

Caracterización bioquímica de un nucleopoliedrovirus de *Chrysodeixis chalcites* autóctono de España

R. MURILLO, J. J. LIPA, D. MUÑOZ, J. AMATE, P. BARRANCO, T. CABELLO Y P. CABALLERO

En las poblaciones naturales de larvas de *Chrysodeixis chalcites* (Esper) que atacan a los cultivos hortícolas de los invernaderos de Almería se desarrolló, en 1997, una epizootia en la que se identificó como agente causal un baculovirus del género Nucleopolyhedrovirus (NPV). El ADN genómico del aislado viral, obtenido a partir de poliedros purificados de larvas muertas por virosis, fue analizado con las enzimas de restricción *BglII*, *EcoRI* y *PstI*. Este análisis, confirmó que se trataba de un virus único cuyo perfil de restricción, con las enzimas utilizadas, no presentaba similitud con los perfiles de restricción de otros NPVs, previamente aislados en esa zona sobre otras especies de lepidópteros como *Spodoptera exigua* (SeMNPV-SP2) y *Spodoptera littoralis* (SiMNPV-SP1), o del NPV de *Autographa californica* (AcNPV-wt) que es la especie tipo del género Nucleopolyhedrovirus. El análisis de las proteínas estructurales del virus también permitió discriminar este aislado de otros del mismo género. Se trata, por tanto, del primer aislado de un NPV de *C. chalcites*, en nuestras condiciones de medio, y siguiendo la nomenclatura propuesta por MURPHY *et al* (1995) se ha denominado ChChNPV-SP1. Ensayos preliminares de su espectro de huéspedes indican que este virus es bastante específico ya que sólo resultó infectivo para larvas de *C. chalcites*, *Plusia gamma* (L) y *Trichoplusia ni* (Hüb). En cambio, no fue infectivo, por ingestión, para distintos estadios larvarios de *Helicoverpa armigera* (Hüb), *Spodoptera exigua* (Hüb), *Spodoptera littoralis* (Boisduval) y *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).

R. MURILLO, D. MUÑOZ Y P. CABALLERO: Laboratorio de Entomología Agrícola y Patología de Insectos, Departamento de Producción Agraria, Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona.

J. J. LIPA: Department of Biocontrol & Quarantine, Institute of Plant Protection, Mieczurina 20, 60318 Poznan, Polonia.

J. AMATE, P. BARRANCO Y T. CABELLO: Departamento de Biología Aplicada, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Almería, 04120 Almería.

Palabras clave: *Chrysodeixis chalcites*, baculovirus, nucleopoliedrovirus, caracterización bioquímica, espectro de huéspedes.

INTRODUCCIÓN

Chrysodeixis chalcites es una especie fitófaga, perteneciente a la familia Plusiinae, que actualmente se distribuye por el Sur de Europa, África, Oceanía, Asia y algunos puntos de América (CAYROL, 1972). Las plusias o geométridos, nombre común con el que se conoce a las orugas de este grupo, se han descrito sobre muchas especies huésped entre las que se encuentran cultivos ornamentales, hortícolas, industriales y tam-

bién sobre malas hierbas. Los daños son producidos por la alimentación de las larvas que llegan a originar importantes defoliaciones en las plantas. En España, causa daños de importancia económica en el Valle del Guadalquivir (CABELLO, 1986), la Vega de Granada (CABELLO, 1988b) y en invernaderos en la provincia de Almería (CABELLO y BELDA, 1994; APARICIO *et al.*, 1995; CABELLO *et al.*, 1996). En esta zona, las poblaciones larvarias de *C. chalcites* suelen producir infestaciones simultá-

neas, sobre los mismos cultivos y al mismo tiempo, con otras especies de noctuidos que producen el mismo tipo de daño, como son la rosquilla verde (*Spodoptera exigua*) y la rosquilla negra (*Spodoptera littoralis*).

En la actualidad el control de esta plaga se realiza por aplicación de insecticidas químicos de síntesis (CABELLO y BELDA, 1994). Sin embargo, la creciente tendencia a minimizar los impactos negativos que se producen por la continuada utilización de insecticidas químicos ha favorecido la búsqueda de otros métodos de control entre los que destaca la utilización de depredadores, parasitoides y virus y microorganismos entomopatógenos. Entre los virus entomopatógenos que regulan las poblaciones de esta especie fitófaga, de forma natural, destaca un nucleopoliedrovirus (NPV) de *C. chalcites*, responsable de epizootías en los invernaderos de la región de El Ejido en Almería (BARRANCO, com. pers.).

Los NPVs son virus pertenecientes a la familia Baculoviridae que han sido aislados de numerosas especies fitófagas, entre las que se encuentran muchas de las más importantes plagas de insectos (MARTIGNONI y IWAI, 1986). Los NPVs tienen cualidades insecticidas, como su especificidad y seguridad de empleo, que los hace totalmente compatibles con otros métodos de lucha (ROBERTS *et al.*, 1991). Varias aislados de NPVs, recogidos en distintos lugares del mundo, han sido caracterizadas a nivel bioquímico y biológico (GELERNTER y FEDERICI, 1990; CABALLERO *et al.*, 1992; HARA *et al.*, 1995) y, actualmente, en varias partes del mundo se han registrados como bioinsecticidas y se utilizan en el control de plagas (MOSCARDI, 1999).

Morfológicamente, los NPVs contienen partículas virales compuestas de ADN de cadena doble, de entre 90 y 160 kilobases (BLISSARD y ROHRMAN, 1990), las cuales quedan incluidas en una matriz protéica que forma el poliedro (también llamado cuerpo de inclusión). La poliedrina, proteína mayoritaria que forma la envoltura del poliedro, les confiere gran estabilidad fuera del

huésped. El análisis del ADN viral con enzimas de restricción ha demostrado ser un método muy útil para diferenciar aislados y caracterizarlos (LEE y MILLER, 1978; HARA *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1998). El objetivo de este trabajo es analizar bioquímicamente un NPV aislado de larvas de *C. chalcites* y determinar su relación con otro NPVs obtenidos en la misma zona, como el NPV de *S. exigua* (SeMNPV-SP2; Se-SP2) y el de *S. littoralis* (SIMNPV-M2; SI-M2), así como con la cepa tipo del género *Nucleopolyhedrovirus*, el NPV de *A. californica* (AcMNPV-wt; Ac-wt). También, se ha determinado su espectro de huéspedes sobre varias especies de lepidópteros de interés agrícola.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los insectos y los nucleopoliedrovirus

Los insectos empleados en este trabajo, proceden de poblaciones mantenidas en condiciones ambientales constantes (temperatura 26 ± 2 °C, humedad relativa $70 \pm 5\%$ y fotoperíodo de 16 h de luz) en el insectario de la Universidad Pública de Navarra (UPNA). Los individuos en estado de larva se alimentan con dieta artificial compuesta por 18% de harina de maíz, 3,4% de levadura de cerveza, 3,2% de germen de trigo, 1,5% de caseína, 0,45% de ácido ascórbico, 0,11% de nipagina, 0,05% de de aldehído fórmico, 0,13% de ácido benzoico y 1,5% de agar (POITOUT y BUES, 1974) y en estado adulto con miel diluida al 30% (p/v) en agua destilada.

El NPV de *C. chalcites* se aisló de larvas de *C. chalcites* recogidas, en 1997, durante el desarrollo de una epizootía en los invernaderos de El Ejido (Almería). La cepa Se-SP2 forma parte de la colección de baculovirus del Laboratorio de Entomología Agrícola y Patología de Insectos de la UPNA. Esta cepa, originariamente, fue aislada de larvas de *S. exigua* recogidas en El Ejido (Almería), en 1990, durante el desarrollo de una epizootía

ocurrida en los invernaderos de la zona (CABALLERO *et al.*, 1992b). La cepa SI-M2 es una variante genotípica purificada en placa a partir de un aislado marroquí obtenido de larvas muertas de *S. littoralis*, en 1967, que nos fue amablemente suministrado por el Dr. Croizier (Station de Recherches de Pathologie Comparée, Saint-Christol-les-Alés, Francia). El aislado Ac-Wt, utilizado como referencia, fue amablemente suministrado por el profesor Dr. R. D. Possee (Institute of Virology and Environmental Microbiology, Oxford, Reino Unido). Se trata de la variante C6 de la que actualmente se conoce toda su secuencia genómica (AYRES *et al.*, 1994).

Multiplificación y purificación de poliedros

La multiplicación del NPV de *C. chalcites* se hizo alimentando larvas del cuarto estadio larvario de *C. chalcites* con dieta artificial contaminada superficialmente con poliedros. Las larvas muertas por virosis fueron homogeneizadas en agua bidestilada y la suspensión resultante se filtró a través de una tela de muselina dos veces. El filtrado se centrifugó a 8.000 r.p.m., durante 8 minutos, y el precipitado de poliedros se lavó en un volumen de SDS al 0,1%, dos veces, y una vez más en CINa al 0,1%. Los poliedros así purificados fueron resuspendidos en agua destilada y la concentración de virus se determinó haciendo tres conteos independientes con una cámara Thoma (Hawksley, Lancing, Reino Unido) en un microscopio óptico con contraste de fases a 400x. La suspensión de poliedros fue almacenada a 4 °C hasta que se hizo uso de ella para el análisis de proteínas estructurales, la extracción del ADN genómico o los bioensayos de espectro de huéspedes.

Análisis de proteínas

Para el análisis de las proteínas estructurales de las cepas virales se tomó una muestra de poliedros de cada una de las cepas a la que se le añadió 1/3 de bufer (124 mM-

Tris/HCl, pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 10% v/v glicerol, 0,0001 (p/v) azul de bromofenol y 5% (v/v) de 2-mercaptoetanol y se hirvieron durante 3 minutos. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de poli(acrilamida) del 12,5% (p/v) a 40 mA, durante aproximadamente 1 h, según el método descrito por Laemmli (1970). Las bandas de proteínas fueron fijadas y teñidas en una solución que contenía 50% (v/v) de etanol; 10% (v/v) de ácido acético, 0,1% (p/v) de azul brillante de Coomassi R250 y 40% (v/v) de agua destilada. El peso molecular de las diferentes bandas fue estimado por comparación con los pesos moleculares estándares de las siguientes proteínas: MBP- β -galactosidasa (158 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), fosforilasa (97,2 kDa) albumina de bovino (66,4 kDa), deshidrogenasa glutámica (55,6 kDa), albumina de huevo (42,7 kDa), anhidrasa carbónica (36,5 kDa), inhibidor de la tripsina de soja (20,0 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

Análisis del ADN

Los poliedros se trataron con 3xDAS (0,3 M Na₂CO₃; 0,5 M NaCl; 0,03 M DTA; pH 10,5) para liberar los viriones de la poliedrina que los rodea. Las muestras se centrifugaron a 5.000 r.p.m., durante 1 minuto, y se recuperaron los viriones en el sobrenadante. Estos fueron digeridos con 500 mg/ml de proteinasa K, para romper la cubierta protéica de los viriones, a 45 °C durante 2,5 h. Se añadió SDS, hasta una concentración final del 1%, y las muestras fueron incubadas 30 minutos más en las mismas condiciones. Finalmente, el ADN fue extraído por fenolización con tres pases sucesivos con fenol y un pase final con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). En cada pase se añadió un volumen del reactivo, facilitando el mezclado de las dos fases con un leve balanceo de los tubos, y se centrifugó a 13.000 r.p.m., durante 5 minutos, recuperándose la fase acuosa. Por último, se precipitó el ADN por

centrifugación (15 minutos a 13.000 r.p.m) después de añadir a la muestra una décima parte de NaAc 3M a pH 5,2 y dos volúmenes de etanol al 96%. Se desechó el sobrenadante y se volvió a lavar el pellet con etanol al 70% a 13.000 r.p.m. durante 2 minutos. El pellet se dejó secar y se resuspendió cada muestra en 50 µl de Tris 10 mM pH 8,1. El ADN purificado se almacenó a 4 °C hasta el momento de su análisis con enzimas de restricción. El genoma fue digerido con las endonucleasas de restricción *Bg/II*, *EcoRI* y *PstI*, a 37 °C durante aproximadamente cuatro horas. Los fragmentos de ADN resultantes se cargaron en un gel de agarosa al 0,7% preparado sobre bufer TAE (40 mM Tris-Acetato; 1mM EDTA) con bromuro de etidio a una concentración de 0,25 µg/ml. La electroforesis se realizó durante 14 horas a 20 V. El perfil resultante se observó a través de una fuente de rayos UV y la imagen obtenida fue analizada en formato digital a través del programa informático Molecular Analyst® (Bio-Rad, 1996).

Espectro de huéspedes

El espectro de huéspedes del NPV de *C. chalcites* se determinó para las siguientes especies de lepidópteros: *S. exigua*, *S. littoralis*, *Spodoptera frugiperda*, *Tricoplusia ni*, *Plusia gamma* y *Helicoverpa armigera*. De cada una de estas especies se trataron grupos de 25 larvas de los estadios L₂ y L₄, utilizando el método de bioensayo descrito por Hughes y Wood (1981). A las larvas L₂ se les suministró una única concentración de 3×10⁶ poliedros por mililitro (pol/ml) y a las de L₄ una única concentración de 3×10⁹ pol/ml. Para cada especie de insecto y estadio se incluyó un testigo de 25 larvas que fueron tratadas de igual modo excepto que la suspensión acuosa no contenía virus. Las larvas tratadas fueron mantenidas en las mismas condiciones ambientales descritas para la cría y observadas diariamente hasta que se produjo su muerte o pupación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró para todos los aislados una banda única mayoritaria, que corresponde a la poliedrina, que tuvo un peso molecular de 33 kDa para el aislado Ac-Wt, de 34 kDa para el NPV de *C. chalcites* y de 30 kDa para los aislados Se-SP2 y SI-M2 (Figura 1). El poliedrín, gen responsable de la expresión de la poliedrina, es un gen muy conservado entre los baculovirus (VAN STRIEN *et al.*, 1991), aunque se han encontrado ligeras variaciones en los pesos moleculares de esta proteína entre distintas especies del género *Nucleopolyhedrovirus*. En este análisis se confirmó el peso descrito para las cepas Se-SP2 y Ac-wt por CABALLERO *et al.*, (1992b). Además, se pudieron observar otras bandas en el gel debidas a los péptidos estructurales de la membrana lipoprotéica del virión. La mayor parte de las bandas tuvieron una movilidad electroforética similar para los cuatro aislados, aunque se observan diferencias en las intensidades relativas de dichas bandas. Para el NPV de *C. chalcites* se observó una banda intensa de 36 kDa que no estaba presente en el resto de las cepas.

El ADN viral del NPV de *C. chalcites* fue analizado utilizando tres enzimas de restricción, *EcoRI*, *Bg/III* y *PstI* y fue comparado con los perfiles obtenidos para los aislados Ac-wt, Se-SP2 y SI-M2 con las mismas enzimas. Para cada una de las enzimas se observó un gran polimorfismo entre los distintos aislados, lo que se manifestó por la diferente movilidad de los fragmentos de ADN en el gel de agarosa (Figura 2). El perfil de restricción del NPV de *C. chalcites* no presentó ninguna similitud con los obtenidos para el NPV de Se-SP2, recogida en esta misma zona, ni con la variante genotípica SI-M2, que presenta un perfil muy similar a un NPV (SI-SP1) aislado en esta misma zona sobre larvas de *S. littoralis* (CABALLERO, com. pers.).

Los tamaños estimados para los fragmentos del NPV de *C. chalcites* obtenidos con

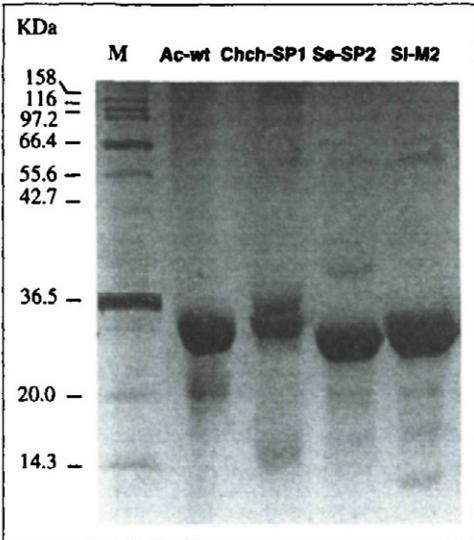


Fig. 1.—Gel de SDS-PAGE al 12,5% mostrando las proteínas estructurales del poliedro y de la membrana lipoproteica de los viriones de los NPV de Ac-wt (columna 2), Chch-SP1 (columna 3), Se-SP2 (columna 4) y S1-M2 (columna 5). En la primera columna se presenta el marcador (M) y a la izquierda de la figura se indican los pesos moleculares de las bandas proteicas en KDa.

las tres enzimas se calcularon por comparación con la movilidad electroforética de los fragmentos del aislado Ac-wt (Cuadro 1). El tamaño del genoma del virus, calculado como la suma total de dichos fragmentos, fue estimado entre 124 y 131 kpb, que resultó ser ligeramente inferior al de Ac-wt (AYRES *et al.*, 1994) y Se-SP2 (CABALLERO *et al.*, 1992b).

La comparación de los perfiles obtenidos para el NPV de *C. chalcites* con Ac-wt y otros NPVs presentes en la zona (SeMNPV-SP2; SIMNPV-M2), sugieren claramente que se trata de un nuevo aislado del género *Nucleopolyhedrovirus* al que, según la nomenclatura propuesta por MURPHY *et al* (1995), se ha denominado *C. chalcites* NPV (ChchNPV) y por ser el primer aislado de origen español ChchNPV-SP1 (o abreviadamente Chch-SP1). Además, el perfil de Chch-SP1 se comparó con otros perfiles de nucleopoliedrovirus caracterizados que se encuentran en la bibliografía, como el de *Mamestra brassicae* (MbMNPV) y el de *He-*

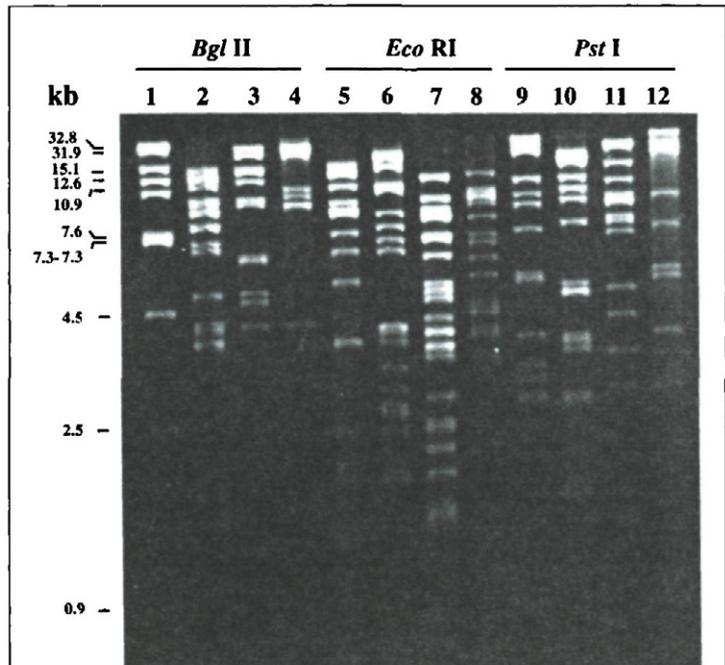


Fig. 2.—Perfiles de restricción del ADN genómico de los NPVs de Ac-wt (columnas 1, 5 y 9), de Chch-SP1 (columnas 2, 6 y 10), de Se-SP2 (columnas 3, 7 y 11) y de S1-M2 (columnas 4, 8 y 12). A la izquierda de la figura se indican los tamaños, en Kpb, de los fragmentos de restricción del NPV de Ac-wt con *Bgl*III.

Cuadro 1.-Tamaños estimados de los fragmentos del NPV de *C. chalcites* obtenidos con las enzimas de restricción *Bgl*III, *Eco*RI y *Pst*I y el tamaño del genoma total en kpb

Fragmento	<i>Bgl</i> III	<i>Eco</i> RI	<i>Pst</i> I
A	15,0	17,8	15,1
B	12,5	17,6	14,9
C	11,8	15,1	14,6
D	10,3	10,9	11,4
E	10,2	10,9	9,8
F	9,2	8,6	9,1
G	7,9	7,4	7,4
H	7,0	7,0	5,1
I	6,7	6,4	4,7
J	5,1	3,9	4,7
K	3,8	3,8	3,5
L	3,6	3,5	3,3
M	3,5	3,2	2,7
N	3,5	2,8	2,6
O	0,5	2,7	2,5
P	0,4	2,6	1,8
Q	0,2	2,0	1,6
R	-	1,9	1,4
S	-	1,8	1,3
T	-	1,8	1,2
U	-	-	0,9
V	-	-	0,8
Genoma	123,8	131,7	123,7

licoverpa armigera (HearNPV) (FIGUEIREDO *et al.*, 1999), sin que parezca tener similitud con ninguno de los ellos.

Se corrobora en este trabajo que el análisis del ADN genómico del virus con enzimas de restricción es una herramienta muy útil para la comparación de distintos aislados de nucleopoliedrovirus y para la caracterización de nuevas cepas (LEE y MILLER, 1978), siendo un método con mayor capacidad de discriminación que el análisis de las proteínas estructurales del virus.

Para determinar el espectro de huéspedes del aislado Chch-SP1 se han realizado bioensayos sobre larvas de las especies de lepidópteros *H. armigera*, *S. exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *P. gamma* y *T. ni*. Las larvas de *T. ni* y *P. gamma* fueron susceptibles a la infección, mostrando claros síntomas de poliedrosis (inapetencia, cambio de color, etc...), a partir del tercer día después de la infección, y, finalmente, muriendo, a

los siete días aproximadamente, con los signos claros de una poliedrosis. En ninguna de las otras especies, tratadas por ingestión con el virus, tuvo lugar el desarrollo de la enfermedad. Por lo tanto, el aislado Chch-SP1 tiene una elevada especificidad ya que su espectro de huéspedes está restringido a su huésped natural y algunas especies filogenéticamente muy próximas. Esta característica, habitual entre los baculovirus (Gróner, 1986), puede ser de interés para su empleo como materia activa de un bioinsecticidas en situaciones donde sea un requisito imprescindible preservar otras especies presentes en el mismo ecosistema. Sin embargo, con vistas a estimar su potencial real para el control de *C. chalcites* o *P. gamma* es necesario realizar estudios detallados que nos permitan determinar las características insecticidas del aislado como son su patogenicidad (DL₅₀) y virulencia (TL₅₀).

ABSTRACT

MURILLO, R.; JERZY J. L.; MUÑOZ, D.; AMATE, J.; BARRANCO, P.; CABELLO, T. y CABALLERO P., 1999: **Caracterización bioquímica de un nucleopoliedrovirus de *Chrysodeixis chalcites* autóctono de España.** *Bol. San. Veg. Plagas*, **26** (Adenda al nº 4): 637-644.

A nuclearpolyhedrovirus identified as the etiological agent causing epizootics in natural population of *Chrysodeixis chalcites* in the South of Spain (Almería), was biochemically characterized. Restriction endonucleases analysis and polihedrin analysis revealed that the isolate is a new strain belonging to the genus *Nucleopolyhedrovirus* that we have called ChchNPV-SP1 after the proposal of MURPHY *et al* (1995). The estimated Chch-SP1 genome size was between 124 and 131 kb. Preliminary bioassays against six lepidopteran species indicated that the ChchNPV-SP1 has a narrow host range since only two of them, *T. ni* and *P. gamma*, were susceptible to this virus while the other insect species, *S. exigua*, *S. littoralis*, *S. frugiperda*, *H. armigera*, were resistant.

Key words: *Chrysodeixis chalcites*, baculoviruses, nucleopolihedrovirus, biochemical characterization, host range.

REFERENCIAS

- APARICIO, V.; RODRIGUEZ, M. D.; GÓMEZ, V.; SÁEZ E.; BELDA, J. E.; CASADO, E. y LASTRES, J., 1995: *Plagas y enfermedades de los principales cultivos hortícolas de la provincia de Almería: control racional*. Comunicación I+D Agroalimentaria 11/95. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 260 pp.
- AYRES, M. D.; HOWARD, S. C.; KUZIO, J.; LÓPEZ-FERBER, M. y POSSEE, R. D., 1994: The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology* **202**: 586-607.
- BLISSARD, G. W. y ROHRMANN, G. F., 1990: Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.*, **35**: 127-155.
- CABALLERO, P.; ZUIDEMA, D.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. y VLAK, J. M., 1992b: Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Sci. Technol.*, **2**: 145-157.
- CABELLO, T. y BELDA, J., 1994: Noctuidos plaga (Lepidoptera: Noctuidae) en cultivos hortícolas de invernadero. En: Moreno, R. (De.). *Sanidad vegetal en la horticultura protegida*. Consejería de Agricultura y pesca. Junta de Andalucía. Sevilla: 179-211.
- CABELLO, T., 1986: Plagas de Lepidópteros en cultivos del Valle del Guadalquivir. *Actas de las VIII Jornadas de la Asociación Española de Entomología*: 869-848.
- CABELLO, T., 1988b: Especies de noctuidos (Lep.: Noctuidae) de interés agrícola en la Vega de Granada y su fenología. *Actas de las III Congreso Ibérico de Entomología*: 473-478.
- CABELLO, T.; GONZÁLEZ, M. P.; JUSTICIA, L. y BELDA, J. E., 1996: *Plagas de noctuidos (Lep: Noctuidae) y su fenología en cultivos de invernaderos*. *Informaciones técnicas 39/36*. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 155 pp.
- CAYROL, R. A., 1972: Famille des Noctuidae, p. 1255-1520. En: A. S. Balachowsky (ed.), *Entomologie appliquée à l'agriculture*, tome II Lépidoptères, vol. 2. Masson et Cie, Paris, France.
- FIGUEIREDO, E.; MUÑOZ, D.; ESCRIBANO, A.; MEXIA, A.; VLAK, J. y CABALLERO, P., 1999: Biochemical identification and comparative insecticidal activity of nucleopolyhedrovirus isolates pathogenic for *Heliothis armigera* larvae. *J. Appl. Ent.*, **123**: 1-00.
- GELERNTER, W. D. y FEDERICI, B. A., 1990: Virus epizootics in Californian populations of *Spodoptera exigua*: dominance of a single viral genotype. *Biochem. System. Ecol.*, **18**: 461-466.
- GRÖNER, A., 1986: Specificity and safety of baculoviruses, 1: 177-202. In: R. R. Granados and B. A. Federici (eds.), *The biology of baculoviruses*, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- HARA, K.; FUNAKOSHI, M. y KAWARABATA, T., 1995: In vivo and in vitro characterization of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Acta virol.*, **39**: 215-222.
- HUGHES, P. R., y WOOD, H. A., 1981: A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, **37**: 154-159.
- KOLODNY-HIRSCH, D. M.; WARKENTIN, D. L.; ALVARADO-RODRÍGUEZ, B. y KIRKLAND, R., 1993: *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus as a candidate viral insecticide for the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econom. Entomol.*, **86**: 314-321.
- LEE, H. y MILLER, L. K., 1978: Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **27**: 754-767.
- MARTIGNONI, M. E. y IWAI, P. J., 1986: A catalog of viral diseases of Insects, Mites and Ticks, 4th edition, General Technical Report PNW-195, U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station, Portland, USA.
- MOSCARDI, F., 1999: Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.*, **44**: 257-289.

- MURPHY, F. A.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; GHABRIAL, S. A.; JARVIS, A. W.; MARTELLI, G. P.; MAYO, M. A. y SUMMERS, M. D., 1995: Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. *Sixth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses*: 104-113. Springer-Verlag, Wien, Austria.
- PORTOUT, S. y BUES, R., 1977: Élevage des chenilles de vingt-huit espèces de Lépidoptères Noctuidae et d'espèces d'Arctiidae sur milieu artificiel simple: Pécularités de l'élevage selon les espèces. *Ann. Zool. Eco. Anim.*, **6**: 431-441.
- ROBERTS, D. W.; FUXA, J. R.; GAUGLER, R.; GOETTEL, M.; JACQUES, R. y MADDO, J. 1991: Use of pathogens in insect control, pp.243-271. En: D. Pimmentel (ed.), *CRC Handbook of Pest Management in Agriculture*, Vol 2, 2nd ed., CRC Press, Florida.
- VAN STRIEN, E. A.; ZUIDEMA, D. y VLACK, J. M., 1991: Nucleotide sequence of the polyhedrin gene of *Spodoptera exigua* Nuclear polyhedrosis virus. *OILB/WPRS. Bulletin*, **15**: 180-184.

(Recepción: 20 diciembre 1999)

(Aceptación: 04 agosto 2000)