ (OB/mm ²)	N	TL ₅₀ (horas)	N
	Media±EE		Media±EE	
AcMNPV	0.413±0.01 a	120	82±0.01 a	180
BacVEFPol	0.196±0.02 b	120	64±0.01 b	180

N= Número total de individuos evaluados. EE=Error estándar. Diferente letra indica medias estadísticamente diferentes (Tukey, P<0.05)(DEL RINCÓN-CASTRO, 1997).

ral), en los viriones que contienen una sola nucleocápsida es necesaria la replicación del genoma; sin embargo, en los viriones que contienen varias nucleocápsidas, una parte de la nucleocápsidas es capaz de atravesar la membrana basal y el único factor requerido para iniciar la infección es la proteína de fusión (GP64 en el caso de AcMNPV). El lapso de tiempo requerido para la síntesis de esta proteína es menor que para la síntesis de toda la partícula viral. Washburn *et al.* (1999) han podido demostrar que la infección secundaria se produce dos veces más rápido en el caso de viriones que contienen varias nucleocápsidas.

Es posible imaginar la modificación de SNPV hacia MNPV, lo cual aumentaría su virulencia. Sin embargo, por el momento, los determinantes moleculares de la encapsidación múltiple no han sido analizados.

3.3. Disminución de la vida de la larva

La modificación del TL₅₀ ha sido mucho más estudiada (VAN BEEK Y HUGHES, 1998). Para acelerar la muerte del insecto, un virus recombinante debe afectar o destruir un sistema vital de la larva más rápidamente que el virus no modificado.

Desde un punto de vista teórico, existen tres vías para conseguir este efecto: 1) disminuir el número de ciclos de multiplicación necesarios en la larva haciendo que cada célula infectada produzca más virus; 2) modificar la duración del ciclo viral y 3) modificar los virus para que estos destruyan órganos o funciones vitales. Los estudios realizados hasta el momento se han centrado en el tercer punto, debido fundamentalmente a la falta de conocimientos sobre los factores que controlan la velocidad de replicación o el número de virus producidos.

Los tipos de modificaciones más frecuentes han sido la delección de genes virales que regulan los ciclos del propio virus y del organismo infectado y la inserción de genes procedentes de otros organismos.

3.3.1. Delección del gen *egt*

Las ecdisonas son hormonas esteroides cuyas concentraciones aumentan justo antes de la muda de los insectos en estadios larvarios sucesivos y durante la meta-

morfosis de larva a pupa. El gen *egt* está conservado en todos los baculovirus estudiados hasta el momento (O'REILLY Y MILLER, 1995), salvo en el granulovirus de *Xestia c-nigrum* (XcGV) (HAYAKAWA *et al.*, 1999). Este gen codifica un enzima, la ecdisteroide UDP-glucosil transferasa (EGT), la cual cataliza la conjugación de las hormonas de la muda de insectos (las ecdisonas) con azúcares UDP (UDP-glucosa y UDP-galactosa). Su función es la supresión de la muda del huésped y la detención del desarrollo del mismo (O'REILLY *et al.*, 1998 ; EVANS Y O'REILLY, 1999). La inactivación de este gen del genoma viral, provoca la muda temprana del insecto y un detenimiento en su alimentación.

La comparación aislados silvestres del AcMNPV con otros en los que se ha eliminado el gen *egt* muestra una reducción significativa en el peso ganado por las larvas, así como reducciones de aproximadamente el 20% en el TL_{50} del virus y de cerca del 40% en la cantidad de alimento consumido por el insecto plaga (O'REILLY Y MILLER, 1991). En contrapartida, el número de poliedros producidos en las larvas infectadas con el virus EGT-*menos* se reduce en 23% (Tabla 2). Una mejora del mismo tipo se obtiene utilizando un SpliNPV (cepa M2) modificado sobre las larvas de *Spodoptera littoralis* (CROIZIER, CROIZIER, Y LÓPEZ-FERBER, datos no publicados) (Figura 3).

Se supone que la causa de esta muerte precoz es la ausencia de control del proceso de la muda. En efecto, durante la muda, la larva se vuelve más frágil y en las larvas infectadas este efecto podría conducir a una muerte prematura.

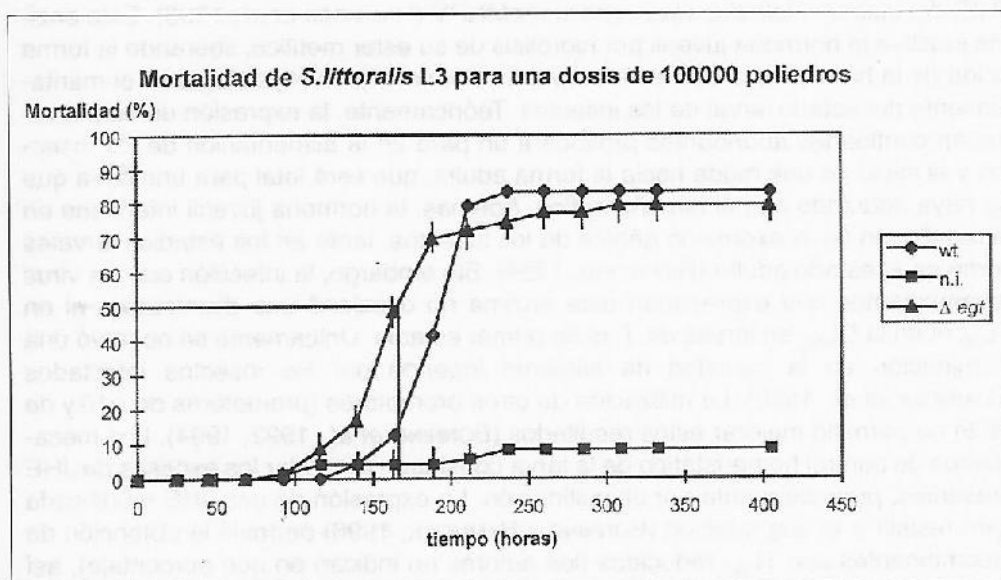


Figura 3. Mortalidad de larvas de tercer estado larvario (L_3) de *Spodoptera littoralis* infectadas *per os* con el baculovirus silvestre (wt) SpliNPV (cepa M2) o con un recombinante obtenido por delección del locus *egt* (Δegt)

Tabla 2. Producción comparativa de poliedros por diferentes virus recombinantes.

Virus	Poliedros por larva ^a	Ref.
AcMNPV C6	9,6x10 ⁸	Cory <i>et al.</i> 1994
AcST3	9,9x10 ⁷ *	Cory <i>et al.</i> 1994
AcMNPV C6 (Experiencia 1)	10,1±0,2x10 ⁸	Ignoffo y García, 1996b
AcAalt (Experiencia 1)	4,2±0,2x10 ⁸ *	Ignoffo y García, 1996b
vSp-TOX34	21,0±2,2x10 ⁵ * Nd	Tomalski y Miller, 1992
vEGTDEL	1,89±0,48x10 ⁹ *	O'Reilly y Miller, 1991
AcMNPV L1	2,46±0,42x10 ⁹	O'Reilly y Miller, 1991

^aSe incluye la producción en poliedros del virus no modificado cuando ésta se indica en la publicación citada.

* indica diferencias significativas para $p < 0,05$. Nd: la significación de la diferencia no fue indicada

3.3.2. Inserción de la esterasa de la hormona juvenil

Otro trabajo relacionado con hormonas específicas de insectos, corresponde a la expresión de la esterasa de la hormona juvenil (Juvenile Hormone Esterase, JHE) del insecto *Heliothis virescens* en AcMNPV (HAMMOCK *et al.*, 1990). Este enzima inactiva la hormona juvenil por hidrólisis de su ester metílico, liberando la forma ácida de la hormona, la cual es inactiva. La hormona juvenil participa en el mantenimiento del estado larval de los insectos. Teóricamente, la expresión de este enzima en cantidades abundantes provocará un paro en la alimentación de los insectos y el inicio de una muda hacia la forma adulta, que será letal para una larva que no haya adquirido aún el tamaño crítico. Además, la hormona juvenil interviene en la regulación de la expresión génica de los insectos, tanto en los estadios larvales como en el estado adulto (RIDDIFORD, 1994). Sin embargo, la infección con los virus recombinantes que expresaban esta enzima no ocasionó una disminución ni en TL_{50} ni en la DL_{50} en larvas de *T. ni* de primer estadio. Únicamente se observó una disminución en la cantidad de alimento ingerido por los insectos infectados (HAMMOCK *et al.*, 1990). La utilización de otros promotores (promotores de *p10* y de *p6.9*) no permitió mejorar estos resultados (BONNING *et al.*, 1992, 1994). Los mecanismos de control homeostático de la larva consiguen degradar los excesos de JHE presentes, probablemente por ubicuitinación. La expresión de una JHE modificada para resistir a la degradación (BONNING Y HAMMOCK, 1996) permitió la obtención de recombinantes con TL_{50} reducidos (los autores no indican en que porcentaje), así como una disminución en los daños a las plantas entre 36 y 50%. Curiosamente, la expresión de mutantes de JHE inactivos (con mutaciones en el sitio catalítico), mejora las propiedades insecticidas del virus de forma similar (BONNING Y HAMMOCK, 1996).

3.3.3. Inserción de hormonas proteicas

La desestabilización de los equilibrios hormonales de la larva ha sido una de las vías analizadas para mejorar los baculovirus. Diferentes genes de hormonas proteicas han sido expresados en baculovirus con este fin. Los resultados, sin embargo, no están a la altura de las expectativas. La expresión en BmNPV de la hormona diurética de *Locusta migratoria* permite una mejora de 10 a 15% en el TL_{50} (MAEDA, 1989). En AcMNPV, los resultados son del mismo nivel (LÓPEZ-FERBER Y POSSEE, resultados no publicados). Mejoras del mismo tipo fueron obtenidas con la expresión de la hormona de eclosión (ELDRIDGE *et al.*, 1991). Sin embargo, la expresión de la PTTH de *B. mori* en AcMNPV no produce ninguna mejora detectable (O'REILLY *et al.*, 1995; LÓPEZ-FERBER Y POSSEE, resultados no publicados). Aparentemente, el sistema de regulación homeostática de la larva consigue compensar los excesos o defectos en el nivel de hormonas, contrarrestando las variaciones debidas a la expresión por el baculovirus.

Ma *et al.* (1998) han obtenido una reducción significativa de TS_{50} en larvas de *T. ni* infectadas con el baculovirus recombinante AcBX-PBAN, que expresa el neuropéptido activador de la biosíntesis de feromonas (*pheromone biosynthesis activating neuropeptide*, PBAN), el cual controla la biosíntesis de las feromonas sexuales. Las reducciones en TS_{50} respecto al virus silvestre fueron de 26% y 19% para larvas neonatas o L_3 , respectivamente.

3.3.4. Inserción de toxinas

La utilización de genes de toxinas no debería presentar, *a priori*, los mismos problemas de compensación por parte del insecto. Sin embargo, la expresión de este tipo de genes puede impedir la continuación del ciclo del virus. En efecto, si el virus expresa una toxina que mata la célula que lo alberga, la producción de virus se ve comprometida y esto no sólo para la producción de los inóculos virales necesarios, sino también para la progresión de la infección en la larva que se quiere matar. La utilización de toxinas con una especificidad de tejido resuelve este problema.

Las dos primeras toxinas utilizadas fueron la del escorpión *Buthus eupeus* y la δ -endotoxina de la bacteria *Bacillus thuringiensis*. En ninguno de los recombinantes obtenidos se pudo demostrar una mejora de la TL_{50} . En el primer caso, el baculovirus recombinante que expresa la toxina del escorpión *B. eupeus*, no causó parálisis en los insectos infectados, ni ningún otro efecto deletéreo (CARBONELL *et al.*, 1988). Insertando genes *cry*, que codifican para las toxinas de *B. thuringiensis*, se han obtenido AcMNPV recombinantes que expresan las protoxinas de *B. thuringiensis* serovar *aizawai* (MARTENS *et al.*, 1990) y de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* (MERRYWEATHER *et al.*, 1990). En ambos casos se lograron expresar las δ -endotoxinas eficientemente e incluso se observó la formación de cristales en el citoplasma de células Sf21 infectadas. No obstante, cuando se infectaron insectos con los AcMNPV recombinantes, no se observó ninguna modificación de la DL_{50} con respecto a la obtenida para la cepa parental sin modificar.

A principios de los años 90 se publicaron dos de los casos con más éxito dentro de la mejora genética de AcMNPV. El primero de ellos corresponde a la expre-

sión de la neurotoxina AaIT del escorpión *Androctonus australis* (STEWART *et al.*, 1991a); el segundo, la de la neurotoxina específica de insectos TxP-1 del ácaro *Pyemotes tritici* (TOMALSKI Y MILLER, 1991).

AaIT es una toxina que actúa sobre el canal neuronal de sodio, causando efectos presinápticos excitatorios (ZOTKIN *et al.*, 1971). La secuencia en aminoácidos y la estructura de los puentes di-sulfuro necesarios para la actividad fueron determinados por Darbon *et al.* (1982). Su potencia es máxima sobre los dípteros, que son las presas habituales de ese escorpión, tanto *per os* como por inyección. En *Sarcophaga falculata*, la DL_{50} *per os* es de 100 ng/mg, aproximadamente 0,14% de la toxicidad por inyección (ZOTKIN *et al.*, 1992). Sin embargo, la dosis letal por inyección de la toxina purificada en larvas de lepidópteros, es muy elevada: en larvas L_4 de *T. ni*, con un peso de 183 mg, la inyección de 300 ng (9 ng/mg) no causa la muerte y sobre larvas de *Galleria mellonella*, la dosis necesaria para provocar parálisis en el 50% de las larvas (DP_{50}) es superior a 5 µg/mg (A. VEY, comunicación personal). La toxina no es activa para mamíferos: la inyección intra-cerebral de 1 mg de toxina purificada en ratones no produce efecto (DE DIANOUS *et al.*, 1987).

La DP_{50} de TxP-1 en larvas de *G. mellonella* es de 0,5 ng/mg, pero dosis de 50 ng/mg no producen ningún efecto en ratones (TOMALSKI *et al.*, 1989).

El baculovirus recombinante AcST3 que lleva un gen sintético que codifica para AaIT provocó la muerte un 25% más rápido, cuando se utilizó para infectar larvas de *T. ni*, al comparar su efecto con el provocado por el AcMNPV silvestre (STEWART *et al.*, 1991a,b). La muerte de la larva ocurre $85,8 \pm 1$ horas después de la ingestión de los poliedros, en lugar de $113,1 \pm 1$, con el virus silvestre. Cabe señalar que la LD_{50} de AcST3 es ligeramente menor que la del virus silvestre utilizado en las mismas condiciones. La toxina AaIT en AcST3 está codificada por un gen artificial, construido teniendo en cuenta la preferencia en el uso de codones de AcMNPV. Para la secreción se utilizó la señal de secreción de la proteína GP64. De forma sorprendente, la expresión del gen de la AaIT en baculovirus produce un efecto claro, aun cuando no se alcancen niveles elevados en la hemolinfa. Stewart *et al.* (1991a) han sugerido que la expresión continua y en diferentes tejidos de la larva puede ser la explicación de esta diferencia.

El baculovirus recombinante desarrollado por Stewart *et al.* (1991a) introdujo una innovación por dos aspectos: 1) la expresión del gen bajo el control del promotor del gen *p10*, el segundo gen muy tardío de AcMNPV, cuyo promotor fue duplicado y 2) la conservación de la expresión de la poliedrina, lo cual permitió la obtención de poliedros utilizables en los experimentos de forma comparable a los bioensayos con virus de fenotipo silvestre. Este tipo de construcción, que ha sido adoptada desde entonces, es la consecuencia de la utilización del promotor del gen *p10* para la expresión de genes heterólogos (GONNET Y DEVAUCHELLE, 1987; VLAK *et al.*, 1988), de su análisis (WEYER Y POSSEE, 1989) y del desarrollo de los vectores de expresión dobles (WEYER *et al.*, 1990; LÓPEZ-FERRER *et al.*, 1995).

Otros grupos han expresado también esta toxina, con genes sintéticos fusionados, utilizando como señal de secreción la del gen de la bombyxina (un neuropép-

tido) de *Bombyx mori*. El virus recombinante AcAaIT se probó en larvas de *Heliothis virescens* y presentó una disminución en el TL_{50} del orden del 30% (McCUTCHEN *et al.*, 1991; MAEDA *et al.*, 1991).

La utilización de promotores tempranos (*ie-1*, *vp39*) no supone una mejora importante (STEWART *et al.*, 1991b). Cuando se utilizó el promotor del gen *ie-1* para dirigir la expresión de la toxina AaIT, los virus recombinantes obtenidos, si bien provocaron la expresión abundante de la toxina en etapas tempranas de la infección, no mataron más rápido a las larvas infectadas, cuando se comparó la infección causada con AcST3. Sin embargo, las larvas infectadas con el recombinante *ie-1*-AaIT murieron siendo más pequeñas que aquellas infectadas por el recombinante AcAaIT, lo cual sugiere que la expresión de AaIT más temprano inhibe la ingestión de alimento (JARVIS *et al.*, 1996).

Experiencias sobre plantas en condiciones de campo controladas con el virus AcST3 (CORY *et al.*, 1994) confirman los datos obtenidos en el laboratorio. En dichas pruebas se ha podido observar que los baculovirus recombinantes mejorados no sólo han producido niveles de protección similares a los obtenidos en el laboratorio, sino que han resultado ser eficientes cuando se utilizan en un sistema agrícola real.

Cuando Tomalski y Miller (1991) utilizaron el gen *tox-34* que codifica la toxina TxP-I del ácaro *P. tritici* para construir un recombinante de AcMNPV, estos autores reemplazaron el gen de la poliedrina, obteniendo un recombinante que no es infeccioso *per os*. Sus resultados sugerían un aumento de la potencia aún mayor que el obtenido con AaIT. Se observó que el virus recombinante presentó una reducción en el TL_{50} del orden del 30 al 40%, comparado con el virus silvestre. Por otro lado, se pudo observar que las larvas de *G. mellonella* infectadas con el AcMNPV que expresa la TxP-I, presentaron una parálisis a los dos días de ser infectadas, pero murieron por infección viral en el tiempo esperado para una infección con baculovirus silvestres (TOMALSKI Y MILLER, 1991).

Posteriormente, los mismos autores han publicado los datos de AcMNPV recombinantes que conservan el gen de la poliedrina y que expresan la toxina TxP-I bajo la influencia de diversos promotores (TOMALSKI Y MILLER, 1992). El recombinante más efectivo se encontró cuando la TxP-I se clonó bajo el control de un promotor híbrido, el cual contenía elementos de promotores tardíos y muy tardíos. Este recombinante presentó una CL_{50} ligeramente mayor a la del virus silvestre (1,6 veces, 2,18 vs. 1,37 poliedros/ml, para el virus recombinante y el silvestre, respectivamente). Sin embargo, el tiempo efectivo (ET_{50}) del recombinante fue un 40% menor que el del virus silvestre (49,2 horas para el recombinante y 83,2 horas para el AcMNPV silvestre) (TOMALSKI Y MILLER, 1992).

Las dos toxinas mencionadas anteriormente son paralizantes e influyen en la movilidad de las larvas y por consiguiente en su comportamiento alimenticio. En las últimas fases de la infección con los virus recombinantes, las larvas quedan paralizadas y cesan de alimentarse. Una forma más apropiada de describir esta mejora del virus como bio-insecticida es la consideración de los daños que el insecto infectado causa a las plantas. La diferencia entre el virus silvestre y los modificados es más importante en este caso. El virus recombinante AcST3 permite reducir

en un 50% los daños, medidos como superficie foliar atacada, en comparación con el virus salvaje (STEWART *et al.*, 1991a). Cory *et al.* (1994), demostraron en condiciones de campo que la reducción del daño es estadísticamente significativa y que está en función de la dosis de poliedros aplicada.

Una consecuencia del efecto paralizante de la toxina expresada por el baculovirus recombinante es la disminución de la transmisión horizontal del virus. En efecto, AcST-3 produce menos poliedros por larva (Tabla 2). Además, las larvas infectadas por el recombinante caen al suelo, mientras que aquellas infectadas por el virus silvestre quedan suspendidas de las hojas y, al desintegrarse el tegumento, liberan los poliedros que se dispersan contaminando las hojas situadas más abajo. Como consecuencia, el número de larvas infectadas en un segundo ciclo de infección es mucho menor (CORY *et al.*, 1994; HOOVER *et al.*, 1995). Estudios detallados de la producción de poliedros y la mortalidad causada por el virus AcAaIT han sido realizados por Ignoffo y García (1996a y b). Estos autores confirman que las larvas L₅ de *T. ni* comen significativamente menos que larvas no infectadas ($13,2 \pm 2,6\%$), o infectadas por el virus silvestre AcMNPV C6 ($8,5 \pm 2,6\%$) y que la producción de poliedros también es reducida (Tabla 2).

La actividad insecticida de los baculovirus también se ha intentado mejorar mediante la construcción de virus recombinantes que expresan otros genes. Así, se ha obtenido un baculovirus que expresa la proteína URF13 de maíz (KORTH Y LEVINGS, 1993). Esta proteína es tóxica para células de insectos cultivadas *in vitro* (línea celular Sf9). El baculovirus recombinante que expresa la URF13 bajo el control del promotor de la poliedrina, fue letal tras inyección en larvas de *T. ni*, provocando una reducción del 40% en el TL₅₀ respecto al virus silvestre.

Prikhod'ko *et al.* (1996) obtuvieron AcMNPV recombinantes que expresan los genes quiméricos sintéticos *mag4*, *sat2* y *ssh1*. El primero codifica para la toxina m-Aga-IV de la araña *Agelenopsis aperta*, mientras que los otros dos genes codifican para las toxinas AsII y Sh1 de las anémonas de mar *Anemonia sulcata* y *Stichodactyla helianthus*, respectivamente. Los tres polipéptidos son secretables y poseen actividad neurotóxica contra insectos. La efectividad de cada virus recombinante fue variable, aunque los tres causaron la parálisis y la muerte en los insectos tratados. El efecto del AcMNPV que expresaba m-Aga-IV fue dependiente del insecto tratado, con la mayor efectividad sobre larvas de *S. frugiperda*, causando una disminución del 37% en su TL₅₀, mientras que los virus recombinantes que expresan AsII y Sh1 provocaron reducciones en el TL₅₀ del 38,4% y 36% sobre larvas de *T. ni*, respectivamente.

Hughes *et al.* (1997) han obtenido virus recombinantes que expresan las neurotoxinas específicas para los insectos TalTX-1 DTX9.2 de las arañas *Tegenaria agrestis* y *Diguetia canities*, respectivamente. Su expresión reduce significativamente el ST₅₀ así como el FT₅₀. Las reducciones oscilan entre 9 y 33% para los TS₅₀ y entre 16 y 40% para los FT₅₀ en tres especies de lepidópteros, *S. exigua*, *T. ni* y *H. virescens*.

Gershburg *et al.* (1998) han utilizado la toxina depresiva Lgh1T2 del escorpión *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. El virus recombinante obtenido presenta carac-

terísticas insecticidas superiores a las observadas con AaIT-I y su utilización a nivel industrial parece inminente (publicación DuPont-H 66638, 1996, citada en ZLOTKIN, 1999).

4. Baculovirus doblemente modificados

Mediante la construcción de virus que presentan dos modificaciones también se ha intentado mejorar las características bioinsecticidas de los baculovirus. Se han realizado estudios adicionales para determinar si la expresión de la JHE en virus que carecen del gen *egt* (Δegt) podría inducir a una muda pupal prematura. Las larvas infectadas con este virus JHE- Δegt presentaron la misma ganancia en peso y una LT_{50} similar al virus recombinante Δegt (ELDRIDGE *et al.*, 1992).

Miller y O'Reilly (1991) describen una mejora en la potencia insecticida cuando utilizan virus Δegt que expresan la hormona pro-toracicotrópica (PTTH). La inyección de larvas L_3 de *S. frugiperda* con 1×10^5 pfu (unidades formadoras de placa) ocasiona la muerte de 100% de las larvas en 6 días; mientras que VEGTDEL (virus Δegt) o VPTTH (virus que expresa PTTH) solos requieren más de 8 días.

Herrmann *et al.* (1995) han observado que la inyección simultánea de dos neurotoxinas de escorpión aumenta en 10 veces la potencia insecticida. Estos autores sugieren que la expresión de dos toxinas en el mismo baculovirus podría producir el mismo tipo de mejora. Sin embargo, Prikhod'ko *et al.* (1998), han expresado dos toxinas, μ -Aga-IV y AsII bajo el control del promotor de HSP70, obteniendo solamente una mejora adicional de un 10% en el FT_{50} respecto a los virus que expresan sólo una de las dos.

5. Los riesgos derivados de la utilización de virus recombinantes en control integrado

La utilización de baculovirus recombinantes presenta una serie de riesgos propios, además de los que presenta la utilización de baculovirus en general.

Estos riesgos propios derivan de las modificaciones que se hayan introducido en el virus, ya sea la delección de un gen viral, la inserción de un gen en el genoma viral o la sustitución de dos genes homólogos. El análisis del riesgo debe tener en cuenta el efecto de los residuos sobre el resto del ecosistema, como para los insecticidas químicos, los efectos de la modificación en otras características del virus (espectro de huéspedes, por ejemplo) y los riesgos derivados de la dispersión del o de los genes introducidos por recombinación. La evaluación de estos riesgos ha sido revisada recientemente por Richards *et al.* (1998). En los párrafos que siguen daremos sólo un esbozo de algunos aspectos.

La utilización de baculovirus recombinantes en control biológico comporta dos tipos de riesgo diferentes. El primero es la presencia en los cadáveres de las larvas de proteínas que pudieran ser tóxicas para los consumidores del cultivo o para

los depredadores naturales de las larvas. Un segundo tipo de riesgo es la dispersión del baculovirus o del gen incluido en él fuera del contexto ecológico para el que se ha considerado.

Diversas compañías productoras de insecticidas han manifestado su interés por la utilización de baculovirus genéticamente modificados, lo cual queda reflejado en la existencia de un número importante de patentes (FRASER *et al.*, 1989 ; MILLER Y O'REILLY, 1991 ; STEWART *et al.*, 1991 ; CHRISTIAN *et al.*, 1993 ; WOOD, 1993; IATROU, 1995 ; etc.). Algunas de estas compañías han realizado peticiones de autorización para experimentación en campo con virus recombinantes de este tipo en USA. En Europa, la utilización en la protección de cultivos de virus recombinantes en los que se hayan incluido genes provenientes de otros organismos, está sujeta a bastante controversia. En efecto, la evaluación del beneficio potencial comparado a los riesgos que se derivan de la distribución en cantidades masivas de organismos genéticamente modificados reviste un carácter ético, como discutiremos a continuación, tanto como nuestro conocimiento nos lo permita. En todos los experimentos, realizados hasta el momento, la modificación genética de un baculovirus conlleva una disminución de su potencial biológico. Así, los virus en los que se ha escindido el gen *egt* o en los que se han introducido genes de toxinas, producen menos poliedros (Tabla 2), con lo cual, en principio, estas variantes serán eliminadas a lo largo del tiempo, suponiendo que entre tanto no se puedan originar nuevas variantes fenotípicas más aptas.

5.1. La contaminación del cultivo por las proteínas expresadas

Este tipo de riesgo no lo presentan los recombinantes por delección, como es el caso de los virus Δegt . Por otro lado, la evaluación de la dosis necesaria para observar efectos teratogénicos en ratones de laboratorio, con la toxina AaIT-I administrada *per os*, es muy elevada (ZLOTKIN, 1983 ; de DIANOUS *et al.*, 1987, 1988). Lo mismo ocurre con las otras toxinas específicas para insectos que se han utilizado (ZLOTKIN, 1999). Este riesgo, sin embargo, no se debe subestimar; en efecto, las hormonas pueden tener efectos importantes aunque las dosis sean bajas (incluso indetectables por los métodos de análisis químicos convencionales) y ciertas toxinas pueden ser asimismo, extremadamente tóxicas para el consumidor final. Los riesgos de intoxicación en este caso deberán ser estimados precisamente. Hay también que considerar los efectos posibles de estas proteínas sobre los depredadores del insecto naturalmente presentes en el cultivo. Un análisis de los efectos directos de baculovirus recombinantes en dos depredadores de *T. ni* (*Chrysoperla carnea* Stephens y *Onus insidiosus* (Say)) ha sido realizado por Heinz *et al.*, 1995. Estos autores analizaron las consecuencias de la ingestión de larvas infectadas por AcAaIT en los depredadores de *T. ni*, así como de la inyección de AcAaIT en abejas, sin encontrar ningún efecto significativo. McCutchen *et al.* (1996) han analizado el efecto del mismo virus sobre *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) un endoparasoide de *T. ni*, observando un desarrollo más rápido de *M. croceipes* en las larvas de *T. ni* infectadas con AcAaIT y un menor tamaño de los adultos.

5.2. La dispersión del baculovirus o del gen que contiene

En este apartado se engloban dos procesos distintos, 1) la posibilidad de dispersión del genoma recombinante entero, que sería debida a la modificación de la capacidad de expresión y/o replicación en huéspedes diferentes de aquellos que se desean combatir y 2) la dispersión del gen por recombinación.

5.2.1. Riesgos debidos a una dispersión del virus en el medio ambiente

La dispersión del virus hacia otros organismos en los que pueda causar efectos indeseables debe ser considerada sobre todo en dos casos: 1) cuando la modificación ha sido intencionadamente una extensión del espectro de huéspedes y 2) cuando el gen introducido se ha colocado bajo el control de un promotor temprano, que pudiera ser activo en células en las que el virus no desarrolla normalmente ciclos productivos. En el primer caso, los efectos nefastos serían, en principio, sobre otros insectos, ya que no se ha añadido nada al virus que lo haga más patógeno para otros seres vivos. En el segundo caso, en contraste, es sobre todo este tipo de riesgo el que se debe analizar. Se sabe que los baculovirus que normalmente infectan lepidópteros pueden entrar en células de dípteros (*Drosophila melanogaster*), de roedores (CARBONELL *et al.*, 1985) o incluso en células humanas (BOYCE Y BUCHER, 1996). En estas células, la infección no procede hasta la fase tardía, con lo que los genes situados bajo el control de promotores tardíos no son transcritos, pero los genes situados bajo el control de promotores tempranos pueden ser transcritos por los sistemas celulares.

5.2.2. Riesgos debidos a una dispersión del gen

Los baculovirus presentan una capacidad de recombinación muy importante, no sólo entre virus de la misma especie (CROIZIER Y RIBEIRO, 1992), sino con virus de especies vecinas (KONDO Y MAEDA, 1993; CROIZIER *et al.*, 1994), con ADN libres presentes en la célula infectada (y este es el principio más utilizado para la generación de baculovirus recombinantes), o con el genoma de la célula huésped (MILLER Y MILLER, 1982; FRASER *et al.*, 1983; JEHLE *et al.*, 1998). Como ya se ha descrito en otros capítulos, los baculovirus pueden albergar transposones que actúan como vehículo de genes.

En consecuencia, antes de aceptar la utilización en el campo de un baculovirus genéticamente modificado, se deben analizar los diferentes riesgos de difusión del baculovirus modificado (o del gen insertado) fuera del contexto ecológico para el que se ha pensado.

Los riesgos dependen del tipo de modificación de que se trate. Por ejemplo, la delección de un gen presente en el virus, como *egt*, no genera el mismo riesgo de transmisión de nueva información genética que la inserción en el genoma del virus de un gen heterólogo. Además, en el caso de una inserción, el riesgo teórico es diferente si se inserta un gen proveniente del huésped (por ejemplo un enzima JHE, o una hormona, PTTH, EH), o un gen proveniente de otro organismo con el que el virus no está normalmente en contacto (lo cual sería el caso de las toxinas de arácnidos, de bacterias o de otros taxones).

La probabilidad de obtener recombinantes entre el virus modificado y otros genomas (virales, celulares, etc.) aumenta con el número de ciclos de replicación del virus. Por tanto, la persistencia de estos virus modificados en el medio no es deseable. Sin embargo, la producción de virus modificados que desaparezcan una vez muerto su huésped no resuelve completamente el problema ya que puede haber recombinación en un solo ciclo viral, aunque lo limita en el tiempo y en el espacio.

5.3. La modificación de la persistencia como método de limitar los riesgos

El sistema más apropiado para limitar la supervivencia de un virus en la naturaleza cabe pensar que sería la eliminación de la forma de persistencia, el OB. Esto no es fácil. En efecto, el OB es necesario para infectar la larva. Se podría imaginar un sistema en el que, en el laboratorio o en la fábrica los poliedros sean producidos, pero que en el campo esto sea imposible. Un sistema basado en la utilización de líneas celulares transformadas con el gen de la poliedrina y virus con una delección en este gen podría satisfacer estos requisitos. Sin embargo, los niveles de expresión de la poliedrina necesarios para la oclusión de los virus son difíciles de alcanzar utilizando genes localizados en la célula. Además, en las fases tardías de la infección, el genoma de la célula huésped es degradado. Por el momento no se ha publicado ningún estudio que resuelva de forma satisfactoria este problema.

Una alternativa a la ausencia de los OB puede ser la producción de OB que no sean infecciosos. Se conocen dos genes virales que afectan a la capacidad infecciosa de los OB, *p74* (FAULKNER *et al.*, 1997) y *pif* (LÓPEZ-FERBER *et al.*, resultados no publicados). La ausencia de los productos de estos dos genes en el OB, conlleva a una pérdida completa de su capacidad de producir una infección. Además, estas dos proteínas son minoritarias; se encuentran presentes en el poliedro en cantidades mínimas, lo cual facilitaría su expresión en células transformadas.

Una estrategia diferente es la de co-inclusión, en la cual, un baculovirus en el cual un gen (que podría ser una toxina) se encuentra en lugar de la poliedrina y un baculovirus de fenotipo silvestre se utilizan para coinfectar un cultivo de células con una multiplicidad de infección elevada. De esta forma, una parte de los viriones incluidos en los poliedros contienen la información genómica que permite expresar el gen insecticida, pero en principio, la presencia de la poliedrina o de ese gen son excluyentes. Los experimentos de seguimiento de la evolución de frecuencias de cada uno de los dos virus a lo largo del tiempo han mostrado que el virus desprovisto de poliedrina tiende a desaparecer (WOOD *et al.*, 1994, D'AMICO *et al.*, 1999).

Otra estrategia considerada es la liberación en el campo de baculovirus preincluidos. Los viriones preincluidos, son aquellos destinados a ocluirse en un poliedro y son altamente infecciosos *per os*, en larvas susceptibles, aunque mucho más frágiles que una vez protegidos en el OB. Estos viriones pueden producirse tanto *in vitro* como *in vivo* (HUGHES y WOOD, 1996). Se han realizado pruebas de

campo con viriones preincludidos. Estas pruebas se realizaron con AcMNPV sin ninguna modificación genética, solamente con la delección del gen de la poliedrina, sobre campos de coliflor con larvas de *T. ni*. Se encontró que en larvas infectadas en el campo, toda la capacidad infecciosa de la progenie viral se perdió a los 7 días p.i. (Wood, 1996). De forma similar al caso de la coinclusión, el virus preincludido sin poliedrina, tiende a desaparecer en el campo y por lo tanto no existen problemas de acumulación ambiental.

6. Resistencia en los insectos hacia los baculovirus recombinantes

La aparición y el control de la resistencia contra los baculovirus se tratara en otro capítulo de este libro (Capítulo 13). Aquí sólo indicaremos el riesgo de aparición de resistencias contra los genes heterólogos expresados por los baculovirus modificados, como por ejemplo hacia las toxinas AaIT y TxP-I, u otras toxinas codificadas en los baculovirus recombinantes desarrollados hasta la fecha. En el caso de la toxina AaIT, un trabajo reciente (ZOTKIN *et al.*, 1999) muestra que se pueden obtener fácilmente cepas mutantes de *D. melanogaster* o de *Musca domestica* con una resistencia superior.

Sin embargo, aunque se encontraran larvas de insectos resistentes a la acción de las toxinas antes mencionadas, es altamente probable que las larvas murieran debido a la infección viral por sí sola, con lo que la frecuencia de insectos resistentes a estas toxinas en la población no aumentaría rápidamente.

7. La decisión de utilizar los baculovirus recombinantes: ¿decisión científica o decisión política?

La evaluación del riesgo de recombinación requiere la simulación de las condiciones en las cuales el virus puede encontrarse en la naturaleza. Esta simulación nunca puede ser exhaustiva. El científico, en función del diseño experimental que se le pida, podrá indicar un valor de riesgo, que nunca será nulo. Es finalmente el conjunto de los actores sociales y económicos el que, teniendo en cuenta los beneficios potenciales evaluados y los riesgos que conlleva en cada caso el uso de organismos genéticamente modificados, deberá tomar una decisión. Esta decisión, aunque debe ser motivada desde un punto de vista científico, supera el ámbito de la ciencia, siendo por su naturaleza una decisión política y ética. De la misma forma, la decisión supera el ámbito de un solo país, la dispersión fuera de las fronteras políticas de residuos insecticidas o de insectos nocivos es, por desgracia, de actualidad.

Aun con todas estas incógnitas, vale la pena mencionar que comparado con el uso masivo de plaguicidas sintéticos, los baculovirus recombinantes tienen un perfil ambiental bastante atractivo.

8. Bibliografía

- ARGAUD, O. 1997. PhD. Thesis. Université de Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- ARGAUD, O., L. CROIZIER, M. LÓPEZ-FERBER Y G. CROIZIER. 1998. Two key mutations in the host-range specificity domain of the p143 gene of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus are required to kill *Bombyx mori* larvae. J. Gen. Virol. **79**:931-935.
- BIRD, F.T. 1959. Polyhedrosis y granulosis viruses causing single and double infections in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Clemens). J. Invertebr. Pathol. **1**:406-430.
- BISCHOFF, D.S. Y J.M. SLAVICEK. 1997. Molecular analysis of an enhancer gene in the *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus. J. Virol. **71**:8133-8140.
- BONNING, B.C., M. HIRST, R.D. POSSEE Y B.D. HAMMOCK. 1992. Further development of a recombinant baculovirus insecticide expressing the enzyme juvenile hormone esterase from *Heliothis virescens*. Insect Biochem. Mol. Biol. **22**:453-458.
- BONNING, B.C., P.W. ROELVINK, J.M. VLAK, R.D. POSSEE Y B.D. HAMMOCK. 1994. Superior expression of juvenile hormone esterase and beta-galactosidase from the basic protein promoter of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus compared to the p10 protein and polyhedrin promoters. J. Gen. Virol. **75**:1551-1556.
- BONNING, B.C. Y B.D. HAMMOCK. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. Ann. Rev. Entomol. **41**:191-210.
- BOYCE, F.M. Y N.L. BUCHER. 1996. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**:2348-2352.
- CARBONELL, L.F., M.J. KLOWDEN Y L.K. MILLER. 1985. Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. J. Virol. **56**:153-60.
- CARBONELL, L.F. Y L.K. MILLER. 1987. Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. Appl. Environ. Microbiol. **53**:1412-1417.
- CARBONELL, L.F., M.R. HODGE, M.D. TOMALSKI 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**:409-18.
- CARTER, J.B. 1984. Viruses as Pest-Control Agents. Biotech. Genetic Eng. Rev. **1**:375-419.
- CHRISTIAN, P.D., D.J. DALL, K.H.J. GORDON, T.N. HANZLIK Y A. SRISKANTHA. 1993. Australia patent PCT/AU92/00413.
- CLEM, R.J., M. FECHHEIMER Y L.K. MILLER. 1991. Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. Science **254**:1388-1390.
- CONDREAY, J.P., S.M. WITHERSPOON, W.C. CLAY Y T.A. KOST. 1999. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**:127-132.
- 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. Nature (London) **370**:138-140.

- CROIZIER, G., Y H.C.T. RIBEIRO. 1992. *Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus wild populations*. Virus Res. **26**:183-196.
- CROIZIER, G., L. CROIZIER, O. ARGAUD Y D. POUDÉVIGNE. 1994. *Extension of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus host range by interspecific replacement of a short DNA sequence in the p143 helicase gene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**:48-52.
- CROIZIER, L. 1995. PhD. Thesis. Université de Montpellier II, Montpellier.
- D'AMICO, V., J.S. ELKINTON, J.D. PODGWAITE, J.M. SLAVICEK, M.L. McMANUS Y J.P. BURAND. 1999. *A field release of genetically engineered gypsy moth (Lymantria dispar L.) nuclear polyhedrosis virus (LdNPV)*. J. Invertebr. Pathol. **73**:260-268.
- DARBON, H., E. ZLOTKIN, C. KOPEYAN, J. VAN RIETSCHOTEN Y H. ROCHAT. 1982. *Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion Androctonus australis Hector*. Int. J. Pept. Protein. Res. **20**:320-330.
- DE DIANOUS, S., F. HOARAU Y H. ROCHAT. 1987. *Re-examination of the specificity of the scorpion Androctonus australis Hector insect toxin towards arthropods*. Toxicon **25**:411-417.
- DE DIANOUS, S., P.R. CARLE Y H. ROCHAT. 1988. *The effect of the mode de application on the toxicity of Androctonus australis Hector insect toxin*. Pesticide Science. **23**:35-40.
- DEL RINCÓN-CASTRO, M.C. 1997. PhD. Thesis. Guanajuato, Irapuato, México.
- DERKSEN, A.C. Y R.R. GRANADOS. 1988. *Alteration of a lepidopteran peritrophic membrane by baculoviruses and enhancement of viral infectivity*. Virology **167**:242-250.
- DU, X. Y S.M. THIEM. 1997. *Responses of insect cells to baculovirus infection: protein synthesis shutdown and apoptosis*. J. Virol. **71**:7866-72.
- DURANTE, D., L. CROIZIER, M.D. AYRES, G. CROIZIER, R.D. POSSEE Y M. LÓPEZ-FERBER. 1998. *The pnp/pnl gene (ORF 86) of Autographa californica nucleopolyhedrovirus is a non-essential, immediate early gene*. J. Gen. Virol. **79**:629-637.
- ELDRIDGE, R., F.M. HORODYSKI, D.B. MORTON, D.R. O'REILLY, J.W. TRUMAN, L.M. RIDDIFORD Y L. K. MILLER. 1991. *Expression of an eclosion hormone gene in insect cells using baculovirus vectors*. Insect Biochem. **21**:341-351.
- ELDRIDGE, R., D.R. O'REILLY, B.D. HAMMOCK Y L.K. MILLER. 1992. *Insecticidal properties of genetically engineered baculoviruses expressing an insect juvenile hormone esterase gene*. Appl. Environ. Microbiol. **58**:1583-1591.
- EVANS, O.P. Y D.R. O'REILLY. 1999. *Expression y structural characterization of a baculovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase*. J. Gen. Virol. **80**:485-492.
- FAULKNER, P., J. KUZIO, G.V. WILLIAMS Y J.A. WILSON. 1997. *Analysis of p74, a PDV envelope protein of Autographa californica nucleopolyhedrovirus required for occlusion body infectivity in vivo*. J. Gen. Virol. **78**:3091-3100.
- FRASER, M.J., G.E. SMITH Y M.D. SUMMERS. 1983. *Acquisition of host cell DNA sequences by baculoviruses: relationship between host DNA insertions and FP mutants of Autographa californica and Galleria mellonella nuclear polyhedrosis viruses*. J. Virol. **47**:287-300.

- FRASER, M.J., K.D. ROSEN Y V.A. PLOPLIS. 1989. *USA patent 153736*.
- FRIESEN, P.D. Y L.K. MILLER. 1986. *The regulation of baculovirus gene expression*. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **131**:31-49.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1996. *Effet of agricultural operations and precipitation on vertical distribution of a nuclear polyhedrosis virus in soil*. Biol. Contr. **6**:324-329.
- GERSHBURG, E., D. STOCKHOLM, O. FROY, S. RASHI, M. GUREVITZ, Y N. CHEJANOVSKY. 1998. *Baculovirus-mediated expression of a scorpion depressant toxin improves the insecticidal efficacy achieved with excitatory toxins*. FEBS Lett. **422**:132-136.
- GOMI, S., K. MAJIMA Y S. MAEDA. 1999. *Sequence analysis of the genome of Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. J. Gen. Virol. **80**:1323-1337.
- GONNET, P. Y G. DEVAUCHELLE. 1987. *Obtention par recombinaison dans le gène du polypeptide p10 d'un baculovirus exprimant le gène de la résistance à la néomycine dans les cellules d'insectes*. Comp. Rend.Acad. Sci. Paris. **305**:111-114.
- HAMMOCK, B.D., B.C. BONNING, R.D. POSSEE, T.N. HANZLIK Y S. MAEDA. 1990. *Expression y effects of the juvenile hormone esterase in a baculovirus vector*. Nature **344**:458-461.
- HASHIMOTO, Y., CORSARO, B.G. Y R.R. GRANADOS. 1991. *Location y nucleotide sequence of the gene encoding the virql enhancing factor of the Trichoplusia ni granulosis virus*. J. Gen. Virol. **72**: 2645-2651.
- HAYAKAWA, T., R. KO, K. OKANO, S.I. SEONG, C. GOTO Y S. MAEDA. 1999. *Sequence Analysis of the Xestia c-nigrum Granulovirus Genome*. Virology **262**:277-297.
- HEINZ, K.M., B.F. MCCUTCHEN, R. HERRMANN, M.P. PARRELLAY B.D. HAMMOCK. 1995. *Direct effect of recombinant nuclear polyhedrosis viruses on selected nontarget organisms*. J. Econ. Entomol. **88**:259-264.
- HERRMANN, R., H. MOSKOWITZ, E. ZLOTKIN Y B.D. HAMMOCK. 1995. *Positive cooperativity among insecticidal scorpion neurotoxins*. Toxicon. **33**:1099-102.
- HOOVER, K., C.M. SCHULTZ, S.S. LANE, B.C. BONNING, S.S. DUFFEY, B.F. MCCUTCHEN Y B.D. HAMMOCK. 1995. *Reduction in damage to cotton plants by a recombinant baculovirus that knocks moribund larvae of Heliothis virescens off the plant*. Biol. Contr. **5**:419-426.
- HUGHES, D.S., R.D. POSSEE Y L.A. KING. 1993. *Activation y detection of a latent baculovirus resembling Mamestra brassicae Nuclear Polyhedrosis Virus in M. brassicae insects*. Virology **194**:608-615.
- HUGHES, D.S., R.D. POSSEE Y L.A. KING. 1997. *Evidence for the presence of a low-level, persistent baculovirus infection of Mamestra brassicae insects*. J. Gen. Virol. **78**:1801-1805.
- HUGHES, P.R. Y H.A. WOOD. 1996. *In vivo production, stabilization y infectivity of baculovirus preoccluded virions*. Appl. Environ. Microbiol. **62**:105-108.
- HUGHES, P.R., H.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.
- IATROU, K. 1995. Canada patent PCT:CA94/00708.
- IGNOFFO, C.M. Y C. GARCÍA. 1996 a. *Rate of larval lysis and yield and activity of 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.
- IGNOFFO, C.M. Y C. GARCÍA. 1996 b. *Mortality and feeding of late-instar Trichoplusia ni larvae fed a wild or recombinant strain of the nuclear polyhedrosis virus of Autographa californica*. *J. Invertebr. Pathol.* **68**:191-193.
- JARVIS, D., L. REILLY, K. HOOER, C. SCHULTZ, B. HAMMOCK Y L. GUARINO. 1996. *Construction and characterization of immediate early baculovirus pesticides*. *Biol. Contr.* **7**:228-235.
- JEHLE, J., A. NICKEL, J.M. VLAK Y H. BACKHAUS. 1998. *Horizontal escape of the novel Tc1-like lepidopteran transposon TCp3.2 into Cydia pomonella granulovirus*. *J. Mol. Evol.* **46**:215-224.
- KAMITA, S.G. Y S. MAEDA. 1997. *Sequencing of the putative DNA helicase-encoding gene of the Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus and fine-mapping of a region involved in host range expansion*. *Gene* **190**:173-179.
- KNEBEL, D., H. LUBBERT Y W. DOERFLER. 1985. *The promoter of the late p10 gene in the insect nuclear polyhedrosis virus Autographa californica: activation by viral gene products and sensitivity to DNA methylation*. *Embo J.* **4**:1301-1306.
- KNEBEL, D. Y W. DOERFLER. 1987. *Activation of an insect baculovirus promoter in mammalian cells by adenovirus functions*. *Virus Res.* **8**:317-326.
- 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.
- KORTH, K.L. Y C.S.I. LEVINGS. 1993. *Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**:3388-3392.
- KUKAN, B. 1999. *Vertical transmission of nucleopolyhedroviruses in insects*. *J. Invertebr. Pathol.* **74**: 103-111.
- KUZIO, J., M. PEARSON, S. HARWOOD, C. FUNK, J. EVANS, J. SLAVICEK Y G. ROHRMAN. 1999. *Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for Lymantria dispar*. *Virology* **253**:17-34.
- LENTZ, T.L. 1990. *The recognition event between virus and host cell receptor: a target for antiviral agents*. *J. Gen. Virol.* **71**:751-766.
- LEPORE, L.S., P.R. ROELVINK Y R.R. GRANADOS. 1996. *Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease*. *J. Invertebr. Pathol.* **68**:131-140.
- LÓPEZ-FERBER, M., W.P. SISK Y R.D. POSSEE. 1995. *Baculovirus transfer vectors*. *Methods Mol Biol.* **39**:25-63.
- LU, A. Y L.K. MILLER. 1995. *Differential requirements for baculovirus late expression factor genes in two cell lines*. *J. Virol.* **69**:6265-6272.
- LU, A. Y L.K. MILLER. 1996. *Species-specific effects of the hcf-1 gene on baculovirus virulence*. *J. Virol.* **70**:5123-5130.
- MA, P.W.K., T.R. DAVIS, H.A. WOOD, D.C. KNIPPLE Y W.L. ROELOFS. 1998. *Baculovirus expression of an insect gene that encodes multiple neuropeptides*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**:239-249.

- 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.L. VOLRATH, T.N. HANZLIK, S.A. HARPER, K. MAJIMA, D.W. MADDOX, B.D. HAMMOCK Y E. FOWLER. 1991. *Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus*. Virology. **184**:777-780.
- 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-kilo-base-pair DNA fragment originating from Bombyx mori NPV*. J. Virol. **67**:6234-6238.
- MARTENS, J.W.M., G. HONEE, W. ZUIDEMA, J. VAN LENT, B. VISSER Y J. VLAK. 1990. *Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells*. Appl. Environ. Microbiol. **56**:2764-2770.
- MARTIGNONI, M.E. 1999. *History of TM Biocontrol-1 : the first registered virus-based product for control of a forest insect*. Am. Entomol. **45**:30-37.
- MARTIN, O. Y G. CROIZIER. 1997. *Infection of a Spodoptera frugiperda cell line with Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*. Virus Res. **47**:179-185.
- MAZZACANO, C.A., X. DU Y S.M. THIEM. 1999. *Global protein synthesis shutdown in Autographa californica nucleopolyhedrovirus-infected Ld652Y cells is rescued by tRNA from uninfected cells*. Virology. **260**:222-231.
- MCCUTCHEN, B.F., P.V. CHOUDARY, R. CRENSHAW, D. MADDOX, S.G. KAMITA, N. PALEKAR, S. VOLRATH, E. FOWLER, B.D. HAMMOCK Y S. MAEDA. 1991. *Development of a recombinant baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control*. Biotechnology **9**:848-52.
- MCCUTCHEN, B.F., R. HERRMANN, K.M. HEINZ, M.P. PARRELLA Y B.D. HAMMOCK. 1996. *Effects of recombinant baculoviruses on a nontarget endoparasitoid of Heliothis virescens*. Biol. Contr. : theory and applications in pest management **6**:45-50.
- MERRYWEATHER, A., U. WEYER, M.P.G. HARRIS, M. HIRST, T. BOOTH Y R.D. POSSEE. 1990. *Construction of genetically engineered baculovirus insecticides containing the Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 delta endotoxin*. J. Gen. Virol. **71**:1535-1544.
- MILLER, D.W. Y L.K. MILLER. 1982. *A virus mutant with an insertion of a copia-like transposable element*. Nature (London) **299**:562-564.
- MILLER, L.K. 1988. *Baculovirus as gene expression vectors*. Ann. Rev. Microbiol. **42**:177-199.
- MILLER, L.K., A.J. LINCO Y L.A. BULLA. 1983. *Bacterial, viral and fungal insecticides*. Science **219** :715-721.
- MILLER, L.K. Y D.R. O'REILLY. 1991. *USA patent WO 91/00014*.
- MILLER, E.S., G.C. SHIH, S.K. CHANG Y D.N. BALLARD. 1997. *An E. coli B mutation, rpoB5081, that prevents growth of phage T4 strains defective in host DNA degradation*. FEMS Microbiol Lett. **157**:109-116.
- MORRIS, T.D. Y L.K. MILLER. 1992. *Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines*. J. Virol. **66**:7397-405.

- MOSCARDI, F. 1999. *Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera*. Ann. Rev. Entomol. **44**:257-289.
- MURGES, D., A. KREMER Y D. KNEBEL-MÖRS DORF. 1997. *Baculovirus transactivator IE1 is functional in mammalian cells*. J. Gen. Virol. **78**:1507-1510.
- O'REILLY, D.R. Y L.K. MILLER. 1991. *Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene*. Biotechnology. **9**:1086-1089.
- O'REILLY, D.R. 1995. *Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases*. Insect Biochem. Mol. Biol. **25**:541-550.
- O'REILLY, D.R., T.J. KELLY, E.P. MASLER, B.S. THYAGARAJA, R.M. ROBSON, T.C. SHAW Y L.K. MILLER. 1995. *Overexpression of Bombyx mori prothoracicotropic hormone using baculovirus vectors*. Insect Biochem. Mol. Biol. **25**:475-485.
- O'REILLY, D.R., R.S. HAILS Y T.J. KELLY. 1998. *The impact of host developmental status on baculovirus replication*. J. Invertebr. Pathol. **72**:269-275.
- PALOMBO, F., A. MONCIOTTI, A. RECCHIA, R. CORTESE, G. CILIBERTO Y N. LA MONICA. 1998. *Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-adenovirus-associated virus vector*. J. Virol. **72**:5025-5034.
- PRIKHOD'KO, G.G., M. ROBSON, J.W. WARMKE, C.J. COHEN, M.M. SMITH, P. WANG, V. WARREN, G. KACZOROWSKI, L.H.T. V. D. PLOEG Y L.K. MILLER. 1996. *Properties of three baculoviruses expressing genes that encode insect-selective toxins: micro-Aga-IV, As II y Sh I*. Biol. Contr.: theory and applications in pest management **7**:236-244.
- PRIKHOD'KO, G.G., H.J.R. POPHAM, T.J. FELGETTO, D.A. OSTLIND, V.A. WARREN, M.M. SMITH, V.M. GARSKY, J.W. WARMKE, C.J. COHEN Y L.K. MILLER. 1998. *Effects of simultaneous expression of two sodium channel toxin genes on the properties of baculoviruses as biopesticides*. Biol. Contr.: theory and applications in pest management **12**:66-78.
- RICHARDS, A., M. MATTHEWS Y P. CHRISTIAN. 1998. *Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides*. Annu. Rev. Entomol. **43**:493-517.
- RIDDIFORD, L.M. 1994. *Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I. General considerations and premetamorphic actions*. Advanc. Insect Physiol. **24**:213-274.
- ROELVINK, P.W., CORSARO, B.G. Y R.R. GRANADOS. 1995. *Characterization of the Helicoverpa armigera and Pseudaletia unipuncta granulovirus enhancing genes*. J. Gen. Virol. **76**:2693-2705.
- ROVESTI, L., N.E. CROOK Y D. WINSTANLEY. 2000. *Biological and Biochemical Relationships between the Nucleopolyhedroviruses of Mamestra brassicae and Heliothis armigera*. J. Invertebr. Pathol. **75**:2-8.
- SHOJI, I., H. AIZAKI, H. TANI, K. ISHII, T. CHIBA, I. SAITO, T. MIYAMURA Y Y. MATSUURA. 1997. *Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors*. J. Gen. Virol. **78**:2657-2664.
- SMITH, G.E., M.D. SUMMERS Y M.J. FRASER. 1983. *Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector*. Mol. Cell. Biol. **3**:2156-2165.

- STEINHAUS, E.A. 1957. *New records of insect-viruses diseases*. Hilgardia. **26**:417-430.
- STEWART, L.M., M. HIRST, M. LÓPEZ FERBER, A.T. MERRYWEATHER, P.J. CAYLEY Y R.D. POSSEE. 1991 a. *Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene*. Nature (London). **352**:85-88.
- STEWART, L.M.D., M. LÓPEZ FERBER, P.J. CAYLEY Y R.D. POSSEE. 1991 b. *UK patent 9106185.3*.
- STODDART, P.J. 1980. Ph.D. Thesis. University of California, Berkeley.
- TANADA, Y., M. HIMENO Y E.M. OMI. 1973. *Isolation of a factor, from the capsule of a granulosis virus, synergistic for a nuclear-polyhedrosis virus of the armyworm*. J. Invertebr. Pathol. **21**:31-40.
- TANADA, Y. 1985. *A synopsis of studies on the synergistic property of an insect baculovirus: a tribute to Edward A. Steinhaus*. J. Invertebr. Pathol. **45**:125-138.
- THIEM, S.M., X. DU, M.E. QUENTIN Y M.M. BERNER. 1996. *Identification of baculovirus gene that promotes Autographa californica nuclear polyhedrosis virus replication in a nonpermissive insect cell line*. J. Virol. **70**:2221-2229.
- TOMALSKI, M.D., R. KUTNEY, W.A. BRUCE, M.R. BROWN, M. BLUM Y J. TRAVIS. 1989. *Purification and characterization of insect toxins derived from the mite, Pyemotes tritici*. Toxicon **27**:1151-1167.
- TOMALSKI, M.D. Y L.K. MILLER. 1991. *Insect paralysis by baculovirus-mediated expression of a mite neurotoxin gene*. Nature (London). **352**:82-85.
- TOMALSKI, M.D. Y L.K. MILLER. 1992. *Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides*. Biotechnology **10**:545-549.
- VAN BEEK, N.A.M. Y P.R. HUGHES. 1998. *The response time of insect larvae infected with recombinant baculoviruses*. J. Invertebr. Pathol. **72**:338-347.
- VLAKE, J.M., F.A. KLINKENBERG, K.J.M. ZAAL, M. USMANY, E.C. KLINGE-ROODE, J.B.F. GEERVLIET, J. ROOSIEN Y J.W.M. VAN LENT. 1988. *Functional studies on the p10 gene of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-beta galactosidase fusion gene*. J. Gen. Virol. **69**:765-776.
- WANG, P., HAMMER Y G. R. R. 1994. *Interaction of Trichoplusia ni granulosis virus-encoded enhancer with the midgut epithelium and peritrophic membrane of four lepidopteran insects*. J. Gen. Virol. **75**:1961-1967.
- WASHBURN, J.O., E.H. LYONS, E.J. HAAS-STAPLETON Y L.E. VOLKMAN. 1999. *Multiple nucleocapsid packaging of Autographa californica nucleopolyhedrovirus accelerates the onset of systemic infection in Trichoplusia ni*. J. Virol. **73**:411-416.
- WEYER, U. Y R.D. POSSEE. 1989. *Analysis of the promoter of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus p10 gene*. J. Gen. Virol. **70**:203-208.
- WEYER, U., S. KNIGHT Y R.D. POSSEE. 1990. *Analysis of very late gene expression by Autographa californica nuclear polyhedrosis virus and the further development of multiple expression vectors*. J. Gen. Virol. **71**:1525-1534.
- WOOD, A.H. 1993. *USA patent PCT/US93/03913*.
- WOOD, H.A., P. HUGHES Y A. SHELTON. 1994. *Field studies of the co-occlusion strategy with a genetically altered isolate of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Environ. Entomol. **23**:211-219.

- 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 y diseases of plants*. CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida.
- YOUNG, S.Y. Y W.C. YEARIAN. 1979. *Soil application of Pseudoplusia NPV : persistence and incidence of infection in soybean looper caged on soybean*. Environ. Entomol. **8**:860-864.
- 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, New York.
- ZILBERBERG, N., D. GORDON, M. PELHATE, M.E. ADAMS, T.M. NORRIS, E. ZLOTKIN Y M. GUREVITZ. 1996. *Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin*. Biochemistry. **35**:10215-10222.
- ZLOTKIN, E. 1983. *Insect selective toxins derived from scorpion venoms: an approach to insect neuropharmacology*. Insect Biochem. **13**:219-236.
- ZLOTKIN, E. 1999. *The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides*. Ann. Rev. Entomol. **44**:429-455.
- ZLOTKIN, E., F. MIRANDA, C. KUPEYAN Y S. LISSITZKY. 1971. *A new toxic protein in the venom of the scorpion Androctonus australis Hector*. Toxicon. **9**:9-13.
- ZLOTKIN, E., L. FISHMAN Y J.P. SHAPIRO. 1992. *Oral toxicity to flesh flies of a neurotoxic polypeptide*. Arch. Insect Biochem. Physiol. **21**:41-52.
- ZLOTKIN, E., A.L. DEVONSHIRE Y J.W. WARMKE. 1999. *The pharmacological flexibility of the insect voltage gated sodium channel: toxicity of AaIT to knockdown resistant (kdr) flies*. Insect Biochem. Mol. Biol. **29**:849-853.
- ZOOG, S.J., J. BERTIN Y P.D. FRIESEN. 1999. *Caspase inhibition by baculovirus P35 requires interaction between the reactive site loop y the beta-sheet core*. J. Biol. Chem. **274**:25995-26002.