

Control de insectos plaga mediante los baculovirus

ANDY CHERRY Y TREVOR WILLIAMS

1. Introducción	391
1.1. Mercado internacional de los bioplaguicidas	391
1.2. Diferencias regionales en el uso de los baculovirus	394
1.3. Enfoque del capítulo	396
2. Estrategias de utilización de los baculovirus	396
2.1. Control biológico clásico	396
2.2. Reintroducciones periódicas	397
2.3. Manipulación del hábitat	397
2.4. Uso inundativo: los bioinsecticidas	399
3. Ejemplos del uso de los baculovirus como bioinsecticidas	400
3.1. Plagas de cultivos anuales	401
3.1.1. <i>Anticarsia gemmatilis</i>	401
3.1.2. <i>Helicoverpa</i> y <i>Heliothis</i> spp.	403
3.1.3. <i>Spodoptera littoralis</i>	404
3.1.4. <i>Spodoptera exigua</i>	408
3.2. Plagas de huertas	411
3.2.1. La palomilla de la manzana, <i>Cydia pomonella</i>	411
3.3. Plagas forestales	414
3.3.1. La palomilla gitana, <i>Lymantria dispar</i>	414
3.3.2. <i>Orgyia pseudotsugata</i>	419
3.3.3. Los tentredínidos	420
3.3.3.1. <i>Neodiprion sertifer</i>	420
3.3.3.2. <i>Neodiprion lecontei</i>	422

3.4. Plagas de productos almacenados	422
3.4.1. La palomilla de la India, <i>Plodia interpunctella</i>	423
4. Limitaciones en el desarrollo comercial de los bioplaguicidas	424
4.1. El paradigma químico	424
4.2. Especificidad	425
4.3. Lentitud para matar	426
4.4. Una escala apropiada de producción	426
4.5. Problemas de comercialización	427
4.6. Registro de los bioplaguicidas	429
5. Conclusiones	431
6. Agradecimientos	432
7. Bibliografía	432

1. Introducción

Aunque los chinos en el siglo VII a.C. ya conocían las enfermedades del gusano de la seda, no se reconoció el concepto de insecticida microbiano hasta la segunda parte del siglo XIX cuando el ruso, Metchnikoff (1879) demostró el potencial del uso del hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de un curculiónido plaga del trigo; un concepto posteriormente probado en campo a gran escala por Krassilshchik (1888). En cambio, el potencial de los baculovirus para el control de insectos defoliadores no fue reconocido hasta el principio de la década de los años cuarenta (1940's) cuando una infección empezó a diezmar poblaciones del tentredínido exótico, *Gilpinia (Diprion) hercyniae*, en Canadá con resultados notables (CAMERON, 1973).

Como disciplina propia, el estudio de la patología de insectos y su aplicación para el control biológico de poblaciones de plagas se inició a finales de la década de los años cuarenta (STEINHAUS, 1949), aunque los avances iniciales más importantes con los baculovirus se produjeron en el laboratorio británico de K. M. Smith durante la siguiente década (SMITH Y WYCKOFF, 1950; SMITH, 1955; SMITH Y RIVERS, 1956). Con los primeros programas de aplicación de baculovirus dirigidos contra insectos forestales en Canadá, F. T. Bird, K. Graham y G. H. Bergold demostraron el potencial de los baculovirus como bioinsecticidas (TANADA Y KAYA, 1993). Por lo tanto, se puede decir que el estudio y aprovechamiento de los baculovirus es una ciencia bastante joven todavía.

1.1. Mercado internacional de los bioplaguicidas

Existe un consenso sobre el valor del mercado mundial de los agroquímicos el cual ha alcanzado aproximadamente 30.000 millones de dólares (US\$) (Tabla 1), siendo la tasa de crecimiento de este mercado de alrededor del 1-3% por año (MENN, 1996; PANUPS, 1997). Los insecticidas representan cerca de una cuarta parte de la venta global de agroquímicos (Figura 1). En cambio, existe bastante desacuerdo sobre el valor del mercado de los bioplaguicidas en el cual *Bacillus thuringiensis* (Bt) representa el principal producto. Algunas estimaciones llegan a proponer unos US\$380 millones por año, debido a tres factores: (i) la venta de bioplaguicidas ha crecido marcadamente durante la década de los años 1990 (~10% anual) y muchas empresas nuevas han entrado al mercado con nuevos productos (ii) la competencia intensa en la venta de Bt ha disminuido los precios provocando un incremento en las ventas pero su valor total se ha quedado estático, (iii) se vende el Bt en pocos mercados, sobre todo para el control de insectos de algodón, coles y forestales ya que fluctuaciones estacionales en las poblaciones de plagas de estos cultivos pueden afectar marcadamente la venta de un año a otro (LISANSKY, 1997). En realidad, un valor entre US\$110 y 130 millones por año para el año 2000 parece lo más correcto, aunque los virus bioinsecticidas sólo representan alrededor del 5% de esta venta (GEORGIS, 1997) (Tabla 1). Todos los bioinsecticidas basados en virus que se encuentran en fase comercial actualmente, son productos de empresas pequeñas o medianas, o bien son producidos por los mis-

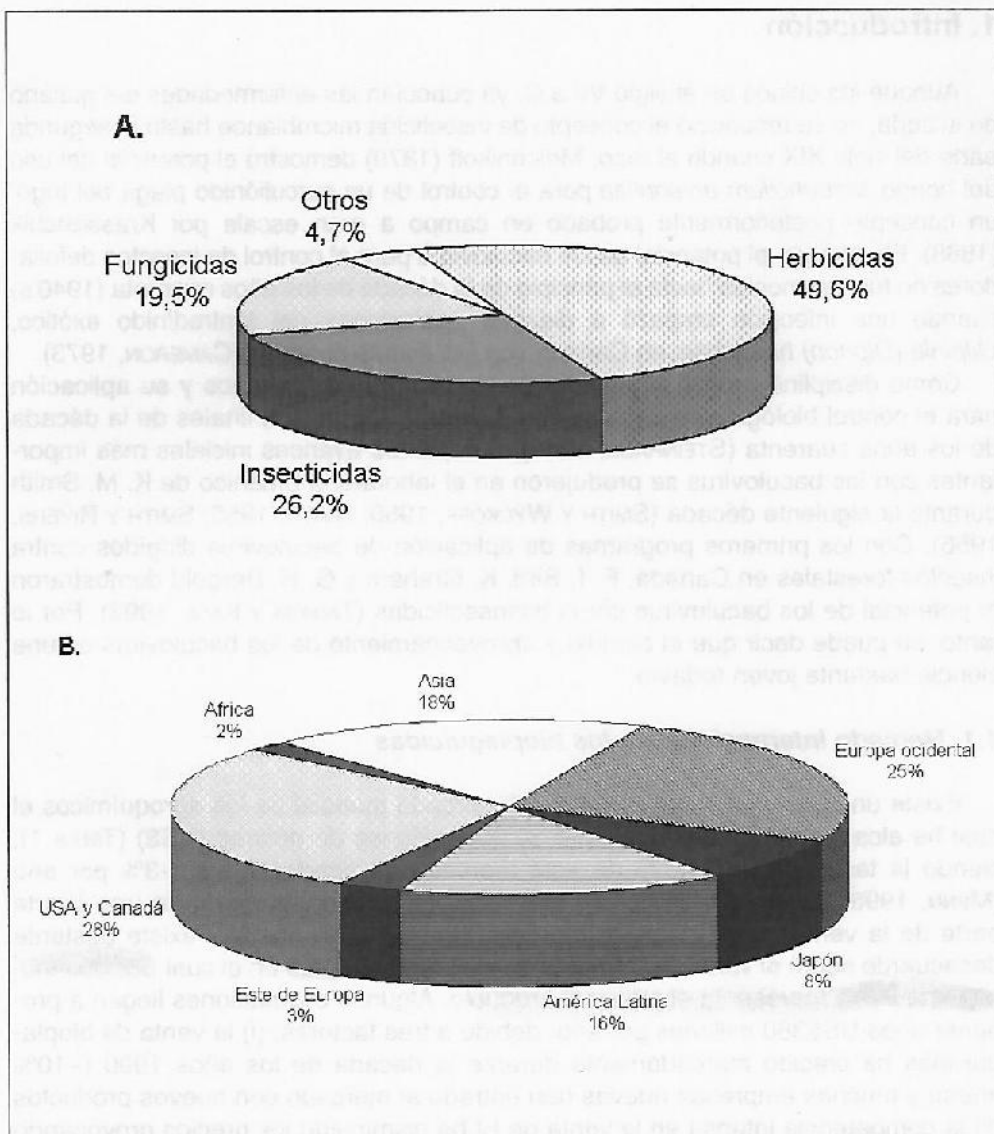


Figura 1. Venta global de agroquímicos 1999 (A) por categoría y (B) por región (Wood MACKENZIE y IVA, Alemania).

Tabla 1. Estimaciones de la venta global de agroquímicos, plaguicidas y bioplaguicidas durante los últimos 10 a 20 años.

Venta Global	Año	Valor en Millones de US\$	Fuente	Citado por
Agroquímicos ¹	1985	16.000	Wood Mackenzie (1986)	Jutsum (1988)
	1991	26.800	Agrow 162 (1992)	Rodgers (1993)
	1991	27.000	-	Powell y Rhodes (1994)
	1995	29.000	Menn (1997)	Menn y Hall (1999)
	1996	31.250	British Agrochemical Assn. (1997)	PANUPS (1997)
	1997	25.000	-	Waage (1997)
	1998	29.000	Wood Mackenzie (1999)	Agrow (2000)
	1999	27.200	IVA, Alemania	Agrow (2000)
	1999	29.800	Wood Mackenzie (2000)	Agrow (2000)
	1999	29.699	European Crop Protec. Assn.	Agrow (2000)
	1999	30.070	Allan Woodburn Assoc.	Agrow (2000)
Insecticidas	1985	5.000	Wood Mackenzie (1986)	Jutsum (1988)
	1995	8000	Wood Mackenzie (1995)	Georgis (1997)
	1999	7.755	Wood Mackenzie (2000)	Agrow (2000)
Bioplaguicidas	finales 1960's - finales 1980's	20-25	-	Lisansky (1997)
	1989-1992	45-60	-	Lisansky (1997)
	1985	125	-	Jutsum (1988)
	1990	120	Agrow 162 (1992)	Rodgers (1993)
	1995	380	Wood Mackenzie (1995)	Georgis (1997)
	1995	380	Menn (1997)	Menn y Hall (1999)
	1997	75	-	Lisansky (1997)
	1998	120	Wood Mackenzie (1999)	-
	2000	120-130 ²	-	Lisansky (1997)
Insecticidas microbianos	1991	57-71	Wood Mackenzie (1995) BioSciences Securities (1996) Thermo Trilogy (datos particulares)	Georgis (1997)
	1995	103-119	idem	Georgis (1997)
	2000	116-141 ²	idem	Georgis (1997)
Virus bioinsecticidas	1995	3-4	idem	Georgis (1997)
	2000			
	5-6 ²	idem	Georgis (1997)	

¹ Todos tipos de plaguicidas (herbicidas, fungicidas, nematocidas, insecticidas, etc.).² Valores pronosticados¹.

mos usuarios, como es el caso del servicio forestal del USDA (Tabla 2). Además, la proporción del mercado ocupado por los baculovirus puede ser reducida por la introducción de una nueva generación de bioinsecticidas macrolidos producidos por fermentación, llamados spinosinas de Dow Agrosciences (THOMPSON *et al.*, 1997; THOMPSON Y HUTCHINS, 1999).

1.2. Diferencias regionales en el uso de los baculovirus

El uso de los virus bioinsecticidas en las regiones templadas de Europa, Estados Unidos y Canadá con sistemas de producción intensiva está limitado actualmente al control de plagas forestales, o a algunos mercados pequeños y especializados. Aunque los gobiernos de estas regiones recomiendan una reducción en el uso de los agroquímicos no han invertido recursos públicos suficientes para la investigación y el desarrollo de medidas de control alternativas. Considerando la falta de promoción por los gobiernos, el uso de los bioplaguicidas probablemente no va a cambiar en un futuro próximo. En cambio, la situación en los países en vías de desarrollo se ve un poco mejor. Es más, se destaca el programa brasileño de control de *Anticarsia gemmatilis* en soja por su gran éxito ya sostenido durante más que una década (MOSCARDI, 1999).

Según Entwistle (1998), de los 45 baculovirus¹ que están siendo investigados en Europa, Norte América, Australia y Japón, actualmente ocho virus (18%) se encuentran en venta, mientras que de los 74 ejemplos listados para los continentes menos desarrollados del mundo, 22 virus (30%) se encuentran en venta (aunque estas cifras pueden incluir ejemplos del mismo virus en venta en diferentes continentes, por ejemplo el nucleopoliedrovirus [NPV] de *Helicoverpa armigera*), sobre todo en la antigua Unión Soviética. La lista de Entwistle (1998) es una estimación conservadora ya que no considera la venta de los productos basados en baculovirus producidos a nivel artesanal. Por ejemplo, en la India existen aproximadamente 77 proveedores² de bioplaguicidas incluyendo instituciones gubernamentales, universidades y pequeñas empresas privadas (GRZYWACZ Y WARBURTON, 1999). Agregando los cuatro virus (HaNPV, SeNPV, SINPV y CiGV) producidos en la India y los dos producidos en Tailandia a los ejemplos señalados por Entwistle (1998), se obtiene un cifra de 28 virus (ó 38% de comercialización); la diferencia en el grado de comercialización de estos productos en el mundo menos desarrollado comparado con los países de Europa, Norte América, Australia y Japón es altamente significativa ($\chi^2=5,31$, g.l.=1, $P<0,02$). A continuación intentamos señalar

1 Únicamente se incluyen los ejemplos de baculovirus (NPV y GV), no de los otros tipos de virus entomopatógenos de insectos mencionados por Entwistle (1998).

2 Muchos de los proveedores en la India ofrecen un rango amplio de productos biológicos que incluye el nim, BI, hongos entomopatógenos y diferentes baculovirus, incluso varios de ellos tienen páginas electrónicas en el Internet. Por ejemplo: <http://www.ajaybio.com/prodhpv.htm>

Tabla 2. Ejemplos de bioinsecticidas comerciales basados en baculovirus¹.

Insecto	Virus	Cultivo	Nombre Comercial	País
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	Manzana	Capex 2	Suiza
<i>Anticarsia gemmatilis</i>	NPV	Soja	Baculoviron	Brasil
			Protege	
			Coopervirus	
<i>Autographa californica</i> ²	NPV	Brocoli, algodón, tomate, etc.	Baculovirus Nitral	Guatemala
			VPN-80	USA
<i>Cydia pomonella</i>	GV	Manzana, Pera	Gusano	Unión Europea
			Carpovirusine	
			Granupom	
			Madex	
<i>Erinnyis ello</i>	GV	Casava	UCB 87	USA
			?	Brasil
<i>Helicoverpa zea</i> y <i>H. virescens</i>	NPV	Algodón	Eicar	Venezuela
			GemStar LC	USA
<i>Helicoverpa armigera</i>	NPV	Algodón, tomate	Viron H	
			Helickill	India
			Biovirus	
			Helivax-NPV	
			Helinash LC	
			Bio-V2	Tailandia
			Ness-A	
<i>Lymantria dispar</i>	NPV	Forestales	?	China
			Gypcheck	USA
			Disparvirus	Canadá
<i>Mamestra brassicae</i>	NPV	Repollo	Virin-ENSH	Rusia
			Mamestrin	Francia
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	NPV	Forestales	Virin-EKS	Rusia
			TM Biocontrol-1	USA
<i>Phthorimaea operculella</i>	GV	Papas	Virtuss	Canadá
			PTM baculovirus	Perú
				Colombia
				Ecuador
				Bolivia
				Tunisia
				Egipto
<i>Pieris rapae</i>	GV	Repollo	?	China
<i>Plutella xylostella</i>	GV	Repollo	?	China
<i>Spodoptera exigua</i>	NPV	Verduras, cebolla, algodón, etc.	SPOD-X	USA
				Unión Europea
				India
<i>Spodoptera frugiperda</i>	NPV	Maíz	Ness-E	Tailandia
			?	Brasil
<i>Spodoptera littoralis</i>	NPV	Algodón	Spodopterin	Unión Europea
<i>Spodoptera litura</i>	NPV	Verduras, algodón, arroz, etc.	?	China
<i>Spodoptera sunia</i>	NPV	Verduras	VPN 82	Guatemala

¹ Sólo se desglosan productos actualmente disponibles aunque en algunos casos la disponibilidad queda en duda.

² Se vende AcMNPV para el control de varias especies de lepidópteros plaga (*P. xylostella*, *T. ni.*, *Pseudoplusia includens*, etc.) debido a su amplia gama de huéspedes (VAIL *et al.*, 1999).

por qué es así y cuáles son los factores clave para el éxito de programas de control de insectos plaga mediante los bioinsecticidas basados en baculovirus.

1.3. Enfoque del capítulo

Primero, se comparan las diferentes estrategias para el uso de los baculovirus y la estrategia más apropiada por utilizar en las distintas situaciones que se pueden presentar. Después, se revisa una selección de ejemplos de programas de control de insectos plaga de cultivos anuales y de otros hábitats con el fin de señalar en cada caso los factores que contribuyen a alcanzar un control satisfactorio. Posteriormente, se detallan las limitaciones del uso de los baculovirus con énfasis en el manejo de un paradigma adecuado para estos virus. Para terminar, se analizan las perspectivas del futuro de los baculovirus en las diferentes regiones del mundo y la importancia del marco legal en el desarrollo de los bioplaguicidas.

2. Estrategias de utilización de los baculovirus

Generalmente, los baculovirus se utilizan directamente como insecticidas biológicos, mediante aplicaciones inundativas, y en menor proporción mediante otras técnicas. Así por ejemplo, en ciertas situaciones muy específicas, se pueden emplear de manera sutil o sofisticada, aprovechando un reservorio del virus existente en el medio ambiente (KALMAKOFF Y CRAWFORD, 1982; RICHARDS *et al.*, 1999) o mediante la dispersión y transmisión del patógeno a través de la contaminación de insectos adultos que, a su vez, contaminan la superficie de los huevos de su propia progenie y, de esta manera, transmitir la enfermedad (FALCON, 1975; JACKSON *et al.*, 1992; VAIL *et al.*, 1993). A continuación se revisan una selección de diferentes estrategias para el control de insectos plaga a través de los baculovirus.

2.1. Control biológico clásico

Hasta donde sabemos, sólo existe un ejemplo de control biológico clásico por baculovirus, el del tentredínido *Gilpinia hercyniae*. Este insecto es nativo de Europa continental pero fue introducido a Canadá por accidente en 1930, provocando daños muy severos en áreas plantadas con *Picea* spp. (BALCH, 1939). Entre 1934 y 1939 se importaron desde Europa diferentes especies de parasitoides con el objeto de que se establecieran como agentes de control y, aparentemente, junto con ellos se introdujo un NPV. A partir de 1939, el virus se dispersó sobre más de 3 millones de hectáreas del área de infestación del insecto sin ayuda del hombre (BALCH Y BIRD, 1944; BIRD Y ELGREE, 1957). Dos años después el insecto ya no era plaga, aunque el virus no llegó a dispersarse por todo el área de distribución de *G. hercyniae* hasta 1952 y, en algunos casos, fue necesario llevar a cabo introducciones artificiales (BIRD Y BURK, 1961). Este insecto no ha vuelto a tener importancia económica debido al control natural ejercido por el virus y los parasitoides. Sin

embargo, se han observado brotes ocasionales en áreas tratadas con insecticidas para el control de otras plagas, lo cual se ha atribuido a un efecto detrimental sobre las poblaciones de los parasitoides (NEILSON *et al.*, 1971).

G. hercyniae también fue introducido en 1968, por accidente a las plantaciones de *Picea* spp. en Gales, Gran Bretaña, y para 1972 la infestación se había distribuido por un área de 1.800 ha. La ocurrencia de una epizootia natural producida por NPV y la dispersión de la enfermedad mediante la redistribución manual de larvas enfermas, permitió un control satisfactorio de la población del insecto en 1974 (ENTWISTLE, 1976; EVANS Y ENTWISTLE, 1982; ENTWISTLE *et al.*, 1983).

2.2. Reintroducción periódica

Después de liberar a un enemigo natural, a veces es necesario reforzar su población a través de reintroducciones periódicas. Este fue el caso del virus no ocluido del escarabajo rinoceronte (*Oryctes rhinoceros*) en el sudeste de Asia, uno de los mejores ejemplos de control biológico que aprovecha la autodispersión del virus por el huésped infectado. Revisiones detalladas de este caso se presentan en Bedford (1981, 1986) y Hunter-Fujita *et al.* (1998). Sin embargo, este virus ya no se incluye en la familia *Baculoviridae* y no lo consideraremos más aquí.

La introducción temprana de virus sólo es factible como método de control si los cuerpos de inclusión (OBs) persisten en el medio ambiente hasta que la gran mayoría de los insectos se encuentran en estadios susceptibles a la infección. Por ejemplo, la aplicación del NPV de *Pannolis flammea* antes de la eclosión de los huevos resulta en un menor control que cuando la aplicación se realiza una vez que han eclosionado el 95% de los mismos. Esto es debido, aparentemente, a la desactivación de los OBs y a la dilución del inóculo por el crecimiento de follaje nuevo, del cual se alimentan las larvas (CORY Y ENTWISTLE, 1990).

La introducción del virus mediante la contaminación de plántulas de col con una suspensión de NPV dio un 90% de protección contra *Trichoplusia ni* durante 84 días de muestreo (IGNOFFO *et al.*, 1980). Este es un método muy económico de aplicar virus a un cultivo. En contraste, la aplicación de virus directamente al suelo, al inicio del ciclo del cultivo, para controlar infestaciones posteriores de dos plagas de col ha funcionado adecuadamente en Canadá (JAKES, 1970) pero no en los Estados Unidos (BAUGHER Y YENDOL, 1976) ni en Gran Bretaña (PAYNE, 1982).

2.3. Manipulación del hábitat

Los reservorios de virus en el medio ambiente pueden tener gran impacto sobre la dinámica poblacional de un insecto. En Escocia, se observó que una proporción de larvas del segundo y tercer estadios del limántrido *Orgyia antiqua* bajan de los árboles pequeños de pino para alimentarse del brezo inferior. El brezo tiene una alta concentración de nucleopoliedrovirus debido a su situación sombreada que ocupan bajo las ramas de los árboles. Después, las larvas infectadas suben a los árboles y allí mueren transmitiendo la enfermedad a otras larvas sanas llegando a

provocar una epizootia devastadora. Muestras tomadas al siguiente año revelaron la presencia de un gradiente vertical de virus con una alta concentración de OBs en el brezo inferior, debido al lavado del virus por la lluvia de las ramas superiores. En otras plantaciones cercanas, sin la presencia de brezo, se observó una prevalencia muy baja de infección (RICHARDS *et al.*, 1999). La conservación del brezo en las plantaciones de pinos indudablemente contribuye a mantener en bajas densidades las poblaciones de *O. antiqua* durante periodos de varios años.

En la mayoría de los casos, el principal reservorio de virus está en el suelo. Varios estudios han mostrado o sugerido la translocación de virus del suelo hacia las hojas de un cultivo, como una fuente importante de virus para iniciar infecciones en insectos fitófagos. Esto es particularmente cierto sobre todo en insectos que se alimentan de plantas pequeñas o plantas jóvenes cuyas hojas se encuentran cerca del suelo y, debido a ello, se contaminan fácilmente a través del salpicado de la lluvia en el suelo. Ejemplos de lo anterior incluyen el granulovirus de *Pieris rapae* y el nucleopoliedrovirus de *T. ni* en cultivos de *Brassica* spp. (JAQUES, 1974a,b) y los NPV de *Pseudoplusia includens* y *Anticarsia gemmatilis* en soja (YOUNG E YEARIAN, 1979, 1986; FUXA Y RICHTER, 1996). Además, se ha identificado que la concentración del virus en el suelo, durante el invierno, es un factor importante en la prevalencia de la infección en poblaciones de *Spodoptera frugiperda* para el siguiente ciclo de producción (FUXA Y GEAGHAN, 1983). En Nicaragua, los agricultores de maíz a veces ponen suelo en el cogollo del maíz para controlar larvas de *S. frugiperda*, aunque Van Huis (1981) no detectó un efecto significativo de control mediante esta práctica. La persistencia de virus en el suelo ha sido sugerida en la iniciación periódica de epizootias naturales en poblaciones de *Orygia pseudotsugata* en los bosques de América del Norte (THOMPSON *et al.*, 1981; Shepherd *et al.*, 1988). El derribar las larvas de *Colias electo* al suelo mediante el uso de una rama que se arrastra a través de los campos de alfalfa, es suficiente para iniciar una epizootia natural por NPV (POLSON Y TRIPCONEY, 1970).

Los pastizales de Nueva Zelanda sufren el ataque de un complejo de especies del género *Wiseana* llamado «Porina», del cual la especie más importante es *Wiseana cervinata* (Lepidoptera: Hepialidae). Las larvas viven en el suelo y cuando se encuentran infectadas por NPV mueren en la superficie del suelo, o muy cerca de ella, que es la zona de alimentación de la plaga. Cuando el pastizal es permanente, la presencia de esta capa de suelo con una alta concentración de virus contribuye a mantener las poblaciones de *Wiseana* por debajo de su umbral económico. En cambio, cuando el pastizal es periódicamente rastreado y sembrado de nuevo, el inóculo superficial de virus se elimina o se diluye permitiendo brotes de *Wiseana* spp. (CRAWFORD Y KALMAKOFF, 1977; FLEMING *et al.*, 1982; KALMAKOFF *et al.*, 1985). El movimiento frecuente de ganado desde pastizales viejos a los nuevos es suficiente para introducir el virus al nuevo pastizal por medio de las patas de los animales, y de esta manera, prevenir los brotes de la plaga (KALMAKOFF Y CRAWFORD, 1982). La mortalidad por NPV es densidad dependiente y aumentos de la densidad de la plaga pueden dar lugar a que las infecciones por NPV lleguen a afectar al 90% de la población (FLEMING *et al.*, 1986). No obstante,

la importancia de virus como un factor clave en la dinámica poblacional de *Wiseana* spp. ha sido cuestionada (BARLOW *et al.*, 1986).

Indiscutiblemente, los reservorios de virus en el medio ambiente no se han manipulado adecuadamente de cara a explotar su potencial en el control de insectos plaga (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998).

2.4. Uso inundativo: los bioinsecticidas

La inundación del hábitat de la plaga con una alta concentración del patógeno para lograr un alto porcentaje de mortalidad, se basa directamente en el principio del uso de los insecticidas convencionales bajo el supuesto de dar mayor probabilidad de aceptación por parte de los productores. Asimismo, los principales temas relevantes al uso de los bioinsecticidas se relacionan continuamente, en los capítulos de este libro, con el aprovechamiento de las propiedades insecticidas de estos virus:

- (i) Dosis. Evidentemente, la dosis de la aplicación tendrá un efecto importante sobre el grado de control de la plaga y hasta cierto punto afectará el tiempo de su supervivencia, ya que el consumo de una dosis mayor disminuye el tiempo letal de la infección. No obstante, la dosis determina en gran parte el costo de cada aplicación, y por lo tanto, se busca aplicar la dosis más baja de virus que permita lograr un control adecuado.
- (ii) Volumen de la aplicación. El volumen de la aplicación puede tener un efecto importante al llevar el inóculo al sitio de alimentación de la plaga. En general se utilizan mayores volúmenes para las aplicaciones de bioplaguicidas que para insecticidas convencionales (CHAPMAN E IGNOFFO, 1972), aunque las aplicaciones de volumen ultrabajo también han dado buenos resultados (PARNELL *et al.*, 1999). Sin embargo, con volúmenes extremadamente grandes se corre el riesgo de diluir el inóculo y/o de perder el inóculo al escurrir las gotas de la superficie de hojas ya mojadas por la pulverización.
- (iii) Determinación del momento propicio de aplicación. Se intenta aplicar los baculovirus en momentos cuando la mayoría de la población plaga se encuentra en los estadios más jóvenes, ya que los estadios tardíos son más resistentes a los baculovirus, y por lo tanto, son más difíciles de controlar.
- (iv) Frecuencia de aplicación. El periodo entre aplicaciones será afectado por la persistencia del inóculo en el cultivo, los hábitos alimenticios, el grado de sincronía en los estadios de desarrollo de la plaga y, hasta cierto punto, por la dosis de virus aplicada. Se ha señalado que en ciertas situaciones las aplicaciones frecuentes de dosis bajas de virus pueden funcionar mejor que dosis elevadas aplicadas menos frecuentemente (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998).
- (v) Formulación. La formulación del virus interactúa con la mayoría de los demás parámetros: dosis, frecuencia y volumen de la aplicación, facilidad de uso, etc. Por lo tanto, no se puede considerar la formulación sin tomar en cuenta todos los otros factores relacionados con el uso del bioinsecticida (se señala la importancia de la formulación con mayor detalle en el Capítulo 10).

- (vi) Aplicación dirigida. La aplicación de virus, ya sea por pulverización o a través de una formulación de gránulos, tiene que llegar al sitio de alimentación de la plaga. Por ello, se debe poner atención en la selección del equipo adecuado, la formulación correcta y el volumen de aplicación más apropiado para lograr este fin.
- (vii) Facilidad de uso. Un producto fácil de preparar en el tanque de pulverización y sencillo de aplicar al cultivo sin necesidad de agregar varios tipos de coadyuvantes, o llevar a cabo diferentes procedimientos de mezclado antes de aplicar, tendrá mayor probabilidad de ser usado correctamente por los productores. La formulación adecuada es crítica en este aspecto.
- (viii) Rapidez de acción. Habitualmente se buscan aislados de virus con altos niveles de virulencia con el fin de reducir el intervalo entre la infección y la muerte de la plaga. Cuanto más rápida sea la muerte, menor será el grado de daño que un insecto pueda ocasionar al cultivo.
- (ix) Especificidad. Los nucleopoliedrovirus de especies de *Spodoptera* y de especies de limántridos, y los granulovirus en general, tienden a ser altamente específicos para una o unas pocas especies de huéspedes. En cambio, el AcMNPV y sus varias cepas (GmMNPV, TnNPV, AfMNPV, etc.) presentan un espectro de huéspedes más amplio y pueden ser empleados para el control de diferentes lepidópteros plaga en sistemas agrícolas (VAIL *et al.*, 1999).
- (x) Persistencia. Se pueden superar problemas de baja persistencia de los baculovirus en las superficies de un cultivo a través de aplicaciones frecuentes o con la incorporación de sustancias fotoprotectoras en la formulación.
- (xi) Seguridad. Por sólo infectar a invertebrados, los baculovirus se consideran entre los patógenos más seguros para el control de insectos plaga. Sin embargo, durante el proceso de control de calidad, es necesario llevar a cabo una evaluación de la presencia de otros microorganismos en las preparaciones de virus, sobre todo para detectar la presencia de posibles patógenos humanos u otros alógenos (sustancias que pueden provocar reacciones alérgicas).
- (xii) Coste. En la gran mayoría de los casos, el coste del control mediante un baculovirus se relaciona con otros métodos de control disponibles para el productor. A este respecto, el coste del control químico es el criterio de comparación de mayor importancia, excepto en situaciones donde la plaga es resistente a la mayoría de los plaguicidas sintéticos o en circunstancias donde se habla de productos orgánicos de mayor valor comercial.

3. Ejemplos del uso de los baculovirus como bioinsecticidas

En esta sección, se demuestra que la verdadera ventaja del uso de los baculovirus ocurre bajo circunstancias específicas en las que es posible aprovechar ciertas características únicas de estos patógenos. Por ejemplo, la habilidad de amplificar y reciclar el inóculo por parte de los productores de soja en Brasil, la alta viru-

lencia y transmisión del virus dentro de grupos de tentredínidos gregarios en plantaciones de pinos, o la persistencia del virus en la superficie de productos almacenados evita el desarrollo de poblaciones de un insecto plaga que ha desarrollado resistencia a numerosos insecticidas convencionales. Es importante señalar que el uso inteligente del virus requiere de una comprensión integrada de la biología, ecología y comportamiento del insecto que se desea controlar.

3.1. Plagas de cultivos anuales

3.1.1. *Anticarsia gemmatilis*

La oruga terciopelo de la soja, *Anticarsia gemmatilis*, es el noctuido plaga de mayor importancia en muchas regiones y sobre todo en Brasil (FEDERICI, 1999). El uso del NPV de *A. gemmatilis* (AgNPV), para el control de esta plaga en soja, constituye el mejor ejemplo documentado del uso de un bioinsecticida basado en baculovirus en un cultivo anual. Con base en esta amplia documentación, a continuación se presenta un resumen de los aspectos más destacados; una revisión más completa se encuentra en Moscardi (1989, 1999).

En 1980 el gobierno brasileño estableció un programa piloto para desarrollar el AgNPV y desde entonces mediante pruebas de campo han demostrado su valor como bioinsecticida. De 1989/90 a 1996/97 el AgNPV fue aplicado sobre un millón de hectáreas por ciclo de cultivo alcanzando un máximo de 1,2 millones de hectáreas en 1997/98 aproximadamente. Se ha utilizado también en 100 mil hectáreas de soja en Paraguay y en escala menor en Argentina y los Estados Unidos.

Inicialmente el NPV se aplicó como una preparación cruda, pero desde 1985 se ha utilizado preferentemente una formulación de polvo humectante con base de caolina (MOSCARDI, 1989). La dosis actual de la aplicación es de $1,5 \times 10^{11}$ OB/ha y normalmente una sola aplicación es suficiente para controlar la plaga. Esto se compara con un promedio de 1,8 aplicaciones de insecticida químico por ciclo (MOSCARDI, 1999).

El virus ya es producido por varias empresas privadas bajo un convenio con Embrapa, la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria. El único método de producción del virus es en parcelas de productores de soja; se hace una aplicación del virus a una parcela con buena infestación de *A. gemmatilis* y una colecta posterior de larvas infectadas, las cuales se almacenan en cámaras entre -4 y -8°C hasta su procesamiento y formulación. Se calcula que mediante colectas de campo se pueden cosechar hasta 1,8 kg de larvas infectadas por persona por día con un costo de US\$15; cantidad suficiente para tratar 100 ha de soja. Actualmente se utilizan alrededor de 30 mil hectáreas de soja para la producción de virus (MOSCARDI, 1999). El control de calidad realizado por Embrapa se basa en el número de OBs por gramo de material y su actividad biológica. El producto está registrado ante las autoridades brasileñas.

El éxito del programa brasileño se debe a la combinación única de varios factores: i) previa existencia de un programa exitoso del manejo integrado de plagas (MIP), el cual facilitó la aceptación del virus por parte de los productores, ii) el virus

es altamente virulento de manera que sólo se requiere una dosis baja para controlar la plaga, iii) la dosis baja de aplicación junto con el sistema de producción en campo nos da un producto de menor costo que los insecticidas químicos y al alcance de los agricultores de escasos recursos, iv) el insecto se alimenta de las hojas que fácilmente se contaminan con residuos del NPV, v) normalmente es la única especie plaga de importancia económica presente en el cultivo, vi) el cultivo puede tolerar niveles considerables de defoliación sin pérdida de rendimiento y, finalmente, vii) el apoyo gubernamental, mediante extensionistas y vinculación con los productores, ha sido fundamental para el desarrollo del programa y su aceptación por parte de los agricultores (MOSCARDI, 1999).

No obstante, se reconoce que la demanda de virus es del orden de los cuatro millones de hectáreas en Brasil, es decir aproximadamente cuatro veces más que el área actualmente tratada. Esto representa alrededor del 35% del área sembrada con soja en Brasil y requeriría una producción de 80 toneladas de larvas infectadas por año. Para alcanzar tales niveles de producción de virus se requiere mejorar las prácticas existentes de producción en campo y laboratorio sin un incremento sustancial en el costo del virus.

El uso extensivo de AgNPV representa una oportunidad única para estudiar la posibilidad de resistencia al virus en poblaciones naturales de este insecto, la cual se consideraba muy poco probable anteriormente. Se han observado varios cambios genéticos del virus, después de una serie de pasos de infección en una cría de laboratorio aunque en campo el virus mantiene una alta virulencia después de diez años de aplicación masiva por los productores (DE OLIVEIRA, 1998).

Estudios con poblaciones de *A. gemmatilis* recolectadas de diferentes regiones de Brasil y con diferentes antecedentes en cuanto a su exposición al NPV indicaron que todas las poblaciones eran altamente susceptibles al virus (ABOT *et al.*, 1995). La posibilidad del desarrollo de resistencia en insectos expuestos a una presión continua de virus ha sido demostrada en laboratorio. Con una exposición a la CL_{80} del AgNPV, las líneas de insectos expuestos rápidamente exhibieron resistencia, a partir de la cuarta generación (F4). La relación de resistencia expresada como la CL_{50} de la población expuesta al virus dividido por la CL_{50} de la población no expuesta al virus incrementó a más de 2.000 para la generación 15 y oscilaba alrededor de 10.000 en las generaciones de 47 a 52 (ver Capítulo 13).

Cuando las líneas resistentes ya no eran expuestas al virus, el grado de resistencia disminuyó dramáticamente, aunque no se alcanzaron los niveles originales de susceptibilidad. Cruces entre individuos resistentes e insectos susceptibles resultaron en la pérdida completa de la resistencia y esto sugiere la existencia de un posible mecanismo que amortigua el desarrollo de la resistencia en las poblaciones de campo y puede representar un argumento importante en favor de la limitación del área total de soja tratada con el virus (MOSCARDI *et al.*, 1999). Por el otro lado, se han observado algunos cambios en la composición genética del virus con el paso del tiempo (MARUNIAK, 1989, 1994), pero no se han detectado cambios en la virulencia del virus obtenido de colectas de campo entre 1979 y 1995 (MOSCARDI, 1999).

3.1.2. *Helicoverpa* y *Heliothis* spp.

El complejo de especies de los géneros *Helicoverpa* y *Heliothis* incluye algunas de las plagas de mayor importancia agrícola del mundo en cultivos anuales tales como el algodón, tabaco, leguminosas y verduras. El control viral ha atraído un marcado interés durante muchos años debido a la susceptibilidad de estas especies a sus baculovirus homólogos y heterólogos. Uno de los casos más documentados en términos del uso operacional en diversos cultivos es el NPV de *Helicoverpa zea* (antes *Heliothis zea*) para el control de *Helicoverpa* y *Heliothis* spp. (IGNOFFO Y COUCH, 1981; HÜBER, 1986; LACEY Y GOETTEL, 1995).

Se han generado varios productos comerciales basados en el HzNPV de los cuales por lo menos tres fueron producidos en los Estados Unidos de América (EUA). En 1975, el primer insecticida viral registrado en los EUA fue Elcar® (de Zeocon (después Sandoz Inc.) pero su producción terminó en 1982. A finales de los años 60 un producto comercial llamado Viron H® (fue producido por la International Minerals and Chemicals Corp., EUA) y en 1996 el GemStar® fue introducido a los EUA por Biosys para su uso en el cultivo de algodón aunque hoy en día es producido por Thermo Trilogy.

En Europa, se ha desarrollado y probado ampliamente el NPV de *Helicoverpa armigera* en el algodón, leguminosas y verduras y se han elaborado varios productos comerciales basados en el HaNPV aunque quizá son menos conocidos que los productos de HzNPV. Por ejemplo, el Virin HS® (es, o fue producido por el gobierno de la antigua Unión Soviética y unos cuantos productores en India y el sudeste de Asia. En la India, el HaNPV es producido y distribuido por numerosas empresas a pequeña escala y también por organizaciones no gubernamentales y grupos de gente en pueblos rurales. Sin embargo, la calidad de estos productos es extremadamente variable, lo cual es motivo de inquietud ya que puede afectar adversamente la aceptación y uso del virus por parte de los agricultores (GRZYWACZ, 1995).

Puesto que el HzNPV es eficaz contra varias especies de *Heliothis* y *Helicoverpa* en algodón, maíz, tabaco, sorgo, soja y tomate (HÜBER, 1986) repetidamente se han probado formulaciones comerciales de este virus, incluyendo el GemStar®, para el control de *H. armigera* en África, Asia y Australia. Sin embargo, durante los años 60 y 70 en Tchad, Botswana y Côte d'Ivoire se demostró que los aislamientos locales de HaNPV eran más efectivos para el control de *H. armigera* en algodón que los productos comerciales basados en HzNPV importados de los Estados Unidos (ANGELINI Y COUILLARD, 1972; ATGER, 1969; CADOU Y SOUBRIER, 1974; ROOME, 1975). La misma plaga también resultó susceptible al NPV del noctuido *Mamestra brassicae* y la formulación comercial francesa Mamestrin® (Natural Plant Protection, Francia) ha mostrado ser eficaz para el control de *H. armigera* en Togo (M. R. GUILLON, comunicación personal). Sin embargo, no se ha implementado la venta y uso del producto. También se ha aislado un granulovirus de *H. armigera* (HaGV) en África del Sur, aunque se ha utilizado poco en programas de evaluación de campo y existe evidencia sugiriendo que el HaGV interfiere con la infección de HzNPV (HACKETT *et al.*, 2000) y el HaNPV (WHITLOCK, 1974, 1977).

La dosis típica utilizada para la aplicación de HaNPV en diversos cultivos incluyendo el algodón es de 1 a $1,5 \times 10^{12}$ OB/ha, aunque se han probado dosis de

hasta un máximo de $2,5 \times 10^{13}$ OB/ha. Normalmente se requieren aplicaciones múltiples. A las dosis más altas el costo de la aplicación se vuelve un factor limitante importante. En cultivos de garbanzo, la aplicación periódica de HaNPV a una dosis de $1,5 \times 10^{12}$ OB/ha durante el periodo de mayor infestación, incrementó el rendimiento del cultivo y dio un nivel de control comparable a las obtenidas con aplicaciones de endosulfán y Bt (CHERRY *et al.*, 2000).

Existe un efecto importante de la planta sobre la actividad del virus. Así por ejemplo, en algodón se han señalado resultados contradictorios acerca de la eficiencia de estos virus en relación con su eficacia en otros cultivos. Para una dosis determinada, el HaNPV asegura un nivel de protección más bajo en algodón en Tailandia y la India (PARNELL *et al.*, 1999) que en cultivos hortícolas (K. A. JONES, Comunicación personal). En un estudio comparativo de la influencia de cinco plantas incluyendo el algodón, girasol, y garbanzo sobre la actividad de HaNPV, se observó que las superficies de las hojas de algodón eran las más detrimentales para el virus, seguido por las de garbanzo (RABINDRA *et al.*, 1994). Esto puede ser debido a la presencia de exudados alcalinos de glándulas presentes en las superficies de las hojas de algodón, los cuales inactivan el virus (ELLEMAN Y ENTWISTLE, 1985). En contraste, los frutos del algodón no afectaron significativamente a la actividad de HaNPV y los mismos autores señalaron que la mortalidad de larvas fue mayor en *Gossypium barbadensis* que en *G. hirsutum*. Por otro lado, Federici (1999) ha señalado que los rendimientos de algodón son equivalentes cuando se trata con un insecticida químico que cuando se hacen aplicaciones de $2,5 \times 10^{11}$ OB/ha para controlar infestaciones moderadas y de $1,125 \times 10^{12}$ OB/ha para el control de infestaciones fuertes.

Los resultados obtenidos en distintos estudios indican que el virus no es tan eficiente, contra *Heliothis* y *Helicoverpa* spp., en otros cultivos como lo es en algodón (IGNOFFO Y COUCH, 1981). El efecto de la formulación puede ser significativo en la comparación de la preparación comercial a base de HzNPV de GemStar® con las preparaciones sencillas de HaNPV. La planta huésped también puede influir en el comportamiento alimenticio del insecto plaga y de esta manera la probabilidad de adquirir una dosis letal del patógeno (KOLODNY-HIRSCH *et al.*, 1997). Asimismo, Rabindra *et al.* (1992) han indicado un efecto de la variedad de garbanzo a la mortalidad de larvas después de la aplicación de HaNPV con mayor mortalidad en variedades susceptibles a *Helicoverpa* que en las variedades resistentes a esta plaga. Este efecto se atribuyó a diferencias en el área de follaje consumido por insectos en cada variedad. Otro factor a tener en cuenta es que las hojas de garbanzo están cubiertas de pelos glandulares los cuales exudan gotas con una alta concentración de ácido málico con un pH de 3,0 o menos (REED *et al.*, 1987). En estudios de laboratorio, se ha demostrado que ocurre una rápida desactivación de NPV de *Heliothis* si la exposición a bajo pH dura más de 24 horas (IGNOFFO Y GARCÍA, 1966).

3.1.3. *Spodoptera littoralis*

A continuación se revisa el uso de un nucleopoliedrovirus para el control de otra plaga importante del algodón en el viejo mundo, la rosquilla negra, *Spodoptera lit-*

toralis (Noctuidae). Este insecto tiene una distribución amplia en África, Medio Oriente y la región del Mediterráneo y se considera una plaga de gran importancia (BROWN Y DEWHURST, 1975).

A diferencia de *Helicoverpa armigera*, que es una plaga críptica que se alimenta dentro de las bolas del algodónero, *S. littoralis* se alimenta de las hojas y por lo tanto representa un blanco más adecuado para el control mediante los baculovirus. Es más, en algodón de riego, la incidencia de *S. littoralis* está íntimamente relacionada con el patrón de emergencia de las nuevas hojas poco después del riego y por lo tanto es posible predecir la incidencia de infestación de esta especie con cierta precisión y así programar las aplicaciones del virus cuando la mayoría de las larvas se encuentren en los primeros estadios de su desarrollo, antes de causar daños significativos al cultivo (JONES, 1995).

A continuación se detalla un programa de largo plazo en Egipto el cual se inició a finales de los años 70 y duró hasta el inicio de los años 90. Dicho programa involucró la Academia Egipcia de Ciencias, el Instituto de Investigación de Protección Vegetal de Egipto (PPRI) y el Instituto de Recursos Naturales (NRI) del Reino Unido y representa un caso bien documentado (CAREY Y HARRAP, 1980; MCKINLEY *et al.*, 1989; JONES *et al.*, 1993, 1994).

Hasta años recientes, el control de esta plaga en Egipto se logró a través de la recolecta y destrucción manual de masas de huevecillos por grupos de niños contratados por los productores de algodón. Posteriormente, esta técnica fue desplazada por la aplicación de insecticidas químicos (TOPPER *et al.*, 1984). La destrucción manual de masas de huevecillos se volvió más costosa y difícil de mantener debido a la escasez de mano de obra y la opinión de ser una práctica inaceptable desde el punto de vista social.

El rápido desarrollo de resistencia a los insecticidas convencionales despertó el interés en métodos alternativos de control. El nucleopoliedrovirus múltiple de *S. littoralis* (SIMNPV) fue aislado inicialmente en larvas recogidas en campo por Abul-Nasr (1956). Sin embargo, el virus no fue purificado y caracterizado hasta 20 años después (HARRAP *et al.*, 1977). Pruebas posteriores de seguridad indicaron que no existía evidencia de efectos nocivos hacia mamíferos (CAREY Y HARRAP, 1980; MCKINLEY, 1980).

Experimentos de campo demostraron el éxito de aplicaciones del virus purificado en formulaciones con coadyuvantes comerciales incluyendo fagoestimulantes, adherentes, fotoprotectores y aceites para el control de *S. littoralis* (TOPPER *et al.*, 1984). Se incluyeron los aceites para determinar si una emulsión de agua y aceite podría proteger los cuerpos de inclusión (OBs) del virus de las condiciones altamente alcalinas de la superficie de las hojas del cultivo (ELLEMAN Y ENTWISTLE, 1982), que pueden inactivar los OBs rápidamente (ELLEMAN Y ENTWISTLE, 1985).

Al principio, se emplearon preparaciones purificadas del SIMNPV aunque después se utilizó una suspensión acuosa de virus liofilizado y finalmente una sencilla pero resistente formulación de polvo humectante con características más adecuadas para su manejo y almacenamiento. También se han evaluado varios adherentes y fotoprotectores como coadyuvantes pero ninguno ha resultado ser más eficaz

que las proteínas y otros restos del cadáver infectado que se encuentran en preparaciones del virus sin purificar. No obstante, a estas preparaciones impuras también se les agregan coadyuvantes para mejorar las características mojantes, de fluidez y la facilidad de resuspender el polvo. La formulación final consistió en 50% del peso de cadáveres infectados liofilizados, 30% de caolín y 20% de sílice sintética (Neosyl), a la cual se absorbió un surfactante (Ecotas 30) al 50% del peso de la sílice (McKINLEY *et al.*, 1989).

Para satisfacer la demanda del programa de experimentos de campo, se estableció una planta de producción del SIMNPV a escala piloto en las instalaciones del PPRI en El Cairo, Egipto. La producción se basó en un sistema estándar en el cual se aplicó el inóculo del virus por pulverización a la superficie de una dieta semisintética en bandejas de plástico. Una reja de aluminio en forma de panal (Aeroweb®, Ciba-Geigy Plastics, Ltd.) fue introducida a la dieta para crear celdas individuales y se introdujo una sola larva de *S. littoralis* en cada una de ellas. Posteriormente, se colocó una tapa de aluminio perforado que permitiera la aireación para evitar al escape de las larvas. Después de varios días de incubación se recogieron las larvas muertas o moribundas las cuales se homogeneizaron y se filtraron a través de tela muselina. La mezcla final se liofilizó para producir un polvo seco estable. Fue necesario almacenar el polvo liofilizado en recipientes de plástico con gel de sílice debido a su naturaleza higroscópica.

La optimización de los parámetros de producción condujo a una producción máxima de $1,2 \times 10^9$ OB/larva cuando se infectó en el tercer estadio (30 a 50 mg de peso) con una dosis de inóculo de 1×10^4 OBs y un periodo de incubación de siete días a 25°C. Fue posible incrementar esta producción a $1,8 \times 10^9$ OB/larva mediante un periodo de cuatro a siete días de incubación a temperaturas de 14-24°C después de cosechar los insectos infectados (GRZYWACZ *et al.*, 1998).

Las larvas de *S. littoralis*, sobre todo en los primeros estadios, prefieren alimentarse de la parte inferior de las hojas nuevas de algodón y por lo tanto fue importante dirigir las aplicaciones del virus hacia esta parte de la planta. Este hábito, motivó el uso de un equipo de aplicación modificado, el cual consistía en una bomba mochila con un aguilón de pulverización modificado en forma de tres V detrás de la persona que lleva la mochila de bomba (Cooper Pegler Ltd., Reino Unido). Las boquillas hidráulicas montadas sobre el aguilón se apuntaron hacia arriba para dirigir la pulverización al envés de las hojas de la planta mientras que la persona camina a través de la parcela (Figura 2). Un beneficio adicional de esta estrategia es que en la parte inferior de la hoja, el virus se encuentra bien protegido de la radiación UV y bajo estas condiciones el virus persiste más de una semana en campo. En cambio, la persistencia del virus en la parte superior de las hojas es de unas pocas horas (JONES *et al.*, 1993).

Se observó que el virus depositado en la parte superior de la planta a pleno sol no es importante para el control de la plaga. Sin embargo, a pesar de la buena persistencia del virus en la parte inferior de las hojas del cultivo, el crecimiento rápido de éstas conduce a una dilución significativa de la concentración del inóculo depositado, ocasionando la necesidad de aplicaciones a intervalos de un máximo de



Figura 2. Bomba mochila pulverizadora modificada con boquillas apuntando hacia arriba para dirigir la pulverización a las áreas interiores de las hojas del algodón (foto cortesía del NRI, Chatham, Reino Unido).

una semana durante periodos de altas infestaciones (JONES Y MCKINLEY, 1987).

Pruebas de campo en Kafr el Sheikh en el delta del río Nilo (Egipto) indicaron que existía una relación importante entre la dosis de aplicación y el grado de daño al cultivo, ya que una dosis de 5×10^{11} OB/ha no disminuyó el daño comparado con el testigo, mientras que dosis de 1×10^{12} OB/ha o más resultaron en una disminución significativa de la defoliación (JONES *et al.*, 1994). Estas dosis son menores que las empleadas para el control de *Heliothis/Helicoverpa* spp. en algodón. No obstante, cabe señalar que el algodón sembrado en Egipto, llamado Giza '75, puede aguantar hasta un 20% de defoliación al inicio del ciclo sin pérdida significativa en el rendimiento, mientras que el mismo grado de defoliación después de la fructificación puede causar una pérdida sustancial en la cosecha (RUSSEL *et al.*, 1993). Por eso, aunque se disminuyó la defoliación con una dosis de 1×10^{12} OB/ha del virus, no se detectó diferencia significativa en la cosecha (JONES *et al.*, 1994).

No se puede pasar por alto, y en este capítulo se menciona varias veces, la importancia de los procesos de control de calidad en la producción de los baculovirus bioinsecticidas. Como parte del programa en Egipto, suspensiones no purifi-

cadáveres del SIMNPV de $2,1 \times 10^9$ OB/ml fueron regularmente examinadas para detectar la presencia de microorganismos contaminantes, de los cuales se encontraron entre 10^6 y 10^9 bacterias (unidades de formación de colonias) por mililitro (GRZYWACZ *et al.*, 1997). Aun cuando no se encontraron patógenos humanos, la presencia de bacterias en concentraciones importantes hace desagradable el manejo del virus. La alta variabilidad de esta característica indicó que existía la posibilidad de reducir la contaminación media por bacterias a niveles más aceptables. La purificación mediante centrifugación no fue eficiente, además de ser costosa y causar la pérdida de una proporción significativa de los OBs. El problema de la contaminación se resolvió recogiendo las larvas infectadas un poco antes de su muerte porque las bacterias oportunistas proliferan rápidamente en los cadáveres de insectos muertos.

También se ha aislado un granulovirus en poblaciones de *S. littoralis* (SIGV) en Egipto (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1990). Un programa de bioensayos establecido como parte del proceso rutinario de control de calidad permitió la detección de una pérdida en la actividad del NPV en la última fase del proyecto. La causa del problema fue la presencia del SIGV en el inóculo que provocó una reducción importante en la producción del NPV y se tuvo que desechar el virus almacenado. La fuente de contaminación nunca fue identificada aunque se sospechó de medidas fitosanitarias inadecuadas alrededor de la unidad de producción. El impacto de la contaminación fue muy severo debido a una interacción antagonista entre los diferentes virus, lo cual resultó en mayor longevidad de la larva y mayor consumo de alimento con consecuencias graves para las propiedades insecticidas del producto (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1997).

A pesar de su viabilidad técnica y económica, el SINPV no fue comercializado en Egipto debido a varias razones. Faltó un colaborador comercial durante este periodo, lo cual hizo que no se pudiera transferir la tecnología de la producción masiva y comercialización del virus al sector privado. Además, el ataque tardó en el ciclo del cultivo por otras plagas importantes de los algodoneros tales como *Pectinophora gossypiella* (Saunders) y *Earias insulana* (Boisd.), especies no susceptibles al SIMNPV, imponen el uso continuo de plaguicidas químicos. Sin embargo, el virus ha sido comercializado bajo el nombre Spodopterin® por Natural Plant Protection en Francia, con cierto grado de éxito.

3.1.4. *Spodoptera exigua*

Spodoptera exigua (Hübner) es una especie del viejo mundo pero actualmente se encuentra ampliamente distribuida en Europa, Asia, África, Australia y las Américas, más comúnmente en climas cálidos (CAB International, 2000). Es una plaga polífaga de muchos cultivos de invernadero y de campo (KOLODNY-HIRSCH *et al.*, 1997). En el norte de Europa, y principalmente en los invernaderos de los Países Bajos (Holanda), su existencia se debe a una introducción accidental, procedente de América del Norte (HÜBER, 1998).

De esta especie se ha aislado un nucleopoliedrovirus múltiple (SeMNPV) en muchas regiones incluyendo Norte América, Tailandia, Países Bajos, Taiwán, India,

Egipto y Japón (HÜBER, 1998; GELERNTER Y FEDERICI, 1986; BATTU, 1986; TUAN-SHUIJEN *et al.*, 1994; HARA *et al.*, 1995). El virus también se aisló en España donde provoca epizootias naturales en poblaciones de *S. exigua* en cultivos de girasol y hortícolas de invernadero (CABALLERO *et al.*, 1992). Además, se observaron epizootias de SeMNPV causando una mortalidad densidad-dependiente en California, EUA, así como infecciones frecuentes aun durante periodos de baja densidad poblacional (TANADA Y OMI, 1974). Estos aislados son genéticamente distintos pero son una sola especie de virus.

El virus es altamente específico y tiene una alta patogenicidad para el huésped natural. Por ejemplo, una dosis de un sólo cuerpo de inclusión (OB) del aislado SeMNPV-608 provocó un 80% de mortalidad de larvas neonatas mientras que una dosis de 10 OBs resultó en un tiempo medio de supervivencia (ST_{50}) de larvas neonatas de sólo 57 horas (GELERNTER Y FEDERICI, 1986). Asimismo, las DL_{50} 's de un aislado de Taiwán fueron estimados en 4, 23, 57, 1219 y 47,025 OBs para larvas del primero al quinto estadio respectivamente (TUAN-SHUIJEN *et al.*, 1994).

A partir de un aislado de Florida, EUA, se ha desarrollado un producto comercial registrado bajo el nombre de Spod-X® en los Países Bajos, Estados Unidos y Tailandia (SMITS Y VLAK, 1994). El producto se utiliza en los invernaderos de los Países Bajos en cultivos de plantas ornamentales. El Spod-X® fue originalmente desarrollado por la empresa Yoder Bros en Florida y posteriormente a través de una colaboración entre Crop Genetics International y la corporación DuPont. Actualmente el virus es comercializado por la Thermo-Trilogy Corporation de los Estados Unidos (CUNNINGHAM, 1995; KOLODNY-HIRSCH *et al.*, 1997; MOSCARDI, 1999), aunque varios grupos en diferentes partes del mundo también producen el virus con fines no comerciales. Por ejemplo, el Departamento de Agricultura en Bangkok, Tailandia produce inóculo de SeMNPV para distribuirlo a los agricultores quienes lo usan para producir su propio virus que luego aplican en sus parcelas (JONES, 1988; CUNNINGHAM, 1995).

En plagas polífagas tales como *S. exigua* y *H. armigera*, las diferencias en el comportamiento alimenticio y los efectos químicos de la planta huésped pueden influenciar la susceptibilidad de las larvas de una planta a otra. Por lo tanto, esto puede generar resultados diversos en cuanto a la dosis efectiva de aplicación del virus en campo. Por ejemplo, en ensayos de campo realizados en Tailandia, se logró un excelente nivel de control de *S. exigua* en chícharo y uva mediante aplicaciones de $3,1 \times 10^{11}$ a $1,25 \times 10^{12}$ OB/ha en grandes volúmenes de agua (625-1.000 litros/ha) a intervalos de cuatro días³. En cambio, aplicaciones de 5×10^{11} a 6×10^{12} OB/ha ofrecieron protección a col rizada y cebollín pero la eficiencia del tratamiento fue baja. Esto fue debido al comportamiento barrenador de las larvas de *S. exigua* en cebolleta y la estructura de la hoja de la col rizada, la cual ofreció un refugio contra los depósitos de virus, a las larvas durante la mayor parte de su

³ La práctica de aplicar insecticidas a hortalizas a intervalos de tres a cuatro días es normal en Tailandia (U. Ketunuti, Dept. de Agricultura, Bankok, Tailandia, comunicación personal).

desarrollo. Estas características, junto con la baja persistencia del virus en la superficie del cultivo, hizo que muchas larvas escaparan a la infección (KOLODNY-HIRSCH *et al.*, 1997).

En los Países Bajos, una sola aplicación de 1×10^{12} OB/ha de SeMNPV condujo a un 90-100% de control de larvas en crisantemo, un cultivo de invernadero de alto valor (SMITS *et al.*, 1987). Asimismo, en California, Estados Unidos, se ha probado el virus en tomate, pimiento y garbanzo donde una aplicación semanal de $2,5 \times 10^{11}$ a $1,25 \times 10^{12}$ OB/ha resultó en una disminución significativa de daño en comparación con plantas no tratadas (KOLODNY-HIRSCH *et al.*, 1993). Por el contrario, Mascarenhas *et al.* (1996) han señalado un control inadecuado de *S. exigua* en algodón en el sur de los Estados Unidos mediante aplicaciones de Spod-X®. Sin embargo, es posible mejorar la eficiencia del virus en algodón a través de aplicaciones con una bomba con asistencia de aire inclinada para aumentar la penetración de la pulverización en el cultivo (MULROONEY Y SKJOLDAGER, 1997).

Como la mayoría de los baculovirus bioinsecticidas empleados en programas de control, el SeMNPV se produce *in vivo* a través de la aplicación de inóculo a la superficie de dieta semisintética dividida en celdas individuales. La producción de cuerpos de inclusión es alrededor de 1×10^7 OB/mg de larva, un valor normal para las infecciones de NPV en lepidópteros. Comúnmente se emplean dosis de 5×10^5 a 1×10^6 OB/larva para lograr una producción máxima por larva en el intervalo de 9×10^8 a 2×10^9 OB/larva (SMITS, 1987; HUANG Y KAO, 1994; CHERRY *et al.*, 1997).

También existen otros nucleopoliedrovirus que son infectivos para las larvas de *S. exigua*. En Guatemala, Agrícola del Sol vende VPN-82®, un producto casero basado en el NPV de *S. sunia* para el control de *S. sunia* y *S. exigua* en verduras (ESTRADA HURTARTE, 1996). El nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) también muestra infectividad para *S. exigua* (BURGERJON *et al.*, 1975; HÜBER, 1998) aunque en pruebas de campo, no se ha logrado buen control de la plaga con dosis económicamente viables (VAIL *et al.*, 1972; GELERTNER Y FEDERICI, 1986). Asimismo, se ha indicado que los nucleopoliedrovirus de *Mamestra brassicae*, *Agrotis segetum*, y de *Anagrapha falcifera* son infectivos para *S. exigua* en pruebas de laboratorio (BURGERJON *et al.*, 1975; CUNNINGHAM, 1995; GREWEL *et al.*, 1998). Este último se considera una cepa de AcMNPV.

La adición de blanqueadores ópticos a la formulación de los baculovirus, incluso a bajas concentraciones, aumenta la actividad de la preparación viral (HAMM, 1999). Al agregar el blanqueador Blankophor BBH (1%) al AfMNPV se observó un marcado incremento en la actividad de este virus en larvas de *S. exigua* y se propuso como un posible agente de control en campo (GREWEL *et al.*, 1998). De igual manera, la DL₅₀ de Spod-X® disminuye desde 47 OB/cm² de dieta hasta 3,8 OB/cm² de dieta cuando el virus se mezcla con Tinopal LPW al 0,25% (peso/vol.) (HAMM Y CHANDLER, 1996).

Aunque el SeMNPV es uno de los pocos baculovirus de los cuales se ha secuenciado el genoma por completo (LJEKEL *et al.*, 1999), la literatura ofrece poca evidencia de la ingeniería genética de SeMNPV con el propósito de mejorar su actividad, quizás se deba a la alta especificidad de este virus, la ausencia de líneas

celulares adecuadas para la replicación *in vitro*, la susceptibilidad de larvas de *S. exigua* al AcMNPV recombinante (BISHOP *et al.*, 1988; POSSEE *et al.*, 1990) y al hecho de que el SeMNPV ya tiene muy alta actividad natural hacia los primeros estadios de *S. exigua*.

Los baculovirus se pueden emplear en combinación con otros agentes de control biológicos y químicos ya que son candidatos ideales para programas de manejo integrado de plagas. Por ejemplo, el SeMNPV fue más efectivo en el control de *S. exigua* en soja cuando se aplicó en combinación con el nematodo *Steinernema carpocapsae* que cuando los dos agentes se aplicaron por separado (GOTHAMA *et al.*, 1996). Puesto que no existe evidencia de resistencia cruzada entre los baculovirus y los plaguicidas químicos, se pueden hacer aplicaciones periódicas de un baculovirus como medio para reducir la presión de selección por resistencia hacia los productos químicos. En este sentido, Chaufaux y Ferron (1986) han señalado que poblaciones de *S. exigua* resistentes a piretroides en Guatemala tienen una susceptibilidad al SeMNPV igual o mayor que la de las poblaciones no resistentes.

3.2. Plagas de Huertas

Los huertos de árboles frutales representan hábitats bastante estables, un caso intermedio entre los hábitats efímeros de los cultivos anuales y las más estables de los bosques. La estabilidad de un hábitat favorece la acumulación de los OBs en el medio ambiente, aumentando la probabilidad de cierto nivel de control de la plaga a mediano plazo (ver Capítulo 6). Por otro lado, el control microbiano de plagas que originan daños directos es problemático porque atacan las partes comerciales de la planta, normalmente a frutas. Así, debido a su bajo umbral económico, una pequeña cantidad de daño tiene un importante impacto en el valor de la cosecha, incluso cuando los daños sean sólo cosméticos. Esta característica es uno de los principales argumentos avanzados para la construcción de virus recombinantes con tiempos de mortalidad cortos.

3.2.1. La palomilla de la manzana, *Cydia pomonella*

La palomilla *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) es una plaga importante en huertas de manzanos, perales y nogales en todo el mundo. Un granulovirus aislado en México (TANADA, 1964) resultó ser uno de los más virulentos baculovirus conocidos con una DL_{50} de menos de 5 OBs para larvas del primer estadio y posiblemente tan bajo como 1,2 OBs/larva (SHEPPARD Y STAIRS, 1976, 1977; ALLAWAY Y PAYNE, 1984; HÜBER, 1986). El espectro de huéspedes de este virus está limitado a otras siete especies de tortricidos, aunque éstas no son habitantes de huertos (CROOK, 1991).

Experimentos de campo en California (FALCON *et al.*, 1968) motivaron estudios en otras partes del mundo, hasta que en 1982 se llevaron a cabo pruebas en 29 huertos de 10 países europeos diferentes (HÜBER, 1986). El control de esta plaga es problemático debido a dos factores: (i) las larvas penetran la fruta pocas horas después de eclosionar por lo que el periodo de oportunidad de infección es muy

Tabla 3. Productos a base de granulovirus de *C. pomonella* registrados comercialmente (SHAH Y GOETTEL, 1999).

Nombre comercial	Empresa	Disponible en
Madex	Andermatt Biocontrol AG	Suiza, Alemania, España
CYD-X ¹	Thermo Trilogy Corp.	Estados Unidos
Granupom	AgrEvo GmbH	Alemania, Suiza
Carpovirusine	Natural Plant Protection (NPP) (Sumitomo/Calliope)	Francia
Virin GYaP ²	Gubernamental	ex-Unión Soviética

¹ Aparentemente CYD-X no está en venta en los Estados Unidos.

² Producción y disponibilidad actual desconocida.

breve ya que sólo consumen una mínima parte de la superficie de la fruta al penetrarla, (ii) el cultivo es de un valor comercial muy alto y cualquier daño cosmético afecta el valor de la cosecha. Para controlar infestaciones de *C. pomonella* en climas cálidos son necesarias hasta 10 aplicaciones de diferentes insecticidas por temporada. Esto elimina los enemigos naturales dentro de la huerta y provoca problemas de brotes de plagas secundarias tal como el ácaro conocido como "araña roja", *Panonychus ulmi*, y el áfido *Eriosoma lanigerum* (DICKLER Y HUBER, 1983; GLEN Y PHILLIPS, 1984, GLEN *et al.*, 1984).

Un factor limitante en los trabajos experimentales es la disponibilidad de suficiente cantidad de virus. Las larvas de *C. pomonella* son pequeñas y según Hüber (1986) para tratar una huerta típica se requieren aproximadamente 10 mil larvas infectadas. En 1980, Sandoz Inc. inició la producción de un producto experimental llamado "SAN 406 I" y a pesar de obtener resultados prometedores durante dos años en Europa y los Estados Unidos, esta compañía decidió abandonar todo su programa de investigación con los virus de insectos. No obstante, la demanda por parte de los productores y el público preocupado por residuos químicos en los alimentos ha animado a diferentes empresas a producir el virus comercialmente (Tabla 3). En Polonia y Rusia se produce el virus bajo el nombre Virin-GYaP®, con una recomendación de una a tres aplicaciones de 9×10^{11} OB/ha al inicio y al final de la eclosión de los huevos de *C. pomonella* (LIPA, 1998).

Debido al corto intervalo entre eclosión y penetración de la fruta, se recomienda un programa de seguimiento de la presencia de adultos mediante trampas de luz o de feromonas. Aplicaciones sincronizadas con la presencia de adultos han funcionado muy bien. Pruebas en los Países Bajos (Holanda) con Granusaf®, un producto Alemán producido por Hoechst AG (ahora llamado Granupom® de AgrEvo GmbH) demostró que el control de esta plaga con el virus es comparable con el obtenido con insecticidas químicos. También fue posible integrar el uso del granulovirus con aplicaciones de fungicidas (HELSEN *et al.*, 1992). Ensayos realizados en Italia han confirmado que Granupom y un producto francés llamado Carpvirusine® (Calliope, Natural Plant Protection), fueron tan eficientes como los

insecticidas químicos (PASQUALINI *et al.*, 1994). En Alemania, con cuatro aplicaciones de alto volumen, de 7×10^{10} OB/litro, se obtuvo un 100% de control (Huber y Dickler, 1977). La doble aplicación de 4×10^9 OB/litro disminuyó un 90% la incidencia de daños profundos en las frutas, pero para limitar los daños superficiales, fue necesario aplicar una dosis muy alta, aproximadamente $1,3 \times 10^{11}$ OB/litro (GLEN Y PAYNE, 1984).

En Estados Unidos, una asociación cooperativa de productores y la Universidad de California trabajaron conjuntamente en el desarrollo de un producto basado en granulovirus. Entre 1987 y 1990 se trataron 450 ha de huertas aplicando $2,5 \times 10^{13}$ OB/ha en volúmenes grandes de 950 a 3.800 litros/ha. Se aplicó el virus cada cuatro a siete días durante el periodo de eclosión de huevos. El costo fue alto: US\$62 a 75 por hectárea. En 1990, en California aplicaron el virus 40 productores sobre una área de 200 ha pero los resultados fueron muy variables. La variabilidad fue debida al distinto grado de cobertura de las pulverizaciones y a fallos en la sincronización de las aplicaciones con la eclosión de los huevos del insecto. No obstante, la Universidad de California hizo una solicitud de registro del producto en 1992 bajo el nombre "Specific-T-1" (CUNNINGHAM, 1998). Hasta la fecha no se han publicado detalles del desarrollo de este producto.

Estudios detallados durante varios años en Canadá concuerdan con los obtenidos en Europa. Con dos a cuatro aplicaciones de 200 a 300 ml por árbol de manzana, de una suspensión de 5×10^9 a $1,5 \times 10^{11}$ OBs/litro se obtuvo un buen control de daños profundos pero un control nulo de los daños superficiales. El virus se formuló con leche descremada (0,5%) como protector solar y/o diferentes adherentes comerciales (JAQUES *et al.*, 1987). Después, se llevó a cabo un programa de pruebas con el Carpvirusine® francés, UCB-87® de California y CYD-X® (antes conocido como CpGV-E) y el control convencional mediante aplicaciones de insecticidas organofosforados. La formulación de tanque incluía leche descremada (0,5%) y/o un adherente comercial y a veces azúcar refinado (2,5%) como fagoestimulante. El grado de control con el granulovirus fue igual al observado con los insecticidas sintéticos en algunas pruebas. En Ontario, donde *C. pomonella* tiene dos generaciones por año, son necesarias hasta siete aplicaciones del virus para mantener la incidencia de daño profundo en menos del 4% de las manzanas. En cambio, en Nueva Escocia la plaga tiene una generación por año y sólo son necesarias dos aplicaciones (JAQUES *et al.*, 1994).

En América Latina, los estudios son escasos. En Chile, se ha señalado que mediante aplicaciones de 500 a 800 ml por árbol de una suspensión de 1×10^{11} OBs/litro en huertas de pera y nogal se consigue un nivel de control igual al tratamiento convencional con diazinon (DE OLIVEIRA, 1998). En Argentina, el granulovirus de *C. pomonella* es el único entomopatógeno que está siendo evaluado por la «Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca» y cuyos estudios de laboratorio son prometedores (ALVARADO Y LEUCONA, 1994).

La persistencia del virus en la superficie de las plantas tratadas es baja, con una disminución del 50% de su actividad en 2 ó 3 días después de la aplicación (Jaques *et al.*, 1987) y el uso de fotoprotectores, seleccionados en estudios de laboratorio,

no aumentaron la eficiencia del virus en el campo (AUDEMARD *et al.*, 1983; PAYNE *et al.*, 1985). No existe evidencia de persistencia de un año a otro de cantidades importantes de virus.

La verdadera utilidad del granulovirus de *C. pomonella* es dentro de una estrategia de manejo integrado, donde su alta especificidad permite la actividad de enemigos naturales que contribuyen al control de ésta y otras plagas en las huertas. En Francia, el proceso de producción está altamente automatizado y se ha reducido el costo a US\$11/ha, aunque el producto está en venta en Europa a US\$25/ha. Un desglose de todos los costos de producción del CpGV ha sido publicado recientemente por Guillon (1997).

3.3. Plagas forestales

El uso de baculovirus para el control de plagas forestales se ve favorecido por dos factores. Primero, los bosques representan los hábitats más estables donde el virus permanece en las hojas sombreadas, la corteza y el suelo durante largos periodos. Segundo, los árboles pueden soportar un mayor grado de defoliación que los cultivos anuales y por lo tanto, el intervalo entre la infección y la muerte por virus generalmente no es tan crítico para el control de brotes de insectos forestales plaga.

Algunas de las plagas más importantes a nivel mundial son defoliadores forestales. Afortunadamente, en este tipo de plaga se encuentran destacados ejemplos de grandes éxitos de control biológico con baculovirus. Cabe mencionar que los NPV de los limántridos y los tentredínidos son altamente específicos para sus huéspedes y su uso es particularmente apropiado en hábitats donde la conservación de especies de insectos nativos es de gran importancia y la aplicación de bioinsecticidas de más amplio espectro, como el *B. thuringiensis*, pondría en riesgo a estas especies.

3.3.1. La palomilla gitana, *Lymantria dispar*

La palomilla gitana, *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae), es un importante defoliador de bosques en el centro de Europa, Estados Unidos y Canadá. Al inicio del siglo XX, se publicaron los primeros resultados de experimentos con la enfermedad de marchitez, como era llamado en aquel entonces a la infección por baculovirus, y se concluyó que la enfermedad tenía potencial para el control biológico de esta plaga (REIFF, 1911; GLASER Y CHAPMAN, 1913). Entre 1960 y 1980, el interés en el NPV de *L. dispar* (LdMNPV) se intensificó, estimulado en la segunda mitad de los años 1970 por el programa de investigación, desarrollo y aplicación del USDA, cuyo resultado fue el registro del producto, Gypcheck®.

El registro de un producto incluye varios pasos. En primer lugar, la selección de una cepa, el desarrollo de técnicas estándares para determinar la potencia del producto, y métodos para la producción masiva del virus a bajo costo, siendo el último punto, un factor clave para el éxito del programa. Posteriormente, se requieren pruebas de campo para determinar la manera más adecuada de formular y aplicar el virus.

Debido a la diversidad de cepas de diferentes orígenes geográficos, fue necesario seleccionar la que tuvo mayor actividad para las poblaciones de Estados Unidos. Mediante una serie de bioensayos se identificó una cepa con alta actividad, llamada «Hamden» por el lugar de su aislamiento en Connecticut. Esta cepa actualmente es el ingrediente activo de Gypcheck®. Después, se diseñaron dos técnicas de bioensayo para poder evaluar la calidad del virus producido rutinariamente. La primera utilizó la incorporación del virus en una dieta semisintética para obtener la CL_{50} y la segunda es el método de dosificación en pastilla de dieta para obtener la DL_{50} (LEWIS, 1981). Para minimizar la variabilidad de los bioensayos, se llevaron a cabo los estudios con dos colonias de *L. dispar* originarias de Nueva Jersey y otra de Pennsylvania, las cuales difieren en su susceptibilidad al virus en un factor de tres.

Mediante las técnicas de bioensayo se definió una «unidad de potencia» del producto en términos de nanogramos de producto incorporado por mililitro de dieta que provocan un 50% de mortalidad en larvas del segundo estadio de la colonia «Nueva Jersey». Tal medida de potencia es la información requerida en la etiqueta del producto por parte de la EPA (Agencia de Protección del Medio Ambiente) de los Estados Unidos (LEWIS, 1981).

Inicialmente, se produjo el virus mediante recogida de cadáveres de *L. dispar* en áreas en las que las poblaciones sufren epizootias. Así fue posible recolectar hasta medio litro de cadáveres equivalente a 6×10^{11} OBs, por persona y por hora. Sin embargo, había dos importantes problemas con esta práctica: (i) las colectas de campo consistían en una mezcla de diferentes patógenos, no sólo del NPV, (ii) se recolectaron cadáveres a diferentes tiempos después de la muerte, muchos de los cuales estaban contaminados con niveles importantes de bacterias y hongos saprofitos.

La producción del virus durante todo el año fue posible gracias al desarrollo de una dieta semisintética que a su vez permitió la infección de las larvas por incorporación del NPV a la dieta. Para la producción masiva, se utilizaron larvas del cuarto estadio que se alimentaron con dieta contaminada con 1×10^5 OB/ml. Las larvas infectadas se recolectaron antes de su muerte y produjeron 2×10^9 OB/larva, así que con dos o tres personas era posible criar e infectar suficientes larvas para alcanzar una producción de 10^{14} ó 10^{15} OBs por año. En aquel entonces, se aplicaron 1.250 equivalentes larvales (1×10^{12} OBs) por hectárea con un costo de US\$25 a US\$37, sin incluir los costos de la aplicación. Sin embargo, el resultado de este método era un producto que contenía pelos irritantes y una alta contaminación de bacterias. Para cumplir con el reglamento de la EPA, se centrifugó el virus en un rotor zonal tipo «k» para eliminar la mayor parte de estos contaminantes. Este paso desafortunadamente incrementó el costo del virus a US\$125-US\$150 por hectárea, el cual es demasiado elevado para un producto comercial (LEWIS, 1981).

Unos años después, la EPA acordó que no sería necesaria la centrifugación zonal siempre y cuando el producto cumpliera con las normas de seguridad estipuladas. Se puso mayor énfasis en la disminución de la contaminación microbiana

y se puso a punto el seguimiento de lotes del virus, mediante pruebas de control de calidad y conteos de bacterias aeróbicas y anaeróbicas, esporas, cóliformes y patógenos humanos (*Salmonella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, etc.). Las mejoras en el proceso de producción, la eliminación de la centrifugación zonal y la disminución de la dosis aplicada a 250 equivalentes larvales (5×10^{11} OB/ha) resultaron en un producto cuyo costo fue de US\$12,50 por hectárea a finales de los años 1970.

Finalmente, con el objetivo de cumplir con todos los requisitos de la EPA se modificó el proceso de producción. Se eligió una dieta basada en germen de trigo, se infectaron las larvas con dieta contaminada superficialmente (no con virus incorporado en la dieta), se congelaron las larvas infectadas a los 10 días de haber sido inoculadas, momento en el cual se había producido el 30% de mortalidad, para evitar la proliferación de bacterias y para poder cosechar las larvas frágiles sin perder virus durante el proceso. De esta manera una persona podía cosechar mil larvas infectadas por hora. Se homogeneizaron las larvas y se filtraron con tela organza. El material retenido por la organza fue resuspendido, homogeneizado, lavado y filtrado nuevamente. Los OBs se concentraron a través de un paso de centrifugación convencional, las pastillas obtenidas se secaron en una campana de flujo laminar y luego se molieron para producir un polvo fino (SHAPIRO *et al.*, 1981a,b). De esta manera y con los precios de aquel entonces, se calculó el costo de la producción y purificación en US\$4,40 por hectárea (suponiendo una dosis de 5×10^{11} OB/ha) (SHAPIRO, 1981).

Una doble aplicación aérea de una formulación del virus, a concentración de $1,25 \times 10^{12}$ OB/ha, con el protector solar Orzan al 6%, un fagoestimulante (Pro Mo liquid supplement al 12,5%) y Rhoplex B60A como adherente resultó en una reducción del 80 al 98% en la densidad de las poblaciones, estimada por el conteo del número de masas de huevos en nueve plantaciones de bosque en Maryland, Estados Unidos, aunque no se observaron diferencias en el grado de defoliación entre bloques tratados y no tratados (PONGWAITE *et al.*, 1992).

Antes de 1994, la USDA recomendó el uso de dos aplicaciones de Gypcheck® a 5×10^{11} OB/ha (con 3 días entre aplicaciones) en mezcla de tanque con melazas y lignosulfonato en un volumen de 19 litros. Actualmente, según Cunningham (1998) se recomiendan dos aplicaciones de Gypcheck® a $1,5 \times 10^{12}$ OB/ha en un volumen de 9,4 litros de una sustancia portadora llamada carrier 038 (Abbott Laboratories, Chicago, IL). El costo actual para producir esta cantidad de virus es alrededor de US\$23. Sin embargo, según Webb *et al.* (1999a) una sola aplicación de 1×10^{12} OB/ha en un volumen de 9,5 litros del portador carrier 038 puede ser tan efectivo como dos aplicaciones de 1×10^{12} OB/ha. Este resultado fue confirmado posteriormente aunque la aplicación funcionó mejor en el Oeste de Virginia que en Maryland debido a las condiciones climatológicas en el momento del tratamiento (WEBB *et al.*, 1999b).

El costo de la formulación estándar (US\$8,95/ha) es sustancialmente menor que el costo del carrier 038 (US\$29,58/ha) pero esta diferencia es compensada por la reducción del costo de una sola aplicación aérea posible con la formulación del

carrier 038. El costo total de tales operaciones, incluyendo el virus, la formulación y la aplicación aérea en zonas rurales es de US\$86 para el virus en la formulación estándar aplicado en dos ocasiones comparado con US\$78 para el virus en la formulación de carrier 038 aplicado una sola vez. La diferencia es aún más marcada en zonas urbanas donde se utiliza un helicóptero (WEBB *et al.*, 1999a).

El uso de blanqueadores ópticos con el LdMNPV ha atraído mucha atención y los resultados son muy prometedores (SHAPIRO Y ROBERTSON, 1992; SHAPIRO Y DOUGHERTY, 1994; WEBB *et al.*, 1996, 1999d; THORPE *et al.*, 1999). Es más, la aplicación del blanqueador óptico solo (sin virus), puede potenciar el impacto del virus natural que persiste en el medio ambiente, provocando importantes niveles de control de *L. dispar* (WEBB *et al.*, 1994a,b).

Una formulación de tanque del LdMNPV con melaza, un protector solar (sulfonato sódico de lignino) y un adherente estimuló el consumo del virus y fue 20 veces más potente que el virus en una formulación de polvo humectante. Al agregar el blanqueador óptico, Blankophor BBH a la formulación, se observó una disminución de 214 veces en la DL_{50} . El blanqueador óptico mostró propiedades antialimenticias moderadas, sin embargo, fue posible disminuir dicho efecto a través de la adición de melaza (FARRAR *et al.*, 1995). La formulación de Gypcheck® con Blankophor BBH, resultó en mayor actividad y mucha mayor persistencia (hasta 35 días) del virus aplicado a robles (WEBB *et al.*, 1998).

El NPV de *L. dispar* fue registrado por la EPA en 1978 bajo el nombre Gypcheck®. Desde entonces, hasta la fecha, se han tratado más de 11 mil hectáreas con este producto en los Estados Unidos (CUNNINGHAM, 1998). En Canadá, el registro del virus fue aprobado en 1997 bajo el nombre Disparvirus® (KAUPP *et al.*, 1988; MOSCARDI, 1999). En Canadá, aplicaciones aéreas a 81 bloques de bosque entre 1982 y 1994 resultaron en un total de 1.280 ha tratadas experimentalmente (CUNNINGHAM *et al.*, 1991a,b, 1993; CUNNINGHAM, 1998). Pulverizaciones de Disparvirus® de $2,7 \times 10^{11}$ a $2,2 \times 10^{12}$ OB/ha resultaron en un 47 a 66% de infección (KAUPP *et al.*, 1988), mientras que dos aplicaciones de $1,25 \times 10^{12}$ OB/ha provocaron una reducción en la población plaga de 84 a 92% y una disminución en el grado de defoliación de 82 a 90% en bloques sin tratar a un 14% en bloques de roble rojo tratados con el virus (CUNNINGHAM *et al.*, 1991a,b).

En pruebas de campo, Webb *et al.* (1993) compararon diferentes cepas del LdMNPV con virus producido en cultivo de células, y Gypcheck® con o sin el protector solar Orzan. Una cepa llamada «Abington» mató las larvas más rápidamente que el Gypcheck®, pero la mortalidad total por virus fue igual para las dos cepas. El virus producido *in vitro* mostró menor actividad (62% de mortalidad en larvas recolectadas a los 7 días después de la aplicación) comparado con el producto Gypcheck® (75% de mortalidad) aplicado a la misma concentración. La presencia de Orzan en la formulación no afectó la actividad del virus, posiblemente porque se hicieron las aplicaciones en las ramas inferiores de los árboles de roble, las cuales fueron sombreadas por el dosel superior.

Posteriormente, se comparó la actividad de Gypcheck® aplicado a una dosis de 1×10^{11} OBs/ha en un volumen de 379 litros, con una cepa producida *in vitro* y apli-

cada de la misma manera. Las aplicaciones se llevaron a cabo con una pulverizadora hidráulica montada sobre una camioneta. La actividad del virus producido *in vitro* fue sustancialmente menor que el producto Gypcheck, lo cual fue debido a que el virus *in vitro* tenía cinco veces menos viriones por poliedro que el virus producido en larvas. La incorporación del blanqueador óptico, Blankophor BBH (0.5%) al Gypcheck® incrementó la mortalidad por virus del 65% al 91% (THORPE *et al.*, 1998). Además, se han recomendado aplicaciones hidráulicas terrestres de $2,5 \times 10^{12}$ OB/ha para la protección de los árboles en los jardines de las casas en los Estados Unidos. Aunque la pulverización sólo alcanza los 10 m de altura, esta táctica aprovecha la tendencia de la enfermedad para dispersarse rápidamente en el dosel y lograr un control adecuado (WEBB *et al.*, 1990).

Webb *et al.* (1999c) estudiaron el patrón de infección por LdMNPV y el hongo *Entomophaga malmaiga* en las orillas de una onda expansiva de *L. dispar* invadiendo el sudoeste de Virginia, Estados Unidos. La incidencia de LdMNPV fue mayor en los bloques de bosque con mayor densidad de población huésped. En cambio, la prevalencia del hongo fue similar en áreas de alta y baja densidad del insecto. La mortalidad por virus ocurrió en dos fases, un patrón bimodal, aunque el segundo pico fue reducido debido a la mortalidad causada por hongo en la población huésped. En el siguiente año una epizootia de infección por el hongo diezmo la población y disminuyó sustancialmente la incidencia de infección por LdMNPV. También se ha observado un patrón bimodal en la mortalidad por virus y en la concentración de OBs sobre el follaje de diferentes especies de árboles atacados por *L. dispar* en Massachussets, Estados Unidos (WOODS Y ELKINTON, 1987).

En los países de la antigua Unión Soviética, fábricas gubernamentales producían un NPV para el control de *L. dispar*, llamado «Virin-ENSh®», en una formulación de 1×10^9 OB/ml en 50% glicerina, caolina y agua. Sólo en 1978, se aplicó el Virin-ENSh® en más de 53 mil hectáreas (ORLOVSKAYA, 1980) que es una área inmensa comparada con los tratamientos hechos en los Estados Unidos. Se recomendó la aplicación de 100 ml/ha es decir 1×10^{11} OB/ha contra larvas del segundo y tercer estadios. Esta dosis es 10 veces menor que la empleada por los estadounidenses. La dosis fue reducida aún más para la aplicación a masas de huevos de 2×10^8 a 2×10^9 OB/ha. Mediante análisis del ADN con enzimas de restricción y por diferencias en el espectro de huéspedes, se ha propuesto que el Virin-ENSh® y el Gypcheck® contienen diferentes virus (LIPA, 1998). Además existen diferencias en la relación entre el número de nucleocapsidas por virión y el número de viriones por poliedro entre los dos aislamientos (IGNOFFO *et al.*, 1983). Según Orlovskaya (1989), el virus de Virin-ENSh® fue aislado de *Lymantria salicis* y adaptado por pasos secuenciales a *L. dispar*, hecho que puede explicar las aparentes diferencias entre los dos productos.

En general, la estrategia de uso de Virin-ENSh® ha sido de inoculación de dosis pequeñas o la contaminación de masas de huevos y después esperar hasta que se desarrolle una epizootia de infección a lo largo del tiempo. En 1978, una dosis muy baja de Virin-ENSh® (1×10^6 OBs/ml) se aplicó manualmente sobre masas de huevos de *L. dispar* en 50% de los árboles en plantaciones de álamo. Esta inocu-

lación aparentemente redujo la población de la plaga en un 65% durante 1978, un 96% en 1979 y un 99,5% en 1980 comparado con árboles no tratados. La siguiente aplicación no ocurrió hasta 1982 (YATSENKO, 1984). Esta táctica sólo es viable si el costo de labor humana es extremadamente bajo, como en los países en vías de desarrollo y si el productor del cultivo, en este caso árboles de madera, está dispuesto a soportar las pérdidas en el crecimiento del cultivo durante el intervalo entre aplicación del virus y el desarrollo de la epizootia. No obstante, el tratamiento de masas de huevecillos en los Estados Unidos no controló la población plaga, ni aún temporalmente (CAMPBELL, 1983).

El control de *L. dispar* mediante aplicaciones de NPV es uno de los más importantes ejemplos del uso de estos virus como bioinsecticidas comerciales, tanto en el Occidente con Gypcheck®, como en Europa Oriental con el Virin-ENSh®.

3.3.2. *Orgyia pseudotsugata*

Orgyia pseudotsugata (Lepidoptera: Lymantriidae) es una plaga severa pero esporádica en los Estados Unidos y Canadá. Brotes de esta plaga siempre terminan con una epizootia de NPV, pero cuando esto ocurre ya se han producido serios daños y mortalidad de árboles de abeto (BROOKES *et al.*, 1978). De *O. pseudotsugata* se han aislado dos tipos de NPV: uno simple (SNPV) y el otro múltiple (MNPV) (HUGHES Y ADDISON, 1970). El MNPV es ligeramente más infectivo que el SNPV y por eso fue seleccionado para el desarrollo de un bioinsecticida. Experimentos preliminares de campo, que se iniciaron en 1965 dieron resultados prometedores a una dosis de aplicación de $1,25 \times 10^{11}$ OB/ha (THOMPSON Y MAKSYMUK, 1978).

En 1974, se obtuvo un permiso experimental de la EPA de los Estados Unidos, el cual dio lugar a una intensificación del programa de investigación sobre el virus con estudios de identificación de cepas, definición de una unidad de potencia del virus, pruebas de toxicidad para mamíferos y peces y un programa de tratamiento de áreas grandes de bosques con preparaciones experimentales del virus (STELZER *et al.*, 1975, 1977; MARTIGNONI, 1978; STELZER Y NEISESS, 1978). Los resultados mostraron que se puede lograr del 90 al 97% de control de *O. pseudotsugata* con una aplicación aérea de $2,5 \times 10^{11}$ OB/ha en un volumen de 9,4 litros. La formulación de tanque incluye melaza al 25% y un protector solar, Orzan LS (CUNNINGHAM, 1998). En otras pruebas de campo también se obtuvieron buenos resultados: aplicación terrestre de $2,4 \times 10^{10}$ OBs en un volumen de 4,5 litros por árbol mató al 85% de las larvas en ocho semanas (SHEPHERD *et al.*, 1984), mientras que la aplicación aérea de 1×10^{11} OB/ha con 25% de melaza resultó en una reducción del 95% de la población plaga 35 días después (STELZER *et al.*, 1975). El tratamiento con virus también ofrece excelente protección contra la defoliación. El registro del producto fue aprobado por la EPA en agosto de 1976 bajo el nombre «TM BioControl-1®» (MARTIGNONI, 1999).

Un reto importante en el desarrollo de TM BioControl-1® fue la reducción del costo de producción del virus. *O. pseudotsugata* es una especie univoltina; los huevos pasan por una diápauza obligatoria durante el invierno y el crecimiento de las larvas es relativamente lento. En 1980, el Servicio Forestal de la USDA estableció

una planta de producción del MNPV de *O. pseudotsugata*. La planta fue dividida en 4 partes: (i) una cocina para la preparación de dieta, (ii) el laboratorio de huevos donde ocurre la oviposición y la diapausa de los huevos en refrigeradores durante 4 meses, (iii) el laboratorio de cría donde las larvas se crían en dieta semisintética hasta 4 semanas de edad y (iv) el laboratorio de propagación del virus donde se colectan y se congelan las larvas cuatro semanas después de ser inoculadas con una dosis letal del virus. Para evitar problemas de contaminación accidental, el laboratorio de propagación de virus se encuentra a varios kilómetros de distancia de los laboratorios de cría (MARTIGNONI, 1999).

El número de técnicos y asistentes trabajando en la planta varía entre 5 y 12 con una producción anual suficiente para tratar de 12 a 40 mil hectáreas. Actualmente, el total de material almacenado en los congeladores es suficiente para tratar a aproximadamente 160 mil hectáreas. Alrededor del 66% del costo para producir el virus está relacionado con la colonia del insecto. El procesamiento posterior del material infectado incluye la concentración de OBs por centrifugación, la liofilización, molienda y empaquetado a vacío, todo hecho por una empresa comercial (MARTIGNONI, 1999). El coste de virus a US\$19.60 por hectárea se considera razonable dado el valor de las plantaciones de abeto (CUNNINGHAM, 1998).

Para obviar los problemas de la diapausa asociados con la producción del virus en *O. pseudotsugata*, el Servicio Forestal de Canadá ha producido el virus bajo el nombre «Virtuss®» en larvas de *Orgyia leucostigma*. La producción se inició en 1975 y el registro fue aprobado en 1983. Este producto se ha empleado con éxito en el control de *O. pseudotsuga* en Canadá (OTVOS *et al.*, 1987a,b; CUNNINGHAM, 1988). La dosis recomendada y la formulación con melazas y protector solar son las mismas que las señaladas para TM BioControl-1®.

3.3.3. Los tentredínidos

Los tentredínidos son himenópteros fitófagos cuyas larvas se parecen a las del orden Lepidoptera. Los NPV de tentredínidos son altamente específicos para sus huéspedes y a diferencia de la mayoría de los NPV, sólo infectan las células del epitelio del intestino medio, de tal manera que la alimentación de la larva se detiene mucho antes de la muerte del insecto.

Muchas de las especies de importancia económica son gregarias y esto favorece el desarrollo de epizootias por virus. Un individuo infectado excreta grandes cantidades de virus en sus heces o en el líquido regurgitado como una acción defensiva que puede contaminar el follaje en el cual sus conespecíficos se encuentran alimentándose. De esta manera la enfermedad se transmite rápidamente dentro de cada grupo. Se puede aprovechar esta característica para el control de estas plagas, ya que la aplicación de dosis bajas de virus son suficientes para iniciar una epizootia generalizada (CUNNINGHAM Y ENTWISTLE, 1981).

3.3.3.1. *Neodiprion sertifer*

El tentredínido europeo del pino, *Neodiprion sertifer*, es una plaga exótica de importancia ocasional en los Estados Unidos y Canadá, pero es endémica y está

muy dispersa en Europa. En 1983, fue registrado un NVP con el nombre «Neochek-S®» para el control de *N. sertifer*, pero su registro no fue renovado debido su escaso uso en los Estados Unidos. Entre 1976 y 1987 el virus se aplicó a sólo 258 ha en los Estados Unidos y entre 1975 y 1993 se trataron 152 ha con el virus en Canadá (CUNNINGHAM, 1998). Sin embargo, una nueva solicitud de registro del producto bajo el nombre «Sertifervirus®» se encuentra en trámite en Canadá y mientras el USDA recomienda la aplicación terrestre de $2,5 \times 10^9$ OB/ha en un volumen de 187 litros/ha (PODGWAITE *et al.*, 1984), el Servicio Forestal de Canadá recomienda 5×10^9 OB/ha en 9,4 litros/ha en aplicación aérea o en 20 litros/ha en aplicación terrestre (CUNNINGHAM, 1998).

En Europa Central y la ex-Unión Soviética, el uso del producto «Virin-Diprion®» a una dosis de entre 1×10^5 y $1,5 \times 10^{12}$ OB/ha en volúmenes de 10 a 80 litros/ha resultó en 88 al 100% de control (KULIKOVSKII, 1984; Lipa, 1998). La aplicación del NsNPV en 100 ml/ha del producto británico «Virox®» resultó en 100% de mortalidad de las larvas tratadas en Polonia (GLOWACKA-PILOT *et al.*, 1987). En experimentos en Italia se compararon los productos Neochek-S® y Virox®; los dos ofrecieron buen control, aunque el Virox® mató a las larvas más rápidamente (Baronio *et al.*, 1987). En Suecia, se encontraron 1×10^5 OB/ml de suelo un año después de una aplicación de virus comparado con 7×10^2 OB/ml de suelo a los 9 años después de una epizootia (OLOFSSON, 1988a). Sin embargo, el virus no persistió ni se dispersó suficiente para mantener el control de brotes de *N. sertifer* (OLOFSSON, 1988b).

El uso de químicos inorgánicos como el fluoruro de sodio o sulfato de cobre al 0,05-0,1% aumenta la actividad del virus y disminuye el tiempo letal aún durante condiciones climatológicas desfavorables (WELLENSTEIN, 1973; LUHL, 1974). Estrés ambiental, tal como la lluvia ácida, también puede disminuir la susceptibilidad de larvas de *N. sertifer* a la infección por NPV (NEUVONEN *et al.*, 1990). También se puede incorporar el NsNPV con el NPV del noctúido *Pannolis flammea*, para el control de infestaciones mezcladas de las dos plagas (DOYLE Y ENTWISTLE, 1988).

En Gran Bretaña, estudios detallados han indicado que la aplicación de 2×10^9 a 5×10^9 OB/ha con bombas hidráulicas o a ultrabajo volumen da excelente control. Con aplicaciones a ultrabajo volumen se aplican gotas de 50 µm de volumen medio de diámetro (VMD) con un volumen de 1,1 litros/ha en una formulación con aceite antievaporante al 20% (Actipron, BP) para el control de larvas del primer al tercer estadio (ENTWISTLE *et al.*, 1985). El uso de protectores solares y adherentes se considera innecesario; una suspensión purificada de OBs en agua es suficiente para lograr excelentes niveles de control (ENTWISTLE *et al.*, 1978). Según Cunningham y Entwistle (1981), en Canadá la transmisión horizontal del NPV de *N. sertifer* es más lenta que la transmisión de la enfermedad en poblaciones de *N. lecontei* (Sección 3.3.3.2) razón por la cual es preferible una cobertura completa de aplicación (a excepción del caso descrito por Benz, 1976).

El virus se produce comercialmente en campo aplicando el inóculo a áreas de alta infestación, días después se recolectan las larvas enfermas o moribundas y se congelan. Posteriormente pueden ser liofilizadas y molidas para producir un polvo

fino como el Neochek-S® de los Estados Unidos, o como el producto semipurificado de la empresa sueca Kemira Agro Oy (Helsinki) o simplemente homogeneizados y filtrados para producir suspensiones emulsificables tal como el producto británico «Virox®», que en estos momentos no está siendo producido.

3.3.3.2. *Neodiprion lecontei*

Esta especie es probablemente la más destructiva y la más dispersa de los tentredínidos de pinos con una distribución geográfica desde el sudeste de Canadá y en todas partes del este de Estados Unidos hasta Texas (FUXA *et al.*, 1998). Exhibe preferencia por atacar al pino rojo (*Pinus resinosa*) aunque muchas otras especies de coníferas también pueden sufrir defoliación por esta plaga. En Canadá, experimentos con aplicaciones aéreas del NPV de *N. lecontei* entre 1976 y 1980 y pruebas de seguridad durante este periodo resultaron en el registro del NPV en 1983 bajo el nombre «Lecontvirus®» (CUNNINGHAM Y ENTWISTLE, 1981; Cunningham, 1998). Debido a la buena eficiencia de aplicaciones terrestres y los altos costos del uso de aviones o helicópteros, actualmente el virus ya no se aplica vía aérea.

En Estados Unidos, la aplicación de una dosis muy baja, 5×10^6 OB/ha, eliminó una población de *N. lecontei* en dos semanas; así mismo, la aplicación de cinco veces menos virus logró aún el 96% de control (PODGWAITE *et al.*, 1986). En Canadá, la aplicación de 5×10^9 OB/ha en volúmenes de 2,4 a 9,4 litros/ha resultó en un excelente grado de control (CUNNINGHAM *et al.*, 1987).

Para el control de larvas del primero y segundo estadios, se recomienda una aplicación terrestre de 50 equivalentes larvales por hectárea (5×10^9 OB/ha) en un volumen de 20 litros/ha. Se calcula el costo del virus en aproximadamente US\$ 1,70 por hectárea. Para el control de larvas del cuarto estadio, es necesaria una dosis dos veces mayor.

El virus se produce en el campo mediante el tratamiento de poblaciones naturales de alta densidad y la posterior recogida de larvas infectadas, de la misma manera que el virus de *N. sertifer*. Esto, junto con la baja dosis de aplicación explica lo económico del control mediante Lecontvirus®. Debido al incremento y dispersión del virus en la población plaga, las aplicaciones en puntos localizados o en surcos alternos, con hasta 100 m entre ellos, puede ser suficiente para iniciar una epizootia (CUNNINGHAM Y ENTWISTLE, 1981). La aplicación terrestre del virus en una emulsión aceite/agua con un nebulizador frío a ultrabajo volumen, condujo a un control del 72% (JOHNSON *et al.*, 1978). Una sola aplicación del virus reduce las poblaciones de *N. lecontei* por varios años (DE GROOT *et al.*, 1979). El Lecontvirus® es el único virus de uso rutinario en Canadá con mas de 6 mil hectáreas tratadas entre 1976 y 1994 (CUNNINGHAM, 1998).

3.4. Plagas de productos almacenados

Los baculovirus se pueden emplear en ambientes de productos almacenados de forma preventiva para evitar el desarrollo de grandes poblaciones de insectos. La buena persistencia del virus y su toxicidad nula hacia consumidores humanos o

animales hacen factible el uso del virus para proteger el producto hasta su empaquetamiento y consumo.

3.4.1. La palomilla de la India, *Plodia interpunctella*

Plodia interpunctella (Lepidoptera: Pyralidae) es una plaga cosmopolita de granos y frutos secos almacenados que demuestra altos niveles de resistencia a la gran mayoría de insecticidas sintéticos e incluso a *B. thuringiensis* (ROUSH Y TABASHNIK, 1990; TABASHNIK, 1994). Esta especie es afectada por un granulovirus (ARNOTT Y SMITH, 1968) que es altamente infectivo (HUNTER, 1970; SAIT *et al.*, 1994a). Diferentes colonias de laboratorio mostraron diferencias significativas en su susceptibilidad al virus y se encontraron evidencias de que los insectos de las colonias más resistentes a la infección tenían menor fecundidad, tamaño pupal y mortalidad hasta estado adulto. Estos efectos no fueron relacionados con efectos subletales del virus sino de un posible balance entre resistencia a la infección y la aptitud reproductora (BOOTS Y BEGON, 1995). Sin embargo, otros autores sí han señalado efectos subletales del granulovirus en la fertilidad y fecundidad de los adultos de *P. interpunctella* (SAIT *et al.*, 1994b, 1998) (ver Capítulo 11).

En ensayos realizados en recipientes de un litro, se calculó una CL_{50} de $7,9 \times 10^4$ OB/g de salvado de trigo. Posteriormente, recipientes de 125 g de almendras, 250 g de almendras descascaradas o 225 g de pasas fueron tratados con aproximadamente $1,75 \times 10^{10}$ OBs de granulovirus liofilizado en salvado molido e inoculados con huevos de *P. interpunctella*. Después de dos generaciones dentro de los recipientes, el tratamiento de virus redujo el porcentaje de daño a las almendras descascaradas desde un 94,5% en el testigo hasta un 2,6% en las tratados con virus. El grado de protección en las pasas fue aún mayor en recipientes con virus (0,1% daño) comparado con testigos (79-100%) (COWAN *et al.*, 1986).

La aplicación de $2,5 \times 10^7$ OB/kg de almendras con cascara en un volumen de 30 ml eliminó la infestación de *P. interpunctella* y redujo el porcentaje de nueces rechazadas por daños entre 75 y 88% comparado con el testigo (HUNTER *et al.*, 1977). De la misma manera, aplicaciones acuosas o en polvo de 6×10^7 OB/kg de grano de una formulación coprecipitada con lactosa resultó en 100% de mortalidad de *P. interpunctella* en muestras de trigo y maíz. La contaminación de los granos hasta una profundidad de 100 mm dio un nivel de control casi igual al tratamiento de toda la muestra (MCGAUGHEY, 1975).

La aplicación de una CL_{99} de virus a nueces de nogal resultó en un 0,2% de daños serios después de 12 semanas, comparado con un 35% en el testigo. El tratamiento con virus fue mucho más económico que tratamientos a baja temperatura o bajo contenido de oxígeno (JOHNSON *et al.*, 1998). Otra estrategia para el control de esta plaga es mediante atrayentes de feromonas contaminados con el virus. Los machos atraídos se contaminan, posteriormente los OBs del virus se pasan a las hembras durante el apareamiento, los cuales después contaminan a los huevos durante la oviposición (VAIL *et al.*, 1991).

La actividad insecticida del granulovirus almacenado a 22°C descendió un orden de magnitud ($\times 10$) en un periodo de 4 meses, mientras que a 45°C la pérdi-

da de actividad fue de aproximadamente un factor de mil (COWAN *et al.*, 1986). En cambio, en estudios de un año, no se detectó un descenso significativo en la actividad de granulovirus aplicado a trigo y almacenado en una granja con un intervalo extremo de temperaturas ambientales de -19°C a 48°C. En el laboratorio, la actividad del virus disminuyó en un factor de 10 durante 42 semanas a una temperatura de 42°C (KINSINGER Y MCGAUGHEY, 1976).

Una formulación del virus ha sido patentada por el USDA aunque todavía no se han llevado a cabo las pruebas de toxicidad e impacto ambiental (CUNNINGHAM, 1998). JOHNSON *et al.* (1998) mencionaron la posibilidad del registro de un producto a base del granulovirus para el control de *P. interpunctella* en un futuro cercano.

4. Limitaciones en el desarrollo comercial de los bioplaguicidas

Desde de hace muchos años se reconocen los factores limitantes para la comercialización de los baculovirus. Invariablemente se señala que los baculovirus son (i) demasiado específicos desde el punto de vista de la industria agroquímica, (ii) tienen un modo de acción lento ya que tardan varios días en matar a sus huéspedes, (iii) una baja persistencia en campo, y (iv) la producción masiva *in vivo* es costosa, mientras que los sistemas de producción *in vitro* todavía se encuentran en proceso de desarrollo (BURGES Y HUSSEY, 1971; BURGES, 1981; PODGWAITE, 1985; HÜBER, 1986; FUXA, 1991; TANADA Y KAYA, 1993; FUXA *et al.*, 1998; HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998). Durante estos años sólo se ha mejorado la persistencia en campo a través de estudios de sustancias fotoprotectoras y formulaciones de microencapsulación (SHAPIRO, 1995; TAMEZ-GUERRA *et al.*, 2000) aunque las perspectivas para la producción *in vitro* son prometedoras (ver Capítulo 9).

No obstante, el principal factor limitante para la comercialización de estos patógenos tal vez no esté relacionado con sus características biológicas, sino con un paradigma inadecuado, el cual se ha asignado para el desarrollo de los baculovirus como insecticidas biológicos.

4.1. El paradigma químico

A raíz de la aceptación de los bioplaguicidas surgió el problema de que el mercado del control de insectos plaga se basa en el "paradigma químico" (WAAGE, 1999). Esto es que si un producto entomopatógeno pretende ofrecer una alternativa viable para el control de algún insecto plaga tiene que alcanzar la rapidez de control, la facilidad de uso al mismo costo y con la misma tecnología de aplicación que los insecticidas sintéticos. Esto evidentemente no es posible. Los bioinsecticidas se comportan de manera diferente precisamente porque no son químicos.

Sin embargo, los bioinsecticidas tienen características únicas que pueden ser aprovechadas incluyendo i) la capacidad de replicarse en sus huéspedes y dispersarse en el cultivo, ii) la habilidad de actuar de manera sinérgica con otros enemigos naturales de la plaga objeto de control y iii) el potencial de ser producidos a

escala local o regional, además de la escala industrial internacional. Por lo menos las dos primeras de éstas son propiedades exclusivas para las entidades biológicas y que no las comparten con los productos químicos.

El paradigma químico también promueve el enfoque de la «bala mágica», bajo el cual se busca una solución singular a un problema de naturaleza agroecológica y consecuentemente compleja, tal como brotes de poblaciones de insectos plaga (LEWIS *et al.*, 1997). Esto es análogo al tratar los síntomas de un paciente enfermo sin dirigirse a la causa de la enfermedad; un antibiótico puede controlar o eliminar temporalmente una infección oportunista en un paciente inmunodeprimido, pero la recuperación de la salud se alcanza restaurando el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Los desequilibrios ecológicos en los hábitats agrícolas se pueden considerar de la misma manera. El uso de un insecticida biológico específico en lugar de uno químico de amplio espectro, puede ser el primer paso en el camino para la curación del sistema pero tarde o temprano será necesario dirigirse a las causas fundamentales que ocasionan que cierta especie de insecto sea plaga del cultivo (LEWIS *et al.*, 1997).

Considerando otra analogía médica, Waage (1997) pregunta si estamos considerando los bioinsecticidas como «la metodona del MIP». Ciertamente, para productores habituados al uso de químicos, los bioplaguicidas, como alternativas verdes o pseudoecológicas, puede tener un papel importante en el cambio hacia un sistema de producción sostenible, de una manera parecida al uso de metodona en la cura de los adictos a la heroína. Sin embargo, hay que destacar que no conviene despreciar sus características distintivas en la producción de productos que no son más que clones biotecnológicos de la industria agroquímica. Queda mucho por investigar acerca del uso de estos virus como bioinsecticidas, sobre todo en términos de su formulación, aplicación y en la manera de emplearlos en sistemas de producción en un contexto más global que el que nos hemos enfocado anteriormente (LEWIS *et al.*, 1997).

4.2. Especificidad

Esta característica de los baculovirus se ha citado repetidamente como un importante factor limitante, pero el hecho de que los baculovirus sean altamente específicos para sus huéspedes se puede aprovechar para lograr un control dirigido contra un único objetivo. Un buen ejemplo es el uso de NPV para controlar brotes de defoliadores forestales donde productos de más amplio espectro, incluso *B. thuringiensis*, pueden tener un impacto no deseado sobre las poblaciones de la fauna nativa de lepidópteros; este riesgo es aún más importante cuando se tratan hábitats que albergan especies en peligro de extinción.

Asimismo, en muchos cultivos existen una o dos especies que son plagas clave: *A. gemmatilis* en soja, *S. frugiperda* en maíz, *Heliothis/Helicoverpa* spp. o *S. littoralis* en algodón, *P. xylostella* en crucíferas, etc. aunque también hay otras especies de insectos plaga que normalmente se presentan en menor abundancia. El control específico de una plaga clave tiene la importante ventaja, sobre el uso de un producto de

amplio espectro, de que permite la supervivencia de huéspedes y presas alternativas para los parasitoides y depredadores en el cultivo. Esto tiene consecuencias prácticas ya que disminuye la probabilidad de brotes de plagas secundarias o una fuerte reinfestación de la plaga principal en ausencia de sus enemigos naturales. Es conveniente difundir este tipo de información en talleres de campo con agricultores usuarios de la tecnología del virus para que asimilen el valor de emplear prácticas que conservan los enemigos naturales en sus cultivos y los beneficios económicos del mismo.

4.3. Lentitud para matar

La acción letal relativamente lenta de los baculovirus ha sido la principal justificación para el desarrollo de los baculovirus recombinantes con genes de neurotoxinas. No obstante, ni siquiera los virus modificados con menor tiempo letal pueden competir con un químico de acción inmediata. La demora entre la aplicación del inóculo y el cese de la alimentación del insecto infectado se puede utilizar como criterio para determinar el momento de realizar el tratamiento y evitar que la densidad de la población de la plaga rebase el umbral económico.

Otra manera de obviar esta limitación es por medio de aplicaciones frecuentes de dosis bajas del virus para evitar el desarrollo de poblaciones dañinas de la plaga. Esta táctica ha funcionado en el control de *S. exigua* en cultivo de cebolla en Asia, donde los productores están acostumbrados a aplicar cócteles de diferentes plaguicidas químicos a intervalos muy cortos. El reemplazo de los insecticidas químicos con aplicaciones de NPV cada 4-5 días a una dosis de $9,4 \times 10^{11}$ OB/ha, en un volumen de 90 litros, se ha logrado una buena aceptación por los productores. Las aplicaciones frecuentes son necesarias porque después de 5 días las larvas penetran en el interior de las hojas y quedan fuera del alcance del virus (JONES *et al.*, 1998).

La lentitud del virus para matar es una característica menos problemática en el control de plagas forestales, donde los árboles pueden aguantar niveles de defoliación mayores que un cultivo anual típico. En general, los nucleopoliedrovirus son más rápidos para matar a su huésped que los granulovirus (BIRD, 1959; BOUCIAS Y NORDIN, 1977; ABDUL KADIR *et al.*, 1999).

4.4. Una escala apropiada de producción

Los baculovirus sólo se replican dentro de células vivas y la tecnología de producción en cultivos de células a escala industrial se encuentra aún en las primeras etapas del proceso de perfeccionamiento aunque es un tema de interés creciente (MURHAMMER, 1996) ya que, hoy en día, la producción a gran escala todavía depende de la cría masiva del insecto huésped. El costo de multiplicar el insecto, inocularlo y criarlo hasta la cosecha del virus sigue siendo la mayor parte del costo de la producción de todos los baculovirus (SHIEH, 1989; CHERRY *et al.*, 1997; GRZYWACZ *et al.*, 1998).

Una manera de reducir el costo es la producción rústica en campo, aplicando el inóculo en áreas con una alta infestación y posteriormente se recolectan las larvas infectadas. Aunque se corre el riesgo de contaminar la producción con otros patóge-

nos y microbios oportunistas, este procedimiento ha funcionado adecuadamente para la producción del NPV de *A. gemmatilis* (MOSCARDI, 1989) y de los tentredínidos *N. sertifer* y *N. lecontei* (CUNNINGHAM Y ENTWISTLE, 1981). Evidentemente, esta práctica requiere una labor intensiva y es más factible en regiones donde los costos de la mano de obra son bajos.

En términos comerciales, en los últimos años se ha notado una tendencia hacia la producción de bioplaguicidas por empresas relativamente pequeñas y con un enfoque hacia mercados especializados y cultivos que ocupan áreas menos extensas. Este tipo de mercado parece representar el futuro comercial de los bioplaguicidas debido a una ausencia de plaguicidas sintéticos adecuados y con mayores márgenes de ganancia, que sí permitirían el uso de bioplaguicidas de mayor coste.

El mundo industrializado no es el único sector en el cual se desarrollan los bioplaguicidas. En los países en vías de desarrollo, especialmente América del Sur, África, o el Sur y el Sudeste de Asia, los bioplaguicidas están en proceso de desarrollo, típicamente dentro de instituciones públicas agrícolas o de extensión, o en los centros de investigación mediante la obtención de financiación externa. En la situación de estos países es donde se está poniendo un mayor énfasis en el desarrollo de bioplaguicidas como alternativa a los químicos.

Sin embargo, aquí también las direcciones tomadas han sido objeto de críticas aunque con motivos diferentes a las dirigidas a la industria agroquímica. El desarrollo de un bioplaguicida comercial requiere habilidades e iniciativas multidisciplinarias, las cuales normalmente no se encuentran en una única institución pública de investigación. La competencia frente a los escasos recursos restringe las posibilidades de colaboraciones esenciales para formar los equipos multidisciplinarios requeridos para lograr el desarrollo de un bioplaguicida. Los proyectos del sector público tienden a concentrarse en la fase inicial de la investigación, tal como la producción, la formulación y la aplicación con una consideración inadecuada de los aspectos posteriores de toxicología, registro y comercialización del producto.

Muchos países en vías de desarrollo tienen expertos en bioplaguicidas y un nivel adecuado de tecnología, pero frecuentemente existe una brecha entre los resultados de la investigación y la implementación y adopción de la nueva tecnología (HARRIS Y DENT, 1999).

Recientemente, se le está prestando mayor atención a la sustentabilidad de los sistemas de protección de los cultivos. La comercialización de los bioplaguicidas representa una gran oportunidad para el desarrollo de tales sistemas sostenibles. No obstante, el modelo de comercialización industrial a gran escala no es la única manera para lograr este fin y se ha logrado éxito mediante enfoques alternativos tales como el NPV de *A. gemmatilis* en Brasil el cual fue comercializado a través de varias empresas de escala relativamente pequeña.

4.5. Problemas de comercialización

Los bioplaguicidas no tienen cabida dentro del modelo de comercialización diseñado para los productos químicos y existe una consideración inadecuada de sus

requerimientos biológicos y ecológicos que son más exigentes que los plaguicidas químicos (GAUGLER, 1997). A pesar de que existen avances significativos en la producción, formulación, aplicación y mejora genética, los bioplaguicidas comerciales todavía están en desventaja en términos de su precio, facilidad de uso y eficacia.

Desde hace 30 ó 40 años, los bioplaguicidas han sido objeto de investigación y desarrollo industrial. La mayor parte de las ventas de bioplaguicidas se realiza en Norteamérica y Europa donde empresas farmacéuticas o agroquímicas llevan a cabo la producción. Al inicio de los años 1990, una diversidad de productos bioplaguicidas estaban disponibles en los mercados de los Estados Unidos, Canadá y los países del Oeste de Europa (RODGERS, 1993; COPPING, 1998). Casi sin excepción dichos productos fueron diseñados para mercados especializados dominados por *B. thuringiensis* (Bt).

Aunque en los últimos 30 años muchas empresas han iniciado una actividad de producción de bioplaguicidas, quedan muy pocas con una proporción sustancial del mercado y durante este periodo la industria de los bioplaguicidas ha evolucionado y cambiado significativamente. Los bioplaguicidas se veían como una opción atractiva y representan una alternativa ante los costos crecientes del desarrollo y registro de insecticidas convencionales. Asimismo, ofrecen una manera de luchar contra la tendencia creciente de desarrollo de resistencia a los productos químicos en cada vez más especies de insectos plaga y su uso como un componente de sistemas MIP fue visto como una estrategia atractiva de mercadotecnia (RODGERS, 1993). Asimismo, las presiones legislativas y de la opinión pública para reducir el uso de agroquímicos en la producción agrícola han sido una fuerza motivadora en el desarrollo de productos bioplaguicidas.

En las décadas de los años 1970 y 1980 las grandes empresas farmacéuticas fueron las pioneras en el desarrollo y comercialización de los bioplaguicidas, sobre todo de Bt. Entre 1985 y 1996 estas empresas farmacéuticas y agroquímicas invirtieron en la investigación y desarrollo de entomopatógenos tales como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y algunos baculovirus (GEORGIS, 1997). Al mismo tiempo varias compañías biotecnológicas pequeñas invirtieron recursos en los bioplaguicidas estimuladas por capital financiero y por predicciones de un mercado crecimiento en el mercado para estos productos (WAAGE, 1999). En la década de los años 1990 ocurrieron muchos cambios: algunas empresas quebraron, otras se unieron y otras sobrevivieron gracias a una diversidad de productos alternativos en su oferta. Hoy en día un número reducido de empresas altamente especializadas ha comenzado a dominar mercados de nicho con cierto grado de éxito.

Los factores que han restringido la comercialización de los bioplaguicidas son varios (RODGERS, 1993). Los fracasos iniciales en la captación de mercados se atribuyeron a la incapacidad de los bioplaguicidas para competir con los nuevos plaguicidas sintéticos. Esto último fue lo que ocurrió en el caso de Elcar® (HzNPV) en los años 1970 el cual no pudo competir con los nuevos piretroides. Bt fue único bioplaguicida que en esa época pudo mantenerse un determinado estatus comercial. A partir de entonces, los bioplaguicidas se acomodaron en mercados más pequeños que los precedentes y a un precio mayor que el de los insecticidas convencio-

nales. En esta nueva situación aparecieron problemas debidos a inconsistencias en las formulaciones, estandarización del producto y de la actividad del entomopatógeno (GEORGIS, 1997).

Las predicciones optimistas sobre el crecimiento del mercado internacional de bioplaguicidas se debieron al éxito de Bt, el cual representó más del 90% de las ventas en el ámbito mundial. En cambio, las predicciones acerca de los demás bioplaguicidas, incluyendo los baculovirus, fueron mucho menos precisas debido a que su posición en el mercado y la documentación de sus ventas no era muy fiable.

Hoy en día, la nueva tecnología química permite la producción de insecticidas con menor espectro de toxicidad, los cuales pueden colonizar los mercados especializados donde los insecticidas microbianos realizan la mayor parte de sus ventas.

Desde el punto de vista industrial, los bioplaguicidas se consideran no fiables debido a una serie de factores bióticos y abióticos. Su especificidad se percibe como una desventaja porque limita el tamaño del mercado para el producto comparado con productos de mayor espectro (RODGERS, 1993).

Además, la vida de almacén de los bioplaguicidas dificulta la distribución de estos productos a través de los canales convencionales. La escala de la producción, sobre todo para los baculovirus que sólo se replican en insectos vivos, representa un obstáculo mayor en la producción industrial (ver Capítulo 9). Así que sólo los mercados especializados de alto valor pueden soportar los altos costos de producción, lo cual frecuentemente elimina los mercados de alto volumen (RODGERS, 1993).

4.6. Registro de los bioplaguicidas

Los marcos legislativos para los bioplaguicidas se encuentran en un estado de cambio pero están lejos de ser uniformizados alrededor del mundo. En términos generales la mayoría de los países de Europa y Norte América ya cuentan con marcos legales activos y funcionales para los bioplaguicidas (OECD, 1996). En Centroamérica y Sudamérica son dispersos los países con marcos legislativos, mientras que en África, hay muy pocos países con un marco especial para los bioplaguicidas.

En los Estados Unidos se ha puesto en marcha un plan específico, llamado "Programa IR-4 para bioplaguicidas en cultivos menores", para promover el desarrollo de los bioplaguicidas (Hartman y Markle, 1999). De igual modo, en Europa existe un ambiente legislativo favorable para los bioplaguicidas que actualmente se encuentra en fase de transformación, aunque todavía no está completamente uniformizado, a pesar del decreto 91/414/EEC de 1991, relacionado con el registro de los agroquímicos y microorganismos (NEAL Y NEWTON, 1999). Como consecuencia, los bioplaguicidas no se promueven tan efectivamente en Europa como dentro del programa IR-4 en los Estados Unidos.

Por el momento, no existen evidencias que sugieran que la falta de marcos legales específicos para los bioplaguicidas haya actuado inhibiendo su uso en los

países en vías de desarrollo. Lo que parece ser más importante es la adopción de un programa nacional que favorezca la política del manejo integrado de plagas (MIP), junto con un servicio de extensionistas activos y bien formados. Por ejemplo, en Brasil, el compromiso gubernamental al servicio de extensión fue clave para el éxito del programa de control de la plaga de la soja *A. gemmatilis* (MOSCARDI, 1999). La experiencia demuestra que, cuando los países invierten en capacitación y extensión acerca del MIP, los agricultores capacitados son receptivos a la idea de los bioplaguicidas. Aunque su motivación principal es de tipo económico, aprecian los beneficios ambientales y de salud al sustituir los insecticidas químicos por agentes de control biológico. En la India, donde se encuentran muchos bioplaguicidas comerciales basados en los NPVs, la política está altamente a favor del MIP adoptado por el gobierno de la India, el cual ha construido un ambiente apropiado para el crecimiento del sector bioplaguicida.

El gobierno de la India implantó una nueva ley, en 1999, para que los bioplaguicidas se registren bajo la ley de los agroquímicos, aunque antes de esta legislación los productos biológicos no eran registrados. Una situación parecida existe en Vietnam donde el gobierno apoya al manejo integrado y, desde 1992, se lleva a cabo un exitoso programa nacional de MIP (JENKINS Y VOS, 2000). Si bien el Departamento de Agricultura y Desarrollo Rural de Vietnam no tiene un marco de requisitos específicos para el registro de productos bioplaguicidas, el departamento sí sigue las recomendaciones publicadas por la FAO, sobre el registro de agentes de control biológico (FAO, 1988, 1996). Actualmente ya tienen registrados varios bioplaguicidas basados principalmente en Bt pero también incluyen un producto que es una mezcla de Bt con baculovirus y dos productos de *Beauveria bassiana*. En contraste con la situación que se da en la India, en Vietnam no existen productores locales de bioplaguicidas y todos los productos son importados de países como China, Rusia y los Estados Unidos. Afortunadamente, ni la importación ni la venta de estos productos son recargados con el impuesto de hasta el 10% aplicado a los plaguicidas químicos (JENKINS Y VOS, 2000).

Asimismo, el Departamento de Agricultura de Tailandia requiere que los bioplaguicidas sean registrados de acuerdo a los requisitos de registro de los Estados Unidos. Para sustentar el registro de todos los productos bioplaguicidas se exige un análisis del producto que incluye datos toxicológicos de pruebas de corto y largo plazo con mamíferos y datos relacionados con sus efectos ecológicos y ambientales. Sin embargo, cualquier agroquímico o bioplaguicida que haya pasado por la EPA puede ser aceptado en el proceso de registro tailandés. Debido a la cantidad de estudios y análisis toxicológicos de Bt y los NPVs ya realizados para cumplir con los requisitos de la EPA, los NPVs y Bt son los únicos bioplaguicidas que no necesitan datos toxicológicos y ecológicos en Tailandia. Sin embargo, son necesarias pruebas de eficiencia para todos los productos basados en estos patógenos (U. Ketunuti, Dept. de Agric., Bangkok, Tailandia, comunicación personal).

En Nicaragua, actualmente no existe diferencia entre el registro de un químico y un producto biológico, aunque en general, el Departamento de Agricultura apoya al MIP y está dispuesto a facilitar un registro más sencillo de los productos inocuos

de origen biológico. Entretanto, el gobierno ha recibido varias propuestas para el registro de *Beauveria*, *Metarhizium*, NPV y nim. Sin embargo, sólo un producto nim, el producto Bt «Biorat®» y un producto *Beauveria* llamado «Naturalis®» tienen registro (WILLIAMSON Y ALI, 2000).

En África, los pocos productos microbianos registrados en el continente se han registrado mediante procedimientos ya existentes de registro de plaguicidas químicos aunque, en ciertos casos, se ha mostrado flexibilidad sobre los datos de registro.

Por tanto, parece que en ciertas situaciones donde no existe un marco de registro propio, las autoridades pueden registrar los productos bioplaguicidas con los procedimientos existentes del registro de insecticidas convencionales y, en otras, pueden tomar en cuenta las recomendaciones establecidas por la FAO y la EPA de los Estados Unidos. Sin embargo, una práctica común en los países en vías de desarrollo es vender los bioplaguicidas sin registrarlos. Esto, en algunos casos, se debe a la falta de recursos para establecer políticas apropiadas y la utilización de información técnica inadecuada para el manejo de las solicitudes de registro de los bioplaguicidas. No obstante, el bajo riesgo percibido del uso de los bioplaguicidas también puede influenciar la política y las decisiones de los gobiernos.

5. Conclusiones

En este momento, el desarrollo futuro de los baculovirus como bioinsecticidas va por dos caminos divergentes. Por el lado biotecnológico, se producen los virus recombinantes modificados para matar más rápido al insecto huésped. La reducción del tiempo letal de los virus recombinantes resulta en una menor producción de virus progenie lo cual hace más necesaria la producción masiva en cultivos de células. Esta técnica de producción masiva resulta atractiva para las empresas industriales multinacionales. No obstante, este enfoque se ha calificado como un desprecio a un recurso natural valioso en favor de la fabricación de bioplaguicidas que representan clones biológicos de productos de la industria agroquímica bajo el argumento, posiblemente válido, de que de esta forma se logrará mayor aceptación por parte de los productores acostumbrados a las características de control que exhiben los insecticidas sintéticos (WAAGE, 1997).

En cambio, por el lado holístico, se reconoce que los baculovirus tienen un papel distintivo en el control de fitófagos de cultivos y forestales pero la manera más adecuada de producirlos y emplearlos depende de las condiciones locales y, como se ha visto en el control de *A. gemmatilis* en Brasil, se requiere un juego de factores biológicos, agrícolas, legislativos y comerciales para llegar al uso extensivo y sostenido de estos productos en sistemas de producción bioracional.

A lo mejor, las diferentes trayectorias de los baculovirus son compatibles para diferentes regiones del mundo con diferencias marcadas en sus sistemas de producción agrícola. El enfoque biotecnológico puede ser más válido para los países más industrializados con una producción agrícola intensiva y tecnificada. El enfo-

que holístico, por su parte, puede ser más apropiado para la producción agrícola en los países en vías de desarrollo donde se pueden adaptar las técnicas de producción y aplicación a las necesidades de cada región.

Finalmente, aprovechamos esta oportunidad para reiterar dos importantes aspectos del uso comercial de los baculovirus. Como se ha señalado anteriormente, muchos de los países en vías de desarrollo no cuentan con un marco regulador adecuado para los bioplaguicidas y esto representa un impedimento para su registro. Por lo tanto, si se llegara a uniformizar internacionalmente los marcos de registro de los bioplaguicidas sería más factible alcanzar objetivos tales como reducir su coste, disminuir las barreras al comercio de los bioplaguicidas y promover una agricultura más sostenible en el mundo.

Sin embargo, no sólo la política influye en el uso de los bioplaguicidas. Una consecuencia importante de tener bioplaguicidas no registrados es que no se controla la calidad del producto. Mientras que los mismos productores observan la eficiencia de estos productos, no existe un mecanismo independiente para el control de productos sin registro. La ausencia de control de calidad conduce a obtener productos inconsistentes y con una utilidad muy variable. Tal situación ha ocurrido en la India donde la falta de un marco legislativo ha permitido la venta de muchos productos basados en los NPVs pero de eficiencia muy imprevisible (GRZYWACZ, 1995). En reconocimiento a este problema muchos países ya están intentando introducir requerimientos específicos para el registro de los bioplaguicidas dentro de los esquemas del registro de los agroquímicos. En gran parte el futuro de estos productos depende de la elaboración de productos de calidad. Así, una calidad consistente y el desarrollo de un paradigma apropiado para su uso serán factores clave para el futuro éxito de los baculovirus bioinsecticidas.

6. Agradecimientos

Se agradece a las agencias y organismos que financian al IITA de la República de Benín y al DFID del Reino Unido, cuyos recursos se utilizaron para llevar a cabo ciertos estudios citados en este capítulo. Éste es el manuscrito número IITA/00/BC/05. Se recibió apoyo del proyecto SIBEJ99-0501047 otorgado a T. Williams de ECOSUR, México.

7. Bibliografía

- ABDUL KADIR, H.B., C.C. PAYNE, N.E. CROOK, J.S. FENLON Y D. WINSTANLEY. 1999. *The comparative susceptibility of the diamondback moth, Plutella xylostella and some other major lepidopteran pests of brassica crops to a range of baculoviruses*. Biocontr. Sci. Technol. 9:421-433.
- ABDUL-NASR, S. 1956. *Polyhedrosis virus disease on cotton leafworm, Prodenia litura* F. Bull. Soc. Entomol. Egypte 40:321-332.

- ABOT, A.R., F. MOSCARDI, J.R. FUXA, D.R. SOSA-GÓMEZ Y A.R. RICHTER. 1995. *Susceptibility of populations of Anticarsia gemmatalis from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus*. J. Entomol. Sci. **30**:62-69.
- ALVARADO, L. Y R. LEUCONA. 1994. *Control biológico en la República Argentina*, p. 3-51. En: L. C. Belarmino, R. M. D. G. Cameiro y J. P. Puignau (ed.), Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. Programa cooperativo para el desarrollo tecnológico agropecuario del Cono Sur. IICA/PROCISUR/EMBRAPA-CPACT, Pelotas, Brazil.
- ALLAWAY, G.P. Y C.C. PAYNE. 1984. *Host range and virulence of five baculoviruses from lepidopterous hosts*. Ann. Appl. Biol. **105**:29-37.
- ANGELINI, A. Y R. COUILLARD. 1972. *Les moyens de lutte biologique contre certains ravageurs du cotonnier et une perspective sur la lutte intégrée en Côte d'Ivoire*. Coton Fibres Trop. **27**:283-289.
- ARNOTT, H.J. Y K.M. SMITH. 1968. *An ultrastructural study of the development of a granulosis virus in the cells of the moth Plodia interpunctella (Hubner)*. J. Ultrastruct. Res. **22**:136-158.
- ATGER, P. 1969. *Observations sur la polyhedrose nucleaire d'Heliothis armigera (Hbn.) au Tchad*. Coton Fibres Trop. **24**:243-244.
- AUDEMARD, H., A. BURGERJON Y D. MARTOUE. 1983. *Production et utilisation de virus et lutte integree contre les torteuses de vergers: resultats des reserches 1979-1981*, pp. 5-13. En: R. Cavalloro y A. Piavaux (ed.), C.E.C. Programme on Intergrated and Biological Control: Progress Report 1979/81. Pubs: Commission of the European Communities, Brussels.
- BALCH, R.E. 1939. *The outbreak of the European spruce sawfly in Canada and some important features of its bionomics*. J. Econ. Entomol. **32**:412-418.
- BALCH, R.E. Y F.T. BIRD. 1944. *A virus disease of the European spruce sawfly, Gilpinea hercyniae (Htg.) and its place in natural control*. Sci. Agric. **25**:64-80.
- BARLOW, N.D., R.A. FRENCH Y J.F. PEARSON. 1986. *Population ecology of Wiseana cervinata, a pasture pest in New Zealand*. J. Appl. Ecol. **23**:415-431.
- BARONIO, P., G. FACCIOLO Y A. ANTROPOLI. 1987. *Utilizzazione di una nucleopoliedrosi virale specifico nella lotta contro Neodiprion sertifer (Geoffr.) (Hym., Diprionidae) confronto tra due preparati*. Boll. Inst. Entomol. "Guido Grande" Univ. Stud. Bologna **41**:233-240.
- BATTU, G.S. 1986. *Nuclear polyhedrosis virus infection of lucerne caterpillar, Laphygma exigua Hubner (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Res. Punjab Agric. Univ. (India) **23**:455-457.
- BAUGHER, D.G. Y W.G. YENDOL. 1976. *Foliar and soil applications of nuclear polyhedrosis virus to control Trichoplusia ni larvae on cabbage*, p. 354-355. En: Proceedings of the 1st international colloquium on invertebrate pathology and 9th annual meeting of the society of invertebrate pathology, Kingston, Ontario, Canadá.
- BEDFORD, G.O. 1981. *Control of the rhinoceros beetle by baculovirus*, p. 409-426. En: H.D. Burges (ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, London.

- BEDFORD, G.O. 1986. *Biological control of the rhinoceros beetle (Oryctes rhinoceros) in South Pacific by baculovirus*. Agric. Ecosyst. Environ. **15**:141-147.
- BENZ, G. 1976. *Current microbial control programs in Western Europe exclusive of the United Kingdom and Ireland*, p. 52-58. En: Proceedings of the 1st international colloquium on invertebrate pathology and 9th annual meeting of the society of invertebrate pathology, Kingston, Ontario, Canadá.
- BIRD, F.T. 1959. *Polyhedrosis and granulosis viruses causing single and double infections in the spruce budworm, Choristoneura fumiferana Clemens*. J. Insect Pathol. **1**:406-408.
- BIRD, F.T. Y D.E. ELGREE. 1957. *A virus disease and introduced parasites as factors controlling the European spruce sawfly, Diprion hercyniae (Htg.), in central New Brunswick*. Can. Entomol. **89**:371-378.
- BIRD, F.T. Y J.M. BURK. 1961. *Artificially disseminated virus as a factor controlling the European spruce sawfly, Diprion hercyniae (Htg.) in the absence of introduced parasites*. Can. Entomol. **93**:228-238.
- BISHOP, D.H.L., P.F. ENTWISTLE, I.R. CAMERON, C.J. ALLEN Y R.D. POSSEE. 1988. *Field trials of genetically-engineered baculovirus insecticides*, p. 143-180. En: M. Sussman, C. H. Collins, F. A. Skinner y D. E. Stewart-Tull (ed.), The release of genetically-engineered micro-organisms. Academic Press, London.
- BOOTS, M. Y M. BEGON. 1995. *Strain differences in the Indian meal moth, Plodia interpunctella, in response to a granulosis virus*. Res. Popul. Ecol. **37**:37-42.
- BOUCIAS, D.G. Y G.L. NORDIN. 1977. *Interinstar susceptibility of the fall webworm, Hyphantria cunea, to its nucleopolyhedrosis and granulosis viruses*. J. Invertebr. Pathol. **30**:68-71.
- BROOKES, M.H., R.W. STARK Y R.W. CAMPBELL. 1978. *The Douglas-fir tussock moth: a synthesis*. USDA Tech. Bull. No. **1585**:1-331.
- BROWN, E.S. Y C.F. DEWHURST. 1975. *The genus Spodoptera (Lepidoptera, Noctuidae) in Africa and the Near East*. Bull. Entomol. Res. **65**:221-262.
- BURGERION, A., G. BIACHE, J. CHAUFaux Y P.V. VAIL. 1975. *Investigations on the specificity of three nuclear polyhedrosis viruses in relation to Mamestra brassicae, Scotia segetum, Trichoplusia ni and Spodoptera exigua*. Entomophaga **20**:153-160.
- BURGES, H.D. 1981. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, Londres.
- BURGES H.D. Y N.W. HUSSEY. 1971. *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, Londres.
- CAB INTERNATIONAL. 2000. *Crop Protection Compendium CD*. Global Module 2nd Edition. CAB International, Wallingford, Reino Unido.
- CABALLERO, P., H.K. ALDEBIS, E. VARGAS-OSUNA Y C. SANTIAGO-ALVAREZ. 1992. *Epizootics caused by a nuclear polyhedrosis virus in populations of Spodoptera exigua in southern Spain*. Biocontr. Sci. Technol. **2**:35-38.
- CADOU, J. Y G. SOUBRIER. 1974. *Utilisation d'une polyedrose nucleaire dans la lutte contre Heliothis armigera (Hb.) (Lep. Noct.) en culture cotonnière au Tchad*. Coton Fibres Trop. **29**:357-365.

- CAMERON, J.W.M. 1973. *Insect pathology*. Annu. Rev. Entomol. **18**:285-306.
- CAMPBELL, R.W. 1983. *Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) control trials combining nucleopolyhedrosis virus, Disparlure, and mechanical methods*. J. Econ. Entomol. **76**:610-614.
- CAREY, D. Y K.A. HARRAP. 1980. *Safety tests on the NPVs of Spodoptera littoralis and Spodoptera exempta*, p. 441-450. En: Invertebrate tissue culture: developments and applications. Academic Press, N.Y.
- CHAPMAN, A.J. Y C.M. IGNOFFO. 1972. *Influence of rate and spray volume of a nucleopolyhedrosis virus on cotton of Heliothis in cotton*. J. Invertebr. Pathol. **20**:183-186.
- CHAPPLE, A.C. Y R.P. BATEMAN. 1997. *Application systems for microbial pesticides: necessity not novelty*, p. 181-190. En: H.F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs., Farnham, Reino Unido.
- CHAUFAUX, J. Y P. FERRON. 1986. *Differing susceptibility of two populations of Spodoptera exigua Hub. (Lepid., Noctuidae) to baculoviruses and synthetic pyrethroids*. Agronomie **6**:99-104.
- CHERRY, A.J., M.A. PARNELL, D. GHZYWACZ Y K.A. JONES. 1997. *The optimization of in vivo nuclear polyhedrosis virus production in Spodoptera exempta (Walker) and Spodoptera exigua (Hubner)*. J. Invertebr. Pathol. **70**:50-58.
- CHERRY, A.J., R.J. RABINDRA, M.A. PARNELL, N. GEETHA, J.S. KENNEDY Y D. GRZYWACZ. 2000. *Field evaluation of Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus formulations for control of the chickpea pod-borer, H. armigera (Hubn.), on chickpea (Cicer arietinum var. Shoba) in southern India*. Crop Protec. **19**:51-60.
- CORY, J.S. Y P.F. ENTWISTLE. 1990. *The effect of time of spray application on infection of the pine beauty moth, Panolis flammea (Den. and Schiff.) (Lep., Noctuidae) with nuclear polyhedrosis virus*. J. Appl. Entomol. **110**:235-241.
- COWAN, D.K., P.V. VAIL, M.L. KOK-YOKOMI Y F.E. SCHREIBER. 1986. *Formulation of a granulosis virus of Plodia interpunctella (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae): efficacy, persistence and influence on oviposition and larval survival*. J. Econ. Entomol. **79**:1085-1090.
- CRAWFORD, A.M. Y J. KALMAKOFF. 1977. *A host-virus interaction in a pasture habitat: Wiseana spp. (Lepidoptera: Hepialidae) and its baculovirus*. J. Invertebr. Pathol. **29**:81-87.
- CROOK, N.E. 1991. *Baculoviridae: subgroup B*, p. 73-110. En: E. Kurstak (ed.), Viruses of invertebrates. Marcel Dekker Inc., NY.
- COPPING, L.G. 1998. *The biopesticide manual*. British Crop Protection Council. Farnham, Reino Unido.
- CUNNINGHAM, J.C. 1988. *Baculoviruses: their status compared to Bacillus thuringiensis as microbial insecticides*. Outlook Agric. **17**:10-17.
- CUNNINGHAM, J.C. 1995. *Baculoviruses as microbial insecticides*, p. 261-292. En: R. Rueveni (ed.), Novel approaches to integrated pest management, CRC Press/Lewis, Boca Raton, USA.
- CUNNINGHAM, J.C. 1998. *North America*, p. 313-331. En: F.R. Hunter-Fujita, P.F.

- Entwistle, H.F. Evans y N.E. Crook (ed.), *Insect viruses and pest management*. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido.
- CUNNINGHAM, J.C. Y P.F. ENTWISTLE. 1981. *Control of sawflies by baculovirus*, p. 379-407. En: H.D. Burges (ed.), *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, Londres.
- CUNNINGHAM, J.C., P. DE GROOT Y W.J. KAUPP. 1987. *A review of aerial spray trials with Lecontivirus for control of redheaded pine sawfly Neodiprion lecontei (Hymenoptera: Diprionidae) in Ontario, Canada*. Proc. Entomol. Soc. Ontario **117**:65-72.
- CUNNINGHAM, J.C., W.J. KAUPP Y K.W. BROWN. 1991a. *Field trials with two gypsy moth viral insecticides, Disparivirus and Gypcheck*. Biocontr. News **4**:38-39.
- CUNNINGHAM, J.C., W.J. KAUPP Y G.M. HOWSE. 1991b. *Development of nuclear polyhedrosis virus for control of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in Ontario*. I Aerial spray trials in 1988. Can. Entomol. **123**:601-609.
- CUNNINGHAM, J.C., W.J. KAUPP, R.A. FLEMING, K.W. BROWN Y T. BURNS. 1993. *Development of nuclear polyhedrosis virus for control of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in Ontario*. II Reduction in dosage and emitted volume (1989 and 1990). Can. Entomol. **125**:489-498.
- DE GROOT, P., J.C. CUNNINGHAM Y J.R. MCPHEE. 1979. *Control of red-headed pine sawfly with a baculovirus in Ontario in 1978 and a survey of areas treated in previous years*. Sault Ste. Marie Ontario, Can. Forest. Serv. Rep. FPM-X-20.
- DE OLIVEIRA, M.R.V. 1998. *South America*, p. 339-355. En: F.R. Hunter-Fujita, P.F. Entwistle, H. F. Evans, y N. E. Crook (ed.), *Insect viruses and pest management*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- DICKLER, E. Y J. HÜBER. 1983. *Microbial control of Adoxophyes orana in combination with granulosis virus control of the codling moth*, pp. 14-21. En: R. Cavalloro y A. Piavaux (ed.), *C.E.C. Programme on Integrated and Biological Control: Progress Report 1979/81*. Pubs: Commission of the European Communities, Bruselas.
- DOYLE, C.J. Y P.F. ENTWISTLE. 1988. *Aerial application of mixed virus formulations to control joint infestations of Panolis flammea and Neodiprion sertifer on lodgepole pine*. Ann. Appl. Biol. **113**:119-127.
- ELLEMAN, C.J. Y P.F. ENTWISTLE. 1985. *Inactivation of a nuclear polyhedrosis virus on cotton by the substances produced by the cotton leaf surface glands*. Ann. Appl. Biol. **106**:83-92.
- ELLEMAN, C.J. Y P.F. ENTWISTLE. 1982. *A study of the glands on cotton responsible for the high pH and cation concentration of the leaf surface*. Ann. Appl. Biol. **100**:553-558.
- ENTWISTLE, P.F. 1976. *The development of an epizootic of a nuclear polyhedrosis virus disease in European spruce sawfly, Gilpinia hercyniae*, p. 64. En: *Proceedings of the 1st international colloquium on invertebrate pathology and 9th annual meeting of the society of invertebrate pathology*, Kingston, Ontario, Canadá.
- ENTWISTLE, P.F. 1998. *A world survey of virus control of insect pests*, p. 189-200. En:

- F.R. Hunter-Fujita, P.F. Entwistle, H.F. Evans, y N.E. Crook (ed.), *Insect viruses and pest management*. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido.
- ENTWISTLE, P.F., H.F. EVANS, K.A. HARRAP Y J.S. ROBERTSON. 1978. *Field trials on the control of the pine sawfly*, *Neodiprion sertifer*. Tech. Rep. Inst. Virol. Oxford 1:1-62.
- ENTWISTLE, P.F., H.F. EVANS, K.A. HARRAP Y J.S. ROBERTSON. 1985. *Control of European pine sawfly Neodiprion sertifer (Geoffr.) with its nuclear polyhedrosis virus in Scotland*, p. 36-46. En: D. Bevan y J.T. Stoakley (ed.), *Site characteristics and population dynamics of lepidopteran and hymenopteran forest pests*. Forest. Comm. Dev. Paper 135, HMSO, Londres.
- ENTWISTLE, P.F., P.H.W. ADAMS, H.F. EVANS Y C.F. RIVERS. 1983. *Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus (Baculoviridae) in European spruce sawfly (Gilpinia hercyniae): spread of disease from small epicentres in comparison with spread of baculovirus diseases in other hosts*. J. Appl. Ecol. 20:573-587.
- ESTRADA HURTARTE, R.E. 1996. *Situación del control biológico en Guatemala*, p. 43-48. En: M. Zapater (ed.), *El control biológico en América Latina*. Actas de la III mesa redonda de control biológico en el Neotrópico, Río de Janeiro, Brasil, 12-16 de agosto de 1991. OIBC, Buenos Aires, Argentina.
- EVANS, H.F. Y P.F. ENTWISTLE. 1982. *Epizootiology of the nuclear polyhedrosis virus on European spruce sawfly with emphasis on persistence of virus outside the host*, p. 449-462. En: E. Kurstak (ed.), *Microbial and virus pesticides*. Marcel Dekker, N.Y.
- FALCON, L.A. 1975. *Patterns of use as they influence virus levels in the environment: chemical controls, biological controls and application methods*, p. 134-137. En: M.D. Bethesda, M. Summers, R. Engler, L.A. Falcon y P. Vail (ed.), *Baculoviruses for Insect Pest Control*. EPA-USDA Working Symposium, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- FALCON, L.A., W.R. KANE Y R.S. BETHELL. 1968. *Preliminary evaluation of a granulosis virus for control of codling moth*. J. Econ. Entomol. 61:1208-1213.
- FAO. 1988. *Guidelines on the registration of biological pest control agents*. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Roma, Italia, 7pp.
- FAO. 1996. *Code of conduct for the import and release of exotic biological control agents*. International Standards for phytosanitary measures 3. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Roma, Italia, 19pp.
- FARRAR, R.R., R.L. RIDGWAY, S.P. COOK, K.W. THORPE Y R.E. WEBB. 1995. *Nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): potency and effects of selected adjuvants on insect feeding behavior*. J. Entomol. Sci. 30:417-428.
- FEDERICI, B.A. 1999. *Naturally occurring baculoviruses for insect pest control*, p. 301-320. En: F.R. Hall y J.J. Menn (ed.) *Biopesticides use and delivery*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- FLEMING, S., R. ARCHIBALD, K. STEWART Y J. KALMAKOFF. 1982. *Natural regulation of Wiseana spp. by enzootic disease*, p. 283-289. En: K.E. Lee (ed.), *Proceedings of the third Australasian conference on grassland invertebrate ecology*. Government Printer, South Australia.

- FLEMING, S., J. KALMAKOFF, R. ARCHIBALD Y K. STEWART. 1986. *Density-dependent virus mortality in populations of Wiseana (Lepidoptera: Hepialidae)*. J. Invertebr. Pathol. **48**:193-198.
- FUXA, J. R. 1991. *Insect control with baculoviruses*. Biotech. Adv. **9**:425-442.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1996. *Effect of agricultural operations and precipitation on vertical distribution of a nuclear polyhedrosis virus in soil*. Biol. Contr. **6**:324-329.
- FUXA, J.R. Y J.P. GEAGHAN. 1983. *Multiple regression analysis of factors affecting prevalence of nuclear polyhedrosis virus in Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) populations*. Environ. Entomol. **12**:311-316.
- FUXA, J.R., R. AYYAPPATH Y R.A. GOYER. 1998. *Pathogens and microbial control of North American forest insect pests*. Forest health technology enterprise team, USDA For. Serv. Rep. FHTET-97-27. Morgantown WV, USA.
- GAUGLER, R. 1997. *Alternative paradigms for commercializing biopesticides*. Phytoparasit. **25**:179-182.
- GELERTNER, W.D. Y B.A. FEDERICI. 1986. *Isolation, identification, and determination of virulence of a nuclear polyhedrosis virus from the beet armyworm, Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae)*. Environ. Entomol. **15**:240-245.
- GEORGIS, R. 1997. *Commercial prospects of microbial insecticides in agriculture*, p. 243-254. En: H.F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs, Farnham, Reino Unido.
- GLASER, R.W. Y J.W. CHAPMAN. 1913. *The wilt disease of gipsy moth caterpillars*. J. Econ. Entomol. **6**:479-488.
- GLEN, D.M. Y C.C. PAYNE. 1984. *Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of Cydia pomonella in the United Kingdom*. Ann. Appl. Biol. **104**:87-98.
- GLEN, D.M. Y M. PHILLIPS. 1984. *Integrating control of earwigs*. Grower **101**:35-37.
- GLEN, D.M., C.W. WILTSHIRE, N.F. MILSOM Y P. BRAIN. 1984. *Codling moth granulosis virus: effects of its use of some other orchard arthropods*. Ann. Appl. Biol. **104**:99-106.
- GLOWACKA-PILOT, B., J. ZIEMNICKA, J.J. LIPA Y J. CHLODNY. 1987. *Laboratory and field efficacy of Virox in control of the European pine sawfly (Neodiprion sertifer Geoffr.) (Hymenoptera: Diprionidae)*. Prace Naukowe Inst. Ochrony Roslin Poznan **28**:399-407.
- GOTHAMA, A.A.A., G.W. LAWRENCE Y P.P. SIKOROWSKI. 1996. *Activity and persistence of Steinernema carpocapsae and Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus against S. exigua larvae on soybean*. J. Nematol. **28**:68-74.
- GREWAL, P.S., K. WEBB, N.A.M. VAN BEEK, M.B. DIMOCK Y R. GEORGIS. 1998. *Virulence of Anagrapha falcifera nuclear polyhedrosis virus to economically significant Lepidoptera*. J. Econ. Entomol. **91**:1302-1306.
- GRZYWACZ, D. 1995. *Homeopathic viruses for control of the podborer Helicoverpa armigera*. IPM IRM Newslet. legum. crops Asia **2**:4-5.
- GRZYWACZ, D., K.A. JONES, G. MOAWAD Y A. CHERRY. 1998. *The in vivo production of Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus*. J. Virol. Meth. **71**:115-122.

- GRZYWACZ, D., D. MCKINLEY, K.A. JONES Y G. MOAWAD. 1997. *Microbial contamination in Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt*. J. Invertebr. Pathol. **69**:151-156.
- GRZYWACZ, D. Y H. WARBURTON. 1999. *An evaluation of the promotion and uptake of microbial pesticides in developing countries by resource-poor farmers: A report on phase 1 of the CPP crosscutting project A0805*. Natural Resources Institute Report No. R2440, September 1999, Chatham, Reino Unido (informe interno).
- GUILLON, M. 1997. *Production of biopesticides: scale up and quality assurance*, p. 151-162. En: H.F. Evans (ed.), *Microbial insecticides: novelty or necessity?* British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs., Farnham, Reino Unido.
- HACKETT, K.J., A. BOORE, C. DEMING, E. BUCKLEY, M. CAMP Y M. SHAPIRO. 2000. *Helicoverpa armigera granulovirus interference with progression of H. zea nucleopolyhedrovirus disease in H. zea larvae*. J. Invertebr. Pathol. **75**:99-106.
- HALL, F.R. Y J.J. MENN. 1999. *Biopesticides use and delivery*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- HAMM, J.J. 1999. *Interactions in entomology: enhanced infectivity of entomopathogenic viruses by fluorescent brighteners*. J. Entomol. Sci. **34**:8-16.
- HAMM, J.J. Y L.D. CHANDLER. 1996. *Effects of nuclear polyhedrosis virus and a fluorescent brightener on colonies of Spodoptera exigua (Hubner)*. J. Entomol. Sci. **31**:355-362.
- HARA, K., M. FUNAKOSHI Y T. KAWARABATA. 1995. *In vivo and in vitro characterization of several isolates of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*. Acta Virol. **39**:215-222.
- HARRAP, K.A., C.C. PAYNE Y J.S. ROBERTSON. 1977. *The properties of three baculoviruses from closely related hosts*. Virology **79**:14-31.
- HARRIS, J. Y D.R. DENT. 2000. *Priorities in biopesticide research and development in developing countries*. CABI Publishing, Wallingford, Reino Unido.
- HARTMAN, C.L. Y G.M. MARKLE. 1999. *IR-4 biopesticide program for minor crops*, p. 443-452. En: F.R. Hall y J.J. Menn (ed.), *Biopesticides: use and delivery. Methods in biotechnology*, vol 5, Humana Press, Totowa, NJ.
- HELSEN, H., L. BLOMMERS Y C. VAGO. 1992. *Efficacy and implementation of granulosis virus against codling moth in orchard IPM*. Med. Fac. Landbouw. Gent **57**:569-573.
- HUANG, L. Y S.S. KAO. 1994. *Production of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus in larvae*. Chin. J. Entomol. **14**:343-352.
- HÜBER, J. 1986. *Use of baculoviruses in pest management programs*, p. 182-202. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), *The biology of baculoviruses*, vol 2: practical application for insect control. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.
- HÜBER, J. 1998. *Western Europe*, p. 201-215. En: F. R. Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans, y N. E. Crook (ed.), *Insect viruses and pest management*. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido.
- HÜBER, J. Y E. DICKLER. 1977. *Codling moth granulosis virus: its efficiency in the field in comparison with organophosphorous insecticides*. J. Econ. Entomol. **70**:557-561.

- HUGHES, K.M. Y R.B. ADDISON. 1970. *Two nuclear polyhedrosis viruses of the Douglas-fir tussock moth*. J. Invertebr. Pathol. **16**:196-204.
- HUNTER, D.K. 1970. *Pathogenicity of a granulosis virus of the Indian meal moth*. J. Invertebr. Pathol. **16**:339-341.
- HUNTER, D.K., S.S. COLLIER Y D.F. HOFFMANN. 1977. *Granulosis virus of the Indian meal moth as a protectant for stored inshell almonds*. J. Econ. Entomol. **70**:493-494.
- HUNTER-FUJITA, F.R., P.F. ENTWISTLE, H.F. EVANS Y N.E. CROOK. 1998. *Insect viruses and pest management*. John Wiley y Sons, Chichester, Reino Unido.
- HUNTER-FUJITA, F.R., E. RADLEY, I.R.L. SMITH Y T.K. ADIKU. 1990. *Characterization of baculoviruses isolated from cotton fields in Egypt*, p. 225. En: Proc. 8th Int. Colloq. Invertebr. Pathol. Microb. Contr., Soc. Invertebr. Pathol., Adelaide, Australia.
- HUNTER-FUJITA, F.R., S. VASILJEVIC, K.A. JONES Y A.J. CHERRY. 1997. *Effects of mixed infections with GV and NPV on the biology of the Egyptian cotton leafworm Spodoptera littoralis*, p. 271-278. En: H.F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs, Farnham, Reino Unido.
- IGNOFFO, C.M. Y C. GARCÍA. 1966. *The relation of pH to the activity of inclusion bodies of a Heliothis nuclear polyhedrosis*. J. Invertebr. Pathol. **8**:426-427.
- IGNOFFO, C.M. Y T.L. COUCH. 1981. *The nucleopolyhedrosis virus of Heliothis species as a microbial insecticide*, p. 330-362. En: H.D. Burges (ed.), Microbial Control of insect pests and plant diseases. Academic Press, Londres.
- IGNOFFO, C.M., C. GARCÍA, D.L. HOSTETTER Y R.E. PIMENTELL. 1980. *Transplanting: a method of introducing an insect virus into an ecosystem*. Environ. Entomol. **9**:153-154.
- IGNOFFO, C.M., M.E. MARTIGNONI Y J.L. VAUGHN. 1983. *A comparison of the US (Gypcheck) and USSR (Virin-ENSh) preparations of the nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth, Lymantria dispar*. Results of research conducted under project V-01.0705. Microbiological control of insect pests of the US/USSR. Joint working group on the production of substances by microbiological means. Washington DC.
- IJKEL, W.F., E.A. VAN STRIEN, J.G.M. HELDENS, R. BROER, D. ZUIDEMA, R.W. GOLDBACH Y J.M. VLAK. 1999. *Sequence and organization of the Spodoptera exigua multicapsid nucleopolyhedrovirus genome*. J. Gen. Virol. **80**:3289-3304.
- JACKSON, D.M., G.C. BROWN, G.L. NORDIN Y D.W. JOHNSON. 1992. *Autodissemination of a baculovirus for management of tobacco budworms (Lepidoptera: Noctuidae) on tobacco*. J. Econ. Entomol. **85**:710-719.
- JAQUES, R.P. 1970. *Application of viruses to soil and foliage for control of cabbage looper and imported cabageworm*. J. Invertebr. Pathol. **15**:328-340.
- JAQUES, R.P. 1974a. *Ocurrence and accumulation of the granulosis virus of Pieris rapae in treated field plots*. J. Invertebr. Pathol. **23**:351-359.
- JAQUES, R.P. 1974b. *Ocurrence and accumulation of viruses of Trichoplusia ni in treated field plots*. J. Invertebr. Pathol. **23**:140-152.

- JAQUES, R.P., J.E. LAING, D.R. LAING Y D. S.K.YU. 1987. *Effectiveness and persistence of the granulosis virus of the codling moth Cydia pomonella (L.) (Lepidoptera: Olethreutidae) on apple*. Can. Entomol. **119**:1063-1067.
- JAQUES, R.P., J.M. HARDMAN, J.E. LAING, R.F. SMITH Y E. BENT. 1994. *Orchard trials in Canada on control of Cydia pomonella (Lep: Tortricidae) by granulosis virus*. Entomophaga **39**:281-292.
- JENKINS, N.E. Y J.G. VOS. 2000. *Delivery of biocontrol technologies to IPM farmers: Vietnam*, p. 1-32. En: D.R. Dent y H.N.B. Gopalan (ed.), UNEP/CABI critical issues case studies. CABI/UNEP Pubs., Wallingford, Reino Unido.
- JOHNSON, J.A., P.V. VAIL, E.L. SODERSTROM, C.E. CURTIS, D.G. BRANDL, J.S. TEBBETS Y K.A. VALERO. 1998. *Integration of nonchemical, postharvest treatments for control of navel orangeworm (Lepidoptera: Pyralidae) and Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) in walnuts*. J. Econ. Entomol. **91**:1437-1444.
- JOHNSON, W.T., J.C. CUNNINGHAM, W.J. KAUPP Y J.C. EDWARDS. 1978. *Insect virus applications with a cold fog generator*. Bi-month. Res. Notes Can. Forest. Serv. **34**:25-26.
- JONES, K.A. 1988. *The use of insect viruses for pest control in developing countries*. Asp. Appl. Biol. **17**:425-433.
- JONES, K.A. 1995. *The use of baculoviruses in cotton IPM*, p. 446-450. En: G.A. Constable y N.W. Forrester (ed.), Challenging the future: Proceedings of the world cotton research conference 1. Brisbane, febrero 14-17 1994. CSIRO Pubs., Melbourne, Australia.
- JONES, K.A. Y D. MCKINLEY. 1987. *Persistence of Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus on cotton in Egypt*. Asp. Appl. Biol. **14**:323-334.
- JONES, K.A., G. MOAWAD, D. MCKINLEY Y D. GRZYWACZ. 1993. *The effect of natural sunlight on Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus*. Biocontr. Sci. Technol. **3**:189-197.
- JONES, K.A., S. IRVING, G. MOAWAD, D. GRZYWACZ, A. HAMID Y A. FARGHALY. 1994. *Application rate trials with a nuclear polyhedrosis virus to control Spodoptera littoralis on cotton in Egypt*. Crop Protec. **13**:337-340.
- JONES, K.A., B. ZELAZNY, U. KETUNUTI, A. CHERRY Y D. GRZYWACZ. 1998. *South-east Asia and the western Pacific*, p. 244-256. En: F. R. Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans, y N. E. Crook (ed.), *Insect viruses and pest management*. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido.
- JUTSUM, A.R. 1988. *Commercial application of biological control: status and prospects*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. **B 318**:357-373.
- KALMAKOFF, J. Y A.M. CRAWFORD. 1982. *Enzootic control of Wiseana spp. in a pasture environment*, p. 435-448. En: E. Kurstak (ed.), Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, NY.
- KALMAKOFF, J., S. FLEMING, R. ARCHIBALD Y K. STEWART. 1985. *The porina story: a stochastic model*, p. 160-166. En: R.B. Chapman (ed.), Proceedings of the fourth Australasian conference on grassland invertebrate ecology. Caxton Press, Christchurch, New Zealand.
- KAUPP, W.J., J.C. CUNNINGHAM, J.H. MEATING, G.M. HOWSE Y A. DENYS. 1988. *Aerial*

- spray trials with Disparvirus in Ontario in 1986*. Inform. Report FPM-X-82, Can. For. Serv., Sault Ste. Marie, Ontario.
- KINSINGER, R.A. Y W.H. MCGAUGHEY. 1976. *Stability of Bacillus thuringiensis and a granulosis virus of Plodia interpunctella on stored wheat*. J. Econ. Entomol. **69**:149-154.
- KOLODNY-HIRSCH, D.M., T. SITCHAWAT, T. JANSIRI, A. CHENRCHAIVACHIRAKUL Y U. KETUNUTI. 1997. *Field evaluation of a commercial formulation of the Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus for control of beet armyworm on vegetable crops in Thailand*. Biocontr. Sci. Technol. **7**:475-488.
- KOLODNY-HIRSCH, D.M., D.L. WARKENTIN, B. ALVARADO-RODRIGUES Y R. KIRKLAND. 1993. *Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral insecticide for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Econ. Entomol. **86**:314-321.
- KRASSILSTCHIK, J. 1888. *La production industrielle des parasites végétaux par la destruction des insectes nuisibles*. Bull. Sci. Fr. Belg. **19**:461-472.
- KULIKOVSKII, Y.N. 1984. *Experience in aerial treatment of forests with biopreparations*. Zashchita Rastenii **7**:28.
- LACEY, J. Y M.S. GOETTEL. 1995. *Current development in microbial control of insect pests and prospects for the early 21st century*. Entomophaga **40**:3-27.
- LEWIS, F.B. 1981. *Control of the gypsy moth by a baculovirus*, p. 363-377. En: H.D. Burges (ed.), Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Academic Press, Londres.
- LEWIS, W.J., J.C. VAN LENETEREN, S.C. PHATAK Y J.H. TUMLINSON. 1997. *A total system approach to sustainable pest management*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:12243-12248.
- LIPA, J. 1998. *Eastern Europe and the former Soviet Union*, p. 216-231. En: F.R. Hunter-Fujita, P.F. Entwistle, H.F. Evans y N.E. Crook (ed.), Insect viruses and pest management. John Wiley & Sons, Chichester, Reino Unido.
- LISANSKY, S. 1997. *Microbial biopesticides*, p. 3-10. En: H.F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs, Farnham, Reino Unido.
- LUHL, R. 1974. *Vrsuche mit insektenpathogenen polyederviren und chemischen stressoren zur bekämpfung forstschadlicher raupen*. Z. angew. Ent. **76**:49-65 (en alemán).
- MARTIGNONI, M.E. 1978. *Virus in biological control. Production, activity and safety*, p. 140-147. En: M. H. Brookes, R. W. Stark y R. W. Campbell (ed.), The Douglas-fir tussock moth: a synthesis. USDA Tech. Bull. No. 1585.
- 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.
- MARUNIAK, J.E. 1989. *Molecular biology of Anticarsia gemmatilis baculovirus*. Mem. Inst. Oswald Cruz **84**:107-111.
- MARUNIAK, J.E. 1994. *Biological and molecular characteristics of insect virus biological pesticides*, p. 81-120. En: D. Rosen, F.D. Bennett y J.L. Capinera (ed.) Pest management in the subtropics: biological control - a Florida perspective. Intercept Pubs., Andover, MA.

- MASCARENHAS, V.J., B.R. LEONARD, E. BURRIS Y J. B. GRAVES. 1996. *Beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) control on cotton in Louisiana*. Fl. Entomol. **79**:336-343.
- MCGAUGHEY, W.H. 1975. *A granulosis virus for Indian meal moth control in stored wheat and corn*. J. Econ. Entomol. **68**:346-348.
- MCKINLEY, D.J. 1980. *The use of viruses in the control of Spodoptera species and prior safety testing*, p. 75-80. En: B. Lundholm y M. Stackerud (ed.), Environmental protection and biological forms of control of pest organisms, Ecol. Bull. No. 31 (Stockholm).
- MCKINLEY, D.J., G. MOAWAD, K.A. JONES, D. GRZYWACZ Y C. TURNER. 1989. *The development of nuclear polyhedrosis virus for the control of Spodoptera littoralis (Boisd.) in cotton*, p. 93-100. En: M.B. Green y D.J. de B. Lyon (ed.) Pest management in cotton, Society of Chemical Industry, Ellis Horwood Pubs., Reino Unido.
- MENN, J.J. 1996. *Biopesticides, has their time come?* J. Environ. Sci. Health B. Pestic. Food Contam. Agric. Wastes **31**:383-389.
- METCHNIKOFF, E. 1879. *Diseases of the larvae of the grain weevil*. En: The grain weevil. Insects harmful to agriculture, Issue III. Commission attached to the Odessa Zemstvo Office (en ruso).
- MOSCARDI, F. 1989. *Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, Anticarsia gemmatilis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **84**:51-56.
- MOSCARDI, F. 1999. *Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera*. Annu. Rev. Entomol. **44**:257-289.
- MOSCARDI, F., A.R. ABOT Y D.R. SOSA-GÓMEZ. 1999. *Studies with resistance of a Brazilian population of the velvetbean caterpillar, Anticarsia gemmatilis, to its nucleopolyhedrosis*, p. 60. En: Proceedings of the XXXII Annual Meeting of Society for Invertebrate Pathology, 22-27 August 1999, University of California, Irvine, USA.
- MULROONEY, J.E. Y L. SKJOLDAGER. 1997. *Evaluation of an air-assisted ground sprayer for control of boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) and beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae)*. Southwest. Entomol. **22**:315-322.
- MURHAMMER, D.W. 1996. *Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture*. Appl. Biochem. Biotechnol. **59**:199-220.
- NEALE, M. Y P. NEWTON. 1999. *Registration/regulation requirements in Europe*, p. 453-471. En: F.R. Hall y J.J. Menn (ed.), Biopesticides: use and delivery. Methods in biotechnology, vol 5, Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- NEILSON, M.M., R. MARTINEAU Y A.H. ROSE. 1971. *Diprion hercyniae (Hartig) European spruce sawfly (Hymenoptera: Diprionidae); biological control programmes in Canada 1959-1968*, p. 136-143. En: Technical bulletin no. 4. Commonwealth Institute of Biological Control, Farnham, Reino Unido.
- NEUVONEN, S., K. SAIKKONEN Y E. HAUKIOJA. 1990. *Simulated acid rain reduces the susceptibility of the European pine sawfly (Neodiprion sertifer) to its nuclear polyhedrosis virus*. Oecologia **83**:209-212.

- OECD. 1996. *Data requirements for registration of biopesticides in OECD member countries: survey results. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD Environment Monograph No 106.* OECD, Paris, Francia.
- OLOFSSON, E. 1988a. *Environmental persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the European pine sawfly in relation to epizootics in Swedish Scots pine forests.* J. Invertebr. Pathol. **52**:119-129.
- OLOFSSON, E. 1988b. *Persistence and dispersal of the nuclear polyhedrosis virus of Neodiprion sertifer (Geoffroy) (Hymenoptera: Diprionidae) in a virus-free lodgepole pine plantation in Sweden.* Can. Entomol. **120**:887-892.
- ORLOVSKAYA, E.V. 1980. *Production of preparations for controlling the cabbage moth (Mamestra brassicae) and gypsy moth (Lymantria dispar L.) based on nuclear polyhedrosis viruses,* p. 54-76. En: C. M. Ignoffo, M. E. Martignoni y J. L. Vaughn (ed.), *Characterization, production and utilization of entomopathic viruses. Proceedings second conference of project V: Microbial control of insect pests in the US/USSR. Joint working group on the production of substances by microbiological means.* Washington DC.
- ORLOVSKAYA, E.V. 1989. *Ispolzvanie virusov v borbe s khvoelistogrizuschimi nasekomymi v USSR.* IOBC/EPRS Bull. **27**:69-72.
- OTVOS, I.S., J.C. CUNNINGHAM Y R.I. ALFARO. 1987a. *Aerial application of nuclear polyhedrosis virus against Douglas-fir tussock moth, Orgyia pseudotsugata (McDunnough) (Lepidoptera: Lymantriidae). II Impact 1 and 2 years after application.* Can. Entomol. **119**:707-715.
- OTVOS, I.S., J.C. CUNNINGHAM Y L.M. FRISKIE. 1987b. *Aerial application of nuclear polyhedrosis virus against Douglas-fir tussock moth, Orgyia pseudotsugata (McDunnough) (Lepidoptera: Lymantriidae). I Impact in the year of application.* Can. Entomol. **119**:697-706.
- PANUPS. 1997. *Pesticide Action Network North America, página Web con fecha de agosto de 1997:* <http://metalab.unc.edu/london/permaculture/mailarchives/sane/t2/msg01004.html>
- PARNELL, M.A., W.J. KING, K.A. JONES, U. KETUNUTI Y D. WETCHAKIT. 1999. *A comparison of motorised knapsack mistblower, medium volume application, and spinning disc, very low volume application, of Helicoverpa armigera nuclear polyhedrosis virus on cotton in Thailand.* Crop Protec. **18**:259-265.
- PASQUALINI, E., A. ANTROPOLI Y G. FACCIOI. 1994. *Performance tests of granulosis virus against Cydia pomonella L. (Lepidoptera: Olethreutidae).* Bull. OILB-SROP. **17**:113-119.
- PAYNE, C.C. 1982. *Insect viruses as control agents.* Parasitol. **84**:35-77.
- PAYNE, C.C., M.G. RICHARDS, D.M. GLEN, N.E. CROOK Y J.E. CRANHAM. 1985. *Research on the production and application of the granulosis virus of the codling moth, Cydia pomonella in the United Kingdom (1979-1983),* p. 9-17. En: R. Cavalloro y A. Piavaux (ed.), *C.E.C. Programme on Integrated and Biological Control: Final Report 1979/83.* Pubs: Commission of the European Communities, Bruselas.
- PODGWAITE, J.D. 1985. *Strategies for field use of baculoviruses,* p. 775-797. En: K.

- Maramorosch y K.E. Sherman (ed.), *Viral insecticides for biological control*. Academic Press Inc., N.Y.
- PODGWAITE, J.D., P. RUSH, D. HALL, G.S. WALTON. 1984. *Efficacy of the Neodiprion sertifer (Hymenoptera: Diprionidae) nucleopolyhedrosis virus (Baculovirus) product, Neocheck-S*. J. Econ. Entomol. **77**:525-528.
- PODGWAITE, J.D., P. RUSH, D. HALL Y G.S. WALTON. 1986. *Field evaluation of a nucleopolyhedrosis virus for control of redheaded pine sawfly (Hymenoptera: Diprionidae)*. J. Econ. Entomol. **79**:1648-1652.
- PODGWAITE, J.D., R.C. REARDON, G.S. WALTON, L. VENABLES Y D.M. KOLODNY-HIRSCH. 1992. *Effects of aerially applied Gypcheck on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations in Maryland woodlots*. J. Econ. Entomol. **85**:1136-1139.
- POLSON, A. Y D. TRIPCONEY. 1970. *A virus disease of the lucerne caterpillar, Colias electo Linn*. Phytophylact. **2**:17-20.
- POSSEE, R.D., C.J. ALLEN, P.F. ENTWISTLE, L.R. CAMERON Y D.H.L. BISHOP. 1990. *Field trials of genetically engineered baculovirus insecticides*, p. 50-60. *En: Risk assessment in agricultural biotechnology: proceedings of the International Conference, August 1988. University of California, Oakland, California, USA.*
- POWELL, K.A. Y D.J. RHODES. 1994. *Strategies for the progresion of biological fungicides into field evaluation*, p. 307-315. *En: H.G. Hewitt, J. Caseley, B.T. Grayson y D. Tyson (ed.), Comparing glasshouse and field pesticide performance II. British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 59, BCPC Pubs, Farnham, Reino Unido.*
- RABINDRA, R.J., M. MUTHUSWAMI Y S. JAYARAJ. 1994. *Influence of host plant surface environment on the virulence of nuclear polyhedrosis virus against Helicoverpa armigera (Hbn.) (Lep., Noctuidae) larvae*. J. Appl. Entomol. **118**:453-460.
- RABINDRA, R.J., N. SATHIAH Y S. JAYARAJ. 1992. *Efficacy of nuclear polyhedrosis virus against Helicoverpa armigera (Hbn.) on Helicoverpa-resistant and susceptible varieties of chickpea*. Crop Protec. **11**:320-322.
- REED, W., C. CARDONNA, S. SITHANANTHAM Y S.S. LATEEF. 1987. *Chickpea insect pests and their control*, p. 283-318. *En: The Chickpea. CAB International, Wallingford, UK.*
- REIFF, W. 1911. *The wilt disease flacerie of the gypsy moth*. Contributions of the entomology laboratory, Busset Institute, Harvard University, Wright & Potter Pubs., Boston, USA.
- RICHARDS, A., J. CORY, M. SPEIGHT Y T. WILLIAMS. 1999. *Foraging in a pathogen reservoir can lead to local host population extinction: a case study of a Lepidoptera-virus interaction*. Oecologia **118**:29-38.
- RODGERS, P. 1993. *Potential of biopesticides in agriculture*. Pestic. Sci. **39**:117-129.
- ROOME, R.E. 1975. *Field trials with a nuclear polyhedrosis virus and Bacillus thuringiensis against larvae of Heliothis armigera (Hb.) (Lepidoptera, Noctuidae) on sorghum and cotton in Botswana*. Bull. Entomol. Res. **65**:507-514.
- ROUSH, R.T. Y B.E. TABASHNIK. 1990. *Pesticide resistance in arthropods*. Chapman & Hall, NY.

- RUSSEL, D.A., S.M. RADWAN, N.S. IRVING, K.A. JONES Y M.C.A. DOWNHAM. 1993. *Experimental assessment of the impact of defoliation by Spodoptera littoralis on the growth and yield of Giza '75 cotton*. Crop Protec. **12**:303-310.
- SAIT, S.M., M. BEGON Y D.J. THOMPSON. 1994a. *The influence of larval age on the response of Plodia interpunctella to a granulosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **63**:107-110.
- SAIT, S.M., M. BEGON Y D.J. THOMPSON. 1994b. *The effects of a sublethal baculovirus infection in the Indian meal moth, Plodia interpunctella*. J. Anim. Ecol. **63**:541-550.
- SAIT, S.M., M.J.G. GAGE Y P.A. COOK. 1998. *Effects of a fertility-reducing baculovirus on sperm numbers and sizes in the Indian meal moth, Plodia interpunctella*. Funct. Ecol. **12**:56-62.
- SHAH, P. Y M.S. GOETTEL. 1999. *Directory of microbial control products and services*. Microbial Control Divn., Soc. Invertebr. Pathol., Gainesville, USA. (disponible en su hoja Web: <http://www.sipweb.org/mcddir.pdf>)
- SHAPIRO, M. 1981. *Gypsy moth nucleopolyhedrosis virus: in vivo production at Otis Air Base, Mass.* p. 464. En: C.C. Doane y M.L. McManus (ed.), *The gypsy moth: Research toward integrated pest management*. USDA Forest. Serv. Tech. Bull. No. 1584.
- SHAPIRO, M. 1995. *Radiation protection and activity enhancement of viruses*, p. 153-165. En: F.R. Hall y J.W. Barry (ed.), *Biorational pest control agents: formulation and delivery*. ACS Symposium Series 595, Amer. Chem. Soc., Washington DC.
- SHAPIRO, M. Y E. DOUGHERTY. 1994. *Enhancement in activity of homologous and heterologous viruses against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by an optical brightener*. J. Econ. Entomol. **87**:361-365.
- SHAPIRO, M. Y J.L. ROBERTSON. 1992. *Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners*. J. Econ. Entomol. **85**:1120-1124.
- SHAPIRO, M., R.A. BELL Y C.D. OWENS. 1981a. *Evaluation of various artificial diets for in vivo production of the gypsy moth nucleopolyhedrosis virus*. J. Econ. Entomol. **74**:110-111.
- SHAPIRO, M., C.D. OWENS, R.A. BELL Y H.A. WOOD. 1981b. *Simplified, efficient system for in vivo mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus*. J. Econ. Entomol. **74**:341-343.
- SHEPPARD, R.F. Y G.R. STAIRS. 1976. *Effects of dissemination of low dosage levels of a granulosis virus in populations of the codling moth*. J. Econ. Entomol. **69**:583-586.
- SHEPPARD, R.F. Y G.R. STAIRS. 1977. *Dosage-mortality and time-mortality studies of a granulosis virus in a laboratory strain of the codling moth, Laspeyresia pomonella*. J. Invertebr. Pathol. **29**:216-220.
- SHEPHERD, R.F., D.D. BENNETT, J.W. DALE, S. TUNNOCK, R.E. DOLPH Y R.W. THIER. 1988. *Evidence of synchronized cycles in outbreak patterns of Douglas-fir tussock moth, Orgyia pseudotsugata (McDonnough) (Lepidoptera: Lymantriidae)*. Mem. Entomol. Soc. Can. **146**:107-121.

- SHEPHERD, R.F., I.S. OTVOS, R.J. CHORNEY Y J.C. CUNNINGHAM. 1984. *Pest management of Douglas-fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae): prevention of an outbreak through early treatment with a nuclear polyhedrosis virus by ground and aerial applications*. Can. Entomol. **166**:1533-1542.
- SHIEH, T. R. 1989. *Industrial production of viral pesticides*. Adv. Virus Res. **36**:315-343.
- SMITH, K.M. Y R.W.G. WYCKOFF. 1950. *Structure within polyhedra associated with insect virus diseases*. Nature **166**:861.
- SMITH, K.M. 1955. What is a virus? Nature **175**:12-14.
- SMITH, K.M. Y C.F. RIVERS. 1956. *Some viruses affecting insects of economic importance*. Parasitol. **46**:235-242.
- SMITS, P.H. 1987. *Nuclear polyhedrosis virus as biological control agent of Spodoptera exigua*. Tesis de Doctorado, Universidad de Wageningen, Países Bajos.
- SMITS, P.H. Y J.M. VLAK. 1994. *Registration of the first viral insecticide in the Netherlands: the development of Spod-X, based on Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*. Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent **59**:383-392.
- SMITS, P.H., M. VAN DER VRIE Y J.M. VLAK. 1987. *Nuclear polyhedrosis virus for control of Spodoptera exigua larvae on glasshouse crops*. Entomol. Exp. Appl. **43**:73-80.
- STEINHAUS, E.A. 1949. *Principles of insect pathology*. McGraw-Hill, N.Y.
- STELZER, M.J. Y J. NEISESS. 1978. *Virus in biological control. Field efficacy tests*, p. 149-152. En: M. H. Brookes, R. W. Stark y R. W. Campbell (ed.), *The Douglas-fir tussock moth: a synthesis*. USDA Tech. Bull. No. 1585.
- STELZER, M.J., J. NEISESS Y C.G. THOMPSON. 1975. *Aerial applications of a nucleopolyhedrosis virus and Bacillus thuringiensis against the Douglas-fir tussock moth*. J. Econ. Entomol. **68**:269-272.
- STELZER, M.J., J. NEISESS, CUNNINGHAM Y J.R. MCPHEE. 1977. *Field evaluation of baculovirus stocks against Douglas-fir tussock moth in British Colombia*. J. Econ. Entomol. **70**:243-246.
- TABASHNIK, B.E. 1994. *Evolution of resistance to Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. **39**:47-79.
- TAMEZ-GUERRA, P., M.R. MCGUIRE, R.W. BEHLE, J.J. HAMM, H.R. SUMNER Y B.S. SHASHA. 2000. *Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from Anagrapha falcifera (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Econ. Entomol. **93**:210-218.
- TANADA, Y. 1964. *A granulosis virus of the codling moth, Carpocapsa pomonella (Linnaeus) (Olethreutidae)*. J. Insect Pathol. **6**:378-380.
- TANADA, Y. Y H.K. KAYA. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, N.Y.
- TANADA, Y. Y E.M. OMI. 1974. *Epizootiology of virus diseases in three lepidopterous insect species of alfalfa*. Res. Pop. Ecol. **16**:59-68.
- THOMPSON, C.G. Y B. MAKSYMUK. 1978. *Virus in biological control. Laboratory and simulated field tests*, p. 147-149. En: M. H. Brookes, R. W. Stark y R. W. Campbell (ed.), *The Douglas-fir tussock moth: a synthesis*. USDA Tech. Bull. No. 1585. Washington, DC.

- THOMPSON, C.G., D.W. SCOTT Y B.E. WICKMAN. 1981. *Long term persistence of the nuclear polyhedrosis virus of the Douglas-fir tussock moth, Orgyia pseudotsugata (Lep.: Lymantriidae) in forest soil.* Environ. Entomol. **10**:254-255.
- THOMPSON, G.D., K.H. MICHEL, R.C. YAO, J.S. MYNDERSE, C.T. MOSBURG, T.V. WORDEN, E.H. CHIO, T.C. SPARKS Y S.H. HUTCHINS. 1997. *The discovery of Saccharopolyspora spinosa and a new class of insect control products.* Down to Earth **52**:1-5. (Disponible en la página web de Dow Agrociencias: <http://www.dowagro.com/DTE/vol52.htm>)
- THOMPSON, G. Y S. HUTCHINS. 1999. *Spinosa*. Pestic. Outlook **10**:78-81.
- THORPE, K.W., J.D. PODGWAITE, J.M. SLAVICEK Y R.E. WEBB. 1998. *Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) control with ground-based hydraulic applications of Gypcheck, in vitro-produced virus, and Bacillus thuringiensis.* J. Econ. Entomol. **91**:875-880.
- THORPE, K.W., S.P. COOK, R.E. WEBB, J.D. PODGWAITE Y R.C. REARDON. 1999. *Aerial application of the viral enhancer Blankophor BBH with reduced rates of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrovirus.* Biol. Contr. **16**:209-216.
- TOPPER, C., G. MOAWAD, D. MCKINLEY, M. HOSNY, K.A. JONES, J. COOPER, S. EL-NAGAR Y M. EL-SHEIK. 1984. *Field trials with a nuclear polyhedrosis virus against Spodoptera littoralis on cotton in Egypt.* Trop. Pest Manag. **30**:372-378.
- TUAN-SHUIJEN, KAO-SUEYSHENG, CHENG-DORJIH, S.J. TUAN, S.S. KAO Y D.J. CHENG. 1994. *Histopathology and pathogenicity of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus isolated in Taiwan.* Chin. J. Entomol. **14**:33-45.
- VAIL, P.V., D.F. HOFFMANN Y J.S. TEBBETS. 1993. *Autodissemination of Plodia interpunctella (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) granulosus virus by healthy adults.* J. Stor. Prod. Res. **29**:71-74.
- VAIL, P.V., D.L. HOSTETTER Y D.F. HOFFMANN. 1999. *Development of the multi-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses (MNPV's) infectious to loopers (Lepidoptera: Plusiinae) as microbial control agents.* Integ. Pest Mangmt. Rev. **4**:231-257.
- VAIL, P.V., C.F. SOO HOO, R.S. SEAY, R.G. KILLINEN Y W.W. WOLF. 1972. *Microbial control of lepidopterous pests of fall lettuce in Arizona and effects of chemical and microbial pesticides on parasitoids.* Environ. Entomol. **1**:780-785.
- VAIL, P.V., J.S. TEBBETS, D.C. COWAN Y K.E. JENNER. 1991. *Efficacy and persistence of a granulosus virus against infestations of Plodia interpunctella (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) on raisins.* J. Stored Prod. Res. **27**:103-107.
- VAN HUIS, A. 1981. *Integrated pest management in the small farmer's maize crop in Nicaragua.* Meded. Fac. Landbou. Wageningen **81-6**:1-221.
- WAAGE, J.K. 1997. *Biopesticides at the crossroads: IPM products or chemical clones?* p. 11-19. En: H.F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs, Farnham, Reino Unido.
- WAAGE, J.K. 1999. *Beyond the realm of conventional biological control: harnessing bioresources and developing biologically based technologies for sustainable pest management,* p. 5-17. En: L.W. Hong, S.S. Sastroutomo, I.G. Cauntar, J.

- Ali, L.K. Yeang, S. Vijaysegaran y Y.H. Sen (ed.), Biological control in the tropics. CAB International, Selangor, Malaysia.
- WEBB, R.E., G.B. WHITE, K.W. THORPE Y S.E. TALLEY. 1999c. *Quantitative analysis of a pathogen-induced premature collapse of a "leading edge" gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) population in Virginia*. J. Entomol. Sci. **34**:84-100.
- WEBB, R.E., J.D. PODGWAITE, M. SHAPIRO, K.M. TATMAN Y L.W. DOUGLASS. 1990. *Hydraulic spray applications of Gypcheck as a homeowner tactic against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*. J. Entomol. Sci. **25**:383-393.
- WEBB, R.E., K.W. THORPE, J.D. PODGWAITE, R.C. REARDON, G.B. WHITE Y S.E. TALLEY. 1999a. *Field evaluation of an improved formulation of Gypcheck (a nuclear polyhedrosis virus product) against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*. J. Entomol. Sci. **34**:72-83.
- WEBB, R.E., K.W. THORPE, J.D. PODGWAITE, R.C. REARDON, G.B. WHITE Y S.E. TALLEY. 1999b. *Efficacy of Gypcheck against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and residual effects in the year following treatment*. J. Entomol. Sci. **34**:404-414.
- WEBB, R.E., M. SHAPIRO, J.D. PODGWAITE, D.E. LYNN, E.M. DOUGHERTY, R.L. RIDGWAY, L. VENABLES Y D.L. COHEN. 1993. *Field comparison of different strains of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in western Maryland in 1990*. J. Econ. Entomol. **86**:1185-1190.
- WEBB, R.E., M. SHAPIRO, J.D. PODGWAITE, R.L. RIDGWAY, L. VENABLES, G.B. WHITE, R.J. ARGAUER, D.L. COHEN, J. WITCOSKY, K.M. KESTER Y K.W. THORPE. 1994b. *Effect of optical brighteners on the efficacy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus in forest plots with high or low levels of natural virus*. J. Econ. Entomol. **87**:134-143.
- WEBB, R.E., N.H. DILL, J.D. PODGWAITE, M. SHAPIRO, R.L. RIDGWAY, J.L. VAUGHN, L. VENABLES Y R.J. ARGAUER. 1994a. *Control of third and fourth instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) with Gypcheck combined with a stilbene disulfonic acid additive on individual shade trees*. J. Entomol. Sci. **29**:82-91.
- WEBB, R.E., N.H. DILL, J.M. McLAUGHLIN, L.S. KERSHAW, J.D. PODGWAITE, S.P. COOK, K.W. THORPE, R.R. FARRAR JR., R.L. RIDGWAY, R.W. FUESTER, M. SHAPIRO, R.J. ARGAUER, L. VENABLES Y G.B. WHITE. 1996. *Blankophor BBH as an enhancer of nuclear polyhedrosis virus in arborist treatments against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*. J. Econ. Entomol. **89**:957-962.
- WEBB, R.E., R. PEIFFER, R.W. FUESTER, K.W. THORPE, L. CALABRESE Y J.M. McLAUGHLIN. 1998. *An evaluation of the residual activity of traditional, safe, and biological insecticides against the gypsy moth*. J. Arboricult. **24**:286-293.
- WEBB, R.E., R.A. PEIFFER, R.W. FUESTER, M.A. VALENTI, K.W. THORPE, G.B. WHITE Y M. SHAPIRO. 1999d. *Effects of Blankophor BBH, a virus enhancing adjuvant, on mortality of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*. J. Entomol. Sci. **34**:391-403.
- WELLENSTEIN, G. 1973. *The use of insect viruses for the protection of forests*. Europ. Plant Protec. Bull. **9**:43-52.
- WHITLOCK, V.H. 1974. *Symptomatology of two viruses infecting Heliothis armigera*. J. Invertebr. Pathol. **23**:70-75.

- WHITLOCK, V.H. 1977. *Simultaneous treatments of Heliothis armigera with a nuclear polyhedrosis and granulosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **29**:297-303.
- WILLIAMSON, S. Y B. ALI. 2000. *Delivery of biocontrol technologies to IPM farmers: Nicaragua*, p. 1-39. En: D.R. Dent y H.N.B. Gopalan (ed.), UNEP/CABI critical issues case studies. Pub. CABI/UNEP, CAB Pubs., Wallingford, Reino Unido.
- WOODS, S.A. Y J.S. ELKINTON. 1987. *Bimodal patterns of mortality from nuclear polyhedrosis virus in gypsy moth (Lymantria dispar) populations*. J. Invertebr. Pathol. **50**:151-157.
- YATSENKO, V.G. 1984. *Primenenie virusnogo preparat Virin-ENSh v borbe s neparnym shelkopryadom v sadakh lesostepnoi zony Ukrainy*, p. 91-96. En: E.V. Orlovskaya (ed.), Itogi i perspektivy proizvodstva i primeneniya virusnykh preparatov v selskom i lesnom khozyastve. Moskva. (en ruso)
- 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.
- YOUNG, S.Y. Y W.C. YEARIAN. 1986. *Movement of a nuclear polyhedrosis virus from soil to soybean and transmission in Anticarsia gemmatilis (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations on soybean*. Environ. Entomol. **15**:573-580.