

Baculoviruses as Biological Insecticides

Zaida Zarely Ojeda P.¹; Pedro J. Rocha S.²; Hugo Calvache G.³

RESUMEN

Los baculovirus son una familia de virus de ADN de doble cadena que infectan específicamente insectos y algunos crustáceos. Dentro de los patógenos utilizados para controlar plagas en los cultivos, los baculovirus han sido usados ampliamente porque tienen la capacidad de controlar la especie plaga sin generar patogenicidad cruzada a otras especies no blanco, las cuales pueden actuar como enemigos naturales de las mismas plagas. En esta revisión se presentan las características generales de los baculovirus y su uso como bioinsecticidas. Así mismo, algunos de los resultados obtenidos en investigaciones realizadas por Cenipalma relacionadas con la multiplicación *in vitro* de baculovirus. Finalmente, se mencionan algunas consideraciones generales que se pueden tener en cuenta para continuar utilizándolos como bioplaguicidas potenciales para el control de plagas en los cultivos, especialmente en el de la palma de aceite.

SUMMARY

Baculoviruses are a family of double – stranded DNA viruses that infect insects and some crustaceans specifically. Among of the pathogens used to control pests in the crops, the baculoviruses have been widely used because of their ability to control insect pests without generating cross pathogenicity to other nontarget species, which work as natural enemies of the same pests. In this review, we show the general features of the baculoviruses and their use as biological insecticides. In addition, some of the results related with the *in vitro* multiplication of baculoviruses, and obtained by Cenipalma, are show here. Finally, general considerations to use baculovirus as potential biological insecticides in the control of insect pests in the oil palm crop are presented.

Palabras claves: Baculovirus, Bioplaguicidas, Control biológico, Virus de la poliedrosis nuclear, Cultivos de tejidos, Cultivos de células.

- 1 Lic. en Biología y Química. Candidata a M.Sc. Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia,
- 2 Biólogo, Ph.D. Investigador Titular. Jefe de laboratorio de Marcadores Moleculares, Área de Fisiología y Mejoramiento. (empalma. F-mail: pedro.rocha@cenipalma.org
- 3 Ingeniero Agrónomo. M.Sc. Investigador Titular. Área de Sanidad Vegetal. Cenipalma. E-mail: hugo.calvache@cenipalma.org

INTRODUCCIÓN

Durante varios años, los insecticidas químicos fueron los únicos medios de control de insectos plaga en cultivos de todo el mundo (Pest Management Research Centre 2000). Estos insecticidas químicos generaron problemas de contaminación ambiental y de alimentos, de intoxicaciones humanas por manipulación de los insecticidas para su aplicación, de desarrollo de resistencia a los insecticidas y de eliminación de insectos benéficos dentro del ecosistema (Pest Management Research Centre 2000).

Estos inconvenientes han originado la restricción en el uso de algunos insecticidas químicos y han incrementado notablemente el uso de insecticidas microbiológicos (Richards et al. 1998). Dentro del grupo de los patógenos controladores de plagas como bacterias, hongos y virus, quizás los que más interés han generado son los baculovirus, debido a que poseen la capacidad de controlar varias especies de insectos plaga sin ocasionar daños a otras especies que no son el blanco, ya que tienen un estrecho rango de huéspedes. Además el daño ambiental que generan es mínimo y hasta el momento no existe ningún reporte de resistencia (Pest Management Research Centre 2000).

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BACULOVIRUS

Los baculovirus constituyen un grupo diverso de virus específicos que infecta sólo invertebrados, particularmente insectos. También se propaga en crustáceos como camarones (Levy et al. 1994; O'Reilly et al. 1994; Pest Management Research Centre 2000). Al igual que los demás virus, los baculovirus necesitan obligatoriamente de un huésped para multiplicarse, no pueden replicarse en medios sintéticos y requieren células vivas como hospederos (Burlison et al. 1992; Levy et al. 1994).

Los baculovirus poseen genomas circulares de ADN de doble cadena superenrollado que varía en tamaño de 88 a 200 Kpb (kilo pares de bases). Estos van encerrados en una cubierta protectora de proteína, denominada cápside protéica que tiene la forma de un bastón. La cápside a su vez está cubierta por una unidad de membrana denominada

envoltura. La cápside más el ADN se denomina nucleocápside o virión. Los viriones pueden estar a su vez embebidos en una matriz proteica protectora llamada cuerpo de oclusión (Levy et al. 1994; Blissard y Rohrmann 1990; O'Reilly et al. 1994).

La replicación del virus toma lugar en el núcleo (Fig. 1) y la lleva a cabo usando la maquinaria de síntesis de proteínas y demás materiales (aminoácidos, lípidos, etc.) de las células del huésped (Levy et al., 1994; Blissard y Rohrmann, 1990; O'Reilly et al. 1994).

RESEÑA HISTÓRICA

El potencial de los baculovirus para el control de plagas de insectos fue inicialmente reconocido a comienzos de 1900. Desde entonces, numerosos baculovirus se han usado para control (Bonning y Hammock 1996), especialmente los aislados de insectos pertenecientes a los órdenes Lepidoptera (a partir del cual se han aislado la mayoría de baculovirus), Hymenoptera y Coleoptera (Bonning y Hammock 1996; Cory y Bishop 1995).

En 1949 se empezaron a utilizar patógenos como plaguicidas biológicos. Desde entonces, los baculovirus se han considerado candidatos importantes para el control, ya que en 1930 fueron observados regulando poblaciones de insectos en Europa y Norte América (Miller y Friesen 1996).

El baculovirus más estudiado ha sido el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica*¹ (Speyer) (Lepidoptera: Noctuidae) (AcVPN). Este fue uno de los primeros virus descritos y el interés en su estudio empezó cuando se observó que controlaba poblaciones de *A. californica*, las cuales destruían masivamente cultivos de alfalfa (Cory y Bishop 1995). En 1970, se aplicó extensivamente en campos del suroeste de Ontario con el fin de estudiar la efectividad contra el gusano de la col, *Trichoplusia ni*. (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Richards et al. 1998, Pest Management Research Centre 2000).

Desde 1970 y con el desarrollo de la biología molecular, la investigación de virus de insectos, especialmente baculovirus, se ha incrementado

(Miller y Friesen, 1996). A partir de 1986 se inició la liberación de baculovirus AcVPN genéticamente modificados en Estados Unidos e Inglaterra con el fin de observar la persistencia del virus en campo (Pest Management Research Centre 2000). Actualmente, las investigaciones en baculovirus

continúan, especialmente en la obtención de baculovirus recombinantes, los cuales se han modificado para aumentar el rango de huéspedes y disminuir el tiempo letal (Cory y Bishop 1995; Miller y Friesen 1996; Pest Management Research Centre 2000).

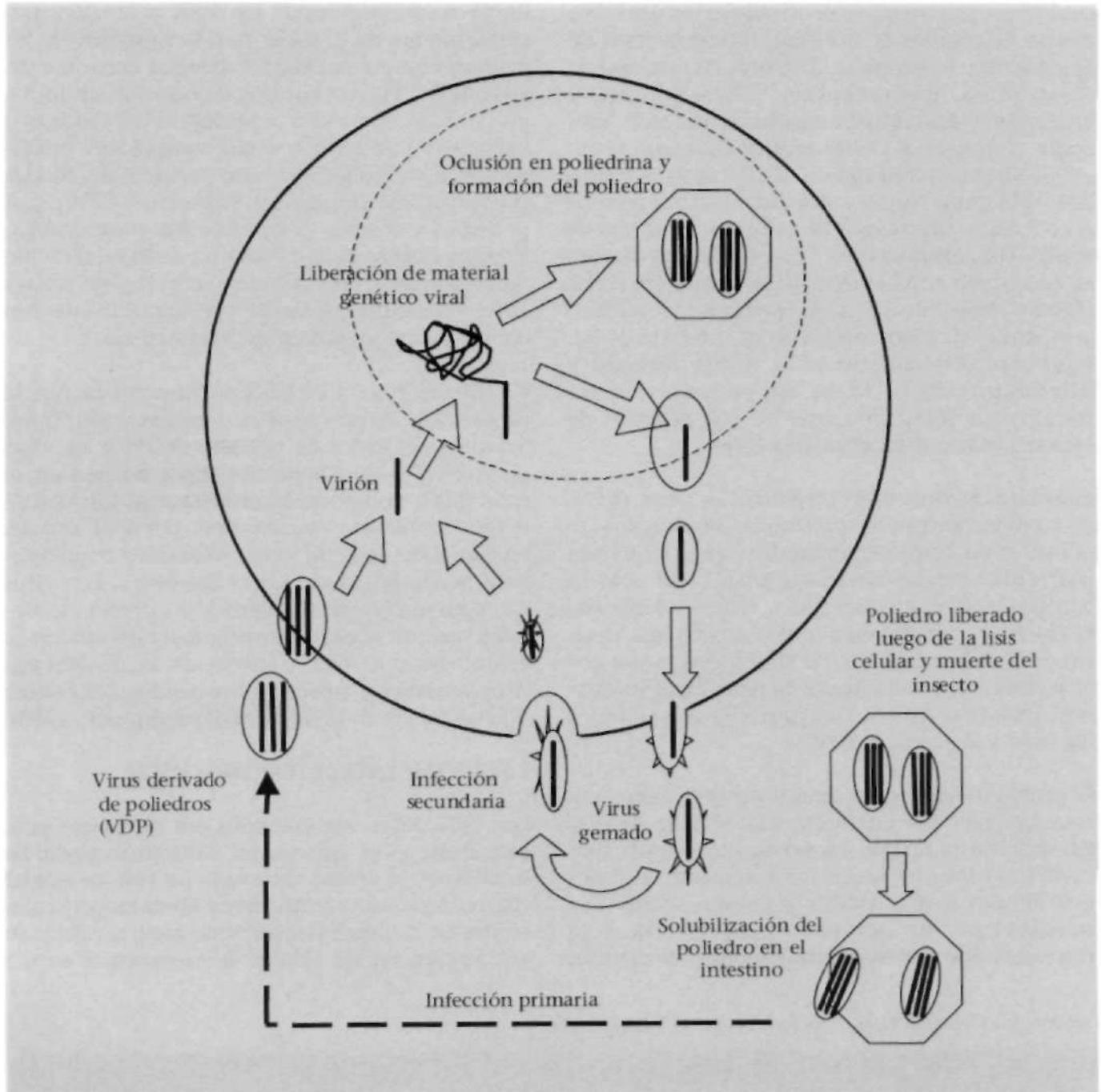


figura 1. Ciclo de Infección del virus de la poliedrosis nuclear (VNP). El poliedro es ingerido y solubilizado en el intestinomedio del insecto. Los VDP son liberados y entran a la célula del huésped. Allí, los viriones al núcleo v se libera el material genético.

FAMILIA BACULOVIRIDAE

La familia baculoviridae se divide en dos subfamilias dependiendo de la formación o no de cuerpos de oclusión (Tabla 1) (Richardson et al. 1995).

Los baculovirus miembros de la subfamilia Eubaculoviridae son baculovirus ocluidos o sea que están dentro de cuerpos de oclusión, infectan larvas de Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Neuroptera, Siphonaptera, Thysanoptera y Trichoptera, así también algunos crustáceos, tales como cangrejos y camarones (Richardson et al. 1995; Blissard y Rohrmann 1990). Los miembros de la subfamilia Nudibaculoviridae son baculovirus no ocluidos (sin cuerpos de oclusión) en forma de varilla o bacilos nucleares. Entre sus huéspedes está el escarabajo rinoceronte de la palma de aceite (*Oryctes rhinoceros* (L.) (Coleoptera: Searabacidae)) y el grillo (*Gryllus campestris* (L.) (Orthoptera: Gryllidae) (Richardson et al. 1995; Blissard y Rohrmann 1990). Se ha encontrado que los baculovirus infectan a más de 600 especies de insectos (Blissard y Rohrmann 1990).

El género de virus de la poliedrosis nuclear (VPN) se caracteriza por la presencia de cuerpos de oclusión en forma de poliedros que contienen partículas virales distribuidas al azar. Por la agregación de nucleocápsides o viriones dentro de la envoltura se subdivide en dos subgéneros, el virus de la poliedrosis nuclear simple (un virión por envoltura viral) y el virus de la poliedrosis nuclear múltiple (varios viriones por envoltura viral) (Blissard y Rohrmann 1990).

El género de virus de la granulosis (VG) tiene una nucleocápside por envoltura viral y tiene además cuerpos de oclusión en forma de granos que contienen uno o raramente dos o más viriones distribuidos al azar (Miller y Friesen, 1996). Los baculovirus no ocluidos poseen una sola nucleocápside por envoltura y carecen de cuerpos

de oclusión (Miller y Friesen 1996; Blissard y Rohrmann, 1990).

VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR (VPN)

En el medio ambiente, los VPN se encuentran comúnmente en el suelo y en la superficie de las plantas, aunque también se pueden encontrar en agua dulce. Poseen cuerpos de oclusión en forma de poliedro que rodea y protege a los viriones o partículas infectivas y están compuestos principalmente de poliedrina, una proteína de 29 kDa (kilo Daltons) (Blissard y Rohrmann 1990). Los poliedros o cuerpos de oclusión son muy estables, excepto a pH básicos, y pueden resistir en el medio ambiente por término indefinido (Tanada y Kaya 1993; Blissard y Rohrmann, 1990) por lo cual son comúnmente usados como bioplaguicidas.

La infección con el VPN se caracteriza por la producción de dos tipos de viriones o fenotipos, los virus derivados de poliedro (VDP) y los virus gemados (Fig. 1). Dichos fenotipos difieren en su morfología, composición protéica, especificidad de tejido y modo de entrada viral. Los VDP son los responsables de la infección primaria y requeridos para la diseminación en el ambiente. Los virus gemados son los responsables de la infección secundaria, ya que pueden moverse fuera del núcleo al citoplasma, gemar a través de la membrana citoplasmática e infectar otros tejidos del insecto (Richardson et al. 1995; Blissard y Rohrmann 1990).

Ciclo de infección del VPN

Los VPN deben ser ingeridos por el insecto para causar infección. Una vez en el intestino medio de su huésped, y debido al elevado pH (10) en éste, el cuerpo de oclusión se disuelve y libera las partículas virales en el lumen del intestino medio. Éstas a su vez, entran en las células del huésped. Una vez

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Baculoviridae

Familia	Subfamilia	Género
Baculoviridae	Eubaculoviridae	Virus de la poliedrosis nuclear (VPN)
		Virus de la granulosis (VG)
	Nudibaculoviridae	Virus de la densonucleosis

dentro de las células, los viriones son transportados al núcleo, donde el material genético viral es liberado. Así, el virus entra en una primera ronda de replicación, observándose viriones o nucleocápsides nuevas a las ocho horas de infección. A las 12 horas de infección, algunos viriones o nucleocápsides geman a través de la membrana nuclear y citoplasmática. Estos viriones gemados pueden infectar muchos tipos celulares: músculo, epitelios, tráqueas, hemocitos, etc. produciendo un segundo ciclo de replicación. Los virus gemados pueden aparecer tan pronto como a las ocho horas de infección en las células epiteliales intestinales, pero pueden ser producidos durante todo el proceso infeccioso en otros tipos celulares. Los virus derivados de poliedro (Fig. 1) sólo aparecen después de 24 horas de infección (Tanada y Caya 1993; Blissard y Rohrmann 1990).

BACULOVIRUS COMO AGENTES MICROBIOLÓGICOS PARA EL CONTROL DE PLAGAS

El potencial de los baculovirus como agentes para el control biológico de insectos plaga ha sido estudiado por varios años (Cory y Bishop 1995; Pest Management Research Centre 2000). Aunque pocos baculovirus se han registrado como agentes de control biológico en Europa, Canadá y Estados Unidos (Pest Management Research Centre 2000), en la actualidad también se usan en el campo de la investigación médica y biotecnológica como vectores de expresión para la producción de proteínas y se multiplican en diversas líneas celulares de insectos especialmente lepidópteros (Blissard y Rohrmann 1990).

Los baculovirus más utilizados como agentes de control son los pertenecientes al género de la

poliedrosis nuclear (VPN), debido a que son más estables que los del género de la granulosis (VG) (Cory y Bishop 1995). Estos virus son excelentes candidatos puesto que generalmente infectan insectos en un limitado rango de huéspedes. Su replicación es limitada a invertebrados y no hay evidencia de resistencia. Además, no presentan patogenicidad cruzada sobre plantas, mamíferos, aves, peces o insectos no blanco (Richards et al. 1998; Pest Management Research Centre 2000).

Los baculovirus se caracterizan por ser altamente seguros y potencialmente efectivos. Pero un gran inconveniente es que algunos son relativamente lentos en matar a su insecto hospedante. Dependiendo de la edad del insecto, las condiciones ambientales, la dosis viral, la especie de virus y la susceptibilidad del huésped, entre otros, el virus puede tardar de días a semanas para matar el insecto (Bonning y Hammock 1996; Pest Management Research Centre 2000). Estudios de laboratorio realizados por Cenipalma han mostrado que el virus de la poliedrosis nuclear de *Euprostema elaeasa* Dyar (Lepidoptera:Limacodidae) tarda en matar a su insecto hospedante tres días y ejerce un porcentaje de control de un 82% (Tabla 2) (Ojeda 2002). En pruebas de campo realizadas en plantaciones de palma de aceite en Perú se observó que el virus provoca mortalidades entre el 70% a más del 90% de las larvas de *E. elaeasa* (Zedman y Cruzado, 1997). En Colombia, aplicaciones de este virus obtenido de larvas enfermas colectadas en el campo, generan controles superiores al 90%. Sin embargo, el problema para los palmicultores radica en que muchas veces no se encuentra material disponible (larvas infectadas) o en cantidad suficiente en el momento que aparece la plaga (Calvache et al. 2000).

En la actualidad se ha implementado el desarrollo de baculovirus recombinantes y su interés como

Tabla 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *E. elaeasa* causado por el virus de la poliedrosis nuclear

Tamaño de la larva (mm)	Número de larvas testigo	Número de larvas infectadas	Número de larvas muertas	% de mortalidad
3 - 5	100	100	87	87
7 - 11	90	90	73	82
7 - 11	168	170	136	80
5 - 10	40	40	31	78
7 - 11	271	280	226	81
Promedio	134	136	111	82

virus para el control de insectos se ha incrementado dramáticamente (Bonning y Hammock 1996). Varios estudios para hacer baculovirus recombinantes proponen la introducción de genes foráneos dentro del genoma de los baculovirus, y como candidatos se incluyen toxinas específicas de insectos como la endotoxina delta del *Bacillus thuringiensis* Berliner (Martens et al. 1995), hormonas de insectos, como la estearasa de la hormona juvenil (JHE) (Bonning et al. 1999) y neurotransmisores o neuropéptidos (Pest Management Research Centre 2000; Levy et al. 1994).

Bonning y Hammock (1996) plantean que gracias al desarrollo de baculovirus recombinantes, la velocidad con que el virus causa muerte a su huésped ha sido marcadamente aumentada y el tiempo de supervivencia del insecto puede reducirse hasta en un 30%. Lo anterior no excluye el uso del baculovirus de tipo silvestre en biocontrol, pero promete producir virus más competitivos que los insecticidas clásicos, incrementando significativamente el potencial del baculovirus para el control de plagas, particularmente en la agricultura de monocultivos. Sin embargo, las modificaciones hechas pueden disminuir el número de polihedros producidos y reducir la persistencia del virus recombinante en el ambiente (Richards et al. 1998, Bonning y Hammock 1996) en comparación con el virus de tipo silvestre. Esto puede hacer que los baculovirus recombinantes sean menos competitivos que los de tipo silvestre (Richards et al., 1998; Bonning y Hammock 1996; Pest Management Research Centre 2000).

En Estados Unidos y Canadá se han registrado varios baculovirus recombinantes para usarlos contra mariposas nocturnas y otros voladores catalogados como plagas de bosques. Sin embargo, el mayor potencial para los baculovirus está en el sector agrícola (Cory y Bishop, 1995). Por ejemplo, en Brasil se usa para controlar plagas de cultivos de soya, mientras que en el Pacífico Sur se usa para controlar las de cultivos de palma de aceite y coco (Richards et al. 1998). En Colombia, los baculovirus se usan para controlar plagas de la papa, el algodón y la palma de aceite (Calvache et al. 2000; Acosta y Baquero 1984). Por ejemplo, en la palma de aceite se utiliza el virus de la poliedrosis nuclear para controlar poblaciones de *E. elaeasa*, *Stenoma cecropia* Meyrick (Lepidoptera:Stenomidae), *Opsiophanes*

cassina Felder (Lepidoptera:Brassolidae) obteniendo porcentajes de control superiores al 90%. En cultivos de algodón el virus ha sido utilizado desde 1970 para el control de *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera:Nuctoidae) (Acosta y Baquero 1984). Una metodología complementaria que acompaña al manejo con baculovirus es la vigilancia intensiva de las larvas para optimizar el tiempo de aplicación del virus antes de que ocurra algún daño (Cory y Bishop 1995).

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS BACULOVIRUS EN EL CONTROL DE PLAGAS

Los baculovirus tienen varias ventajas sobre los insecticidas convencionales (Bonning y Hammock 1996; Cory y Bishop 1995; Pest Management Research Centre 2000; Richards et al. 1998):

- Tienen un estrecho rango de huéspedes.
- No presentan patogenicidad cruzada con insectos no blanco.
- Algunos tienen la capacidad de persistir en el ambiente.
- Se pueden modificar genéticamente, especialmente para incrementar su eficiencia.
- Se pueden producir localmente y su producción *in vivo* requiere de baja inversión económica.
- Se pueden multiplicar *in vitro*.
- No generan respuesta inmunogénica (alergias) a las personas que los manipulan para su aplicación.
- Se requieren dosis bajas de aplicación.
- Pueden ser aplicados usando técnicas convencionales y no crean problemas asociados con residuos.
- Se pueden usar como vectores de expresión de proteínas.

Las desventajas que presentan los baculovirus son:

- El aumento de la velocidad de muerte establecida en los baculovirus recombinantes limita su estabilidad para reciclarse en el ambiente. En este aspecto son mejores los baculovirus de tipo silvestre.
- Existen limitaciones asociadas con la correcta utilización del producto como la aplicación del virus cuando las condiciones ambientales son

inadecuadas (días muy soleados, lluvia, etc) o la dispersión del producto sobre los folíolos es dispereja.

MULTIPLICACIÓN DE BACULOVIRUS

Los baculovirus usados como controladores de plagas generalmente se multiplican *in vivo*, es decir en el organismo huésped, pero también se pueden multiplicar *in vitro*, es decir en células del huésped original o de diferentes huéspedes, utilizando líneas celulares establecidas o desarrollando cultivos primarios de células (Bonning y Hammock 1996; Cory y Bishop 1995; Granados et al. 1986; Lenz et al. 1991; Lynn y Shapiro, 1998; Lynn et al. 1989; Kondo et al. 1995).

El cultivo de células o de tejidos tiene su origen en el siglo XIX cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio (Morgan y Darlins 1993). El término *in vitro* significa literalmente "en vidrio", aunque en la actualidad la mayor parte de los cultivos de células se realizan en o sobre plástico. En términos generales, el cultivo celular tiene como objetivo reproducir las condiciones existentes *in vivo* que permitan el crecimiento de células *in vitro*. En la actualidad pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes (Morgan y Darlins 1993).

Los cultivos de células primarios son cultivos que se pueden obtener de cualquier tejido u órgano, como embriones o animales adultos. Las células obtenidas a partir de embriones son células que se dividen muy rápido, crecen fácilmente *in vitro* y se disgregan sin dificultad. Las células obtenidas a partir de animales adultos se disgregan con más dificultad y crecen de forma lenta en cultivo (Burleson et al. 1992; MacDonald 1996). En invertebrados, como los insectos, los cultivos de células primarios se obtienen a partir de embriones, hemocitos, ovarios, tejido graso y macerados de larvas, pupas o adultos (Hink 1979).

Recientemente se ha incrementado el establecimiento de líneas celulares de insectos, ya que existe un amplio interés en los sistemas de crecimiento, multiplicación y expresión del baculovirus (Mac-

Donald 1996). La principal razón para utilizar líneas celulares es que suelen ser más sencillas de manejar que las células primarias, crecen continuamente y puede obtenerse un mayor número de células. También, son más fáciles de obtener y existe una información relativamente abundante sobre ellas. Los cultivos de células primarios son generalmente más complejos que las líneas celulares establecidas en relación con sus requisitos de crecimiento (Morgan y Darlins 1993).

Cenipalma, en su programa de Manejo Integrado de Plagas, desarrolló un proyecto en el cual se realizó el primer intento de multiplicación *in vitro* del virus de la poliedrosis nuclear simple de *E. elaeasa*, utilizando una línea celular establecida de *Mamestra brassicae* (L.) (Lepidoptera: Noctuidae) cuya característica principal es la susceptibilidad a baculovirus (Miltenburguer y David 1976).

Los resultados de dicho estudio mostraron que la línea celular de *M. brassicae* utilizada para la multiplicación del virus se propagó adecuadamente con una producción celular que osciló alrededor de los 20 millones de células por frasco de cultivo (Fig. 2, 3 y 4). Además, se determinaron las características morfológicas (Fig. 5) y condiciones de crecimiento óptimos de las células. Finalmente, éstas se sembraron en crioviales de 2 ml a una densidad de 6×10^6 células por mililitro y se almacenaron a una temperatura entre -70°C y -80°C . La evidencia experimental mostró que el virus de la poliedrosis

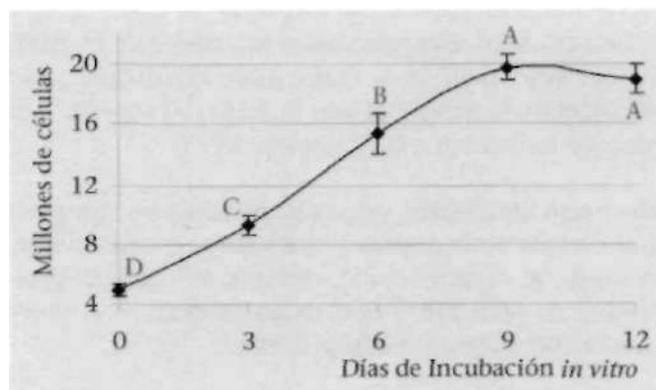


Figura 2. Propagación de las células de *M. brassicae* durante el transcurso del cultivo. Cada punto representa el valor promedio de cinco datos procedentes de cinco replicaciones. También se observan las desviaciones estándar. Valores con diferente letra tienen diferencia significativa ($p < 0,05$).

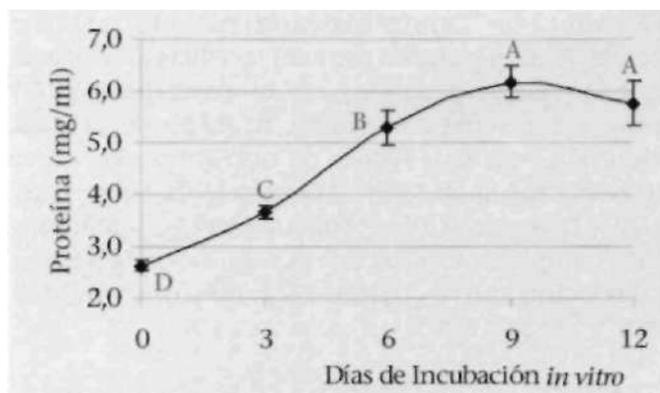


Figura 3. Contenido de proteína durante el transcurso del cultivo. Cada punto representa el valor promedio de cinco datos procedentes de cinco replicaciones. También se observan las desviaciones estándar. Valores con diferente letra tienen diferencia significativa ($p < 0,05$).

nuclear de *E. elaeasa* puede multiplicarse en las células de *M. brassicae*. Sin embargo, su dinámica de infección es baja y lenta comparada con la que se observó en su multiplicación *in vivo* (Ojeda 2002).

DESARROLLO DE BACULOVIRUS COMO AGENTE DE CONTROL

El primer paso para cualquier programa de control de plagas usando baculovirus es la evaluación de los aislamientos. Se hace con el fin de ensayar la eficiencia del virus como agente potencial de control. Este paso se realiza mediante bioensayos. Algunos de los parámetros medidos en un bioensayo son la concentración letal, la dosis letal y el tiempo letal. Existen varios factores que pueden afectar un bioensayo, como son: el instar usado del insecto, la temperatura, la dieta del insecto y el peso de la larva (Cory y Bishop 1995).

Los pasos siguientes incluyen pruebas de campo a gran escala (estrategias y métodos de aplicación, pruebas de formulación), ensayos de campo integrados (interacción con otras plagas) y comercialización (Cory y Bishop 1995).

Formulación

Los baculovirus se pueden formular en líquido o en sólido, aunque las preparaciones sólidas no son muy comunes. Sin embargo, algunos baculovirus se comercializan como polvos mojables concen-

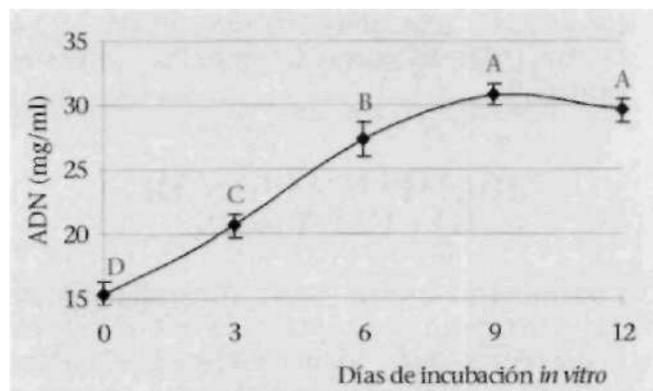


Figura 4. Contenido de DNA durante el transcurso del cultivo. Cada punto representa el valor promedio de cinco datos procedentes de cinco replicaciones. También se observan las desviaciones estándar. Valores con diferente letra tienen diferencia significativa ($p < 0,05$).

trados. Con estas formulaciones se logra mejorar el uso del virus, protegerlo de factores ambientales y proveerlo de protección contra antagonistas (Cory y Bishop 1995).

La formulación de baculovirus como insecticida contempla dos áreas: estabilidad de almacenamiento y factores importantes para la aplicación en el campo. Dependiendo del método de procesamiento del baculovirus para su formulación, éstos se pueden almacenar por largos períodos, mediante liofilización. Se plantea que en términos de estabilidad las formulaciones líquidas son el producto de mejor calidad (Cory y Bishop 1995).

Aplicación

Los baculovirus necesitan ser ingeridos por el insecto para que se produzca infección. Por ello, es importante realizar una aplicación bien distribuida y con buen cubrimiento del producto para que el insecto logre ingerir una dosis letal máxima. La efectividad de los virus aislados en el laboratorio puede fallar en el campo si no se aplica en el lugar y tiempo correctos. También es necesario conocer el comportamiento del insecto, su distribución dentro del cultivo, el estado de desarrollo y el área de follaje ingerida por cada instar, para que el uso de un patógeno viral sea preciso y efectivo (Cory y Bishop 1995).

En bosques, el método normal de aplicación se hace desde el aire usando aeroplanos. Para cultivos

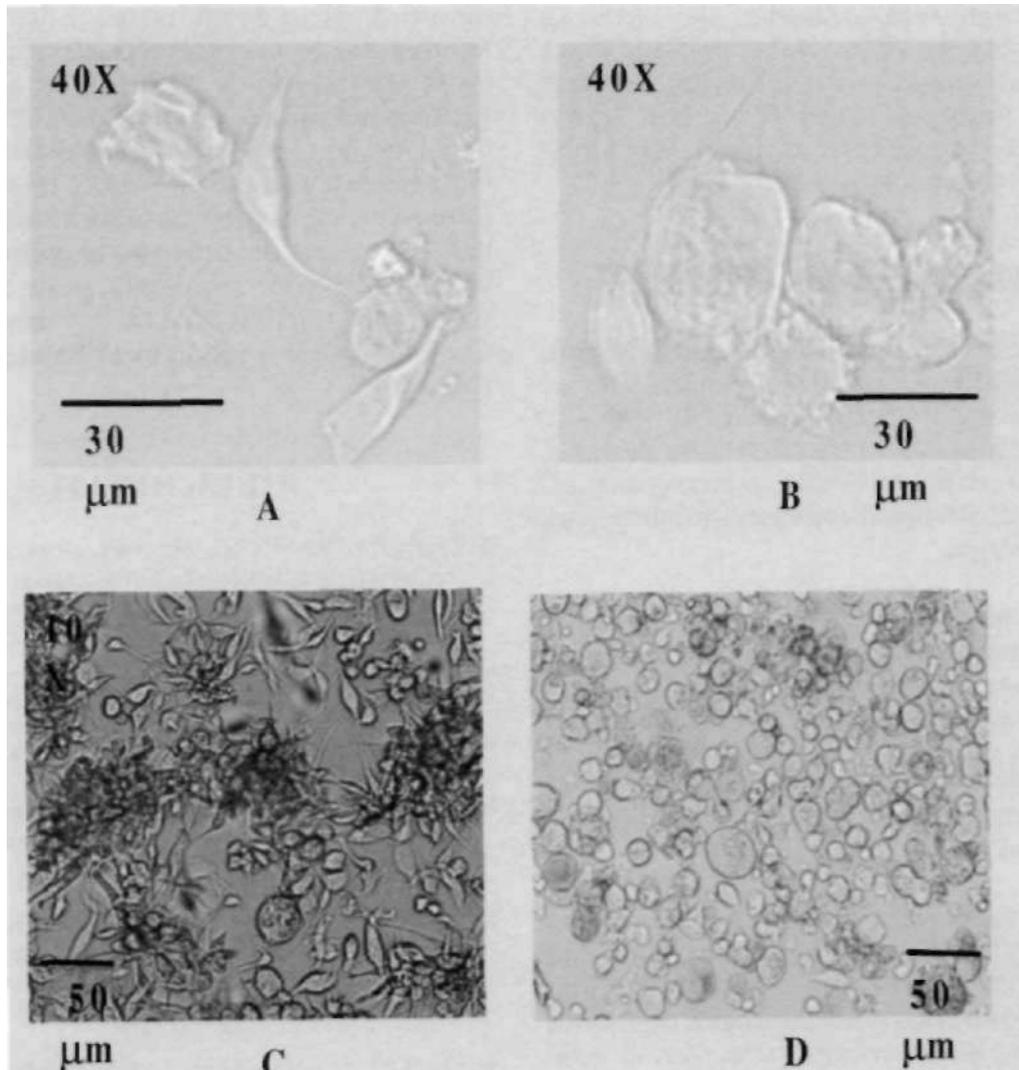


Figura 5. Células de *Mamestra brassicae* observadas con un microscopio OLYMPUS BX40. A. Célula fibroblástica. B. Célula epitelial. C. Agregaciones celulares. D. Células disgregadas. Fotografías: Zaida Ojeda. Banco de imágenes Cenipalma

agrícolas, muchos baculovirus son aplicados por aspersión y su ventaja es que se pueden aplicar con los equipos convencionales. Para algunos tipos de plagas que viven en el suelo, este tipo de aplicación no es efectiva, entonces, se usan cebos usualmente basados en salvado. Otro método de aplicación incluye la liberación de insectos afectados, técnica generalmente usada con baculovirus no persistentes (Cory y Bishop 1995).

Estrategias de aplicación

La mayoría de baculovirus se aplican de forma masiva, aunque hay otras técnicas como la inoculación. La aplicación masiva consiste en adi-

cionar grandes cantidades del virus en donde la población de insectos plaga puede causar daño económico. Este método, generalmente, se usa cuando se sabe que el virus es incapaz de establecerse en el cultivo y que con una sola aplicación el control generado es suficiente para disminuir drásticamente la población del organismo plaga. En cultivos donde las plagas presentan varias generaciones al año, hay que realizar aplicaciones más frecuentes (Cory y Bishop 1995).

La inoculación es una estrategia de aplicación utilizada cuando se espera que el control realizado por el virus sea duradero. En esta técnica, el efecto del virus no es permanente, sino que en un tiempo

prudente requiere reintroducción del virus. La introducción del virus dentro de la población plaga debe hacerse por etapas, con la intención de que el virus se vaya multiplicando y finalmente pueda superar la población de insectos plaga, ejerciendo un control efectivo (Cory y Bishop 1995).

CONSIDERACIONES FINALES

Se ha visto que los baculovirus son agentes de control muy utilizados para manejar poblaciones de insectos plaga en diversos cultivos. El impacto ambiental que generan los baculovirus es mínimo, comparado con el de los demás microorganismos patógenos, como bacterias y hongos utilizados para el control de plagas.

Teniendo en cuenta que los baculovirus son una excelente alternativa para el control, ya que además de sus ventajas mencionadas pueden llegar a establecerse en el cultivo, es necesario implementar estrategias de multiplicación diferentes a la multiplicación *in vivo* que permitan mantener cantidades suficientes de virus para el momento en que llegue la plaga.

Por lo mencionado en la revisión, se sabe que es posible multiplicar baculovirus utilizando como huéspedes células cultivadas de insectos. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos por Cenipalma, es importante pensar en el establecimiento de nuevas líneas celulares a partir de los huéspedes originales del virus, las cuales pueden asegurar porcentajes de infección más altos. Así, se podría llegar a pensar en una producción *In vitro* masiva del virus que sería utilizada como bioplaguicida para ejercer un mejor control de las plagas en el cultivo de la palma de aceite, especialmente plagas defoliadoras como *E. elaeasa*, *S. cecropia*, *O. cassina*, entre otras.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, especialmente a la profesora Janeth Arias Palacios por su valiosa crítica y aportes a la investigación, al doctor Jairo Tovar por sus acertadas observaciones y el préstamo de equipos del labo-

ratorio de Neurobioquímica, al departamento de Microbiología por el préstamo de equipos y espacio en el laboratorio de Virología, y a los doctores Aristóbulo López (Corpoica), Felio Bello (Facultad de Ciencias, Universidad del Rosario y Pontificia Universidad Javeriana) y Lois Jerabeck por sus importantes comentarios sobre el trabajo. Este trabajo hace parte del proyecto Manejo Integrado de Plagas (MIP) de Cenipalma y fue parcialmente financiado por PRONATTA. La investigación de Cenipalma es apoyada por el Fondo de Fomento Palmero.

BIBLIOGRAFÍA

- ACOSTA, M.; BAQUERO, M. 1984. Desarrollo del control biológico de insectos plagas del algodón en Colombia. *Tesis de Pregrado*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, p. 116 - 117.
- BLISSARD, G.; ROHRMANN, G. 1990. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology* (Estados Unidos) v.35, p.127 - 155.
- BONNING, B.; HAMMOCK, B. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. *Annual Review of Entomology* (Estados Unidos) v.41, p.191 -210.
- BONNING, B.; POSSEE, R.; HAMMOCK, B. 1999. Insecticidal efficacy of a recombinant baculovirus expressing JHE-KK, a modified juvenile hormone esterase. *J. Inver. Pathol.* 73: 234 - 236.
- BURLESON, E; GHAMBERS, E; WIEDBRAUK, D. 1992. *Virology: A laboratory manual*. Academic Press, Inc. California, USA. p. 39-42, 53-54, 100-102.
- CALVACHE, H.; FRANCO, P.; ALDANA, J.; ALDANA, R. 2000. *Plagas de la palma de aceite en Colombia*. 1ª ed. Cenipalma. Bogotá. Colombia, p. 35 - 38.
- CORY, J.; BISHOP, D. 1995. Use of baculoviruses as biological insecticides. In: C. Richardson (Ed.) *Baculovirus expression protocols*. Humana Press. Totowa, USA. p. 277 - 290.
- GRANADOS R.; DERKSEN, A.; DWYER, K. 1986. Replication of the *Trichoplusia in* granulosis and nuclear polyhedrosis virus in cell culture. *Virology* (Estados Unidos) v.152, p.472-476.
- HINK, W. 1979. Cell lines from invertebrates. In: W. Jakobi; I. Pastan (Eds.). *Cell Culture Vol. LVIII*. Academic Press. San Diego, USA. p. 450 - 466.
- KONDO, M.; EUNAKOSHI, K.; HARA, K. KAWARABATA, T. 1995. Replication of a *Mamestra brassicae* nuclear poly-

- hedrosis virus in a newly established *Mamestra brassicae* cell line. *Acta Virologica* (Inglaterra) v.39, p. 136 - 141.
- LENZ, J.; MCINTOSH, H.; MAZZACANO, C; MONDERLOH, U. 1991. Replication of *Heliothis zea* polyhedrosis virus in cloned cell lines. *Journal Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) v.57, p.227 - 233.
- LEVY J.; FRAENKEL, H.; OWENS, R. 1994. *Virology*. Prentice Hall. New York, USA. p. 203, 204, 363 - 365.
- LYNN, D.; SHAPIRO, M. 1998. New cell lines from *Heliothis virescens*: Characterization and susceptibility to baculoviruses. *Journal Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) v.72, p.276 - 280.
- LYNN, D.; DOUGHERTY, E.; MCCLINTOCK, J.; SHAPIRO, M. 1989. Comparative replication of *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus strains in three continuous culture cell lines. *Applied and Environmental Microbiology* (Estados Unidos) v.55, p.1049 - 1051.
- MacDONALD, C. 1996. Primary culture and the establishment of cell lines. *In*: M. Davis, (Ed.). *Basic cell culture*. Oxford University Press. New York, USA. p. 149-179.
- MARTENS, J.; KNOESTER, M.; WEIJTS, R; GROFFEN, S.; HU, Z.; BOSCH, D.; VLAK, J. 1995. Characterization of baculovirus insecticides expressing tailored *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) crystal proteins. *Journal Invertebrate Pathology* (Estados Unidos) v.66, p.249 - 257.
- MIELER, K.; FRIESEN, P. 1996. Insect Viruses. *In*: D. Knipe; P. Howley. (Eds.) *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. p.401-411.
- MILTENBURGUER, H.; DAVID, P. 1976. Nuclear polyhedrosis virus replication in permanent cell lines of the cabbage moth (*Mamestra brassicae*). *Die Naturwissenschaften* (Estados Unidos) v.63, p.197 - 198.
- MORGAN, S.; DARLINS, D. 1993. Cultivo de células animales. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza, España, p. 1-2, 37-46, 51, 60-61, 71-75, 149-150.
- OJEDA, Z. 2002. Multiplicación de baculovirus para el control de *Euprosterina claeasa* en palma de aceite. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 107 p. (Tesis de Maestría).
- O'REILLY, D.; MILLER, L.; LUCKOW, V. 1994. *Baculovirus expresión vector. Laboratory Manual*. Oxford University Press. New York, USA. p. 1-10.
- PEST MANAGEMENT RESEARCH CENTRE. 2000. *Baculoviruses as microbial pest control agents: potential benefits of biotechnology*. Agriculture & Agfi - Food Canada Publication. Ontario, Canada. 10p.
- RICHARDS, A.; MATTHEWS, M.; CHRISTIAN, P. 1998. Ecological considerations for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Animal Review of Entomology* (Estados Unidos) v.43, p.493 -517.
- RICHARDSON, C; VIALARD, J.; ARIF, B. 1995. Introduction to the molecular biology of baculovirus. *In*: D. Richardson (Ed.). *Baculovirus expression & Agfi - Food Humana Press*. Totowa, USA. p. 1-24.
- TANADA, Y.; KAYA, K. 1993. *Insect pathology*. Academic Press. New York, USA. p. 382-403.
- ZEDDMAN, J.; CRUZADO J. 1997. Un nuevo virus de poliedrosis nuclear aislado del defoliador *Euprosterina claeasa* Dyar (Lepidoptero: Limacodidae) en el cultivo de palmera aceitera (*Elaeis guinensis*). Primera caracterización del virus y ensayos de campo para controlar la plaga en Palmas del Espino S.A. Documento interno de trabajo. Area de Sanidad Vegetal Palmas del Espino. Lima, Perú. 35p.