

04

 PHYTOMA



**CONTROL
BIOLÓGICO
DE PLAGAS
AGRÍCOLAS**

J.A. Jacas y A. Urbaneja

Editores

ISBN: 978-84-935247-0-8
Dep. Legal: V-3075-2008

Capítulo 8. VIRUS ENTOMOPATÓGENOS

Primitivo Caballero^a y Trevor Williams^b

^aInstituto de Agrobiotecnología, CSIC-Universidad Pública de Navarra España

^bInstituto de Ecología A.C., Veracruz, México



1. Virus entomopatógenos y su potencial insecticida

Un virus es una entidad microbiológica, no celular, que tiene un genoma con capacidad de replicarse y adaptarse a los cambios ambientales. Sin embargo, los virus se caracterizan por no poder capturar y almacenar energía libre y no ser funcionalmente activos fuera de las células de sus huéspedes. En este sentido, un virus se puede definir como un biosistema elemental que, en su forma más sencilla, está constituido por un ácido nucleico protegido en una cápsida proteica (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000). Los virus son patógenos obligados pero no son considerados como genuinos microorganismos de vida libre. Actualmente, se conocen más de 1.600 virus patógenos de invertebrados que afectan a un importante número de especies, la mayoría de las cuales son insectos pertenecientes a 13 órdenes distintos (CABALLERO, 2002). En este capítulo nos vamos a referir a los virus patógenos de insectos (llamados entomopatógenos) y su potencial como insecticidas biológicos.

Los virus entomopatógenos tienen partículas cuya morfología es muy variable tanto en forma como en tamaño y pueden ser de DNA o RNA de hebra simple o doble. En algunos virus, la nucleocápsida (ácido nucleico + cápsida proteica) puede estar envuelta por una bicapa lipídica, en cuyo caso forma un virión. Los viriones, a su vez, pueden estar, o no, incluidos en una matriz proteica que se denomina cuerpo de inclusión (OB, del inglés *occlusion body*).

Las bases genéticas para describir los virus como especies fueron establecidas por Bishop (1985). Todos los virus patógenos de insectos se agrupan en 15 familias y 33 géneros sin que hasta ahora se hayan definido, para la mayoría de los grupos, otros niveles taxonómicos de clasificación superiores (FAUQUET *et al.*, 2005). En la Tabla 8.1 se recogen algunas de las características que han contribuido en gran medida a la fundación del actual sistema de clasificación y que, por tanto, permiten diferenciar entre estos grupos de virus.

La formación del OB es una característica común de las familias Baculoviridae, Poxviridae y Reoviridae, en las cuales esta estructura ha evolucionado de forma independiente como un mecanismo de protección contra la

degradación ambiental, que les confiere una gran ventaja como bioplaguicidas. En los baculovirus (Baculoviridae), concurren otras dos características adicionales que hacen que hayan recibido mayor atención y alcanzado mayor desarrollo como insecticidas que cualquier otro grupo de virus entomopatógenos: 1) sólo se han aislado de especies del filo Arthropoda, mayoritariamente de la clase Insecta, lo cual representa un alto grado de bioseguridad, tanto para los seres humanos y otros vertebrados, como para la vida silvestre en general, y 2) tienen una elevada patogenicidad y virulencia para numerosas especies de insectos que producen importantes plagas.

La familia Baculoviridae incluye los géneros *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) y *Granulovirus* (GV) (THEILMANN *et al.*, 2005). Los NPVs típicamente contienen desde unos pocos hasta varias decenas de viriones dentro de cada OB. Se reconocen dos tipos morfológicos, aquellos cuyos viriones contienen característicamente una sola nucleocápsida (SNPVs) y los que contienen múltiples nucleocápsidas (MNPVs). Tanto los MNPVs como los SNPVs han sido aislados mayoritariamente de especies pertenecientes al orden Lepidoptera, aunque los SPNVs también se han aislado de algunas especies de los órdenes Hymenoptera, Diptera, Thysanura y Trichoptera (CABALLERO *et al.*, 2001). Los NPVs se replican en el núcleo de las células de varios tejidos (poliorganotróficos), incluida la epidermis, de las larvas infectadas en donde se producen millones de OBs que son diseminados al medio después de la muerte del insecto. En cambio, los GVs se caracterizan por tener viriones de tipo simple, los cuales están incluidos individualmente en los OBs. Los GVs sólo han sido aislados de especies de Lepidoptera, pero los tejidos afectados y patología son muy similares a la de los NPVs. Tanto los NPVs como los GVs originan epizootias naturales que a veces son muy llamativas. Algunos de los NPVs y GVs más patogénicos y con tiempos letales más cortos han sido desarrollados comercialmente como insecticidas microbianos (Tabla 8.2). En la actualidad se intenta seleccionar NPVs y GVs con mayor potencial insecticida (punto 3 de este capítulo) así como optimizar los sistemas de producción de OBs (punto 4) y los métodos y técnicas de formulación y aplicación (punto 5) para su desarrollo como insecticidas biológicos.

Tabla 8.1. Características de las familias y géneros de los virus patógenos de insectos.

Familia (Subfamilia) Género	Ácido nucleico ^a	Forma del virión	Diámetro o dimensiones del virión (nm)	¿Envuelta en el virión?	¿Viriones ocluidos?	Espectro de huéspedes ^b
Ascoviridae <i>Ascovirus</i>	hsDNA	baciliforme u ovoide	130 x 200-240	Sí	No	L, Hy (ichneumonídeos)
Baculoviridae <i>Nucleopolyhedrovirus</i> <i>Granulovirus</i>	hdDNA hdDNA	baciliforme baciliforme	40-60 x 200-400 30-60 x 260-360	Sí Sí	Sí Sí	L, Hy, D, Th, Tr L
Birnaviridae <i>Entomobirnavirus</i>	hsRNA	icosahédrica	60	No	No	D
Dicistroviridae <i>Cripavirus</i>	hsRNA	icosahédrica	30	No	No	He, O, D
Iridoviridae <i>Iridovirus</i> <i>Chloriridovirus</i>	hdDNA hdDNA	icosahédrica icosahédrica	120-140 180-200	No No	No No	C, D, He, L, O, Tr D
Metaviridae <i>Metavirus</i> <i>Errantivirus</i> <i>Semotivirus</i>	hsRNA hsRNA hsRNA	ND esféricos u ovoides esféricos u ovoides	ND ND ND	No No/Sí No/Sí	No No No	L, D, C D D
Nodaviridae <i>Alphanodavirus</i>	hsRNA	icosahédrica	30	No	No	C, D, L
Parvoviridae (Densovirinae) <i>Densovirus</i> <i>Iteravirus</i> <i>Brevdensovirus</i> <i>Pefudensovirus</i>	hsDNA hsDNA hsDNA hsDNA	redondeada redondeada redondeada redondeada	18-22 18-22 18-22 18-22	No No No No	No No No No	L, D, O, Od, L L, D Di, L, D., He
Polydnaviridae <i>Ichnovirus</i> <i>Brachovirus</i>	hdDNA hdDNA	elipsoide cilíndrica	85 x 330 40 x 30-150	Sí Sí	No No	Hy (ichneumonídeos) Hy (bracónidos)
Poxviridae (Entomopoxvirinae) <i>Alphaentomopoxvirus</i> <i>Betaentomopoxvirus</i> <i>Gammaentomopoxvirus</i>	hdDNA hdDNA hdDNA	ovoide ovoide forma de ladrillo	250 x 450 250 x 450 230 x 320	Sí Sí Sí	Sí Sí Sí	C O D
Pseudoviridae <i>Hemivirus</i>	hsRNA	redondeada	50	No	No	D
Reoviridae <i>Cypovirus</i> <i>Idnoreovirus</i>	hdRNA hdRNA	redondeada redondeada	55-69 75	Sí No	Sí No	L, Hy
Tetnaviridae <i>Betatretavirus</i> <i>Omegatetnavirus</i>	hsRNA hsRNA	redondeada redondeada	40 40	No No	No No	L L

^a hs - DNA o RNA de hebra simple; hd - DNA o RNA de hebra doble.

^b Órdenes de insecto - C: Coleoptera; D: Diptera; Di: Dictyoptera; He: Hemiptera; Hy: Hymenoptera; L: Lepidoptera; O: Orthoptera; Od: Odonata; Th: Thysanoptera; Tr: Trichoptera.
ND: no determinado.

En la familia Poxviridae, los virus específicos de insectos se encuentran clasificados en la subfamilia Entomopoxvirinae, que se caracterizan por formar OBs denominados esféricos. Los entomopoxvirus (EPVs) se han agrupado en tres géneros y un grupo de virus, aún no clasificados, en función de que hayan sido aislados de especies de Coleoptera (*Alphaentomopoxvirus*), Lepidoptera y Orthoptera (*Betaentomopoxvirus*), Diptera (*Gammaentomopoxvirus*) e Hymenoptera (virus no clasificados) (BULLER *et al.*, 2005). Las larvas de lepidópteros infectadas por EPVs se hinchan y adquieren una apariencia blancuzca. Su muerte puede ocurrir a los 12 días o retrasarse hasta más de 70 días de haberse iniciado la infección. En Coleoptera, el desarrollo de la infección puede ser todavía más lento. Los EPVs aislados de algunas especies de insectos que originan plagas, sobre todo en aquellas para las que no hay baculovirus descritos, podrían ser utilizados como agentes de control biológico una vez mejoradas sus propiedades insecticidas, sobre todo el tiempo letal.

En la familia Reoviridae, los de mayor interés para su

desarrollo como bioplaguicidas son los virus de la poliedrosis citoplásmica (CPVs) que se encuentran agrupados en el género *Cypovirus* (MERTENS *et al.*, 2005). Los OBs que forman son muy parecidos a los de los NPVs con los cuales es fácil confundirlos fuera de la célula; en cambio, dentro de la célula es fácil diferenciarlos ya que los OBs de los CPVs se forman en el citoplasma mientras que en los NPVs, los OBs se forman en el núcleo. Se han aislado, principalmente, de especies de Lepidoptera y con menor frecuencia de especies de Diptera, Hymenoptera, Coleoptera y Neuroptera (HUKUARA Y BONAMI, 1991). Los CPVs se transmiten por vía oral; los OBs se disuelven en el mesenterón y los viriones sólo afectan a las células epiteliales, con la excepción de algunas especies de CPVs que también afectan al cuerpo graso y otros tejidos. Los CPVs son muy infecciosos pero actúan muy lentamente y son más frecuentes las infecciones crónicas que las infecciones francas (BILLONCIK Y MORI, 1998). Hasta la fecha, no se han desarrollado bioinsecticidas comerciales. No obstante, se cree que su mayor potencial para el control biológico de plagas es

Tabla 8.2. Algunos ejemplos de plagas de cultivos o masas forestales controladas mediante bioinsecticidas basados en baculovirus en distintos países del mundo.

Insecto	Virus	Nombre del bioinsecticida	Empresa	Cultivo	País
<i>Adoxophyes orana</i>	GV	Capex	Andermatt Biocontrol AG	Manzano	Suiza
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	NPV	Baculo-Soja Baculovirus Nitril Coopervirus PM Protege	Nova Era Biotecnología Agrícola Nitril Urbana Laboratorios Coop. Central Agropecuaria DTE Milenio Agro Ciencias	Soja	Brasil
<i>Autographa californica</i>	NPV	VPN-80	Agrícola El Sol	Hortalizas, algodón, etc.	Guatemala
<i>Cydia pomonella</i>	GV	Carpovirusine Madex CYD-X	Natural Plant Protection Andermatt Biocontrol AG Certis	Manzano y Peral	Unión Europea, Argentina, África del Sur EE UU
<i>Cryptophlebia leucotreta</i>	GV	Cryptex	Andermatt Biocontrol AG	Cítricos, algodón	África
<i>Erinnyis ello</i>	GV	-	Biocaribe SA	Yuca	Colombia
<i>Helicoverpa armigera</i>	NPV	Helicovex Heliokill	Andermatt Biocontrol AG Ajay Bio-Tech	Hortalizas, algodón	Unión Europea India
<i>H. zea</i> y <i>Heliothis virescens</i>	NPV	Elcar GemStar LC	Sandoz Certis	Algodón, hortalizas, etc.	EE UU EE UU
<i>Hyphantria cunea</i>	NPV	Virin-ABB		Forestales	Rusia
<i>Lymantria dispar</i>	NPV	Gypchek Disparvirus Virin-ENSh	USDA ForestService Corporation CCIP Inc.	Forestales	EE UU Canadá Rusia
<i>Mamestra brassicae</i>	NPV	Mamestrin Virin-EKS	Natural Plant Protection	Hortalizas	Unión Europea Rusia
<i>Mamestra configurata</i>	NPV	Virosoft CP4	Biotepp Inc.	Manzano	Canadá
<i>Neodripion sertifer</i> y <i>N. lecontei</i>	NPV	Virox Neocheck S Leconteivirus	Microbial Resources USDA Forest Service Canadian Forest Service	Forestales	Reino Unido EE UU Canadá
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	NPV	TM Biocontrol-1 Virtuss	USDA Forest Service Corporation CCIP Inc.	Forestales, ornamentales	EE UU Canadá
<i>Phthorimaea operculella</i>	GV	PTM baculovirus	Varias	Patatas	Perú Bolivia Ecuador Egipto Túnez Colombia
<i>Pieris rapae</i>	GV	-	Wuhan University	Hortalizas	China
<i>Spodoptera exigua</i>	NPV	Spod-X Spexit Ness-E	Certis Andermatt Biocontrol AG Applied Chem. Thail.	Hortalizas, ornamentales	EE UU, Unión Europea, Tailandia
<i>Spodoptera frugiperda</i>	NPV	-	Embrapa	Maíz, sorgo	Brasil
<i>Spodoptera littoralis</i>	NPV	Spodopterin	Natural Plant Protection	Hortalizas, algodón, etc.	Unión Europea, África
<i>Spodoptera litura</i>	NPV	-	Zhongshan University	Hortalizas, algodón, arroz	China
<i>Spodoptera sunia</i>	NPV	VPN-82	Agrícola El Sol	Hortalizas	Guatemala

mediante la realización de sueltas inoculativas o aumentativas.

El resto de las familias de virus entomopatógenos han sido menos estudiadas o tienen poco interés, por diversas razones, para ser desarrollados como agentes de control. Los ascovirus (Ascoviridae) producen enfermedades crónicas con consecuencias fatales en especies de Lepidoptera (FEDERICI, 1983) y también se han aislado de parasitoides ichneumonídeos (BIGOT *et al.*, 1997). Al contrario de lo que ocurre con otros virus de insectos, son poco infectivos *per os* e inducen la apoptosis como parte de un mecanismo que favorece su replicación y la formación de grandes vesículas repletas de viriones que circulan libremente por la hemolinfa del insecto infectado. Los himenópteros endoparasitoides adquieren en su ovipositor los viriones y vesículas virales durante pruebas de parasitismo y los transmiten a más de un 80% de los insectos en los que seguidamente pincan el ovipositor. Dicho mecanismo opera muy eficientemente en condiciones de campo por lo que estos virus pueden ser un importante componente del com-

plejo de enemigos naturales en poblaciones de lepidópteros.

Los virus entomopatógenos de la familia Iridoviridae se incluyen en los géneros *Iridovirus* y *Chloriridovirus* y han sido aislados de Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Lepidoptera y Orthoptera (CHINCHAR *et al.*, 2005). Generalmente producen infecciones crónicas, mientras que las infecciones letales son poco frecuentes, lo que unido a su baja infectividad hace que tengan poco potencial para el control biológico de plagas (WILLIAMS, 1998). Las infecciones subletales son frecuentes en las poblaciones naturales de insectos y pueden provocar cambios importantes en la capacidad reproductiva, supervivencia y tamaño corporal de los insectos con infecciones ocultas (MARINA *et al.*, 2003).

En la familia Parvoviridae los virus patógenos de insectos se encuentran en los géneros *Densovirus*, *Iteravirus*, *Brevidensovirus* y *Pefudensovirus* (TATTERSALL *et al.*, 2005). Inicialmente fueron aislados de *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) y después, de especies

de Diptera, Orthoptera, Blattodea, Odonata y otras especies de Lepidoptera. Los densovirus tienen una elevada virulencia e infectividad para algunas de sus especies huéspedes que originan plagas. Sin embargo, su elevada homología con otros parvovirus que son patógenos para vertebrados, incluidos los humanos, limita sus posibilidades con vistas a ser desarrollados como agentes de control (BERGOIN AND TIJSSEN, 2000). Son necesarios estudios más detallados sobre su especificidad y tropismo tisular para poder valorar con más precisión la posible utilidad de estos virus como bioinsecticidas.

Los virus de la familia Polydnviridae sólo han sido aislados de especies de parasitoides braconídeos (*Bracovirus*) e ichneumónidos (*Ichnovirus*) (WEBB *et al.*, 2005). Se caracterizan por mantener una relación mutualista obligada con las especies de himenópteros a las que afectan; el DNA del virus se integra en el DNA genómico del insecto que de esta manera lo transmite a su descendencia (WEBB, 1998). El virus se escinde del genoma del himenóptero y sólo se replica en el cáliz de los ovarios sin efectos patogénicos para éste. Cuando la hembra del parasitoide oviposita en un insecto huésped, el virus es transferido junto con los huevos para suprimir el sistema inmune del huésped y favorecer la supervivencia del huevo y la larva del parasitoide (GLATZA *et al.*, 2004). La posibilidad de utilizar estos virus, o ciertos genes de estos virus, con el propósito de suprimir el sistema inmune de un insecto plaga, para favorecer la infección por otros patógenos, requiere de una caracterización previa de los mecanismos implicados en el modo de acción de estos virus.

Los pequeños virus RNA más frecuentemente aislados de insectos se encuentran en las familias Nodaviridae y Tetraviridae. En la familia Nodaviridae todos los virus patógenos de insectos se agrupan en el género *Alphanodavirus* y su espectro de huéspedes incluye especies de Coleoptera, Diptera y Lepidoptera (SCHNEEMANN *et al.*, 2005). Producen lesiones en el citoplasma de las células de varios tejidos (músculos, nervios, glándulas salivares, etc.) que primero dan lugar a la paralización del insecto y luego a su muerte. Han sido muy estudiados como modelos de virus de RNA pero, por ahora, carecen de interés como agentes de control. Los virus de la familia Tetraviridae sólo infectan especies de Lepidoptera y todos ellos se clasifican en dos géneros *Betatretavirus* y *Omegetetavirus* (HANLIZK *et al.*, 2005). Pueden producir infecciones no perceptibles o infecciones letales agudas. En este caso, a los pocos días (8-10) de haber sido infectadas las larvas cambian el color del tegumento, se vuelven flácidas y quedan colgando por las falsas patas de manera parecida a lo que les ocurre a las larvas infectadas por baculovirus. La cápsida del virus es sensible a la radiación UV pero resistente a otras condiciones ambientales (deseccación, proteasas, etc.) que favorecen su transmisión horizontal por ingestión (HANLIZK *et al.*, 1993). Debido a ello, estos virus han

sido identificados como el agente causante de epizootias en varias especies, algunas de las cuales originan plagas como por ejemplo *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (BROOKS *et al.*, 2002). A pesar de ello, los tetravirus no han recibido la necesaria atención como agentes de control debido a la dificultad de producirlos.

Otros virus RNA aislados más raramente se han incluido en las familias Birnaviridae, Dicistroviridae, Metaviridae, Pseudoviridae y Rhadoviridae y para más información sobre ellos se recomienda el libro *The Insect Viruses* editado por Miller y Ball (1998), o el sitio web del ICTV (2002).

2. Ecología y biología de los baculovirus

Los OBs de los baculovirus pueden sobrevivir fuera del huésped por largos periodos de tiempo, especialmente cuando se encuentran protegidos de la degradación por radiación ultravioleta. La distribución espacial de los OBs varía en función del tipo de ecosistema, de las diferentes combinaciones baculovirus-insectos y de las distintas plantas sobre las que se alimentan los insectos huéspedes. Para explicar, al menos parcialmente, las diferencias respecto a la ocurrencia de epizootias en un mismo sistema huésped-baculovirus se ha propuesto la existencia de ecosistemas permisivos y no permisivos (FUXA, 2004).

Para la mayoría de los baculovirus el principal reservorio de OBs es el suelo. Aquí pueden persistir por periodos más o menos largos aunque afectados por factores tales como valores extremos del pH y las altas temperaturas, el tipo de suelo y la elevada humedad, o la degradación por microorganismos (FUXA, 2004; PENG *et al.*, 1999). Para que tenga lugar la transmisión del virus es necesario que haya un transporte de OBs desde el suelo hasta la superficie foliar, donde son ingeridos por insectos susceptibles, lo cual puede ocurrir por la acción del viento y la lluvia (YOUNG Y YEARIAN, 1986). En el mesenterón de las larvas los OBs se desintegran, por la acción combinada de condiciones alcalinas (pH 9-11) y enzimas proteasas, liberando las partículas infectivas (viriones). Los baculovirus producen varias proteínas que mejoran el proceso infeccioso (CABALLERO *et al.*, 2001). Los viriones atraviesan la membrana peritrófica e infectan las células epiteliales en cuyo núcleo tiene lugar la replicación del DNA y la formación de nuevas nucleocápsidas (GRANADOS Y WILLIAMS, 1986). En las larvas de lepidópteros, estas nucleocápsidas dan lugar a un nuevo tipo de viriones, los viriones brotados, que diseminan la infección por diversos tejidos (cuerpo graso, hemocitos, epidermis, etc.) (Figura 8.1). Parece que los viriones brotados se dispersan en el insecto utilizando el sistema de las traqueolas respiratorias como una red de caminos para llegar a todas partes del cuerpo (ENGELHARD *et al.*, 1994). Al final del proceso infeccioso,

las células repletas de OBs se lisan y la actividad de ciertas enzimas producidas por el virus (p.e. quitinasa y cisteína proteinasa) degradan el tegumento al mismo tiempo que se produce su muerte (CABALLERO *et al.*, 2001). Los millones de OBs producidos se liberan del cadáver contaminando así el follaje de las plantas (Figura 8.2) donde sirven de inóculo para infectar nuevos huéspedes, o bien caen al suelo por gravedad o arrastrados por la lluvia. En otros órdenes de insectos, la infección por baculovirus se restringe a las células epiteliales del mesenterón en las cuales hay una producción continua de OBs infectivos que son expulsados con los excrementos (FEDERICI, 1997).

La eficiencia de la transmisión horizontal del virus depende tanto de la densidad de población del virus como del huésped. Cuanto mayor es la densidad de los insectos susceptibles mayor es la probabilidad de contacto entre el virus y el huésped. Por otra parte, la densidad y la distribución de OBs determina la cantidad de inóculo a la que están expuestos los insectos en la naturaleza (HAILS *et al.*, 2002). La transmisión horizontal de los OBs, junto con su persistencia en el medio, ha sido el modelo utilizado para el estudio de la ecología de baculovirus (CORY *et al.*, 1997); sin embargo, hay evidencias que indican que la transmisión vertical también juega un importante papel en la supervivencia de estos patógenos, particularmente durante periodos de baja densidad poblacional del huésped (BURDEN *et al.*, 2006). En varios sistemas huésped-baculovirus se han observado bajos porcentajes de mortalidad larvaria en ausencia de una exposición continua al virus, lo cual sugiere la presencia de infecciones persistentes de baculovirus en las poblaciones huéspedes (KUKAN, 1999). Una hipótesis admisible es que la transmisión vertical es el resultado de una forma de evolución de los baculovirus como medio para sobrevivir durante periodos de baja densidad del huésped, cuando las oportunidades de

Figura 8.2.a). Larva de *Spodoptera exigua* muerta por una infección viral en el momento en que se rompe el tegumento y se liberan los OBs del virus para contaminar el follaje de las plantas. Por la derecha se aproxima una larva sana en la que, al ingerir los OBs liberados y ser infectada, se repite el ciclo biológico del virus.

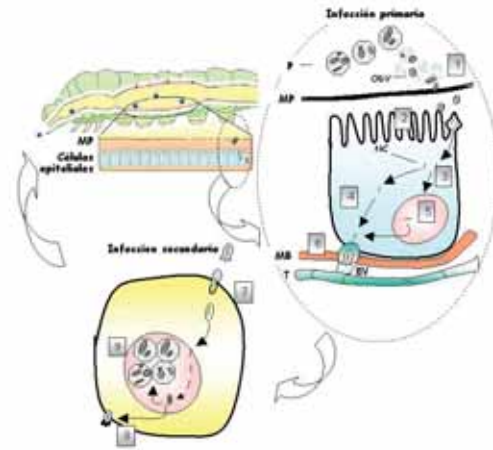
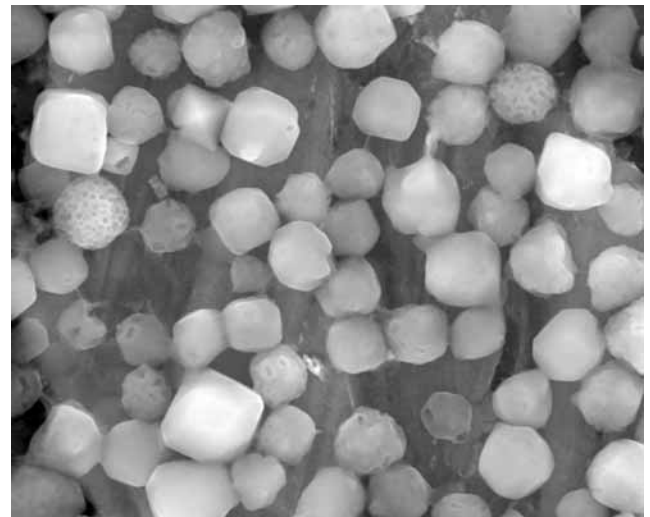


Figura 8.1. Representación esquemática del proceso infeccioso de los baculovirus: los poliedros (P) ingeridos se solubilizan en el mesenterón de la larva liberando viriones (ODV) (1) que atraviesan la membrana peritrófica (MP) a través de sus poros naturales. La membrana del ODV se fusiona con la membrana de la célula epitelial (2) y las nucleocápsidas (NC) desnudas atraviesan el citoplasma (3) y se dirigen al núcleo donde se produce una primera replicación del ADN viral (5). Alternativamente algunas nucleocápsidas atraviesan el citoplasma (4) y, sin pasar por el núcleo, se dirigen a la zona basal. Las nucleocápsidas atraviesan la membrana celular formando los viriones brotados (BVs) (6) que pasan a la cavidad hemocélica a través de las traqueolas (T) evitando la membrana basal (MB). En el hemocele, los BVs llevan a cabo la segunda fase del proceso infeccioso infectando las células de los órganos y tejidos por endocitosis (7). Las nucleocápsidas forman nuevamente BVs favoreciendo la dispersión de la infección. Alternativamente forman ODVs y poliedros completos en una fase más avanzada del proceso infeccioso, que se acumulan en la célula y finalmente producen su lisis liberando los cuerpos de inclusión al medio (9).

transmisión horizontal son limitadas. Además, la transmisión vertical permite que el virus pueda ser transportado dentro del insecto infectado a larga distancia, e iniciar nuevos focos de infección, tal y como ha sido documentado para los nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Anti-*

Figura 8.2.b). Cuerpos de inclusión (OBs) de un nucleopoliedrovirus vistos al microscopio electrónico de barrido a 20.000 aumentos.



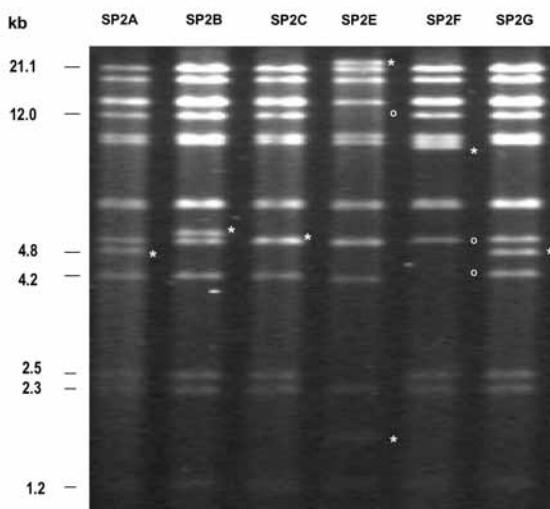


Figura 8.3. Perfiles de restricción de distintos aislados del nucleopoliédrovirus de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) al digerir el ADN genómico del virus con la enzima de restricción *Bgl*II. Los asteriscos señalan fragmentos polimórficos y los círculos la posición de fragmentos ausentes. A la izquierda de la figura se indica el tamaño en kilobases (kb) de los fragmentos de restricción.

carsia gemmatalis (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (FUXA, 2004). La transmisión vertical también podría jugar un papel importante en relación con la resistencia que el huésped adquiere con la edad frente a la infección por baculovirus, que puede haber coevolucionado con la infectividad del baculovirus (FUXA, 2004).

3. Caracterización y selección de los baculovirus

Los baculovirus han sido aislados de más de 700 especies de insectos. Su caracterización por medio de técnicas moleculares y biológicas ha revelado que poseen una gran diversidad genotípica y fenotípica. Esta información, además de ayudar a identificar las distintas especies o aislados y establecer su filogenia (HERNIOU *et al.*, 2003), contribuye a seleccionar los genotipos o mezclas de genotipos del virus que reúnen el espectro de huéspedes (número de especies para las que el virus es infectivo), la patogenicidad (en términos de la dosis letal o concentración letal 50%, DL_{50} , CL_{50}), y la virulencia (velocidad a la que mata al huésped) más adecuados para su desarrollo como bioplaguicidas.

La selección de un baculovirus como insecticida se hace en función de la especie o especies de insectos que se quieren controlar. Cada especie fitófaga suele ser más susceptible a su propio baculovirus pero también puede serlo, en mayor o menor grado, a los baculovirus de otras especies de insectos (MUÑOZ Y CABALLERO, 2001). Por su parte, el espectro de huéspedes de los baculovirus es variable. Algunos son absolutamente específicos, como es el caso del NPV de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (MUÑOZ Y CABALLERO, 2001), o los NPVs que infectan especies de la familia

Lymantridae (CORY *et al.*, 2000). Otros, en cambio, como es el caso del NPV de *Autographa californica* (Speyer) (Lepidoptera: Noctuidae) (AcMNPV), es infectivo para más de 50 especies pertenecientes a unas 15 familias del orden Lepidoptera (CABALLERO *et al.*, 2001). Los baculovirus con más amplio espectro de huésped no son igualmente infectivos para todas sus especies huéspedes. Para estos baculovirus puede establecerse una distinción entre el espectro de huéspedes biológico, que comprendería a todas las especies que pueden ser infectadas en el laboratorio, y el espectro de huéspedes económico, que sólo incluye aquellas especies que pueden ser controladas de forma efectiva en el campo mediante la aplicación de cantidades de OBs económicamente aceptables (BLACK *et al.*, 1997).

Entre los distintos aislados geográficos de una misma especie de baculovirus se encuentra con frecuencia una considerable diversidad genética que es fácilmente detectable mediante un análisis de restricción del ADN genómico del aislado (Figura 8.3) (CABALLERO *et al.*, 1992; ESCRIBANO *et al.*, 1999). Algunas de las variaciones genéticas son silenciosas, pero otras han sido asociadas a diferencias significativas de virulencia (HUGHES *et al.*, 1983), o patogenicidad (GRAHAM *et al.*, 2004) que, en ocasiones, pueden llegar a ser de dos o más órdenes de magnitud (SHAPIRO Y ROBERTSON, 1991). Estas variaciones fenotípicas tienen un claro interés práctico a la hora de seleccionar un aislado silvestre como agente de control.

Más interesante aún es la diversidad genética existente dentro de un mismo aislado geográfico e incluso dentro de un mismo insecto infectado. La clonación *in vitro* (LYNN *et al.*, 1993; RIBEIRO *et al.*, 1997; SIMÓN *et al.*, 2005a) o *in vivo* (SMITH Y CROOK, 1988; MUÑOZ *et al.*, 1999) de los genotipos, que característicamente componen los aislados de los baculovirus silvestres, ha revelado una amplísima variabilidad genotípica originada, principalmente, por inserciones o deleciones (MUÑOZ *et al.*, 1999; SIMÓN *et al.*, 2005a), transposiciones (JEHLE *et al.*, 1995), o recombinación *in vivo* (CROIZIER Y RIBERO, 1992). Muchos de estos cambios genéticos tienen consecuencias fenotípicas de gran relevancia. Por ejemplo, se ha encontrado que el valor de la DL_{50} (OBs/larva) para ciertos genotipos puede llegar a ser más de cien veces mayor que el valor de otros genotipos clonados a partir de un mismo aislado del NPV de *A. gemmatalis* (RIBEIRO *et al.*, 1997), o del NPV de *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae) (LYNN *et al.*, 1993). Diferencias menores pero, aún así, estadísticamente significativas se han encontrado entre los genotipos obtenidos a partir de otros aislados de los NPVs (MUÑOZ *et al.*, 1999; SIMÓN *et al.*, 2005a). A partir de ciertos aislados también se han clonado genotipos cuya velocidad de acción puede ser hasta un 40% más rápida que la de otros genotipos con los que coexisten de forma natural (MUÑOZ *et al.*, 2000; HODGSON *et al.*, 2001). La cantidad de OBs producidos por larva o miligramo de larva es otra característica fenotípica para la que se han encontrado

diferencias significativas entre los genotipos clonados en aislados del NPV de *S. frugiperda* (SIMÓN *et al.*, 2008), el NPV de *S. exigua* (MUÑOZ *et al.*, 2000; MURILLO *et al.*, 2006) y el NPV de *Panolis flammea* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Noctuidae) (HODGSON *et al.*, 2001) por citar sólo algunos ejemplos.

Las interacciones entre genotipos de un mismo aislado pueden tener importantes repercusiones fenotípicas. Por ejemplo, con la mezcla de ciertos genotipos de una misma población almeriense del NPV de *S. exigua* se consigue obtener un aumento en la actividad insecticida del virus en larvas de *S. exigua* (MURILLO *et al.*, 2006). Por otra parte, la presencia de ciertos genotipos mutantes, que no son capaces de replicarse por sí mismos, se ha comprobado que pueden tener un efecto positivo sobre la patogenicidad del virus como ocurre en un aislado del NPV de *S. frugiperda* (SIMÓN *et al.*, 2005b) o, por el contrario, un efecto negativo como sucede en un aislado del NPV de *S. exigua* (MUÑOZ *et al.*, 1998).

Todo ello resalta la necesidad de realizar detallados análisis genéticos y biológicos de los distintos aislados de un baculovirus con objeto de poder diseñar la materia activa con mejores propiedades insecticidas. Por otra parte, también es importante señalar que distintas poblaciones del huésped difieren con frecuencia en su susceptibilidad a un determinado aislado de baculovirus (MILKS, 1997), lo que hace necesaria la selección del aislado en función de las características de la población que se quiere tratar.

4. Producción de los baculovirus

Sin duda alguna, la producción masiva representa uno de los mayores retos en la comercialización de productos basados en estos patógenos. Se cree que la producción masiva en biorreactores de cultivos celulares tiene gran potencial, aunque actualmente, todos los baculovirus producidos como bioinsecticidas son el resultado de la producción en larvas de insectos. Los principales problemas de la producción en cultivos celulares son dos. Primero, los medios son costosos, particularmente cuando contienen derivados de sueros (CLAUS Y SCIOCCO DE CAP, 2001). Segundo, los baculovirus se adaptan rápidamente al cultivo celular y pierden los genes que no sean necesarios para la supervivencia en el ambiente del cultivo y, como consecuencia, los OBs producidos en cultivos celulares tienen menor actividad insecticida.

La producción de los baculovirus en insectos involucra la inoculación de cantidades masivas de larvas, su cría durante la replicación del virus y la cosecha de los OBs de los cadáveres de las larvas infectadas. Aunque parece un proceso fácil, en realidad la producción masiva depende de una serie de pasos sucesivos, los cuales requieren ser optimizados para que la producción siga en marcha de manera fluida y coordinada. El vigor y la

limpieza de la colonia principal de insectos son de importancia elemental y se asegura mediante la descontaminación frecuente de los recipientes de cría, superficies de laboratorio, cámaras bioclimáticas, etcétera y el tratamiento rutinario de los huevos y las pupas del insecto con soluciones de lejía o formol para reducir la presencia de patógenos en la colonia. Por otro lado, la dieta que se usa para mantener la colonia se prepara con inhibidores de crecimiento de microorganismos, antibióticos y pequeñas cantidades de formol, aunque el formol no se incluye generalmente si la dieta está destinada a la cría de larvas infectadas con virus. Asimismo, es necesario contar con recipientes diseñados para criar cantidades importantes de larvas y para poder cosechar los cadáveres infectados de manera rápida y eficiente.

La optimización del sistema de inoculación, cría y cosecha de las larvas infectadas requiere de estudios detallados orientados a determinar el estadio por infectar, que normalmente es el último o penúltimo estadio larvario, la densidad larvaria que maximiza la producción de OBs por recipiente sin provocar pérdidas importantes por canibalismo o infecciones oportunistas (SIKOROWSKI Y LAWRENCE, 1994), la concentración y administración del inóculo (CHERRY *et al.*, 1997), la composición de la dieta (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998), la temperatura de incubación (SHAPIRO 1986), las condiciones ambientales (SHAPIRO *et al.*, 1981), y el momento de la cosecha de las larvas infectadas para minimizar la contaminación por microorganismos (GRZYWACZ *et al.*, 1998). Los sistemas actuales de producción de OBs en insectos generan una carga importante de bacterias y hongos que naturalmente infestan a la dieta, la superficie del insecto, a su intestino y las heces. La gran mayoría de estos microorganismos son generalmente especies comunes de *Pseudomonas*, *Enterococcus*, y especies coliformes de Enterobacteriaceae. Como la purificación mediante la filtración y centrifugación es costosa, poco eficiente y resulta una pérdida importante de los OBs, se considera como objetivo prioritario la limpieza del sistema productivo con el fin de evitar el desarrollo de altos niveles de microorganismos contaminantes (JENKINS Y GRZYWACZ, 2000). Es importante señalar que ningún estudio sobre microorganismos contaminantes de preparaciones de baculovirus ha detectado la presencia de patógenos humanos como *Salmonella*, *Shigella* o *Vibrio*, mientras que la presencia de otras bacterias de interés médico, como *Staphylococcus aureus* o *Bacillus cereus* ha sido, por lo general, esporádica y de baja abundancia. No obstante, el proceso de registro de estos productos exige un control continuo de los lotes de OBs producidos para descartar la presencia de patógenos primarios de humanos.

5. Formulación y aplicación

Aunque el fabricante tiene poco control sobre el uso de su producto por parte del agricultor, hasta cierto punto

puede promover el buen funcionamiento del patógeno mediante la formulación adecuada y las instrucciones de uso en la etiqueta del producto. Pero, ¿qué es una formulación? Una formulación se prepara cuando se mezcla un ingrediente activo, en este caso los OBs del virus, con una o más sustancias con el fin de conservar o mejorar sus propiedades insecticidas o el manejo del producto. Existen diferentes métodos para lograr lo anterior, incluyendo la producción de suspensiones líquidas, gránulos y polvos mojables. La formulación adecuada dependerá de diversos factores tales como el comportamiento y hábitat de la plaga, la disponibilidad y coste de los componentes de la formulación, el equipo empleado para aplicarlo y las preferencias de los agricultores.

Concretamente, una formulación correcta tiene que mantener la estabilidad del virus durante su almacenamiento, facilitar el manejo del producto por parte del agricultor, optimizar la aplicación y la ingestión de los OBs por la plaga objetivo y maximizar la persistencia ambiental de los depósitos de OBs sobre las hojas del cultivo (JONES *et al.*, 1997). Por lo tanto, existe una relación íntima entre la formulación del producto y su aplicación.

Entre la producción del formulado y su aplicación en campo, hay un periodo durante el cual el producto no debe experimentar pérdida significativa de actividad insecticida, descomposición de otros componentes de la formulación ni cambios importantes en las características físicas del producto como la sedimentación o agregación de los OBs en suspensiones, o el endurecimiento de polvos. En este sentido, el almacenamiento del producto a temperaturas bajas y en recipientes bien cerrados es deseable para prolongar su viabilidad. En general, los baculovirus se pueden almacenar a temperaturas frescas durante varios años (BATISTA-FILHO *et al.*, 1991). Para producir una formulación seca, típicamente se secan los OBs al aire, mediante la liofilización (BATISTA-FILHO *et al.*, 1986), o la deshidratación por aspersión en aire caliente (BEHLE *et al.*, 2006). Después de secado, los OBs se mezclan con un material portador inerte de bajo coste como la arcilla, sílice sintética y un surfactante (JONES *et al.*, 1998). En cambio, una típica formulación líquida de OBs puede estar constituida por agua con un agente dispersante-antiespumante, un espesante como la goma xantán, y conservantes para controlar el crecimiento de los microorganismos (Burges y Jones, 1998). Cabe mencionar que la encapsulación de los OBs en almidón ha atraído cierto interés para la formulación de *B. thuringiensis* y los baculovirus (IGNOFFO *et al.*, 1991; MORALES-RAMOS *et al.*, 1998). Igualmente prometedor es el uso de harinas y almidones para la formulación de OBs como gránulos pulverizables (TAMEZ-GUERRA *et al.*, 2000).

La mezcla de tanque se basa en sustancias que se agregan a la formulación básica en el momento de preparar

el producto para la aplicación en campo. Se utilizan los coadyuvantes para facilitar la aplicación del producto, para mejorar el depósito del virus en el sitio de alimentación de la plaga y para aumentar la persistencia de los OBs en el cultivo. Los componentes más comunes en las mezclas de tanque son los humectantes-adherentes, y sustancias fotoprotectoras que tienen el objetivo de maximizar la persistencia ambiental de los OBs sobre las hojas del cultivo (SHAPIRO, 1989; DOUGHERTY *et al.*, 1996; FARRAR *et al.*, 2003). La fotoprotección de los OBs es menos problemática en los invernaderos porque el plástico de la estructura filtra aproximadamente el 90% de la radiación UV, dando como resultado, una buena persistencia de los OBs en los cultivos de invernadero (LASA *et al.*, 2007c). El uso de fagoestimulantes para incrementar la alimentación del insecto, con el fin de que consuma una dosis letal de OBs en menos tiempo, ha sido notablemente subexplotado. Parece que los azúcares, lípidos y proteínas son los componentes esenciales de los mejores fagoestimulantes para larvas de lepidópteros y algunas empresas han desarrollado fagoestimulantes comerciales para emplearlos en programas de control de los insectos plaga más importantes (BARTELT *et al.*, 1990; FARRAR Y RIDGWAY, 1994).

En la aplicación de los baculovirus, casi siempre se busca la manera de saturar el sitio de alimentación de la plaga con depósitos de la pulverización para maximizar la probabilidad de que cada larva consuma una dosis letal de OBs en poco tiempo. La dosis de la aplicación depende de la patogenicidad del virus, el estadio de las larvas plaga, la fenología del cultivo y los hábitos alimenticios del insecto por controlar, entre otros factores. Como la cantidad de OBs determina en gran parte el coste de cada aplicación se busca la menor dosis que redunde en un control aceptable de la plaga. Al actuar por ingestión se requiere una distribución uniforme del producto en el sitio de alimentación del fitófago plaga y normalmente esto se logra mediante la aplicación de un gran número de gotas pequeñas. Sin embargo, las gotas más finas son más propensas a ser arrastradas por el viento, mientras que las gotas grandes se utilizan para aplicaciones al suelo o cuando es importante evitar el desplazamiento de la pulverización por corrientes de aire. Los bioinsecticidas casi siempre se aplican con equipos diseñados para insecticidas químicos. Dichos equipos son, en su mayor parte, boquillas hidráulicas que producen una pulverización en forma de abanico o cono. Las bombas con asistencia de aire se utilizan para aplicaciones en árboles, huertas, viñas e invernaderos. Las boquillas centrífugas, del tipo de disco giratorio o jaula giratoria, se emplean frecuentemente para aplicaciones de ultra bajo volumen con formulaciones basadas en aceites minerales o vegetales (GÓMEZ Y RUMIATTO, 1987; CORY Y ENTWISTLE, 1990).

Finalmente, la frecuencia de la aplicación dependerá de la persistencia de los OBs en las hojas del cultivo, la eficiencia de la transmisión del virus de las larvas muertas

a las sanas y el ritmo de crecimiento del cultivo. Los cultivos que crecen rápidamente producen nuevas hojas que no están contaminadas superficialmente con OBs y que requieren de tratamientos repetidos cuando las infestaciones de la plaga alcanzan los umbrales de tratamiento.

6. Ejemplos del uso de los bioplaguicidas basados en baculovirus

6.1. El control de *Anticarsia gemmatalis* en soja

El control de larvas de *A. gemmatalis* mediante aplicaciones de AgMNPV sobre una superficie de más de un millón y medio de hectáreas de soja en Brasil y a menor escala en Paraguay, representa el más importante ejemplo del uso de los baculovirus como bioplaguicidas (MOSCARDI, 1999). El manejo de *A. gemmatalis* involucra una serie de empresas privadas y el EMBRAPA (un instituto brasileño de investigación agropecuaria), que producen el virus principalmente en formulaciones de polvo mojable basado en caolín. El material primario viene de una combinación de colectas de larvas infectadas en el campo y la producción masiva en laboratorio. Estos productos están sujetos a un control de calidad por parte del EMBRAPA que revisa la cantidad de OBs por gramo de producto y su actividad insecticida, aunque desafortunadamente, no existen barreras efectivas a la venta de productos de baja actividad biológica por parte de algunas empresas sin escrúpulos. El coste del virus para el agricultor es de aproximadamente 1,50 \$ USA (~1,1 euro)/ha, que es más económico que el control químico. Una serie de factores contribuyen al éxito de AgMNPV como bioplaguicida. Primero, el virus es muy patogénico y una sola aplicación de $1,5 \times 10^{11}$ OB/ha es suficiente para controlar la plaga durante el ciclo de producción. Segundo, *A. gemmatalis* es, por lo general, la única plaga de importancia de la soja y el cultivo tolera la defoliación sin pérdidas importantes en el rendimiento. Tercero, los programas gubernamentales de manejo integrado en los años 1970-80 facilitaron la aceptación por parte de los agricultores de alternativas al control químico durante la implementación del uso del AgMNPV en las décadas siguientes. Por otra parte, la aplicación del bioplaguicida ha sido promovida por los servicios oficiales de extensión en los diferentes Estados de Brasil.

Actualmente, existe una demanda de virus para tratar una superficie de alrededor de cuatro millones de hectáreas y, por lo tanto, la tecnología de producción representa un factor limitante al mayor uso del virus (MOSCARDI *et al.*, 1997). Por otro lado, se llevan a cabo programas de seguimiento del grado de resistencia al virus en las poblaciones naturales de *A. gemmatalis* en el campo. Aunque en estudios de laboratorio se han generado biotipos del insecto con niveles muy altos de

resistencia (ABOT *et al.*, 1996), en las poblaciones naturales de la plaga aún no se han encontrado evidencias de resistencia. Esto posiblemente se deba a un elevado cruzamiento entre los insectos que sobreviven a las aplicaciones de AgMNPV y los individuos de poblaciones no expuestas al virus. Hasta la fecha, el control de *A. gemmatalis* en soja en Brasil es el ejemplo más destacado del control mediante los baculovirus.

6.2. El control de *Spodoptera exigua* en cultivos de invernadero

La gardama, *S. exigua*, es una plaga polífaga de diversos cultivos de invernadero y campo abierto en muchas regiones del mundo incluida la zona de invernaderos de Almería (Figura 8.4). El SeMNPV ha sido comercializado bajo el nombre de Spod-X en una formulación de líquido concentrado que está registrado en los Estados Unidos, Canadá, Méjico y los Países Bajos (CERTIS, 2007). Además, el SeMNPV forma la base de diversos productos de pequeñas empresas en el sur y el sureste de Asia (KOLODNY-HIRSH *et al.*, 1997; CBP, 2007). El proceso de control mediante aplicaciones de SeMNPV ha sido simulado y validado por Bianchi *et al.* (2002). El SeMNPV tiene la característica de ser uno de los más específicos de todos los nucleopoliedrovirus, de hecho sólo infecta a larvas de *S. exigua*. Su eficiencia como insecticida reside en su alta patogenicidad; la dosis letal en el primer estadio es aproximadamente un OB mientras que la dosis letal 50% (DL₅₀) en el cuarto estadio es de 30 a 100 OBs, dependiendo del aislado y el origen de las larvas de *S. exigua* (SMITS Y VLAK, 1988; TAKATSUKA Y KUNIMI, 2002).

Actualmente, en España, el SeMNPV está siendo desarrollado como un bioplaguicida para uso en los invernaderos de Almería y Murcia. Partiendo de un aislado autóctono recolectado en 1990 durante una epizootia en invernaderos en Almería (CABALLERO *et al.*, 1992), se identificaron cepas adicionales de esta región (MURILLO *et al.*, 2006), las cuales fueron mezcladas en diferentes proporciones para producir una combinación única con alta actividad insecticida. Pruebas iniciales en cultivo de pimiento demostraron contundentemente que el SeMNPV dio mayor control que los insecticidas de síntesis, sobre todo en casos donde el control químico había fracasado debido a la resistencia por parte de la población plaga (BELDA *et al.*, 2000; LASA *et al.*, 2007b). La formulación del SeMNPV con un estilbino sinergista de la actividad insecticida de los baculovirus resultó en menor tiempo de adquisición de la infección pero no mejoró el control total de infestaciones naturales, comparado con la aplicación del SeMNPV solo (LASA *et al.*, 2007c).

Un avance importante en la producción del SeMNPV se logró mediante la aplicación de varios compuestos análogos de la hormona juvenil de insectos a larvas del quinto estadio de *S. exigua* (LASA *et al.*, 2007a). La producción total de OBs en larvas tratadas con dos análogos comerciales, metopreno y fenoxicarb, aumentó en

un factor de casi tres veces comparado con la producción convencional en larvas del quinto estadio.

Estudios de la estabilidad de una formulación sencilla del virus con el ácido sórbico y glicerol indicó que no hubo pérdida de actividad insecticida durante 18 meses de almacenamiento a 4°C. Asimismo, la carga de contaminantes microbianos fue principalmente debida a la presencia de *Enterococcus* spp y levaduras, mientras que no se detectaron patógenos humanos de importancia médica (LASA, 2007).

La identidad genotípica del virus y la tecnología de producción han sido objeto de una solicitud de patente en España. El proceso de registro del producto está en marcha y se está montando una planta piloto de producción en Almería con el fin de ofrecer a los agricultores de la zona una alternativa a los insecticidas sintéticos, para el control efectivo de *S. exigua*.

7. Registro y seguridad de los bioplaguicidas

Cada año se introducen en el mercado nuevos plaguicidas algunos de los cuales están dentro de la considera-

ción de los bioplaguicidas. La materia activa de estos productos incluyen microorganismos (bacterias, protozoos, hongos) y virus cuya utilización en el control de plagas representan un escaso o nulo riesgo para el hombre o el medio ambiente. No obstante, para el registro y comercialización de estos nuevos productos debe contarse con la autorización de las administraciones públicas encargadas de acreditar que son seguros para la salud del hombre, los animales y la conservación del medio ambiente.

En la Unión Europea (UE), la legislación para el registro de materias activas y productos fitosanitarios que rige en todos los estados miembros está recogida en la Directiva 91/414/CEE (1991). Esta directiva incluye una lista de todas las materias activas autorizadas para su incorporación en productos fitosanitarios (Anejo I) y establece los requerimientos necesarios para la solicitud de nuevas materias activas (Anejo II) y nuevos productos fitosanitarios (Anejo III). Los Anejos II y III contienen una parte dedicada a los plaguicidas químicos (Parte A) y otra dedicada a los microorganismos y virus (Parte B). La Directiva 2001/36/CE (2001) enmienda la parte B de estos dos anejos para requerir datos específicos de los microorganismos y virus que no son de aplicación para las sustancias químicas. A su vez, la

Figura 8.4. Izquierda: Cultivo de pimiento en un invernadero de plástico de Almería. Derecha arriba: larva del quinto estadio de *Spodoptera exigua* alimentándose de una hoja de pimiento. Derecha en medio: daños en hojas producidos por la actividad alimenticia de las larvas de *Spodoptera exigua*. Derecha abajo: daño de una larva de *Spodoptera exigua* en un pimiento.



Directiva 2005/25/CE (2005) enmienda el Anejo VI de la Directiva 91/414/CEE para añadir una Parte II en la que se recogen los principios uniformes para la evaluación y autorización de productos para la protección de plantas que contienen microorganismos y virus.

La Organización para el Desarrollo Económico y la Cooperación (OECD) ha llevado a cabo iniciativas paralelas dentro del Programa Plaguicidas con objeto de armonizar, abreviar y abaratar el proceso de registro de plaguicidas en todos los países miembros. Con este fin, se han establecido dos tipos de formatos: 1) un expediente que recoge los datos que la industria (productor, importador, distribuidor, etc.) debe remitir sobre los microorganismos o virus para los que se solicita un nuevo registro, y 2) una monografía que recoge el informe de evaluación que la administración elabora sobre el expediente. Para fomentar la calidad y consistencia de dichos documentos, la OECD (2004a,b) ha publicado sendas guías que especifican el tipo de formato a seguir y el nivel de información que es necesaria incluir.

Las autorizaciones son concedidas por los ministerios encargados por los gobiernos en respuesta a una solicitud realizada por parte de la industria. Esta solicitud debe estar apoyada por datos suficientes (expediente) sobre la identificación específica del virus o microorganismo, sus propiedades biológicas, ciclo de vida, efectos sobre la salud humana y de los animales, efectos tanto sobre los organismos diana como sobre los organismos no diana, relación con otros patógenos conocidos de humanos y animales, estabilidad y capacidad de producir toxinas, etc. El expediente es evaluado por el estado miembro, que actúa de comunicador, el cual elabora un informe (monografía) que es enviado a la Comisión Europea. De esta monografía se envían copias a todos los estados miembros de la UE para su consideración por grupos de expertos. La monografía, junto con los informes de los grupos de expertos, son considerados por un Grupo de Trabajo de la Comisión a la cual son invitados todos los estados miembros. Finalmente, si la materia activa es incluida en el Anejo I, los estados miembros pueden iniciar el registro de productos que contengan esa materia activa. Este proceso es muy largo, costoso y requiere la aportación de muchos datos que se consideran innecesarios para el caso de algunos microorganismos o virus.

En la UE se ha llevado a cabo la acción REBECA (2007) con el objetivo de revisar la actual legislación y directrices a nivel de la UE y de los estados miembros y compararlas con las legislaciones en otros países donde la autorización y comercialización de nuevos microorganismos y virus ha tenido mayor éxito. Entre las recomendaciones del proyecto REBECA se encuentra la aceptación y puesta en práctica de los documentos y directrices elaborados por la OECD. Particularmente, recomienda que la utilización de baculovirus en productos fitosanitarios debe asumirse generalmente como

segura basándose en un documento consensuado por la OECD sobre la información utilizada en la evaluación de las aplicaciones de plaguicidas basados en baculovirus. Por tanto, REBECA ha desarrollado una propuesta para incluir los baculovirus en el Anejo I sin necesidad de realizar evaluaciones de riesgo adicionales (EHLERS, 2007). En el caso de nuevas especies de baculovirus, sólo deberían ser necesarios datos sobre su identificación molecular y su espectro de huéspedes así como el depósito del virus en una colección de cultivos internacionalmente reconocida. También sería necesario aportar los datos específicos del producto de acuerdo a los requerimientos del Anejo III como, por ejemplo, los relacionados con el método de producción y la composición de la formulación.

8. Conclusiones

Es claro que los bioplaguicidas basados en baculovirus ofrecen una alternativa importante al control químico para el manejo de una diversidad de plagas, sobre todo las larvas de lepidópteros. Los baculovirus se pueden emplear en una variedad de hábitats, incluyendo forestales, huertas, cultivos de campo abierto e invernadero, e incluso en productos almacenados. Tienen características de especificidad, patogenicidad y virulencia que los hace muy efectivos como agentes de control y muy seguros para los otros organismos presentes en los cultivos, además de los peces, aves y mamíferos, incluyendo el hombre. No obstante, la comercialización de productos basados en estos patógenos se enfrenta a varios retos que ha limitado su impacto en la producción agrícola en los países desarrollados, mientras que su aceptación ha sido mayor en algunos países en vías de desarrollo, notablemente Brasil y los países del sur y sur-este de Asia.

La tecnología molecular ha sido empleada para generar una serie de baculovirus recombinantes que expresan neurotoxinas de arañas, alacranes y ácaros (INCEOGLU *et al.*, 2001). Tales recombinantes paralizan y matan el insecto huésped unos pocos días después de iniciar la infección, disminuyendo así el grado de daño al cultivo por parte del fitófago. Esta tecnología fue desarrollada y probada en los años 1990's (CORY *et al.*, 1994), pero la preocupación por el impacto al medio ambiente y la legislación respecto a los organismos genéticamente modificados ha sido una barrera a la comercialización de productos basados en los baculovirus recombinantes (RICHARDS *et al.*, 1998). De hecho, ningún producto basado en un baculovirus recombinante ha sido registrado en Europa o los Estados Unidos, aunque actualmente se están utilizando en aplicaciones de campo abierto en China (SUN *et al.*, 2004).

Finalmente, siguen retos importantes en la tecnología de la producción masiva de estos patógenos y en su comercialización en muchos países del mundo. No obstante, cambios en los sistemas de registro para los bio-

plaguicidas indican que las autoridades son conscientes de la necesidad de promover el uso de estos productos en los sistemas agrarios productivos tanto en Europa

como en los Estados Unidos. Por lo tanto, el futuro de los bioplaguicidas basados en los baculovirus parece prometedor.

REFERENCIAS

- ABOT, A.R.; F. MOSCARDI, J.R. FUXA, D.R. SOSA-GÓMEZ Y A.R. RICHTER. 1996. *Development of resistance by Anticarsia gemmatalis from Brazil and the United States to a nuclear polyhedrosis virus under laboratory selection pressure*. Biol. Control 7: 126-130.
- BARTELT, R.J.; M.R. MCGUIRE Y D.A. BLACK. 1990. *Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): additives to a starch-based formulation for Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. 19: 182-189.
- BATISTA-FILHO, A.; S.B. ALVES, N.T. AUGUSTO Y B.P.B. CRUZ. 1991. *Estabilidade de formulações de Baculovirus anticarsia oleo emulsionavel e po mofavel em condicoes de laboratorio*. Arquiv. Inst. Biol. Sao Paulo 58: 17-20.
- BATISTA-FILHO, A.; B.P.B. CRUZ Y D.A. OLIVEIRA. 1986. *Estudios preliminares seleccionados ao emprego da liofilizacao como proceso de preservacao de Baculovirus anticarsia*. Biológico 51: 263-269.
- BEHLE, R.W.; P. TAMEZ GUERRA Y M.R. MCGUIRE. 2006. *Evaluating conditions for producing spray-dried formulations of Anagrapha falcifera nucleopolyhedroviruses (AfMNPV)*. Biocontr. Sci Technol. 16: 941-952.
- BELDA, J.E.; E. MIRASOL, A. ESCRIBANO, S. RAPALLO Y P. CABALLERO. 2000. *Eficacia de un nucleopoliedrovirus (SeNPV) en el control de Spodoptera exigua (Hübner, 1080) (Lepidoptera: Noctuidae) en pimiento de invernadero*. Bol. San. Veg. Plagas 26: 619-628.
- BERGOIN, M. Y P. TIJSSSEN. 2000. *Molecular biology of Densovirinae*. Contrib. Microbiol. 4: 12-32.
- BIANCHI, F.J.J.A.; J.M. VLAK Y W. VAN DER WERF. 2002. *Evaluation of the control of beet armyworm, Spodoptera exigua, with baculoviruses in greenhouses using a process-based simulation model*. Biol. Control 24: 277-284.
- BIGOT, Y.; A. RABOUILLE, G. DOURY, P.Y. SIZARET, F. DELBOST, M.H. HAMELIN Y G. PERIQUET. 1997. *Biological and molecular features of the relationships between Diadromus pulchellus ascovirus, a parasitoid hymenopteran wasp (Diadromus pulchellus) and its lepidopteran host, Acrolepiopsis assectella*. J. Gen. Virol. 78: 1149-1163.
- BILLONCIK, S. Y H. MORI. 1998. *Cypoviruses*, pp. 31-68. En: L.K. Miller y L.A. Ball [editores], The insect viruses. Plenum Press, New York, USA.
- BISHOP, D.H.L. 1985. *The genetic basis for describing viruses as species*. Intervirolog. 24: 79-93.
- BLACK, B.C.; L.A. BRENNAN, P.M. DIERKS Y I.E. GARD. 1997. *Commercialization of baculoviral insecticides*, pp. 341-388. En: L.K. Miller [editor], The baculoviruses. Plenum Press, New York, USA.
- BROOKS, E.M.; K.H.J. GORDON, S.J. DORRIAN, E.R. HINES Y T.N. HANZLIK. 2002. *Infection of its lepidopteran host by the Helicoverpa armigera stunt virus (Tetraviridae)*. J. Invertebr. Pathol. 80: 97-111.
- BULLER, R.M.; B.M. ARIF, D.N. BLACK, K.R. DUMBELL, J.J. ESPOSITO, E.J. LEFKOWITZ, G. MCFADDEN, B. MOSS, A.A. MERCER, R.W. MOYER, M.A. SKINNER Y D.N. TRIPATHY. 2005. *Family Poxviridae*, pp. 117-133. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger y L.A. Ball [editores], Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, USA.
- BURDEN, J.P.; R.D. POSSEE, S.M. SAIT, L.A. KING, Y R.S. HAILS. 2006. *Phenotypic and genotypic characterization of persistent baculovirus infections in populations of the cabbage moth (Mamestra brassicae) within the British Isles*. Arch. Virol. 151: 635-649.
- BURGES, H.D. Y K.A. JONES. 1998. *Formulation of bacteria, protozoa and viruses*. p. 33-127. En: H.D. Burges [editor], Formulation of microbial biopesticides: beneficial micro-organisms, nematodes and seed treatments. Kluwer, Dordrecht, Países Bajos.
- CABALLERO, P.; T. WILLIAMS Y M. LÓPEZ-FERBER. 2001. *Estructura y clasificación de los baculovirus*. pp. 15-46. En: P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams [editores], Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma-España, Valencia, España.
- CABALLERO, P.; D. ZUIDEMA, C. SANTIAGO-ÁLVAREZ Y J.M. VLAK. 1992. *Biochemical and biological characterization of four isolates of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus*. Biocontr. Sci. Technol. 2: 145-157.
- CBP. 2007. *Commercialization of biopesticides in southeast Asia*. <http://www.biopesticides-seasia.net/download/biopest-Thai.pdf> (24/07/07).
- CERTIS. 2007. *Spod-X LC biological insecticide - Certis USA*. <http://www.certisusa.com/products/spod-x-lc-biological-insecticide.htm> (24/07/07).
- CHERRY, A.J.; M.A. PARNELL, D. GRZYWACZ Y K.A. JONES. 1997. *The optimization of in vivo nuclear polyhedrosis virus production in Spodoptera exempta (Walker) and Spodoptera exigua (Hübner)*. J. Invertebr. Pathol. 70: 50-58.
- CHINCHAR, V.G.; S. ESSBAUER, J.G. HE, A. HYATT, T. MIYAZAKI, V. SELIGY Y T. WILLIAMS. 2005. *Family Iridoviridae*, pp. 145-162. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, y L.A. Ball [editores], Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, USA.
- CLAUS, J.D. Y A. SCIOCCO DE CAP. 2001. *Producción masiva de baculovirus*. pp. 257-312. En: P. Caballero, M. López-Ferber y T. Williams [editores], Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma-España, Valencia, España.
- CORY, J.S. Y P.F. ENTWISTLE. 1990. *The effect of time of spray application on infection of the pine beauty moth, Pannolis flammea (Den. and Schiff.) (Lep.: Noctuidae) with nuclear polyhedrosis virus*. J. Appl. Entomol. 110: 235-241.
- CORY, J.S.; R.S. HAILS Y S.M. SAIT. 1997. *Baculovirus ecology*, pp. 301-40. En: L.K. Miller [editor], The baculoviruses. Plenum Press, New York, USA.
- CORY, J.S.; M.L. HIRST, P.H. STERILING Y M.R. SPEIGHT. 2000. *Narrow host range nucleopolyhedrovirus for control of the browntail moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*. Environ. Entomol. 29: 661-667.
- CORY, J.S.; M.L. HIRST, T. WILLIAMS, R.S. HAILS, D. GOULSON, B.M.

- GREEN, T.M. CARTY, R.D. POSSEE, P.J. CAYLEY Y D.H.L. BISHOP. 1994. *Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide*. Nature 370: 138-140.
- CROIZIER, G. Y H.C.T. RIBEIRO. 1992. *Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus wild populations*. Virus Res. 26: 183-96.
- DIRECTIVA 91/414/CEE. 1991. *Council Directive of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market*. Official Journal of the European Communities, L230, 19-8-1991.
- DIRECTIVA 2001/36/CE. 2001. *Commission Directive of 16 May 2001 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the plant protection products on the market*. Official Journal of the European Union, L164, 20-6-2001.
- DIRECTIVA 2005/25/CE. 2005. *Council Directive of 14 March 2005 amending Annex VI to Directive 91/414/EEC as regards plant protection products containing micro-organisms*. Official Journal of the European Union, L90/1, 8-4-2005.
- DOUGHERTY, E.M.; K.P. GUTHRIE Y M. SHAPIRO. 1996. *Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection*. Biol. Control 7: 71-74.
- EHLERS, R.U. 2007. *Regulation of microbial biocontrol agents in Europe: results of the REBECA policy support action*. 11th European meeting IOBC/WPRS working group, Alès, Gard, Francia, 3-7 de Junio de 2007.
- ENGELHARD, E.K.; L.N. KAM-MORGAN, J.O. WASHBURN Y L.E. VOLKMAN. 1994. *The insect traqueal system: a conduit for the systematic spread of Autographa californica M nuclear polyhedrosis virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 3224-3227.
- ESCRIBANO, A.; T. WILLIAMS, D. GOULSON, R.D. CAVE, J.W. CHAPMAN Y P. CABALLERO. 1999. *Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic and biological comparison of four isolates from the Americas*. J. Econ. Entomol. 92: 1079-1085.
- FARRAR, R.R.; M. SHAPIRO Y I. JAVAID. 2003. *Photostabilized titanium dioxide and a fluorescent brightener as adjuvants for a nucleopolyhedrovirus*. BioControl 48: 543-560.
- FARRAR, R.R. Y R.L. RIDGWAY. 1994. *Comparative studies of the effects of nutrient based phagostimulants on six lepidopterous insect pests*. J. Econ. Entomol. 87: 44-52.
- FAUQUET, C.M.; M.A. MAYO, J. MANILOFF, U. DESSELBERGER Y L.A. BALL [EDITORES]. 2005. *Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, USA.
- FEDERICI, B.A. 1983. *Enveloped double-stranded DNA insect virus with novel structure and cytopathology*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 7664-7668.
- FEDERICI, B.A. 1997. *Baculovirus pathogenesis*, pp. 33-60. En: L.K. Miller [editor], The baculoviruses. Plenum Press, New York, USA.
- FUXA, J.R. 2004. *Ecology of insect nucleopolyhedrovirus*. Agric. Ecosyst. Env. 103: 27-43.
- GLATZA, R.V.; S. ASGARIB Y O. SCHMIDT. 2004. *Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors*. Trends Microbiol. 12: 545-554.
- GÓMEZ, S.A. Y M. RUMIATTO. 1987. *Controle da lagarta da soja pelo Baculovirus anticarsia aplicado via aérea com melaco e oleo de soja*. Com. Tec. EMBRAPA Dourados No. 30, 8 pp.
- GRAHAM, R.I.; W.I. TYNE, R.D. POSSEE, S.M. SAIT Y R.S. HAILS. 2004. *Genetically variable nucleopolyhedrovirus isolated from spatially separate populations of the winter moth Operophtera brumata (Lepidoptera: Geometridae) in Orkney*. J. Invertebr. Pathol. 87: 29-38.
- GRANADOS, R.R. Y K.A. WILLIAMS. 1986. *In vivo infection and replication of baculoviruses*, pp. 89-108. En: R.R. Granados y B.A. Federici [editores], The biology of baculoviruses, vol. I, biological properties and molecular biology. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- 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.
- HAILS, R.S.; P. HERNÁNDEZ-CRESPO, S.M. SAIT, C.A. DONNELLY, B.M. GREEN Y J.S. CORY. 2002. *Transmission patterns of natural and recombinant baculoviruses*. Ecology 83: 906-916.
- HANZLIK, T.N.; S.J. DORRIAN, K.H.J. GORDON Y P.D. CHRISTIAN. 1993. *A novel small RNA virus isolated from the cotton bollworm Helicoverpa armigera*. J. Gen. Virol. 74: 1105-1110.
- HANZLIK, T.N.; K.H.J. GORDON, A.E. GORBALENYA, D.A. HENDRY, F.M. PRINGLE, V.K. WARD Y J.L. ZEDDAM. 2005. *Family Tetraviridae*, pp. 873-883. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger y L.A. Ball [editores], Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, USA.
- HERNIU, E.A.; J. OLSZEWSKI, J.S. CORY Y D.R. O'REILLY. 2003. *The genome sequence and evolution of baculoviruses*. Annu. Rev. Entomol. 48: 211-234.
- HODGSON, D.J.; A.J. VABERGEN, A.D. WATT, R.S. HAILS Y J.S. CORY. 2001. *Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a lepidopteran baculovirus*. Evol. Ecol. Res. 3: 687-701.
- HUGHES, P.R.; R.R. GETTIG Y W.J. MCCARTHY. 1983. *Comparison of the time-mortality response of Heliothis zea to 14 isolates of Heliothis nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. 41: 256-261.
- HUKUARA, T. Y J.R. BONAMI. 1991. *Reoviridae*, pp. 393-434. En: J.R. Adams y J.R. Bonami [editores], Atlas of invertebrate viruses. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- HUNTER-FUJITA, F.R.; P.F. ENTWISTLE, H.F. EVANS Y N.E. CROOK. 1998. *Insect viruses and pest management*. John Wiley, Chichester, UK.
- ICTV. 2002. *The universal virus database of the international committee on taxonomy of viruses*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/lctv/ICTVindex.htm> (30/10/07).
- IGNOFFO, C.M.; B.S. SHASHA Y M. SHAPIRO. 1991. *Sunlight ultraviolet protection of the Heliothis nuclear polyhedrosis virus through starch-encapsulation technology*. J. Invertebr. Pathol. 57: 134-136.
- INCEOGLU, A.B.; S.G. KAMITA, A.C. HINTON, Q. HUANG, T.F. SEVERSON, K.D. KANG Y B.D. HAMMOCK. 2001. *Recombinant baculoviruses for insect control*. Pest Manag. Sci. 57: 981-987.
- JEHLE, J.A.; E. FRITSCH, A. NICHEL, J. HUBER Y H. BACKHAUS. 1995. *TC14.7: a novel lepidopteran transposon found in Cydia pomonella granulosis virus*. Virology 207: 369-79.
- JENKINS, N.E. Y D. GRZYWACZ. 2000. *Quality control of fungal and viral biocontrol agents - assurance of product performance*. Biocontr. Sci. Technol. 10: 753-777.
- JONES, K.A.; A.J. CHERRY, D. GRZYWACZ Y H.D. BURGESS. 1997.

- Formulation: is it an excuse for poor application?*, pp. 173-180. En: H.F. Evans [editor], *Microbial insecticides: novelty or necessity?* British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Publications, Farnham, UK.
- JONES, K.A.; B. ZELAZNY, U. KETUNUTI, A. CHERRY Y D. GRZYWCZ. 1998. *South-east Asia and the western Pacific*, pp. 244-257. En: F.R Hunter-Fujita, P.F. Entwistle, H.F. Evans, y N.E. Crook [editores], *Insect viruses and pest management*. John Wiley, Chichester, UK.
- 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.
- KUKAN, B. 1999. *Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects*. *J. Invertebr. Pathol.* 74: 103-111.
- LASA, R. 2007. *Formulation and efficacy of Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in the greenhouses of southern Spain*. Tesis doctoral, Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, marzo de 2007.
- LASA, R.; P. CABALLERO Y T. WILLIAMS. 2007a. *Juvenile hormone analogs greatly improve the production of a nucleopolyhedrovirus*. *Biol. Control* 41: 389-396.
- LASA, R.; I. PAGOLA, I. IBÁÑEZ, J.E. BELDA, T. WILLIAMS Y P. CABALLERO. 2007b. *Efficacy of Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in greenhouses of southern Spain*. *Biocontr. Sci. Technol.* 17: 221-232.
- LASA, R.; C. RUIZ-PORTERO, M.D. ALCÁZAR, J.E. BELDA, P. CABALLERO Y T. WILLIAMS. 2007c. *Efficacy of optical brightener formulations of Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain*. *Biol. Control* 40: 89-96.
- LYNN, D.E.; M. SHAPIRO Y E.M. DOUGHERTY. 1993. *Selection and screening of clonal isolates of the Abington strain of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus*. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 191-195.
- MARINA, C.F.; J.E. IBARRA, J.I. ARREDONDO-JIMÉNEZ, I. FERNÁNDEZ-SALAS, P. LIEDO Y T. WILLIAMS. 2003. *Adverse effects of covert iridovirus infection on life history and demographic parameters of Aedes aegypti*. *Entomol. Exp. Appl.* 106: 53-61.
- MERTENS, P.P.C.; S. RAO Y Z.H. ZHOU. 2005. *Genus Cypovirus*, pp. 522-533. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger y L.A. Ball [editores], *Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, USA.
- MILKS, M.L. 1997. *Comparative biology and susceptibility of cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) lines to a nuclear polyhedrosis virus*. *Environ. Entomol.* 26: 839-848.
- MILLER, L.K. Y L.A. BALL [editores] 1998. *The insect viruses*. Plenum Press, New York, USA.
- MORALES-RAMOS, L.H.; M.R. MCGUIRE Y L.J. GALÁN-WONG. 1998. *Utilization of several biopolymers for granular formulations of Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 91: 1109-1113.
- MOSCARDI, F.; L.G. LEITE Y C.E. ZAMATARO. 1997. *Production of nuclear polyhedrosis virus of Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): effect of virus dosage, host density and age*. *An. Soc. Entomol. Bras.* 26: 121-132.
- MOSCARDI, F. 1999. *Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera*. *Annu. Rev. Entomol.* 44: 257-289.
- MUÑOZ, D. Y P. CABALLERO. 2001. *Diversidad natural de los baculovirus*. pp. 95-118. En: P. Caballero, M. López-Ferber, y T. Williams [editores], *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma-España, Valencia, España.
- MUÑOZ, D.; J. CASTILLEJO Y P. CABALLERO. 1998. *Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4372-4377.
- MUÑOZ, D.; R. MURILLO, P.J. KRELL, J.M. VLAK Y P. CABALLERO. 1999. *Four genotypic variants of a Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region*. *Virus Res.* 59: 61-74.
- MUÑOZ, D.; I. RUIZ DE ESCUDERO Y P. CABALLERO. 2000. *Phenotypic characteristics and relative proportions of three genotypic variants isolated from a nucleopolyhedrovirus of Spodoptera exigua*. *Entomol. Exp. Appl.* 97: 275-282.
- MURILLO, R.; S. ELVIRA, D. MUÑOZ, T. WILLIAMS Y P. CABALLERO. 2006. *Genetic and phenotypic variability in Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain*. *Biol. Control* 38: 157-165.
- OECD. 2004a. *Dossier guidance for microbials*. <http://www.oecd.org/dataoecd/60/6/30919600.pdf> (30/10/07).
- OECD. 2004b. *Monograph guidance*. <http://www.oecd.org/dataoecd/60/6/30919574.pdf> (30/10/07).
- O'REILLY, D.R. Y L.K. MILLER. 1991. *Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene*. *Bio/Technol.* 9: 1086-1089.
- PENG, F.; J.R. FUXA, A.R. RICHTER Y S.J. JOHNSON. 1999. *Effects of heat-sensitive agents, soil type, moisture, and leaf surface on persistence of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus*. *Environ. Entomol.* 28: 330-338.
- REBECA. 2007. *Regulation of biological control agents*. <http://www.rebeca-net.de/> (30/10/07).
- RIBEIRO, H.C.T.; O.H.O. PAVAN Y A.R. MUOTRI. 1997. *Comparative susceptibility of two different hosts to genotypic variants of the Anticarsia gemmatalis nuclear polyhedrosis virus*. *Entomol. Exp. Appl.* 83: 233-37.
- RICHARDS, A.; M. MATTHEWS Y P. CHRISTIAN. 1998. *Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides*. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 493-517.
- SCHNEEMANN, A.; L.A. BALL, DELSERT, J.E. JOHNSON Y T. NISHIZAWA. 2005. *Family Nodaviridae*, pp. 865-872. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, y L.A. Ball [editores], *Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, USA.
- SHAPIRO, M. 1986. *In vivo production of baculoviruses*, pp. 31-62. En: R.R. Granados, y B.A. Federici [editores], *The biology of baculoviruses*, vol. II. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- SHAPIRO, M. 1989. *Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus*. *J. Econ. Entomol.* 82: 548-550.
- SHAPIRO, M.; R.A. BELL Y C.D. OWENS. 1981. *In vivo mass production of gypsy moth nucleopolyhedrosis virus*, pp. 633-655. En: C.C. Doane, y M.L. McManus [editores], *The gypsy moth: research toward integrated pest management*. United States Forest Service, Washington D.C, USA.

- SHAPIRO, M. Y J.L. ROBERTSON. 1991. *Natural variability of three geographic isolates of gypsy moth (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus*. J. Econ. Entomol. 84: 71-75.
- SIKOROWSKI, P.P. Y A.M. LAWRENCE. 1994. *Microbial contamination and insect rearing*. Am. Entomol. 40: 240-253.
- SIMÓN, O.; T. WILLIAMS, M. LÓPEZ-FERBER Y P. CABALLERO. 2005a. *Genetic structure of a Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5579-5588.
- SIMÓN, O.; T. WILLIAMS, M. LÓPEZ-FERBER Y P. CABALLERO. 2005b. *Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population*. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4254-4262.
- SIMÓN, O.; T. WILLIAMS, M. LÓPEZ-FERBER, J.M. TAULEMESSE Y P. CABALLERO. 2008. *Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus*. Biol. Contr. 4: 321-330.
- SMITH, I.R.L. Y N.E. CROOK. 1988. *In vivo isolation of baculovirus genotypes*. Virology 166: 240-244.
- SMITS, P.H. Y J.M. VLAK. 1988. *Biological activity of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus against S. exigua larvae*. J. Invertebr. Pathol. 51: 107-114.
- SUN, X.; H. WANG, X. SUN, X. CHEN, C. PENG, D. PAN, J.A. JEHLE, W. VAN DER WERF, J.M. VLAK Y Z. HU. 2004. *Biological activity and field efficacy of a genetically modified Helicoverpa armigera single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus expressing an insect-selective toxin from a chimeric promoter*. Biol. Contr. 29: 124-137.
- TAKATSUKA, J. Y Y. KUNIMI. 2002. *Lethal effects of Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus isolated in Shiga prefecture, Japan, on larvae of the beet armyworm, Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae)*. Appl. Entomol. Zool. 37: 93-101.
- 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.
- TATTERSALL, P.; M. BERGOIN, M.E. BLOOM, K.E. BROWN, R.M. LINDEN, N. MUZYCZKA, C.R. PARRISH Y P. TIJSSSEN. 2005. *Family Parvoviridae*, pp. 353-369. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger y L.A. Ball [editores], Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, USA.
- THEILMANN, D.A.; G.W. BLISSARD, B. BONNING, J. JEHLE, D.R. O'REILLY, G.F. ROHRMANN, S. THIEM, Y J.M. VLAK. 2005. *Family Baculoviridae*, pp. 177-185. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger y L.A. Ball [editores], Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, USA.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V.; C.M. FAUQUET, D.H.L. BISHOP, E.B. CARSTENS, M.K. ESTES, S.M. LEMON, J. MANILOFF, M.A. MAYO, D.J. MCGEOCH, C.R. PRINGLE Y R.B. WICKNER. 2000. *Virus taxonomy, seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, USA.
- WEBB, B.A. 1998. *Polydnavirus biology genome structure and evolution*, pp 105-139. En: L.K. Miller y L.A. Ball [editores], The insect viruses. Plenum Press, New York, USA.
- WEBB, B.A.; N.E. BECKAGE, Y. HAYAKWA, B. LANZREIN, D.B. STOLTZ, M.R. STRAND Y M.D. SUMMERS. 2005. *Family Polydnaviridae*, pp. 255-267. En: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, y L.A. Ball [editores], Virus taxonomy, eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, San Diego, USA.
- WILLIAMS, T. 1998. *Invertebrate iridescent viruses*, pp. 31-68. En: L.K. Miller y L.A. Ball [editores], The insect viruses. Plenum Press, New York, USA.
- YOUNG, S.Y. Y W.C. YEARIAN. 1986. *Movement of a nuclear polyhedrosis virus from soil to soybean and transmission in Anticarsia gemmatalis (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations on soybean*. Environ. Entomol. 15:573-580.