

## Bioinsecticidas virales en el control biológico de plagas: una alternativa amigable para el control de insectos

Jackelyn Hernández Alvarado<sup>1</sup>, Jessica Guadalupe Hernández Mosqueda<sup>2</sup>, Karen Andrea Vázquez González<sup>2</sup>, Elizabeth Hernández Durán<sup>2</sup>, Nayeli Guadalupe Segura Ávila<sup>3</sup>, Nahaivi Paola Rodríguez Castillo<sup>4</sup>, María Cristina Del Rincón Castro<sup>2,4</sup>  
Licenciatura en Biología Experimental, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato<sup>1</sup>, Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca<sup>2</sup>, Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra<sup>3</sup>, Posgrado en Biociencias<sup>4</sup>, Universidad de Guanajuato.  
j.hernandezalvarado@ugto.mx<sup>1</sup>, jg.hernandezmosqueda@ugto.mx<sup>2</sup>, ka.vazquezgonzalez@ugto.mx<sup>2</sup>, e.hernandezduran@ugto.mx<sup>2</sup>, ng.seguraavila@ugto.mx<sup>3</sup>, np.rodriguezcastillo@ugto.mx<sup>4</sup>, cdelrincon@ugto.mx<sup>2,4</sup>

### Resumen

Los insecticidas químicos causan problemas de contaminación ambiental, intoxicación a animales y resistencia a los insectos plaga. El control biológico de plagas presenta una alternativa al uso de estos productos químicos, el cual es inocuo para el hombre, amigable con el medio ambiente y altamente específico para el control de insectos plaga, sin afectar a organismos benéficos. Los baculovirus son un grupo de virus entomopatógenos que se han aislado solamente de artrópodos, y casi exclusivamente de insectos. Se han utilizado en diversas partes del mundo como agentes de control efectivos para controlar plagas agrícolas, forestales, y hortícolas. En esta investigación se estudiaron 6 cepas de baculovirus aisladas del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, con la finalidad de evaluar su potencial bioinsecticida. Se estableció una colonia bajo condiciones de insectario de *S. frugiperda*, se analizó la identidad molecular de 6 cepas de baculovirus aisladas de esta plaga, a partir de insectos naturalmente infectados, mediante PCR y se realizaron bioensayos preliminares para estimar el tiempo letal medio o TL<sub>50</sub> de las cepas estudiadas. Todo ello con la finalidad de seleccionar a las cepas de baculovirus con mayor potencial bioinsecticida para controlar al gusano cogollero del maíz, sin la utilización de insecticidas químicos.

**Palabras clave:** bioinsecticidas; baculovirus; control biológico; *Spodoptera frugiperda*; maíz

### Introducción

El maíz (*Zea mays* L. subsp. *mays*) (Poaceae) es un grano de alta importancia<sup>1</sup>, y desde varias décadas atrás se han establecido monocultivos en los sistemas agrícolas para satisfacer su demanda, lo que ha influenciado el incremento de la presencia de diversas plagas<sup>2</sup>. El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (Smith, 1797) es reconocido como una plaga polífaga, voraz y de importancia económica en el norte y sur de América, que afecta una gran variedad de especies de plantas como maíz, sorgo, algodón y soya<sup>3</sup>. Para el control de plagas se han utilizado insecticidas químicos que han ocasionado resistencias en los insectos<sup>4</sup>, por lo que el control biológico es una estrategia sustentable en la disminución de insecticidas químicos durante el control de plagas. Los agentes de control biológico como los entomopatógenos, parasitoides y depredadores representan una alternativa prometedora, ya que además de su especificidad, no representan un riesgo a la salud, al medio ambiente y a insectos benéficos<sup>5</sup>.

Los baculovirus pertenecen a la familia *Baculoviridae* y son generalmente patógenos altamente selectivos de insectos de los órdenes Lepidoptera, Hymenoptera y Diptera<sup>6</sup>. Son un grupo diverso de virus con genomas de ADN de doble cadena circular y superenrollado, con tamaños que varían de 80 a 180 kb y codifican entre 90 y 180 genes. Los dos fenotipos de viriones generalmente encontrados en baculovirus son los viriones derivados de oclusión (ODV) y viriones gemados (BV)<sup>7</sup>. Los cuerpos de oclusión (CO's) son partículas virales que permiten a los virus sobrevivir en el ambiente y están compuestos por una matriz cristalina de proteína (poliedrina en los nucleopoliedrovirus (NPV) y granulina en los granulovirus (GV) que ocluyen a los viriones. La familia *Baculoviridae* está dividida en 4 géneros: *Alphabaculovirus* (NPV específicos de lepidópteros; grupo I y II), *Betabaculovirus* (GV específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV específicos de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (NPV específicos de dípteros)<sup>8</sup>

La principal plaga del maíz es el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)<sup>9</sup>. Este insecto es considerado de gran importancia económica debido a que es responsable de las

pérdidas significativas en la producción de maíz, puesto que provoca pérdidas de rendimiento de 15 a 73%<sup>10</sup>. Esta plaga ha sido controlada en gran medida con insecticidas químicos, requiriéndose de 2 a 4 aplicaciones durante el desarrollo de la planta, lo que representa un costo extra de producción<sup>10</sup>. Además, su uso descontrolado ha inducido resistencia tanto en *S. frugiperda*, como en plagas secundarias y a su vez favorece la contaminación del medio ambiente. También cabe mencionar que su uso ha provocado la intoxicación crónica en trabajadores agrícolas<sup>10</sup>. Un método alternativo para controlar a esta plaga, es el uso de enemigos naturales, principalmente virus entomopatógenos. Ya existen en otros países, cepas de baculovirus (específicamente Nucleopoliedrovirus o NPVs) aisladas de *S. frugiperda* denominadas SfNPV's, las cuáles han sido ampliamente estudiadas y representan agentes de control microbiano muy eficaces contra las larvas del gusano cogollero, debido a su alta especificidad, bioseguridad, persistencia, y el alto nivel de virulencia<sup>11</sup>. Los NPV's de *S. frugiperda* han sido aislados de las poblaciones del gusano cogollero en el norte, centro y sur de América<sup>12,13</sup>. Algunos aislamientos han sido evaluados bajo condiciones de laboratorio y de campo como bioinsecticidas potenciales para controlar *S. frugiperda* en maíz, los cuales han presentado niveles importantes de mortalidad larval<sup>13,14</sup>.

En el Laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la División de Ciencias de la Vida del Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato, se ha hecho la caracterización biológica y molecular de diversas cepas de baculovirus SfNPV con actividad bioinsecticida hacia la población mexicana del gusano cogollero del maíz, de las cuales algunas han sido evaluadas a nivel laboratorio mostrando un buen potencial insecticida<sup>14</sup>. No obstante, en este laboratorio se tiene una colección de 6 cepas nativas y exóticas, aisladas de este insecto, las cuales se deben continuar caracterizando con la finalidad de seleccionar a aquellas que puedan utilizarse con mejores resultados a nivel de laboratorio y campo, para posteriormente poder aplicarse formuladas en cultivos de maíz. En esta investigación se identificaron a nivel molecular a estas 6 cepas de virus SfNPV, mediante la detección por PCR de dos genes conservados, y se realizaron los estudios preliminares para establecer su tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>).

## Materiales y Métodos

### Cepas de virus

Se trabajó con 6 cepas de baculovirus SfNPV's: SfNPV-An1, Sf-An2 y SfNPV-Sin aisladas en México, SfNPV-Arg aislada en Argentina, SfNPV-Fx aislada en Estados Unidos, y SfNPV-Ho aislada en Honduras, todos con actividad hacia *S. frugiperda*, los cuales fueron previamente caracterizadas tanto molecularmente utilizando enzimas de restricción, como a nivel biológico, obteniendo la concentración letal media o CL<sub>50</sub><sup>13,14</sup>

### Propagación viral y manejo de colonia de *S. frugiperda*

Para instalar la colonia de *S. frugiperda* se partió de individuos en estado de pupa, se les mantuvo en condiciones de insectario (60% de humedad relativa, 25°C y 16:8 horas de luz:oscuridad) dentro de bolsas de papel estraza. Los adultos se alimentaron con una solución de agua destilada con miel de maíz al 5%. Estos ovipositaban en las paredes de las bolsas de papel, los huevecillos se colocaban en una caja Petri con dieta artificial para *S. frugiperda* (Agua destilada 1 000 ml, agar bacteriológico 12.5 g, maíz 120 g, levadura 50 g, germen de trigo 5g, polvo de espiga de maíz 25g, ácido sórbico 2.5 g, ácido ascórbico 5 g, metil paraben (MPB) 3.125 g, mezcla de sales 8.75 g, frijol soya 62.5 g, formaldehído al 37% 3.125 ml, antibiótico 0.75 mg y mezcla de vitaminas 18.75 g) hasta que eclosionaron. Después de la eclosión, en la misma caja de Petri se alimentaron las larvas, hasta llegar al 2° instar. Debido a los hábitos cabalísticos que adquieren en este instar, se individualizaron en vasos de plástico con tapa y dieta artificial, en estos vasos permanecieron hasta que puparon, bajo condiciones de insectario.

Para la amplificación viral se utilizaron larvas de *S. frugiperda*, las cuales fueron mantenidas en dieta semi-artificial bajo condiciones de insectario (60% de humedad relativa, 25°C y 16:8 horas de luz:oscuridad) en una cámara ambiental (PERCIVAL) y la infección se realizó en superficie de Cajas de Petri, partiendo de 500 µl de una solución 1x10<sup>6</sup> CO/ml de cada cepa viral, que fue depositada en la superficie de la dieta y se colocaron 10 larvas de 2° estadio de *S. frugiperda*, individualizadas con una rejilla e incubadas durante 6-7 días.

### Extracción de DNA

Los CO's de larvas infectadas fueron purificados mediante gradientes de sacarosa por ultracentrifugación en un rotor SW-32 (Optia XPN-100, Beckman Coulter) a 24,000 rpm durante 1:30 horas; los CO's fueron tratados con una solución amortiguadora de TE (0.01 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA, pH 7.6) y álcali (0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.1 M NaCl, pH 10.8) durante 15 min en agitación; los viriones fueron purificados mediante gradientes de sacarosa a 28,000 rpm durante 40 min, y posteriormente se llevó a cabo la extracción de ADN, primeramente con un tratamiento con buffer para Proteinasa K (0.01 M Tris, 0.005 M EDTA, 0.5% SDS) e incubado durante 15 min/60°C y 0.1 µg de proteinasa K (Invitrogen) y nuevamente incubado 30 min/60°C. Se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), un lavado con alcohol isoamílico y otro con etanol al 70% y la pastilla fue resuspendida en agua destilada estéril.

#### Amplificación por PCR de los genes *pif-2* y *polh*

Fragmentos de los genes *pif-2* y *polh* fueron amplificados por PCR partiendo del DNA extraído de las seis cepas de baculovirus, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos degenerados<sup>7,15</sup>. Los oligonucleótidos para *pif-2* amplificaban un fragmento de 270 pb y *polh* de 540 pb. La amplificación de los fragmentos de genes de *pif-2* se realizó por PCR touchdown (desnaturalización inicial a 95°C/3 min; 15 ciclos disminuyendo la temperatura de alineamiento -1°C cada ciclo 95°C/30 seg, 55°C/30 seg, 72°C/30 seg; 20 ciclos 95°C/30 seg, 60°C/30 seg, 72°C/30 seg; extensión final 72°C/7min). Para el caso de la *polh* se amplificó por PCR convencional (desnaturalización inicial 95°C/4 min; 95°C 30 seg, 55°C/1 min, 72°C/1 min; extensión final 72°C/10 min).

#### Estimación del TL<sub>50</sub>

Para estimar el TL<sub>50</sub> se efectuaron una serie de pruebas preliminares, antes de encontrar el intervalo de tiempo y dosis para determinar este parámetro. Se plaquearon 500 microlitros por caja de Petri con dieta artificial para *S. frugiperda*, 2 cajas en total de la concentración en CO/ml, en base a la CL<sub>50</sub> de cada cepa de SfNPV (Tabla 1) y la mortalidad se evaluó por períodos de 12 h, durante un lapso total de hasta 120 h (se evaluó por 5 días a la misma hora, la mortalidad por cada caja). Se utilizaron 20 larvas neonatas de *S. frugiperda* (primer instar) por concentración probada y 20 larvas para el control negativo (cajas con dieta artificial sin virus). Los bioensayos se incubaron bajo las mismas condiciones de insectario mencionadas previamente para la propagación viral, y la mortalidad se analizó mediante análisis Probit.

**Tabla 1.** Concentración de CO's (CL<sub>50</sub>) de cepas de SfNPV utilizadas para estimar el TL<sub>50</sub>

Nombre de la cepa	Concentración CO's/ml
SfNPV-Arg	48,421
SfNPV-Fx	142,362
SfNPV-Ho	183,212
SfNPV-An1	57,684
SfNPV-An2	57,684
SfNPV-Sin	234,950

## Resultados y Discusión

#### Propagación viral y manejo de colonia de *S. frugiperda*

La colonia de *S. frugiperda* se estableció exitosamente en el laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la División de Ciencias de la Vida del Campus Irapuato-Salamanca de la Universidad de Guanajuato, se mantuvieron las condiciones de 16:8 horas luz: oscuridad, 60% de humedad relativa y temperatura promedio de 25°C. Se obtuvo una población promedio mensual de 350 pupas (Fig. 1A), 350 adultos alimentándose con miel de maíz al 5% (Fig. 1B), 1,250 larvas de los diferentes instar (Fig. 1C), alimentadas con dieta artificial, y masas de huevecillos de diferentes densidades (Fig. 1D). Estas condiciones de incubación ya habían sido utilizadas por otros autores, encontrándose números similares de individuos de cada etapa del ciclo de vida de este insecto.<sup>11,12</sup>

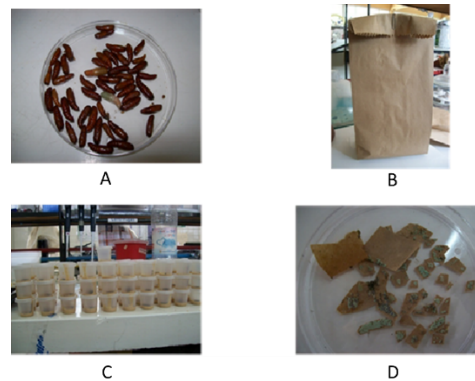


Figura 1. Mantenimiento de la colonia de *S. frugiperda* en sus distintas etapas.

### Amplificación de CO's de las cepas SfNPV

Se amplificaron las seis cepas de SfNPV, utilizando larvas de 3° estadio de *S. frugiperda*, obtenidas de la colonia establecida en el laboratorio. Las concentraciones que se obtuvieron de CO/ml para la caracterización biológica de cada una de las cepas fueron:  $2.1 \times 10^7$  CO/ml para la cepa SfNPV-Ar,  $1.1 \times 10^9$  CO/ml para la cepa SfNPV-Fx,  $1.945 \times 10^8$  CO/ml para la cepa SfNPV-Ho, para SfNPV-An1,  $4.495 \times 10^8$  CO/ml, para SfNPV-An2,  $1.88 \times 10^8$  CO/ml y para la cepa SfNPV-Sin,  $2.755 \times 10^8$  CO/ml, como se muestran en la Tabla 2. Es sabido que los niveles de producción de CO's, dependen del instar larval y de la virulencia de cada cepa<sup>16</sup>, de ahí las diferencias detectadas en cada cepa, en cuanto al número de CO's obtenidos en cada una de ellas.

**Tabla 2.** Amplificación de CO's en las cepas de SfNPV

Nombre de la cepa	Concentración CO's/ml
SfNPV-Arg	$2.1 \times 10^7$
SfNPV-Fx	$1.1 \times 10^9$
SfNPV-Ho	$1.945 \times 10^8$
SfNPV-An1	$4.495 \times 10^8$
SfNPV-An2	$1.88 \times 10^8$
SfNPV-Sin	$2.755 \times 10^8$

### Extracción de DNA

En la figura 2, se observa en un gel de agarosa, el producto del proceso de extracción de DNA a partir de los CO's purificados de las distintas cepas de SfNPV. Como puede observarse, en todos los carriles se encontró que en las 6 cepas de estudio, se obtuvo una banda de arriba de las 12 kpb, con respecto a la banda de mayor peso molecular del marcador utilizado (Ladder 1 kb). EL DNA de los baculovirus supera las 100 kpb<sup>7</sup>, por lo que con la obtención de esta banda de alto peso molecular, no se puede conocer con precisión su peso exacto, pero si se puede concluir que se obtuvo el DNA del genoma de cada cepa de trabajo de manera correcta y este pudo utilizarse para realizar la amplificación de los genes *polh* y *pif-2*.

### Amplificación por PCR de los genes *pif-2* y *polh*

En la figura 3, puede observarse el producto de PCR al intentar amplificar dos genes fundamentales para reconocer la identidad de un virus como miembro de la familia Baculoviridae, los genes *pif*, involucrados en la entrada de los viriones a las células columnares de los insectos<sup>6</sup> y el gen de la poliedrina, *polh*, el cual representa al gen que codifica para la proteína principal de los CO's de todos los baculovirus<sup>15</sup>. Como pudo observarse en la figura 3 (carriles, 3, 4 y 7), solamente las cepas SfNPV-Arg, SfNPV-Ho y SfNPV-An1 amplificaron el fragmento del gen de la poliedrina, mientras que el resto de las cepas, incluido el estándar utilizado AcMNPV, no amplificaron este gen. Esto pudo deberse que el DNA podía haberse degradado en estas cepas o estaba sucio, y por ello no se obtuvo el amplicón esperado de 540 pb. Esta conclusión deriva

del hecho de que todas las cepas de estudio, al observarse al microscopio compuesto, se detectaban los CO's de la mismas, y por ellos es poco probable que no presenten el gen de la poliedrina *polh*, si son virus ocluidos. Se sabe que esta proteína constituye hasta el 50% de la proteína total de los baculovirus, y es la proteína mayoritaria de los CO's, dentro de este grupo de virus entomopatógenos<sup>7,15</sup>. Por otro lado, cuando se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar el gen *pif-2* (Fig.3, carriles 9-14), este no amplificó para ninguna de las cepas de estudio, motivo por el cual se tiene que repetir este experimento, ya que es posible que la calidad del DNA no fuese suficientemente buena para obtener el amplicón de 250 pb o bien, otra posibilidad es que ninguna de las cepas poseen el gen *pif-2*, cosa que es altamente improbable, ya que estos genes son factores esenciales para la entrada de todos los baculovirus en sus células huéspedes, reportados hasta hoy.<sup>17</sup>

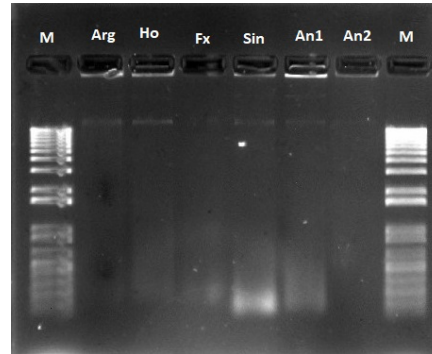


Figura 2. Extracción de DNA de las cepas SfNPV.

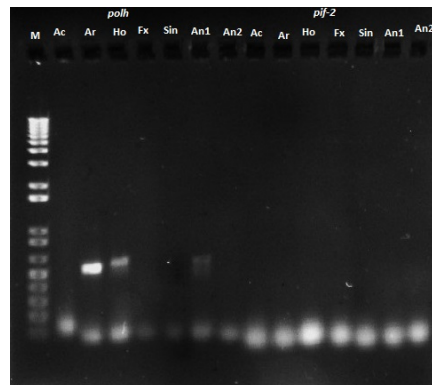


Figura 3. Amplificación por PCR de los genes *polh* (poliedrina) y *pif-2* de las cepas SfNPV

### Estimación del TL<sub>50</sub>

Un bioensayo se puede definir como cualquier método que mida alguna propiedad de un material, en términos de respuesta biológica. El bioensayo toma a los organismos vivos como aparatos de medición, y establece el parámetro biológico que utilizará (mortalidad, longevidad, fertilidad, crecimiento, etc.) para relacionar el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo. En el terreno toxicológico, el fenómeno causal es siempre un agente deletéreo y el efecto normalmente es la mortalidad o algún otro daño biológico. En este trabajo se realizaron bioensayos para estimar el tiempo letal medio de cada cepa de estudio con la finalidad de seleccionar a aquellas cepas que mataran más rápido a los insectos. Se utilizaron los datos de las CL<sub>50</sub> previamente establecidas de cada cepa, considerando que los niveles de virulencia entre las distintas cepas de virus SfNPV's, varían de una forma considerable<sup>13</sup>. Sorprendentemente, como puede observarse en la Tabla 3, la cepa que mató a un mayor número de larvas en un periodo de 5 días, fue la cepa SfNPV-Sin, alcanzando una mortalidad del 45%, lo cual era de esperarse, ya que se utilizó la concentración de su CL<sub>50</sub>, es decir una dosis que mata al 50% de la población probada. Este resultado fue un tanto sorprendente, ya que esta cepa en estudios previos, fue la que presentó la mayor CL<sub>50</sub> de todas las cepas estudiadas<sup>18</sup> y, por lo tanto, se esperaba que matara más lentamente a las mismas. Aún resta por analizar cuáles fueron las causas por las cuales, las cepas que aparentemente son más virulentas, por tener menores niveles de CL<sub>50</sub>



como SfNPV-Ar, SfNPV-Fx, SfNPV-Hon, y SfNPV-An1, <sup>13,18</sup>, no mataron de forma efectiva a las larvas probadas en 5 días (Fig. 4). Este experimento se inició con larvas de primer estadio (Fig. 4A), las cuáles se consideran altamente susceptibles a los baculovirus<sup>13,18</sup>, sin embargo, al término del experimento a los 5 días, se pudo observar que las larvas tuvieron muy bajo efecto letal, ocasionado por las cepas virales, ya que éstas prácticamente llegaron al quinto estadio larval (Fig. 4B), lo cual significó que los virus no ejercieron ningún efecto detrimental sobre las mismas. Posiblemente, esto se debió a que se utilizó una baja concentración viral y es necesario utilizar concentraciones más elevadas y diferentes a la de la CL<sub>50</sub>, para poder establecer estudios de TL<sub>50</sub> efectivos, los cuáles puedan ser analizados estadísticamente y así poder tener valores válidos para estimar este parámetro.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las otras 5 cepas estudiadas, pero todas demostraron tener un lento modo de acción, ya que, al término de los 5 días del estudio, ninguna de estas 5 cepas mató a más del 40% de las larvas probadas (Tabla 3). La cepa que le siguió en efectividad a SfNPV-Sin, para matar larvas de *S. frugiperda*, fue la cepa SfNPV-Fx (Fig.4C), con un porcentaje del 35% (Tabla 3), mientras que la cepa que posee la mayor virulencia en cuanto a su valor de CL<sub>50</sub>, SfNPV-Ar, según estudios previos<sup>13,18</sup>, no presentó niveles de mortalidad mayores al 20% (Fig.4D).

**Tabla 3.** Evaluación de mortalidad en larvas de *S. frugiperda* a diferentes tiempos pos-infección con las cepas SfNPV

Nombre de la cepa	Concentración CO <sup>s</sup> /ml	24 hpi*	48 hpi*	72hpi*	96hpi*	120hpi*
SfNPV-Arg	2.1x10 <sup>7</sup>	20/0	20/0	20/1	20/2	20/4
SfNPV-Fx	1.1x10 <sup>9</sup>	20/0	20/1	20/3	20/3	20/7
SfNPV-Ho	1.945x10 <sup>8</sup>	20/0	20/1	20/1	20/1	20/4
SfNPV-An1	4.495x10 <sup>8</sup>	20/0	20/1	20/2	20/2	20/3
SfNPV-An2	1.88x10 <sup>8</sup>	20/0	20/2	20/2	20/3	20/3
SfNPV-Sin	2.755x10 <sup>8</sup>	20/0	20/6	20/6	20/9	20/9
T (-)	No virus	20/0	20/0	20/0	20/0	20/0

\*Larvas probadas/larvas muertas; hpi: horas pos-infección

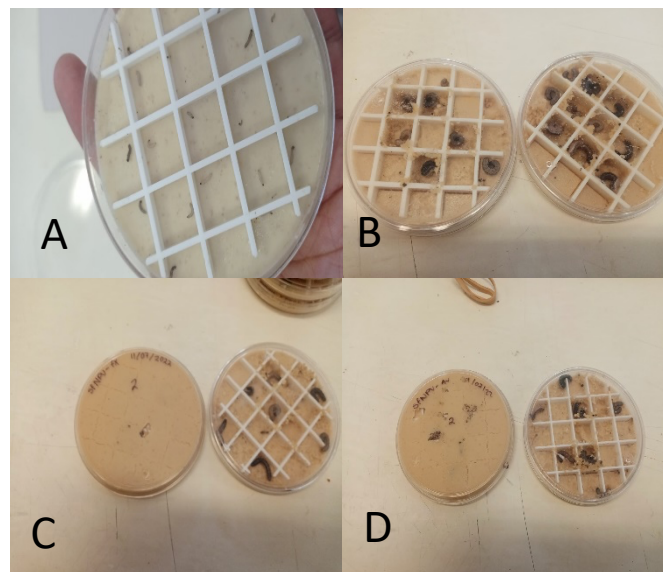


Figura 4. Estudio para estimar la TL<sub>50</sub> de las cepas SfNPV. A) Larvas de primer instar de *S. frugiperda* al inicio del estudio; B) Larvas de 5° instar a los 5 días pos-infección con las distintas cepas virales SfNPV; C) Larvas de *S. frugiperda* infectadas con la cepa SfNPV-Fx; D) Larvas de *S. frugiperda* infectadas con la cepa SfNPV-Ar.

## Conclusiones

En el presente trabajo se evaluaron 6 cepas de baculovirus SfNPV, aisladas del gusano cogollero *S. frugiperda*, con la finalidad de estudiar primero, si eran cepas pertenecientes a la familia Baculoviridae y segundo, cuál de ellas era la que mataba más rápidamente a las larvas de este insecto plaga, para utilizarse como bioinsecticida en el futuro. Tres de las 6 cepas estudiadas amplificaron el gen *polh*, lo cual evidenció su pertenencia a esta familia de virus entomopatógenos y las otras 3 que no lo amplificaron, necesitan estudiarse las causas de ello y no solamente concluir que no son miembros de la Familia Baculoviridae. Por otro lado, ninguna de las cepas amplificó uno de los genes de virulencia de esta familia de virus, como lo son los genes *pif-2*. Sin embargo, estos estudios no pueden ser concluyentes, ya que existen muchos más genes de virulencia encontrados en los genomas de estas cepas, los cuales no fueron analizados en este trabajo. Los tiempos letales demostrados por las diferentes cepas, tampoco evidenciaron cuál de ellas es la que tiene un mayor poder bioinsecticida, ya que se obtuvieron resultados contrastantes entre las  $TL_{50}$  observadas en este trabajo, y las  $CL_{50}$  previamente estimadas. Es necesario continuar realizando estudios a mayor profundidad y con mayor precisión, para poder elegir a la cepa del virus SfNPV, con mayor potencial para poder formularse y aplicarse a nivel de campo en cultivos de maíz. Todo ello con el objetivo de poder ofertar en el futuro, una alternativa de control biológico, y así contribuir a la disminución de la producción de maíz con productos químicos y poder obtener un maíz inocuo para el consumo humano y de mejor calidad de exportación.

## Bibliografía/Referencias

- Moya Raygoza G, Cuevas Guzmán R, Pinedo Escatel JA, Morales Arias JG, 2018. Comparison of leafhopper (Hemiptera: Cicadellidae) diversity in maize and its wild ancestor teosinte, and plant diversity in the teosinte habitat. *Annals of the Entomological Society of America*, say053-say053.
- Altieri MA, Francis CA, Van Schoonhoven A, Doll JD, 1978. A review of insect prevalence in maize (*Zea mays* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) polycultural systems. *Field Crops Research* 1: 33-49.
- Montezano DG, Specht A, Gómez DRS, Specht VFR, Silva JCS, Moraes SVP, Peterson JA, Hunt TE, 2018. Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. *African Entomology* 26: 286-300.
- Gutierrez-Moreno R, Mota-Sanchez D, Blanco CA, Whalon ME, Teran-Santofimio H, Rodriguez-Maciel JC, DiFonzo C, 2018. Field-evolved resistance of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) to synthetic insecticides in Puerto Rico and Mexico. *Journal of Economic Entomology* 112: 792-802
- Lacey LA, Grzywacz D, Shapiro-Ilan DI, Frutos R, Brownbridge M, Goettel MS. 2015. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology* 132: 1-41.
- Fuxa JR, 2004. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 103: 27-43.
- Herniou EA, Arif BM, Becnel JJ, Blissard GW, Bonning BC, Harrison R, Jehle JA, Theilmann DA, Vlak JM, 2011. Baculoviridae. In: *Virus taxonomy, Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Ed. by MJ Adams, AMQ King, EB Carstens, EJ Lefkowitz, Elsevier, Oxford, 163-174.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM, 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology* 151: 1257-1266.
- Diaz NG, Palacios SM. 2015. Bioinsecticidal effect of the flavonoids pinocembrin and quercetin against *Spodoptera frugiperda*. *J Pesticide Sciences* 88: 629-635.
- Rios Velasco C, Gallegos Morales G, Berlanga Reyes D, Cambero Campos J, Romo Chacón A. 2012. Mortality and Production of Occlusion Bodies in *Spodoptera frugiperda* Larvae (Lepidoptera:Noctuidae) Treated with Nucleopolyhedrovirus. *Florida Entomological Society* 95: 752-757.
- Lasa R, Williams T, Caballero P. 2009. The attractiveness of phagoestimulant formulations of a nucleopolyhedrovirus-based insecticides depends on prior insect diet. *J Pesticide Sciences* 82: 247-250.
- Berreta M, Rios ML, Cap S. 1998. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 280-282.
- Barrera G, Simón O, Villamizar L, Williams T, Caballero P. 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyherovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolated from Colombia. *Biological Control* 58: 113-120.
- Rangel Nuñez JC, Vazquez Ramírez MF, Del Rincón Castro MC. 2014. Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de baculovirus SfNPV, con actividad bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia* 39: 320-326.

- Rios Velasco C, Gallegos Morales G, Del Rincón Castro MC, Cerna Chávez E, Sánchez Peña SR, Siller MC, 2011. Insecticidal activity of native isolates of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus from soil samples in México. *Florida Entomologist* 94: 716-718.
- Lange M, Wang H, Zhihong H, Jehle JA, 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. *Virology* 325: 36-47.
- Escribano-Cumba, A., 1999. Nucleopolyhedrovirus and parasitoids interactions in *Spodoptera frugiperda* larvae, Doctoral Thesis, 1999, Universidad Pública de Navarra, Pamplona, España.
- Pijlman GP, Pruijssers AJP, Vlaskin JM. 2003. Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects. *J General Virology* 84: 2041-2049.
- Zanella-Saenz I, Herniou EA, Ibarra JE, Huerta-Arredondo IA, Del Rincón-Castro MC. 2022. Virulence and genetic characterization of six baculovirus strains isolated from different populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Archive of Microbiology* 204(1):108.