



Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN
AGROPECUARIA

PROYECTO DE TESIS

Producción *in vivo* del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda*
con un enfoque en el tipo de dieta, tiempo de cosecha y almacenaje del
patógeno

QUE PRESENTA:

IBT. CRISTIAN ANGEL GARCÍA

Para Obtener el grado de:

Maestro en Producción Agropecuaria en el área Agrícola

DIRECTORA:

DRA. ANA MABEL MARTÍNEZ CASTILLO

CO-DIRECTORA:

DRA. SELENE RAMOS ORTIZ

Morelia, Michoacán. Diciembre, 2022

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, y a su programa de Maestría en Producción Agropecuaria por darme la oportunidad de realizar este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado a mi persona.

A la Dra. Ana Mabel Martínez Castillo y a la Dra. Selene Ramos Ortiz por su asesoramiento y compromiso con el proyecto a pesar de las dificultades globales que atravesamos durante la realización de este trabajo.

A mis sinodales la Dra. Norma Zamora Avilés, el Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa y el Dr. Samuel Pineda Guillermo, por apoyar con sus observaciones, comentarios y puntos de vista, los cuales enriquecieron no solamente este trabajo; también pude enriquecerme de su conocimiento siendo su alumno.

Al Dr. Jorge Fonseca Madrigal y a la M.C. Sibila Concha Santos del Laboratorio de Biotecnología Acuícola y Acuicultura; Laboratorio Nacional de Nutrigenómica y Microbiómica Digestiva Animal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por su colaboración en la caracterización y cuantificación de los ácidos grasos presentes en las larvas de *S. frugiperda* realizada en este proyecto.

A mis compañeros Jesús Palma Castillo, Xcaret Contreras Figueroa, Roberto Andres Carachure, Andrea Zermeño Bucio, Omar, Ignacio, Itzel, Yuritzi y a todas las personas en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, que se involucraron en este proyecto de manera directa e indirecta.

CONTENIDO	Página
RESUMEN	1
ABSCTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Características generales e importancia del maíz	5
2.2. Distribución de <i>S. frugiperda</i>	6
2.3. Plantas hospederas de <i>S. frugiperda</i>	7
2.4. Daños y control del gusano cogollero en maíz	7
2.5. El SfMNPV	8
2.6. Producción de los baculovirus	9
2.6.1. Producción <i>in vivo</i>	10
2.6.2. Producción <i>in vitro</i>	10
2.7 Formulaciones de bioinsecticidas virales y su futuro	11
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
IV. OBJETIVOS	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Cría del insecto y preparación de las dietas	15
5.2. Replicación del SfMNPV.	16
5.3. Condiciones de producción masiva del aislamiento YUC-SfMNPV mediante el uso de una dieta estándar y una fría	16
5.4. Tiempo óptimo de cosecha de las larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV	17
5.4.1 Ácidos grasos totales (AGs) en larvas de <i>S. frugiperda</i> sanas e inoculadas con el aislamiento YUC-SfMNPV	18
5.5 Influencia del EDTA sobre la actividad de un bioformulado líquido en dos condiciones de temperatura	19
5.6 Extracción de ADN viral	20
5.7 Efecto del EDTA en un formulado del aislamiento YUC-SfMNPV en larvas de <i>S. frugiperda</i> sobre plantas de maíz	21
5.8 Análisis estadísticos	22
VI. RESULTADOS	23
6.1. Evaluación de la producción masiva del aislamiento YUC-SfMNPV mediante el uso de una dieta convencional y una fría	23
6.2. Tiempo óptimo de cosecha de las larvas de <i>S. frugiperda</i> infectadas con el aislado YUC-SfMNPV a una temperatura de incubación estándar	23
6.3. Ácidos grasos totales (AGs) en larvas de <i>S. frugiperda</i> sanas e inoculadas con el aislado YUC-SfMNPV	25
6.4. Influencia del EDTA sobre la actividad de un bioformulado líquido del aislamiento YUC-SfMNPV en dos condiciones de temperatura	28
6.5. Efecto del EDTA en un formulado del aislamiento YUC-SfMNPV en larvas de <i>S. frugiperda</i> sobre plantas de maíz	30
VIII. DISCUSIÓN	31
VII. CONCLUSIONES	37
VIII. LITERATURA CITADA	38

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Ingredientes de dos dietas semi-sintéticas: dieta estandar de referencia (Poitout & Bues 1974) y dieta texturizada fría (Zamora-Avilés et al. 2017b).	15
Cuadro 2. Comparación del peso larval y producción de cuerpos de inclusión (CI) por larva en <i>S. frugiperda</i> inoculadas con el aislamiento YUC-SfMNPV ($\sim 1.5 \times 10^9$ CI/mL) en dos tipos de dieta.	23
Cuadro 3. Peso larval, producción de cuerpos de inclusión (CI) por larva y CI por mg de peso de larvas de <i>S. frugiperda</i> de cuarto instar inoculadas con el aislamiento YUC-SfMNPV a una concentración de 1.5×10^9 CI/mL.	25
Cuadro 4. Correlación entre la ganancia de peso de <i>S. frugiperda</i> y la producción de cuerpos de inclusión (CI) del aislamiento YUC-SfMNPV.	25
Cuadro 5. Perfil de AGs encontrados en larvas del cuarto al sexto instar de <i>S. frugiperda</i> en larvas infectadas y no infectadas con el aislado YUC-SfMNPV.	26
Cuadro 6. Resumen de los modelos ANOVA o GLM Gamma con los factores Tiempo (24 y 48 h post-inoculación de las larvas de <i>S. frugiperda</i> con el aislado YUC-SfMNPV) y Virus (con virus y sin virus) con su interacción.	26
Cuadro 7. Porcentaje de AGs totales (\pm EE) de larvas del cuarto al sexto instar de <i>S. frugiperda</i> infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV y no infectadas trascurridas 24 y 144 h post-inoculación.	28
Cuadro 8. Porcentajes de mortalidad de larvas segundo instar de <i>S. frugiperda</i> (\pm EE) y la concentración de ADN viral (\pm EE) obtenidos en los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA al inicio del experimento, dos tiempos de almacenamiento y dos temperaturas.	29
Cuadro 9. Valores de pH entre los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA al inicio del experimento, dos tiempos de almacenamiento y dos temperaturas.	30
Cuadro 10. Bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales (UFC/ml) determinadas en los formulados del aislamiento YUC-SfMNPV, recientemente preparados (0 meses) y después de 6 meses de almacenamiento en dos temperaturas.	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipo de consumo de maíz en México en el periodo 2014- 2017; (a) maíz blanco, (b) maíz amarillo (tomado de FIRA, 2016).	5
Figura 2. Distribución mundial del gusano cogollero desde el 2016 hasta septiembre de 2022 (FAO, 2022).	6
Figura 3. Proceso de infección de un nucleopoliedrovirus	9
Figura 4. Peso larval (\pm EE) de <i>S. frugiperda</i> después de su inoculación con el aislamiento YUC-SfMNPV a una concentración de 1.26×10^9 CI/mL.	24
Figura 5. Porcentaje total de AGs en larvas de cuarto al sexto instar de <i>S. frugiperda</i> en dos tiempos de post-inoculación con el aislamiento YUC-SfMNPV	27
Figura 6. Tasa de mortalidad entre los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA con sus respectivos testigos.	31

RESUMEN

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los cultivos con mayor importancia cultural y económica en México. Este cultivo se ve principalmente afectado por el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Para su control se requieren alternativas compatibles con el ambiente. El nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) (Baculoviridae) es un virus específico capaz de generar mortalidades elevadas hacia su huésped. El presente estudio evaluó la producción *in vivo* de un aislamiento nativo del SfMNPV (YUC-SfMNPV) sobre larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* alimentadas con dos tipos de dietas: una estándar elaborada con agar (D1) y otra elaborada con fibra de soya (D2) (**Objetivo 1**). Los pesos de las larvas post-mortem (68.5 ± 1.70 y 62.8 ± 1.71 mg) y la producción de partículas infectivas (cuerpos de inclusión, CI) por larva ($4.15 \times 10^7 \pm 1.91 \times 10^6$ y $5.24 \times 10^7 \pm 7.03 \times 10^6$) no fueron significativamente afectados por las D1 y D2, respectivamente. Además, se realizó un experimento para evaluar el tiempo óptimo de cosecha del virus (CI por mg de biomasa) utilizando la D1 (**Objetivo 2**). El número de CI por mg larva fueron estadísticamente iguales entre los días 2 y 3 y entre los días 5 y 6 post-inoculación, siendo estos dos últimos días los de mayor producción (3.80 y 2.78×10^5 CI/mg larva, respectivamente). Por otro lado, se realizaron experimentos para cuantificar e identificar los ácidos grasos (AGs) totales en larvas de *S. frugiperda* sanas e infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV en dos tiempos post-inoculación (24 y 144 h) (**Objetivo 3**). La lectura del cromatógrafo de gases reveló la presencia de 9 tipos de AGs, los cuales coincidieron en las larvas sanas e infectadas, pero en diferente proporción: c14, c16, c18, c20, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6 y 18:3n-3. El AG c20 fue el único ácido graso influenciado por los factores tiempo y virus. Además, se analizó la influencia del EDTA dentro de un bioformulado líquido sobre la bioactividad del aislamiento YUC-SfMNPV en dos condiciones de temperatura (4 y 25°C) (**Objetivo 4**). Se preparó una suspensión del SfMNPV solo (1×10^8 CI/mL) y en combinación con EDTA (5mM). Durante su elaboración, se determinó el pH (7.55 ± 0.15) y estos formulados se almacenaron a 4 and 25°C. Se realizaron bioensayos sobre larvas de segundo estadio de *S. frugiperda* en tres etapas de almacenamiento (0, 3 y 6 meses), se cuantificó el contenido de ADN viral de los formulados en las tres etapas de almacenamiento previamente mencionadas y se cuantificó la carga bacteriana al inicio y final del experimento. Se registró una mortalidad larvaria inicial de ~70% para ambos tratamientos (SfMNPV solo y en combinación con EDTA). Sin embargo, ésta declinó significativamente a los 6 meses de almacenamiento en un rango entre 28.2 y 32.5%. En contraste, la carga bacteriana se incrementó con el tiempo. La misma preparación de los tratamientos (SfMNPV solo y en combinación con EDTA) se realizó en un experimento independiente con el objetivo de evaluar su efecto sobre el control de las larvas *S. frugiperda* cuando se aplicaron sobre plantas de maíz (**Objetivo 5**). No se observaron diferencias significativas en la mortalidad larvaria provocada por ambos tratamientos ($93.75 \pm 3.0\%$ y $99.31 \pm 0.7\%$, respectivamente). Confirmamos que el aislado Sf-YUC podría ser un bioinsecticida prometedor para el control de distintos estadios larvales de *S. frugiperda*; sin embargo, se necesitan más estudios para optimizar los sistemas de producción y lograr una mayor estabilidad de sus formulados en almacenamiento.

Palabras clave: Control biológico, *S. frugiperda*, Producción *in-vivo*, Ácidos grasos, Baculovirus.

ABSTRACT

The maize, *Zea mays* L., is one of the most culturally and economically important crops in Mexico. This crop is mainly affected by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). Environmentally compatible alternatives are required for its control. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) (Baculoviridae) is a specific virus capable of generating high mortality rates towards its host. The present study evaluated the *in vivo* production of a native isolate of SfMNPV (YUC-SfMNPV) on fourth instar *S. frugiperda* fed with two types of diets: a standard agar diet (D1) and another prepared with fiber soybean (D2) (**Objective 1**). The post-mortem larval weights (68.5 ± 1.70 and 62.8 ± 1.71 mg) and the production of the infective particles (occlusion bodies, OBs) per larva ($4.15 \times 10^7 \pm 1.91 \times 10^6$ and $5.24 \times 10^7 \pm 7.03 \times 10^6$) were not significantly affected by the D1 and D2, respectively. In addition, an experiment was performed to evaluate the optimal time of virus harvest (OBs per mg of biomass) using D1 (**Objective 2**). The number of OBs per mg of larvae was statistically equal between the 2 and 3 days and between 5 and 6 days post-inoculation, highest OB production at the last two days was observed (3.80 and 2.78×10^5 OBs/mg larva, respectively). On the other hand, experiments were carried out to quantify and identify total fatty acids (FAs) in healthy and infected *S. frugiperda* larvae with the YUC-SfMNPV isolate at two post-inoculation times (24 and 144 h) (**Objective 3**). The gas chromatograph reading revealed the presence of 9 types of FAs, which coincided in healthy and infected larvae, but in different proportions: c14, c16, c18, c20, 18:1n-9, 18:1n-7, 18:2n-6 and 18:3n-3. FA c20 was the only fatty acid influenced by time and virus factors. In addition, the influence of EDTA within a liquid bioformulate on the bioactivity of the isolated YUC-SfMNPV in two temperature conditions (4 and 25°C) was analyzed (**Objective 4**). A suspension of SfMNPV alone (1×10^8 OBs/mL) and in combination with EDTA (5 mM) was prepared. During their preparation, the pH (7.55 ± 0.15) was determined and these formulations were stored at 4 and 25°C. Bioassays were carried out on second instar *S. frugiperda* in three storage stages (0, 3 and 6 months), the viral DNA content of the formulations was quantified in the three storage stages mentioned above and the bacterial presence was quantified. At the beginning and at the end of the experiment. An initial larval mortality of ~70% was recorded for both treatments (SfMNPV alone and in combination with EDTA). However, it decreased significantly after 6 months of storage in a range between 28.2 and 32.5%. In contrast, the bacterial presence increased over time. The same preparation of the treatments (SfMNPV alone and in combination with EDTA) was carried out in an independent experiment with the objective of evaluating its effect on the control of *S. frugiperda* larvae when applied to maize plants (**Objective 5**). No significant differences were observed in larval mortality caused by both treatments ($93.75 \pm 3.0\%$ and $99.31 \pm 0.7\%$, respectively). We confirm that the isolated Sf-YUC could be a promising bioinsecticide for the control of different larval stages of *S. frugiperda*; however, more studies are needed to optimize production systems and achieve greater storage stability of their formulations.

I. INTRODUCCIÓN

La plaga de mayor importancia del maíz, *Zea mays* L., en México y el mundo es *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) (Murúa, Molina & Coviella, 2006; Blanco *et al.*, 2014). Para el control de este insecto se han implementado varias acciones a fin de controlar los daños provocados sobre este cultivo, entre ellas el control químico. No obstante, su uso excesivo tiene un impacto negativo en las poblaciones de organismos benéficos, al favorecer el desarrollo de resistencia e incrementar el deterioro ambiental (Williams *et al.*, 1999; Blanco *et al.*, 2014). Para el control de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz, se han implementado varias acciones, entre ellas, el control químico. No obstante, su uso excesivo tiene un impacto negativo en las poblaciones de organismos benéficos, favorece el desarrollo de la resistencia y causa contaminación ambiental (Williams *et al.*, Ante este escenario, los insecticidas biológicos son una alternativa para el control de insectos plaga, los cuales se caracterizan por su eficacia, especificidad y compatibilidad con el medio ambiente. Entre estos, los insecticidas biológicos destacan aquellos que contienen virus entomopatógenos pertenecientes a la familia Baculoviridae (Szewczyk *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2018).

La familia Baculoviridae agrupa a virus ocluidos de ADN de doble cadena que infectan a los lepidópteros, himenópteros fitófagos y dípteros. Poseen un gran potencial para regular a las poblaciones de sus huéspedes y se caracterizan por tener una elevada patogenicidad en un rango específico de huéspedes (Szewczyk *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2018). El nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) es un baculovirus que se ha aislado de poblaciones naturales del gusano cogollero en Estados Unidos de América, Nicaragua, Colombia, Argentina (Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2013) y México (Ríos-Velasco *et al.*, 2011). Estudios de campo han demostrado que la aplicación del SfMNPV en etapas tempranas del cultivo del maíz, puede ocasionar niveles significativos de mortalidad en las larvas sin afectar a las poblaciones de los enemigos naturales (Williams *et al.*, 1999; Armenta *et al.*, 2003). Sin embargo, un punto clave para utilizar a los aislamientos del SfMNPV como una alternativa de control de *S. frugiperda*, es la estandarización de sus métodos de producción y bioformulación (Grzywacz *et al.*, 2014; Reid *et al.*, 2014; Zamora-Avilés *et al.*, 2017a).

La producción *in vivo* es el método más utilizado para la producción de los baculovirus (Claus & Sciocco de Cap, 2001; Grzywacz *et al.*, 2014), el cual consiste en el uso de los propios huéspedes para la replicación del patógeno. Una de las ventajas que ofrece

este sistema de producción es que no se requiere de un equipo altamente tecnificado (Ziemnicka, 2007). No obstante, la producción *in vivo* tiene la limitante de ser altamente sensible a la contaminación, especialmente a la presencia de bacterias que se reproducen en el propio huésped durante la replicación. Así mismo, la oxidación de los ácidos grasos (AGs) que se liberan de los tejidos del insecto durante el proceso de purificación pueden generar radicales libres (RL), los cuales así mismo pueden inactivar el ADN viral durante el almacenamiento de los formulados (Grzywacz *et al.*, 2014). Debido a ello, el conocimiento de los AGs del huésped durante un ciclo de infección puede ser un fundamental. Otra limitante de los formulados, especialmente líquidos, es la presencia de enzimas, las cuales contribuyen a la inactivación viral (Jones & Burges 1998; Villamizar *et al.*, 2018).

Una de las alternativas para reducir la contaminación bacteriana es incrementar la calidad del inóculo viral utilizado, la asepsia del sistema de producción y el tiempo exacto de la cosecha del virus (Grzywacz *et al.*, 2004; Lasa *et al.*, 2008). En general, para lograr una formulación efectiva de un bioinsecticida se deben tener en cuenta las propiedades físicas y químicas del formulado final, lo que repercutirá de manera directa su efectividad (Moggia *et al.*, 2001). Para ello, se han reconocido varios compuestos estabilizadores en los formulados de baculovirus, tal es el caso del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el cual podría inhibir las enzimas presentes en el sistema (Williams & Cisneros, 2001).

A pesar de que existen importantes avances en términos de las formulaciones de la producción y formación de los baculovirus (Williams & Cisneros, 2001; Grzywacz *et al.*, 2014), es difícil adaptar protocolos que se han generado para distintos sistemas. Debido a ello, es necesario realizar investigaciones enfocadas a estudiar la relación específica aislamiento-huésped-producción. El presente estudio evaluó un sistema semi-masivo de producción *in vivo* del SfMNPV con un enfoque en el tipo de dieta, tiempo de cosecha y almacenaje del patógeno cuando éste se combinó con EDTA. Así mismo, también se evaluó el efecto del virus en combinación con EDTA sobre plantas de maíz, para el control de *S. frugiperda*. La visión de este estudio se encausa a que el uso de alternativas para el control de plagas es importante, tanto para la productividad del cultivo como para el cuidado del medio ambiente y la salud humana.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Características generales e importancia del maíz

El maíz es una planta monoica con médula esponjosa, que puede alcanzar hasta cuatro metros de altura y su tallo no presenta ramificaciones ni entre nudos (González-Cortés, 2016). En México se producen diversas variedades del maíz, pero destacan el maíz blanco y amarillo (Figura 1), debido a que en éstas se basa una gran cantidad de productos para consumo humano, pecuario e industrial (Aragón *et al.*, 2006). Este cultivo representa el 6% de la superficie cultivable, lo cual indica una ocupación de una tercera parte de su producción agrícola interna. El 54.5% del maíz blanco se produce en cuatro estados: Sinaloa, Jalisco, México y Michoacán (SIAP, 2022). En el caso del maíz amarillo, los principales estados productores son Chihuahua, Jalisco, Tamaulipas y Chiapas, los cuales contribuyen con el 94% de la producción (SAGARPA, 2017).

A nivel internacional, México es el tercer consumidor más grande de maíz, superado por Lesoto y Malawi en el consumo per cápita. Considerándose el alimento más importante del país, consumido principalmente como tortilla (González *et al.*, 2011). El maíz blanco se usa principalmente para el consumo humano, ya que la combinación entre las líneas de autoconsumo y consumo humano representan aproximadamente el 60% del consumo total de maíz blanco (Figura 1a). Por otro lado, más del 50% del consumo de maíz amarillo es utilizado con fines de explotaciones pecuarias y como segunda categoría más importante está el uso de este maíz para la industria almidonera (Figura 1b) (FIRA, 2016).

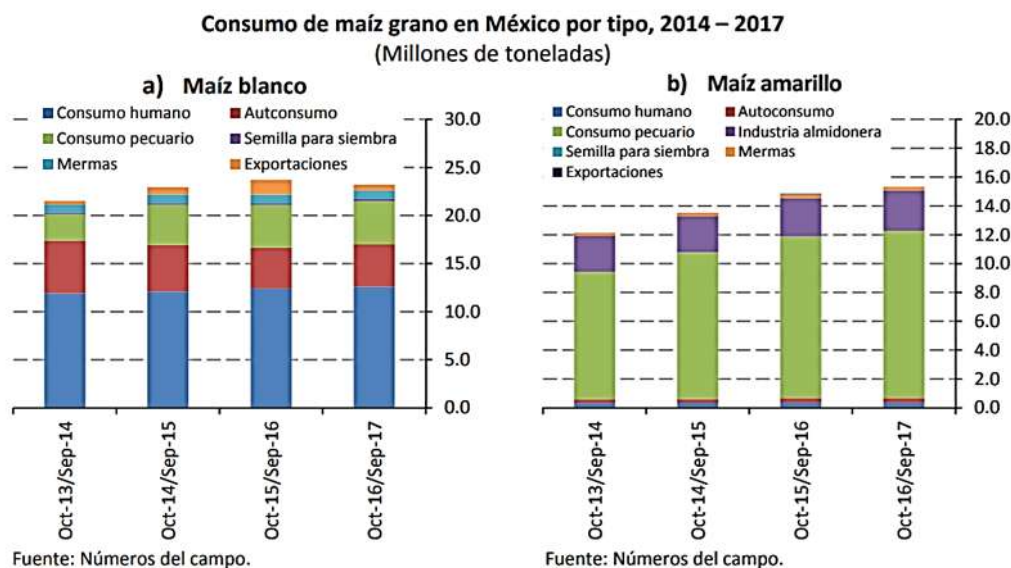


Figura 1. Tipo de consumo de maíz en México en el periodo 2014- 2017; (a) maíz blanco, (b) maíz amarillo (tomado de FIRA, 2016).

2.2. Distribución de *S. frugiperda*

Aunque *S. frugiperda* es originaria del continente americano, este insecto se detectó por primera vez en 2016 en la zona occidental de África (Goergen et al., 2016). Actualmente, se ha confirmado su presencia en más de 40 países de África y continúa expandiéndose rápidamente por el mundo (Kinkar et al., 2020, du Plessis *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020), provocando en este continente pérdidas en cultivos de maíz entre el 20 y 50% (Goergen et al., 2016). En mayo de 2019 se reportó por primera vez en Asia, en la provincia de Yunnan, China (Rice, 2017) (du Plessis et al., 2020). En los últimos años se ha extendido rápidamente en África y Asia. Esto se debe, en gran parte, a la biología del insecto, ya que en etapa adulta es capaz de volar hasta 100 km por noche, aunado a la comercialización entre países que existe actualmente (FAO, 2018). Harrison (2019) señala que, en 2020 el gusano cogollero causó pérdidas de hasta 13 mil millones de dólares sólo en África. Actualmente, *S. frugiperda* representa un grave problema en los cultivos de maíz, con excepción de Europa (FAO, 2020). Para el año 2020, algunos estudios pronosticaron la llegada de este insecto a Australia (Li *et al.*, 2020). (Figura 2).



Figura 2. Distribución mundial del gusano cogollero desde el 2016 hasta septiembre de 2022 (FAO, 2022).

2.3. Plantas hospederas de *S. frugiperda*

Esta especie es comúnmente conocida como gusano cogollero. Es un insecto polífago que presenta un amplio rango de plantas hospederas (~ 80 plantas); entre las que destacan, además del maíz, el sorgo *Sorghum* spp., algodón *Gossypium herbaceum* L., soya *Glycine max* L., papa *Solanum tuberosum* L., tomate *Solanum lycopersicum* L. y varias especies de pastos (Pacheco, 1994; FAO, 2018).

2.4. Daños y control del gusano cogollero en maíz

En general, se han registrado pérdidas de producción del cultivo del maíz causadas por el gusano cogollero que van de 30 al 40% y, para su control, se utilizan anualmente 3,000 ton de insecticidas en solo en México (Rodríguez & de León 2008; Blanco *et al.*, 2014). Entre estos compuestos se incluyen el spinetoram, piretroides, metomilo y clorpirifos. Si bien, algunos de estos compuestos son de tipo biorracional (ejemplo, spinetoram), la mayoría ocasionan daños a la fauna benéfica, además de una serie de consecuencias como el riesgo a la salud del agricultor y favorece la resistencia de la plaga (Walter, 2002; Blanco *et al.*, 2014).

Los agentes de control biológico como los baculovirus pueden ser usados como método alternativo para el control de gusano cogollero, ya que han mostrado causar altos niveles de mortalidad larval (Barrera *et al.*, 2011; García-Banderas *et al.*, 2020).

2.5. El SfMNPV

El interés por desarrollar nuevas alternativas que permitan un mejor desarrollo y sanidad de los productos agrícolas ha crecido a nivel mundial. Asimismo, se ha incrementado la conciencia para adoptar medidas preventivas y hacer uso de un manejo integrado de plagas, que tengan como objetivo mejorar la viabilidad de los cultivos, la calidad de los alimentos y contribuir a minimizar el impacto en el medio ambiente (Moshi & Matoju, 2017). El SfMNPV pertenece al género *Alphabaculovirus* de la familia Baculoviridae. Las poblaciones naturales de *S. frugiperda* son afectadas por el SfMNPV y algunos aislamientos del patógeno han mostrado un claro potencial para el control de esta plaga (Escribano, 1999; Harrison *et al.*, 2008). Debido a ello, diversos trabajos se han realizado para validar el uso del SfMNPV como un agente de control en varios países de América (Barrera *et al.*, 2011; García *et al.*, 2012; Haase *et al.*, 2015), incluyendo México (Méndez *et al.*, 2002; Ríos-Velasco *et al.*, 2011; García-Banderas *et al.*, 2020).

En general, los baculovirus se caracterizan por contener los viriones dentro de una matriz proteica de forma poliédrica denominada cuerpo de inclusión (CI) (Santos *et al.*, 2014) y existen cuatro mecanismos de entrada de los cuerpos de inclusión al insecto: i) por vía oral, a través de alimento contaminado; ii) ruta transovum (contaminación de la superficie de huevo), iii) ruta transovárica (transmisión dentro del huevo) y iv) infección por medio de parasitoides durante la ovoposición (Granados & Williams, 1986). La vía de entrada más común de los baculovirus se da cuando los CI son ingeridos por las larvas al alimentarse, continúa con la dispersión de la enfermedad dentro del insecto y finaliza tras la muerte del mismo, con liberación de nuevos CI que contienen las partículas infectivas.

El ciclo de infección más general de un nucleopoliedrovirus inicia cuando los CI son ingeridos por el insecto (Figura 3A-1), los cuales se disuelven en el intestino medio por el pH alcalino que oscila entre 9-11 (Figura 3A-2) (Caballero *et al.*, 2009). Durante la disolución, los viriones se liberan y atraviesan la membrana peritrófica del intestino (Figura 3A-3) y se unen a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio mediante una fusión (Figura 3A-4). Este proceso es conocido como infección primaria (Figura 3A) (Gómez & Villamizar, 2013). La infección secundaria comienza con la endocitosis de las partículas virales a la célula (Figura 3B-1). El virus viaja por el citoplasma de la célula (Figura 3B-2) e ingresa al núcleo (Figura 3B-3) para liberar su material genético (Figura 3B-4) y utilizar la maquinaria celular (Figura 3B-5). Entonces los primeros genes son

transcritos y traducidos (Figura 3B-6,7). Algunas de las proteínas se trasladan al núcleo (Figura 3B-8). Por otra parte, las proteínas estructurales del virus se sintetizan en el núcleo de la célula para formar nuevas partículas virales (Figura 3B-9). Estas partículas saldrán del núcleo nuevamente al citoplasma de la célula (Figura 3B-10), lo que podrá generar viriones brotados. En etapas tardías de la infección se sintetizan proteínas (granulina o poliedrina) que conforman los cuerpos de inclusión (Figura 3B-14,15), los cuales se dispersan al medio una vez que lisan los tejidos del insecto. En general, todo este proceso de replicación permite que en el núcleo de las células del huésped se lleve a cabo la replicación, transcripción viral y ensamblaje de las nuevas nucleocápsides, que dan origen a una infección a gran escala que lisa las células del huésped provocando su muerte (Figura 3B) (Passarelli, 2001; Haase *et al.*, 2015).

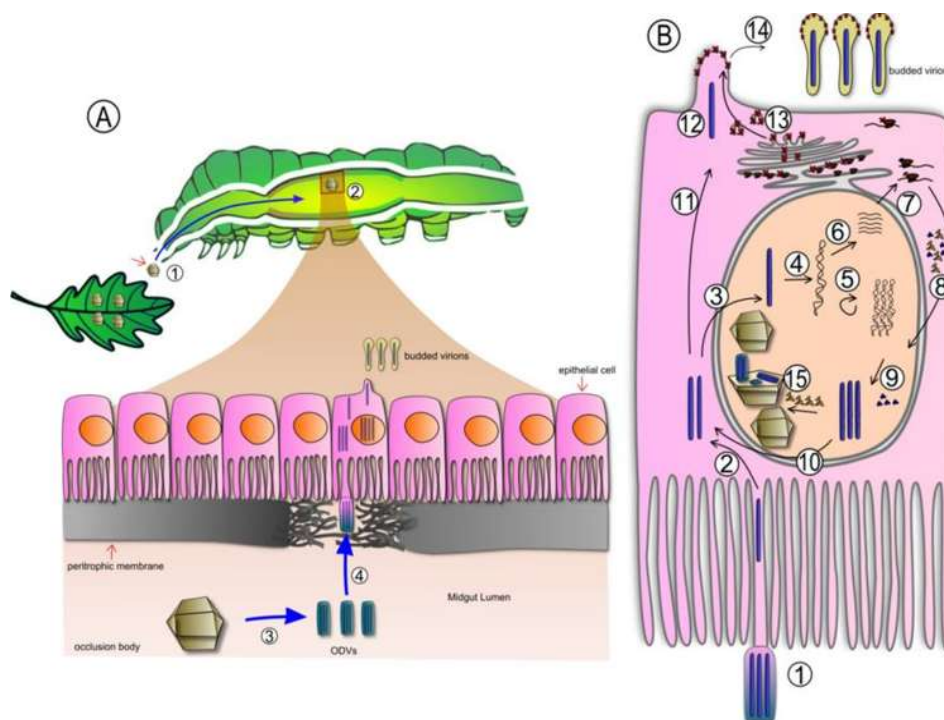


Figura 3. Proceso de infección de un nucleopoliedrovirus (ver explicación en el texto) (Haase *et al.*, 2015).

2.6. Producción de los baculovirus

La explotación comercial de un baculovirus requiere del desarrollo de tecnologías que hagan posible su producción a un costo aceptable (Lasa *et al.*, 2008; Zamora-Avilés *et al.*, 2017a). Por esta razón, la producción de estos patógenos debe ofrecer una alternativa para satisfacer todas las condiciones de control de calidad, garantizar que las características genéticas y físicas del virus no se han afectado durante su producción o almacenamiento y que la actividad insecticida del producto final es la esperada (Walter *et al.*, 2002). Actualmente, el

sistema de producción *in vivo* de los baculovirus es el método que ofrece los mejores resultados. Sin embargo, la producción *in vitro* ofrece grandes beneficios en términos de la investigación y mejoramiento de aislamientos por técnicas moleculares.

2.6.1. Producción *in vivo*

La producción *in vivo* de baculovirus comenzó en la década de los años 70's, al contar con equipamientos y condiciones controladas para mantener poblaciones de insectos bajo laboratorio y con la implementación de las primeras dietas semisintéticas (Claus & Sciocco de Cap, 2001; Zamora-Avilés *et al.*, 2017b). Este método de producción no requiere de maquinaria sofisticada para llevarse a cabo, ya que consiste en utilizar a los individuos huésped del baculovirus para su reproducción, provocando una septicemia y posteriormente recolectar los individuos que presenten síntomas evidentes de una toxemia generalizada y poder extraer de las células del huésped los CI generados tras la toxemia (Burges & Jones, 1998). Dentro de las principales desventajas de este método de producción es la obtención de productos de baculovirus *in vivo* contra plagas de las especies plaga del género *Spodoptera*, debido a la extrema licuefacción de las larvas muertas, lo que dificulta la recolección del producto, además de ser un método altamente sensible a la contaminación.

2.6.2. Producción *in vitro*

Esta producción es el método que tiene el mayor margen de manipulación de las líneas celulares (ejemplo, sf9 y sf21) (Almeida *et al.*, 2010). Este método consiste en multiplicar líneas celulares en un biorreactor mediante un sistema Batch semi continuo, con el objetivo de inocular una concentración viral que pueda utilizar al cultivo celular para reproducirse y así obtener altas concentraciones de CI (Reid *et al.*, 2014). Aunque este método presenta un mayor control sobre las variables del sistema y reduce notablemente la contaminación en la producción, su principal inconveniente es el costo que representa la maquinaria y el mantenimiento constante de las líneas celulares, además ser susceptibles al apareamiento de mutaciones en el genoma de la cepa viral estandarizada tras varias generaciones de producción, provocando cambios negativos en la efectividad (Zhao *et al.*, 2019)) y una nueva estandarización de una cepa viral. Aun bajo estas limitaciones, este método de producción, sigue ofreciendo importantes expectativas en términos de su escalabilidad en proporciones de producción masiva (Reid *et al.*, 2014; Bernal *et al.*, 2018).

La producción *in vivo* de baculovirus comenzó en la década de los años 70's, al contar con equipamientos y condiciones controladas para mantener poblaciones de insectos bajo

laboratorio y con la implementación de las primeras dietas semi-sintéticas (Claus & Sciocco de Cap, 2001; Zamora-Avilés *et al.*, 2017b). Este método de producción no requiere de maquinaria sofisticada para llevarse a cabo, ya que consiste en utilizar a los individuos huésped del baculovirus para su reproducción, provocando una septicemia y posteriormente recolectar los individuos que presenten síntomas evidentes de una toxemia generalizada y poder extraer de las células del huésped los CI generados tras la toxemia (Burges & Jones, 1998). Dentro de las principales desventajas de este método destaca que es particularmente difícil de producir productos de baculovirus *in vivo* contra plagas de *Spodoptera* sp., debido a la extrema licuefacción de las larvas muertas, lo que dificulta la recolección del producto, además de ser un método altamente sensible a la contaminación. También, la biología del insecto hospedero puede generar algunos problemas de costos para la producción *in vivo*, ya que algunas especies, como *S. frugiperda*, presentan canibalismo y, por consiguiente, se requiere el uso de contenedores individuales para evitar pérdidas del material biológico (Claus & Sciocco de Cap, 2001; Zamora-Avilés *et al.*, 2017).

2.7 Formulaciones de bioinsecticidas virales y su futuro

Una formulación es el resultado de la mezcla de componentes logra efectos que no se pueden obtener de sus componentes cuando se utilizan individualmente, logrando así mezclar un ingrediente activo con una o más sustancias para mejorar la eficacia, estabilidad y manejo, aplicación y seguridad. Los bioformulados con capacidad insecticida están basados en agentes de control biológico como virus de un bioinsecticida (Williams y/o microorganismos como bacterias, hongos y nematodos, entre otros además de incluir otros ingredientes. Cisneros 2001). La formulación es sin duda uno de los aspectos más importante para mejorar y extender la actividad de agentes de control biológico, tales como virus, bacterias, hongos y nematodos, entre otros (Kala et al., 2019). Además, en estas formulaciones se incluyen agentes estabilizadores y componentes inertes que permiten que el formulado, sólido o líquido, tenga una mejor persistencia durante su almacenamiento. Aunque esta mezcla de ingredientes contribuye a mejorar su estabilidad y eficacia en campo (Gasic & Tanovic, 2013), algunos de estos compuestos son poco accesibles en el mercado y de alto costo.

Por otro lado, como se señaló anteriormente, la pérdida de la eficacia y estabilidad de los formulados de los baculovirus puede estar relacionada con la presencia de RL, los cuales pueden ser consecuencia de la oxidación de los ácidos grasos provenientes de los tejidos del

huésped (Cherry *et al.*, 1997; Burges & Jones, 1998; Khalil & Khodr, 2001). Al respecto se conoce que muchos insectos tienen la capacidad de sintetizar todos los AGs que requieren; sin embargo, algunas larvas de lepidópteros adquieren de manera exógena ácidos grasos insaturados (ejemplo, ácido linoleico) para lograr su desarrollo (Klowden, 2007). Se ha documentado que los RL pueden degradar el material genético de los baculovirus en las formulaciones líquidas y, por lo tanto, afectan su periodo de almacenamiento y patogenicidad (Williams & Cisneros, 2001; Lasa *et al.*, 2008). Además, Villamizar *et al.* (2018) señalan que la presencia de enzimas como las proteasas y nucleasas puede también contribuir a la inactivación viral. Por consiguiente, se deben identificar compuestos que ayuden a mantener la vida útil de los baculovirus en condiciones de almacén. Tal es el caso del EDTA el cual se ha demostrado ha sido capaz de controlar el obscurecimiento enzimático en frutos, relacionados con la oxidación. Esto debido a que la actividad enzimática se ve sustancialmente afectada por los inhibidores quelantes como el EDTA rompiendo el sistema enzima-sustrato (Cjuno, & Arroyo. 2014).

Los insecticidas biológicos elaborados con baculovirus tienen como inconveniente la pérdida de su actividad biológica en campo por efecto de la luz solar. Además, si las condiciones de su almacenamiento no son óptimas, estos patógenos pueden perder su patogenicidad a través del tiempo (Beas-Catena *et al.*, 2014; Lasa *et al.*, 2018; Zamora-Avilés *et al.*, 2019). Esto ha llevado a desarrollar alternativas que disminuyan a su degradación en campo por efecto de la luz ultravioleta (UV), como es el caso de la formulación descrita por Wilson *et al.* (2020). En esta formulación, las partículas virales del virus de la granulosis de *Cydia pomonella* (CpGV) fueron incluidas en un microencapsulado compuesto por una cera (*EntoStat*®) y un absorbente de ondas UV (dióxido de titanio, TiO₂). Este formulado fue sometido a una exposición de luz solar simulada por más de 90 h, junto a un tratamiento de NPV sin formular y un virus comercial (LITTOVIR®). *El formulado* mantuvo una eficacia superior al 80% mientras que el NPV sin formular y el virus comercial mostraron una disminución de la eficacia de hasta 30%.

Recientemente, se patentó el uso de baculovirus como bioinsecticidas con el uso de mezclas de partículas infectivas que proceden infecciones cruzadas en distintos hospederos (Beperet *et al.*, 2021). A través de esta técnica se demostró que es posible aumentar el rango de hospederos, ya que los genomas de diferentes especies de baculovirus pueden incluirse dentro de viriones individuales y/o ocluirse dentro de un solo CI.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, la producción a gran escala de los baculovirus se basa en por la producción *in vivo*, debido a que este sistema es considerado como el método económicamente más rentable y que además ofrece una mejor calidad insecticida. Sin embargo, existen varios factores que pueden afectar su producción y formulación; entre ellos: la influencia de la dieta sobre el desarrollo del insecto huésped, la pérdida de las partículas virales al momento de la cosecha y la formación de RL, los cuales son consecuencia de la oxidación de los ácidos grasos provenientes de los tejidos del huésped, así como la generación de enzimas. El presente estudio plantea el análisis de puntos clave para la producción semi-masiva de un aislamiento nativo del SfMNPV, el uso de una dieta simplificada fría previamente estudiada (Zamora-Avilés *et al.*, 2017b), el momento óptimo de cosecha del virus, la caracterización y cuantificación de los ácidos grasos del huésped que puedan influir en la degradación del ADN viral. Finalmente, este proyecto plantea analizar el efecto del estabilizante EDTA en un formulado del SfMNPV en términos de su efectividad biológica en el tiempo.

IV. OBJETIVOS

General

Evaluar la producción *in vivo* de un aislamiento mexicano de nucleopoliedrovirus (YUC-SfMNPV) con un enfoque en la reducción de contaminantes durante el periodo de infección del huésped, cosecha y almacenamiento.

Específicos

- Evaluar la producción semi-masiva del aislamiento YUC-SfMNPV mediante el uso de una dieta semisintética estándar y una dieta fría en contenedores con celdas individuales.
- Determinar el tiempo óptimo de cosecha de las larvas de *S. frugiperda* infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV a una temperatura de incubación estándar.
- Cuantificar e identificar los ácidos grasos totales en larvas de *S. frugiperda* sanas e infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV.
- Analizar la influencia del EDTA dentro de un bioformulado líquido sobre la bioactividad del aislamiento YUC-SfMNPV en dos condiciones de temperatura.
- Evaluar el efecto del EDTA en un formulado líquido del aislamiento YUC-SfMNPV sobre la mortalidad larvaria de *S. frugiperda* en plantas de maíz.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cría del insecto y preparación de las dietas. Los individuos de *S. frugiperda* utilizados en la presente investigación procedieron de una colonia del laboratorio de Entomología Agrícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF). Las larvas se alimentaron con una dieta semi-sintética convencional modificada de Poitout & Bues (1974) o con una dieta semi-sintética fría propuesta por Zamora-Avilés *et al.* (2017b) (en el Cuadro 1 se describen los ingredientes de cada una de ellas), y ambas se utilizaron en los bioensayos posteriores. Las condiciones ambientales del mantenimiento de la cría y de los bioensayos fueron de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de HR y 16:8 (L:O). Los ingredientes de la dieta semisintética fría propuesta por Zamora-Avilés *et al.* (2017) también se describen en el cuadro 1. Ambas semi-dietas, convencional y fría, se usaron en pruebas posteriores (puntos 5.4 y 5.5) y la descripción de su preparación general se indica en la siguiente sección.

Cuadro 1. Ingredientes de dos dietas semi-sintéticas: Poitout y Bues (1974), dieta de referencia, y dieta fría desarrollada por **ZAMORA-AVILÉS ET AL. (2017B)**.

Ingredientes	Poitout & Bues (1974) (g/mL)	Zamora-Avilés <i>et al.</i> (2017) (g/mL)
Agua*	1000	1000
Agar	14	-
Germen de trigo	31.7	31.7
Fibra de soya	-	140
Harina de soya	81	81
Levadura	25	25
Azúcar	13	13
Sorbato de potasio	1	1
Nipagin	1.6	1.6
Ácido ascórbico	4.3	4.3
Ácido acético 25%*	12	12

Cloruro de colina 15%*	7.3	-
Vifort® A (vitaminas para ave)	1	1.5

*Compuestos medidos en mL

Para el caso de la dieta estándar, todos los ingredientes se mezclaron en un vaso de precipitado de plástico de 2 L, con excepción del ácido ascórbico, Vifort® A (vitaminas para ave) y cloruro de colina (Cuadro 1). Esta mezcla se esterilizó en una autoclave a 15 libras por 15 min y, cuando alcanzó una temperatura de 40°C o se agregó el resto de los ingredientes. La mezcla se vertió en un contenedor de plástico y se mantuvo a temperatura ambiente durante al menos 2 h. Posteriormente, la dieta se mantuvo a 6°C hasta su uso. Para la elaboración de la dieta fría se llevaron a cabo las siguientes modificaciones en la dieta semisintética fría propuesta por Zamora-Avilés *et al.* (2017b): i) sustitución del sorbato de potasio por ácido benzoico en la misma cantidad, ii) adición de un antibiótico (RuViOtic® de Vedilab®, 3 g/Kg de dieta) y iii) adición de 3 mL de agua por cada 100 mL del volumen de dieta a preparar.

5.2. Replicación del SfMNPV. El aislamiento del SfMNPV bajo estudio se obtuvo del laboratorio de Patología de insectos del IIAF, el cual está denominado como YUC-SfMNPV por ser un nucleopoliedrovirus nativo procedente del estado de Yucatán, México. Las larvas de cuarto instar de *S. frugiperda* infectadas y muertas con evidentes síntomas del virus, se maceraron junto con 200 µl de SDS al 0.01% con ayuda de un micropistilo. Los macerados obtenidos se purificaron mediante un método de filtración con dos tamaños diferentes de filtro (0.3 y 0.5 mM) y en cada filtrado se realizó un lavado de las paredes del microtubo y un lavado para cada filtro. Cada lavado se realizó con una alícuota de 200 µl de SDS al 0.01% hasta obtener una muestra con un volumen aproximado de 1 mL, con el fin de reducir los contaminantes como lo describe Grzywacz *et al.* (2004). Los CI se cuantificaron en una cámara de conteo Neubauer® a 400x con un microscopio con contraste de fases. La suspensión del virus se almacenó a -20°C hasta su uso.

5.3. Condiciones de producción masiva del aislamiento YUC-SfMNPV mediante el uso de una dieta estándar y una fría. Para la realización de este objetivo se realizó una comparativa entre las dietas. Se usó la dieta: semi-sintéticasemisintética convencional

modificada de Poitout & Bues (1974) y la dieta semi-sintética fría texturizada desarrollada por Zamora-Avilés *et al.* (2017). Durante la elaboración de ambas dietas, se incluyó una concentración de $\sim 1.5 \times 10^9$ CI/mL del aislamiento YUC-SfMNPV con el objetivo de provocar $\sim 90\%$ de muerte en larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* (datos no publicados). En la dieta convencional, el virus se incluyó al momento de adicionar el ácido ascórbico, vitaminas para ave y cloruro de colina, mientras que en la dieta fría se incluyó después de mezclar la mayoría de los ingredientes junto con la mitad del agua total a utilizar, antes de agregar la fibra de soya (último ingrediente de esta dieta) y el resto del agua hasta obtener la consistencia deseada.

Para ambas dietas se cortó o formó manualmente un prisma rectangular con medidas aproximadas de 5 x 2 x 12 cm. Esta tira de dieta se colocó en un contenedor plástico de 24.5 x 8 x 24.5 cm donde se liberaron 100 larvas de *S. frugiperda* de cuarto instar con un peso promedio individual de 10 ± 0.3 mg y mantuvieron por un periodo de 24 h. Posteriormente, las larvas se transfirieron a un contenedor de plástico (24.5 x 24.5 cm) que contenía en el fondo del recipiente una capa homogénea de dieta libre de virus de ~ 1 cm de alto. Sobre la dieta se colocó una rejilla de plástico de 100 celdas, cada celda con una medida de 15 x 15 mm. En cada celda se colocó de manera individual por celda una larva de *S. frugiperda* previamente infectada y sobre la rejilla se colocó una mica con poros como sustituto de tapa para que las larvas no escaparan.

Para cada dieta se realizó un total de cuatro repeticiones y un testigo de 100 larvas libres, donde las 100 larvas correspondientes a cada testigo se alimentaron con una dieta libre de virus. Bajo las observaciones preliminares se determinó el día estimado del pico máximo de muerte y la sintomatología característica previa a la muerte según Clem & Passarelli (2013), la cual osciló entre los 6 y 7 días posteriores a la inoculación. Teniendo en cuenta esta información, las larvas se colectaron y pesaron en un estado post-mortem no mayor a 5 h. Por cada repetición se tomó una muestra de 60 larvas por cada tratamiento de dieta (20 por repetición) y se contabilizó la concentración de CI por larva como se describió en el punto 5.2.

5.4. Tiempo óptimo de cosecha de las larvas de *S. frugiperda* infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV. Este experimento está basado en la técnica de inoculación de larvas descrito en el apartado anterior. Para determinar el momento óptimo de cosecha a través del tiempo, se realizó una colecta con el uso de una pinza entomológica cada 24 h de

10 larvas tomadas al azar por cada repetición y testigo. La toma de muestra se inició desde las 24 h posteriores a la exposición con la dieta tratada con el virus. Se tomaron muestras durante seis días, tiempo en el cual se tuvo la muerte de todas las larvas. Una vez colectada la muestra, cada larva se pesó y posteriormente se colocó individualmente en tubos de 1.5 mL. Todas las muestras tomadas, incluyendo el testigo, se conservaron a -20°C hasta su procesamiento y análisis. Se utilizaron un total de cuatro repeticiones con larvas infectadas (n= 100 larvas) con el aislamiento YUC-SfMNPV y un testigo de 100 larvas libre del baculovirus.

Cada muestra de 10 larvas por repetición de cada día se dividió en dos grupos con la finalidad de utilizar un grupo de cuatro larvas destinado para la cuantificación de CI/larva y otro grupo de seis larvas para cuantificar su perfil de producción de ácidos grasos (AGs). Los conteos de CI se realizaron por triplicado por cada larva en una cámara Neubauer y *con esto se generó un promedio diario de producción de CI, tomando como base la metodología utilizada por Zamora-Avilés et al. (2017b)*. La cuantificación de los AGs se describe en el siguiente apartado.

5.4.1 Ácidos grasos totales (AGs) en larvas de *S. frugiperda* sanas e inoculadas con el aislamiento YUC-SfMNPV. Para la cuantificación de los AGs o ésteres metílicos de AGs presentes en las larvas de *S. frugiperda* se utilizaron larvas sanas (testigo) e infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV del experimento anterior. Las larvas se sometieron a un proceso de derivatización (transformar un compuesto químico en un producto que posee una estructura química similar) y, posteriormente, se realizó la cuantificación y caracterización de los AGs por cromatografía de gases. Para esto, se tomaron al azar cuatro larvas de cada repetición a las 24 y 144 h post-inoculación (n = 16 por tratamiento y tiempo). Los grupos de larvas por cada repetición se pesaron y congelaron, después se colocaron en un tubo de ensayo de 15 mL y se maceraron con una espátula metálica hasta formar una mezcla homogénea. Posteriormente, en cada tubo se añadieron 6 mL de cloroformo: metanol 2:1 (FOLCH), además de) + 10 µl de C23:0 (ácido tricosanoico, AG saturado) + 10 µl del antioxidante butilhidroxitolueno (BHT), después la muestra se homogenizó hasta formar una mezcla heterogénea y se incubó a -20°C por 24 h con el fin de disgregar los tejidos de la larva.

Posterior de la incubación, cada muestra fue sonicada (agitada mediante ultrasonidos hasta romper la membrana celular de las células de las larvas de *S. frugiperda* infectadas o

sanas) en un baño con hielo por 15 min. Enseguida, las muestras se homogenizaron nuevamente en un vortex (con el fin de generar una mayor disolución de los ácidos grasos por parte de los solventes). Una vez realizada esta serie de pasos se tomaron 3 mL del extracto y se evaporaron hasta su secado con Nitrógeno molecular (N_2) a una temperatura mayor de $30^\circ C$ para posteriormente derivatizar con 2.5 mL de metanol: HCL 95:5 a $85^\circ C$ por 2 h (este proceso consiste en modificar mediante reacción química la estructura de un compuesto con el fin de aumentar su volatilidad). La muestra se enfrió a temperatura ambiente y se agregó 1 mL de hexano, la mezcla se homogenizó en un vortex y se centrifugó a 2000 rpm a $5^\circ C$ por 5 min. La fase alcohólica (inferior) se descartó y se añadieron 2 mL de agua destilada para homogenizar y centrifugar nuevamente a 2000 rpm a $5^\circ C$ por 5 min. El sobrenadante se congeló durante 24 h a $-20^\circ C$, después se tomó la fase hexano más lípidos y se filtró con membrana de $0.7 \mu m$. El material filtrado se vertió a un vial ámbar hasta su lectura en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6850 Network GC System) usando un inyector de la misma marca modelo 7683.

5.5 Influencia del EDTA sobre la actividad de un bioformulado líquido en dos condiciones de temperatura. La formulación se realizó con la adición del estabilizador EDTA a una concentración de 5 mM, como lo describe Williams & Cisneros (2001). La concentración del formulado fue de 1×10^8 CI/mL y, al momento de su elaboración se registró el pH de cada repetición. La formulación se elaboró con agua destilada estéril y se distribuyó en frascos ámbar estériles de 30 mL. Se realizaron los siguientes tratamientos a dos temperaturas distintas de almacenamiento: i) YUC-SfMNPV sin EDTA almacenado a $25^\circ C$, ii) YUC-SfMNPV sin EDTA almacenado a $4^\circ C$, iii) YUC-SfMNPV + EDTA almacenado a $4^\circ C$ y iv) YUC-SfMNPV + EDTA almacenado a $25^\circ C$. Cada tratamiento se realizó por triplicado con su respectivo testigo sin virus (agua + EDTA). La actividad biológica de los formulados se determinó al momento de ser preparados (tiempo cero de almacenamiento) y se determinó nuevamente a los 3 y 6 meses de almacenamiento, tiempo en el cual se espera que la actividad biológica del baculovirus decline a $25^\circ C$ (Lasa *et al.*, 2008; Zamora-Avilés *et al.*, 2017a). Se midieron los siguientes parámetros según protocolos estándares: ensayos de actividad biológica por la técnica de la gota (Hughes & Wood, 1981) y cuenta bacteriana total, esta se mandó determinar con base a las normas oficiales mexicanas NOM-092-SSA1-194 y NOM-113-SSA1-194 en el Centro de Diagnóstico Microbiológico, S.A. de C.V. Cabe señalar que en el tiempo 0, 3 y 6 meses de almacenamiento, también se

analizó la extracción de ADN con los protocolos descritos por Muñoz *et al.* (1999) y Zamora-Avilés *et al.* (2017a).

5.6 Extracción de ADN viral. Para la extracción de ADN viral, se tomó 1 mL de cada repetición y tratamiento (0, 3 y 6 meses de almacenamiento) de los bioformulados descritos en el apartado anterior. A cada muestra se le realizaron cinco lavados previos a la extracción de ADN: dos lavados con SDS 0.5% y tres lavados con agua destilada estéril. Para precipitar los CI del virus, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm a temperatura ambiente. Para la extracción de ADN se utilizó la metodología de Muñoz *et al.* (1999), con modificaciones. Para esto, se utilizó una alícuota de 300 µl de las muestras previamente lavadas. A cada muestra se le añadieron 33 µl de Na₂CO₃ al 1 M, se mezcló por inversión suave y se dejó reposar durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, y a diferencia de la metodología de Murillo *et al.* (2006), se agregaron 0.6 µl de Tris-HCl (pH 7), 15 µl de SDS 0.5%, 15 µl de EDTA 0.025 M y 200 mg/mL de proteinasa K. Todas las muestras se incubaron a 65°C por 90 min con una agitación suave cada 20 min. Después, las muestras se centrifugaron a 11,000 rpm durante 4 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un microtubo tuvo estéril, al cual se le añadieron 500 µl de fenol. La muestra se centrifugó a 13,000 rpm a 4 °C, posteriormente, se agitó suavemente, recuperándose cuidadosamente la fase acuosa (fase superior). A la fase acuosa se le agregaron 500 µl de cloroformo isoamílico y se mezcló vigorosamente hasta formar una emulsión. Esta mezcla se centrifugó a 13,500 rpm durante 10 min a 4°C. La fase acuosa se recuperó cuidadosamente y se realizó un lavado con 330 µl de isopropanol. La precipitación de ADN se realizó utilizando 18 µl de acetato de potasio 5 M. La muestra se agitó de manera suave por rotación e inversión durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 500 µl de etanol al 70% con agitación ligera para su último lavado.

Una vez realizado el lavado con etanol al 70%, la muestra se centrifugó a 13, 00 rpm durante 10 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla se incubó durante 15 min a temperatura ambiente (libre de etanol). Finalmente, la pastilla se resuspendió en 30 µl de agua estéril mili-Q. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 15 min para su completa dilución en agua. El ADN viral se observó y reviso mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% TAE y se corroboró con los controles positivo y negativo. Para visualizar el ADN, se colocaron 5 µl de la muestra con 3 µl de buffer de carga, se mezcló y se corrió a 90V durante

45 min en un gel de agarosa al 1%, con amortiguador TAE 1x (40 mM Tris-acetatoTris, pH 8,0; 1 mM EDTA). Los geles se tiñeron con 1µl GelRed® Nucleic Acid Stain 10 000X (Biotium, Estados Unidos de América) antes de solidificar. Finalmente, las muestras se documentaron en un transiluminador de UV (BioDoc-It2® Upland, CA, USA) (100-115V~50/60 Hz). Para la cuantificación de ADN se utilizaron 2 µl de muestra los cuales se analizaron en un espectrofotómetro de placas Varioskan® usando el software Thermo Scientific SkanIt®.

5.7 Efecto del EDTA en un formulado del aislamiento YUC-SfMNPV en larvas de *S. frugiperda* sobre plantas de maíz. Para la validación de la actividad del virus sobre plantas de maíz se usaron semillas de la variedad PUMA (Asgrow®), éstas se cultivaron en condiciones de invernadero utilizando plantas de aproximadamente 65 cm de altura con una edad de aproximada de seis semanas. El virus se aplicó y evaluó utilizando la técnica descrita por García-Gómez (2019). Esta técnica se basa en la aplicación de virus por aspersión fuera del invernadero y la revisión de la mortalidad larvaria bajo condiciones controladas $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de HR y 16:8 (L:O). Se evaluaron cuatro tratamientos: YUC-SfMNPV (1×10^8 CI/mL) (I); YUC-SfMNPV (1×10^8 CI/mL) + EDTA 5 mM (II); SDS al 0.01% (III); y EDTA 5 mM (IV). Todos los tratamientos se prepararon con agua destilada + SDS al 0.01%. Se realizaron seis repeticiones, pero en el caso de los tratamientos sin virus se realizaron tres testigos. Cada repetición consistió en una hoja de maíz por planta tratada por aspersión. Para la selección de la hoja se tomó la quinta hoja desarrollada por planta. Después de la aplicación del tratamiento, la hoja de maíz se colocó en un recipiente de 500 mL de capacidad provisto de una tira de papel filtro humedecida con agua destilada estéril (ADE).

En cada recipiente, se liberaron 30 larvas de tercer estadio por repetición. Una vez preparadas todas las repeticiones, éstas se almacenaron en una cámara bioclimática ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de HR y 16:8 (L:O). durante un periodo de 24 h. Una vez transcurrido este periodo, todas las larvas se transfirieron individualmente en celdas de cultivo de tejidos de 24 celdas por repetición. En cada celda se incluyó un trozo de 1 x 3 cm de hoja de maíz libre de virus. Para mantener la turgencia de la hoja, se incluyó una pequeña pieza de papel filtro (0.5 x 0.5 cm) humedecido con ADE. Al cuarto día de la individualización de las larvas, éstas se alimentaron con una dieta semi-sintética modificada de Poitout & Bues (1974). La mortalidad se revisó diariamente hasta el día 12 post-tratamiento.

5.8 Análisis estadísticos. Con el objetivo de observar la distribución de la normalidad en los datos obtenidos, se realizó la prueba de Shapiro Wilk. Los datos que no presentaron una distribución normal, aun con una transformación a base logaritmo, se analizaron con una prueba no paramétrica. A continuación, se mencionan los análisis realizados:

Prueba t-student: i) peso de larvas de *S. frugiperda* previos a la inoculación con el SfMNPV, peso de larvas post-mortem y producción de CI por larva cuando el huésped se alimentó con una dieta fría o dieta convencional, ii) pesos de larvas de *S. frugiperda* previo a la inoculación con el aislamiento YUC-SfMNPV comparados con un testigo y destinadas a alimentarse con dieta fría y iii) peso larval de *S. frugiperda* después de su inoculación con el aislamiento YUC-SfMNPV comparado con su testigo (días 1, 3 y 6).

ANOVA de una sola vía: i) peso larval de *S. frugiperda* y producción de CI por larva del aislamiento YUC-SfMNPV entre 5 días post-inoculación, ii) porcentaje entre distintos AGs de larvas infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV y no infectadas trascurridas 24 y 144 h post-inoculación, iii) porcentaje de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* al ser tratadas con los formulados entre temperaturas (4 y 25 °C) y tiempos de almacenaje (0, 3 y 6 meses) y iv) conteo de bacterias mesófilas (UFC/ml) de los formulados (YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA).

Análisis de dos vías para ácidos grasos (tiempo y virus como factores): GLM Gamma para c14 y ANOVA para el resto de AGs.

Pruebas no paramétricas: Producción de CI por mg larva del aislamiento YUC-SfMNPV entre cinco días post-inoculación, conteo de bacterias coliformes totales (UFC/ml) de los formulados (YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA), tasa de mortalidad entre formulados con sus respectivos testigos cuando se aplicaron sobre plantas de maíz y valores de pH entre los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA) al inicio del experimento, dos tiempos de almacenamiento y dos temperaturas, valores de pH entre los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA al inicio del experimento (Kruskal-Wallis). Peso larval de *S. frugiperda* después de su inoculación con el aislamiento YUC-SfMNPV comparado con su testigo (días 2, 4 y 5) (U Mann-Whitney).

Correlación de Spearman: relación entre ganancia de peso y la producción de CI, los datos fueron transformados a LN.

Todos los datos se analizaron con un nivel de confianza del 95%. Se utilizaron los programas estadísticos IBM SPSS Statistics for Windows, Versión 25.0 (Armonk, NY: IBM Corp) y Paleontological data analysis analysis (PAST (Harper & Whalley, 2020).2001).

VI. RESULTADOS

6.1. Evaluación de la producción masiva del aislamiento YUC-SfMNPV mediante el uso de una dieta convencional y una fría

No se observaron diferencias significativas entre los pesos iniciales de las larvas destinadas al tratamiento con la dieta estándar (9.0 ± 0.03 mg) y la dieta fría (10 ± 0.04 mg) ($t = -1.35$, g.l. = 717, $P = 0.18$), lo cual indica una homogeneidad en el inicio del experimento. Con respecto al peso larvario post-mortem de la dieta estándar no fue significativamente mayor (68.5 ± 1.70 mg) comparado con la dieta fría (62.8 ± 1.71 mg) ($t = 2.18$, g.l. = 717, $P < 0.05$). La tasa de mortalidad entre dietas fue homogénea a través del tiempo, con un porcentaje de muerte de $98.06 \pm 1.38\%$ y $99.42 \pm 1.16\%$ para la dieta estándar y la fría, respectivamente. (Cuadro 2), lo cual sugiere que la ganancia de peso y la producción de CI por mg de biomasa obtenida entre ambas dietas es similar bajo el mismo proceso de producción de CI.

Cuadro 2. Comparación del peso larval y producción de cuerpos de inclusión (CI) por larva en *S. frugiperda* inoculadas con el aislamiento YUC-SfMNPV ($\sim 1.5 \times 10^9$ CI/mL) en dos tipos de dieta

Tipo de dieta	Peso de larva (mg) (\pm EE) ^a	CI/mg larva (\pm EE) ^b
Fría	65.73 ± 3.81 a	$4.15 \times 10^7 \pm 1.91 \times 10^6$ a
Estándar	62.78 ± 6.68 a	$5.24 \times 10^7 \pm 7.03 \times 10^6$ a

Los datos se transformaron a LN previo al análisis. Valores dentro de la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes. ^a t -student = 0.4, g.l. = 112, $P = 0.69$. ^b t -student = -1.21, g.l. = 112, $P = 0.223$.

6.2. Tiempo óptimo de cosecha de las larvas de *S. frugiperda* infectadas con el aislado YUC-SfMNPV a una temperatura de incubación estándar

No se observaron diferencias significativas entre los pesos de las larvas de *S. frugiperda* destinadas para la infección con el aislado YUC-SfMNPV (10.14 mg \pm 0.03) y las larvas testigo (10.07 ± 0.06 mg) ($t = 0.034$; g.l.= 498; $P = 0.35$). Así mismo, los promedios de peso

de las larvas inoculadas (rango de 32.8 ± 1.8 a 84.3 ± 7.5 mg) y las del testigo (rango de 30.76 ± 2.3 a 83 ± 12.1 mg) no fueron significativamente distintos durante los tres días post-inoculación (Figura 4). Sin embargo, entre el cuarto y sexto día post-infección los pesos de las larvas inoculadas con el virus (rango de 84 ± 5.2 a 102 ± 6.5 mg) fueron significativamente menores con respecto a las larvas del testigo (rango de $123 \pm$ a 167 ± 6.5 mg) (Figura 4).

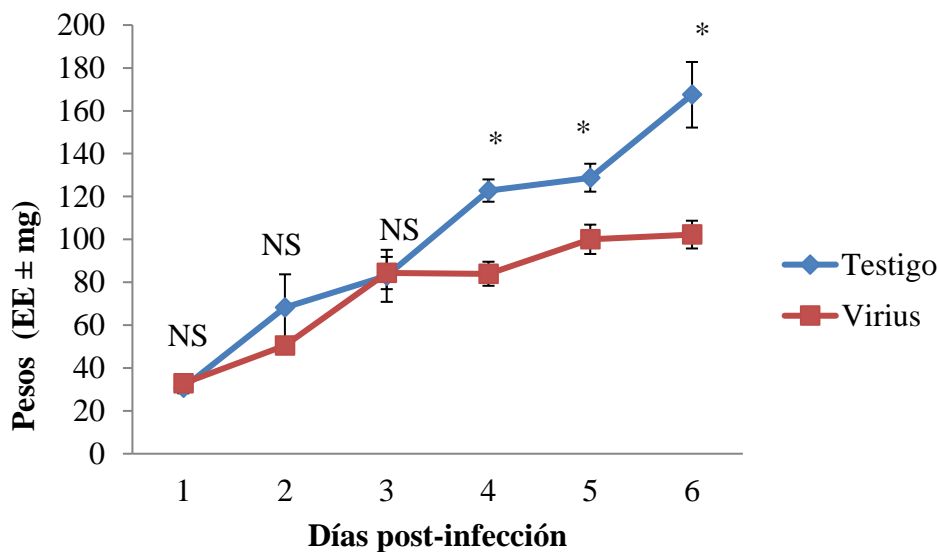


Figura 4. Peso larval (\pm EE) de *S. frugiperda* después de su inoculación con el aislamiento YUC-SfMNPV a una concentración de 1.26×10^9 CI/mL. Días 2,4 y 5: U de Mann-Whitney test; días 1, 3 y 6: *t*-Student test ($P > 0.05$). NS, no significativo, $*P < 0.05$.

Se observó una relación positiva entre la ganancia de peso y el día post-inoculación (Figura 4). Consecuentemente, la producción de CI por larva tuvo una tendencia de incremento conforme al avance de la infección, especialmente entre los últimos tres días (4, 5 y 6) post-inoculación (Cuadro 3). No se observaron diferencias significativas en los CI/larva obtenidos entre los últimos dos días post-inoculación. La producción de CI por mg larval es el resultado del cociente de la producción de CI por larva y la ganancia de peso. Las medias de este índice fueron estadísticamente iguales entre los días 2 y 3 y entre los días 5 y 6 post-inoculación, siendo estos dos últimos días los de mayor producción (Cuadro 3). El análisis de correlación entre peso y producción por larva, mostró una correlación lineal positiva en los días 1, 2 y 6 post-inoculación. Sin embargo, la correlación entre peso y producción por mg de larva fue negativa pero significativa y en los días 3 y 6 post-inoculación (Cuadro 4).

Cuadro 3. Peso larval, producción de cuerpos de inclusión (CI) por larva y CI por mg de peso de larvas de *S. frugiperda* de cuarto instar inoculadas con el aislamiento YUC-SfMNPV a una concentración de 1.5×10^9 CI/mL.

Días post-inoculación	Promedio de peso (mg \pm EE) ^a	Promedio de CI/larva ^b (\pm EE) (1×10^7)	Promedio de CI/mg de peso de larva ^c (\pm EE) (1×10^5)
1	30.4 \pm 2.1 a	0.005 \pm 0.002 a	0.02 \pm 0.01 a
2	43.1 \pm 0.6 ab	0.011 \pm 0.001b	0.03 \pm 0.005 a
3	66.6 \pm 8.2 bc	0.022 \pm 0.002 b	0.04 \pm 0.01 ab
4	74.2 \pm 15.9 bc	0.459 \pm 0.167 c	0.92 \pm 0.56 ab
5	90.9 \pm 17.6 c	2.264 \pm 0.406 d	3.80 \pm 1.2 bc
6	96.7 \pm 13.9 c	2.641 \pm 0.205 d	2.78 \pm 0.35 c

Valores dentro de la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (^{a,b}Tukey-Kramer HSD, ^cKruskal-Wallis $P > 0.05$). ^a $F_{5,65} = 9.541$, $p < 0.0001$, ^b $F_{5,65} = 170.946$, $p < 0.0001$, ^c $\chi^2 = 18.067$, $p < 0.0001$.

Cuadro 4. Correlación entre la ganancia de peso de *S. frugiperda* y la producción de cuerpos de inclusión (CI) del aislamiento YUC-SfMNPV.

Días post-inoculación	Peso/CI por larva		Peso/CI por mg de peso de larva	
	Sperman's	P	Sperman's	P
1	0.58	0.02	0.16	0.55
2	0.55	0.04	-0.29	0.56
3	0.08	0.07	-0.76	0.003
4	0.18	0.53	-0.16	0.59
5	0.51	0.09	-0.75	0.005
6	0.63	0.02	-0.16	0.60

6.3. Ácidos grasos totales (AGs) en larvas de *S. frugiperda* sanas e inoculadas con el aislado YUC-SfMNPV

Dentro del perfil de ácidos grasos (AGs) se lograron cuantificar 4 AG saturados (AGS), 2 monoinsaturados (AGM) y 2 poliinsaturados (AGP), uno de la serie omega 3 y otro de la

serie omega 6 (Cuadro 5). Se observó una respuesta significativa del factor tiempo sobre los ácidos grasos c16, c20, Total AGS, Total AGM, Total n-6 (AGP), Total n-3 (AGP) y Total AGPS ($P < 0.01$) (Cuadro 6). En el caso del factor virus, sólo se observó un efecto significativo en el AG c20. En ningún caso se observó una interacción significativa (Cuadro 6).

Cuadro 5. Perfil de AGs encontrados en larvas del cuarto al sexto instar de *S. frugiperda* en larvas infectadas y no infectadas con el aislado YUC-SfMNPV.

Tipo de ácido graso	Nombre común del ácido graso	Nomenclatura
Saturados	Mirístico	c14
	Palmítico	c16
	Esteárico	c18
	Araquídico	c20
Monoinsaturados	Oléico	18:1n-9
	Palmitoléico	18:1n-7
Poliinsaturados	Linoléico	18:2n-6
	Linolénico	18:3n-3

Cuadro 6. Resumen de los modelos ANOVA o GLM Gamma con los factores Tiempo (24 y 48 h post-inoculación de las larvas de *S. frugiperda* con el aislado YUC-SfMNPV) y Virus (con virus y sin virus) con su interacción.

Variables (ácidos grasos)	Tiempo	Virus	Tiempo x Virus
c14	0.880	0.310	0.336
c16	0.002**	0.995	0.242
c18	0.862	0.291	0.580
c20	0.022*	0.024*	0.732
Total AGS	0.003**	0.485	0.588
18:1n-9	0.066	0.197	0.716
18:1n-7*	0.087	0.208	0.175
Total AGM	0.034*	0.265	0.973
Total n-6	0.002**	0.619	0.557
Total n-3	0.002**	0.549	0.253
Total AGP	<0.001***	0.689	0.980

Dentro de cada variable, el factor fue significativo de acuerdo a la prueba GLM Gamma (c14, $t < 0.001^{***}$, 0.01**, 0.05*) y ANOVA *post hoc* (el resto de los ácido grasos, $P < 0.001^{***}$, 0.01**, 0.05*).

Los porcentajes de los AGs c16 y total AGS fueron significativamente mayores a las 24 h post-inoculación comparado con las 48 h (Figura 6). En contraste, esta relación fue inversa en los AG c20, Total AGM, Total n-6, Total n-3 y Total AGP (Figura 6). En general, los porcentajes de los ácidos grasos oscilaron entre 3.0 ± 0.4 (Total n-3) y 60 ± 5.3 % (total AGS) (Figura 5).

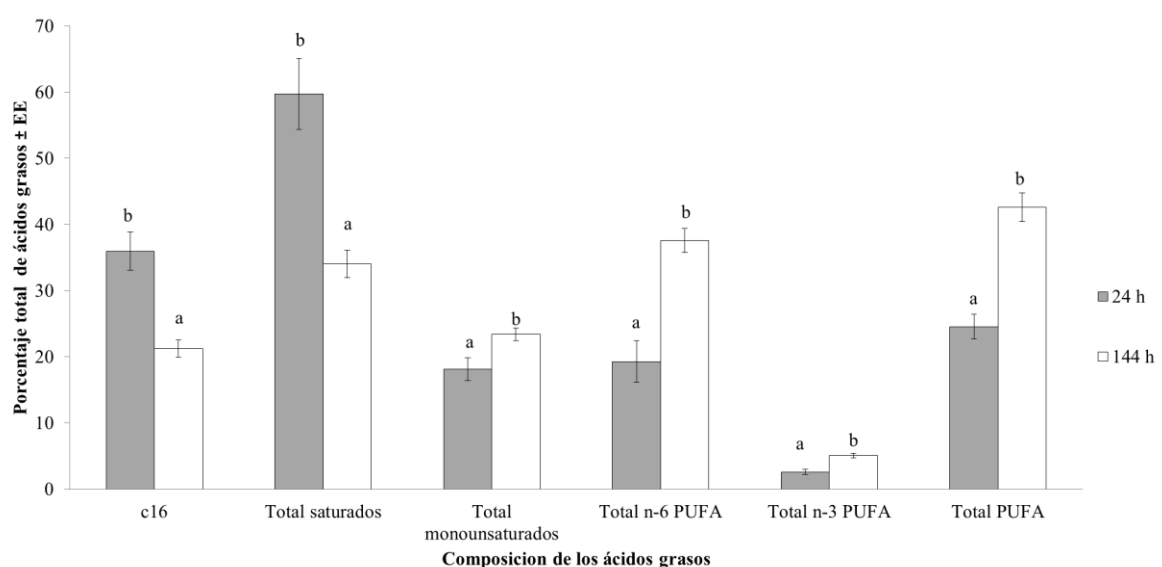


Figura 5. Porcentaje total de AGs en larvas de cuarto al sexto instar de *S. frugiperda* en dos tiempos de post-inoculación con el aislamiento YUC-SfMNPV.

En el testigo-24 h, el Total AGS (56%) y c16 (34%) fueron los que presentaron el porcentaje significativamente mayor (Cuadro 7); sin embargo, el último no tuvo diferencias significativas con respecto a Total AGP (24%). Aquellos AGs con un porcentaje entre 0.6-6.7 (18:1n-7, Total n-3, c18 y c14) y 13-24% (c20, 18:1n-9, Total AGM, Total n-6 y Total AGP) no fueron significativamente distintos entre sí. En el tratamiento virus-24 h, el porcentaje de Total saturados (64%) fue significativamente mayor que el resto de los ácidos grasos determinados (Cuadro 7), los cuales fueron en su mayoría significativamente similares. Los porcentajes del testigo-144 h formaron cuatro grupos de menor a mayor valor: i) rango entre 0.9 y 6.37% (c14, 18:1n-7, c20, Total n-3 y c18); ii) rango entre 23.3 a 24.6% (c16, 18:1n-9 Total AGM), iii) 33.35 y 37% (Total AGS y Total n-6) y iv) 42% (Total AGP).

En el tratamiento virus-144 h, el porcentaje de los ácidos Total n-6 (38%) y Total AGP (43%) fueron significativamente mayores, comparado con el resto de los ácidos grasos determinados (Cuadro 7). Además, se formaron otros 4 grupos de menor a mayor porcentaje,

significativamente diferentes entre sí: 1) 0.66 y 0.83% (c14 y 18:1n-7), 2) 5.7 y 5.6% (c18 y 18:3n-3), 3) 13.2% (c20) y 4) rango de 19, 21 y 22% (c16, 18:1n-9 y Total AGM) (Cuadro 7). De todos los AGs presentes en los cuadros 6 y 7, el 18:2n-6 y 18:3n3 se omitieron debido a que fueron los únicos ácidos encontrados en su categoría de agrupación, Total n-6 y Total n-3, respectivamente.

Cuadro 7. Porcentaje de AGs totales (\pm EE) de larvas del cuarto al sexto instar de *S. frugiperda* infectadas con el aislamiento YUC-SfMNPV y no infectadas trascurridas 24 y 144 h post-inoculación.

Porcentaje de ácidos grasos totales - Tiempo post-inoculación (h)				
Variables (AGs)	Testigo - 24 h ^a	Virus - 24 h ^b	Testigo - 144 h ^c	Virus - 144 h ^d
c14	1.79 \pm 0.32aA	2.45 \pm 1.35abA	0.92 \pm 0.25aA	0.62 \pm 0.02aA
c16	33.92 \pm 2.9cC	38.02 \pm 5.33dBC	23.27 \pm 1.63bAB	19.21 \pm 1.47dA
c18	6.74 \pm 0.73abA	5.15 \pm 1.63abA	6.37 \pm 0.36aA	5.86 \pm 0.45bA
c20	13.32 \pm 1.71bcAB	21.10 \pm 4.40abcB	4.41 \pm 2.54aA	13.22 \pm 0.50cAB
Total AGS	55.78 \pm 4.34eAB	63.66 \pm 10.38eB	33.50 \pm 1.19cA	34.51 \pm 4.44eA
18:1n-9	19.82 \pm 2.09cA	16.08 \pm 3.36abcA	23.51 \pm 1.21bA	21.34 \pm 0.94dA
18:1n-7	0.61 \pm 0.01aA	0.78 \pm 0.16 A	1.07 \pm 0.27aA	0.83 \pm 0.13 aA
Total AGM	19.39 \pm 1.53cA	16.86 \pm 3.39abcA	24.57 \pm 1.48bA	22.17 \pm 0.98dA
Total 18:2n-6	21.49 \pm 2.52cAB	17.07 \pm 6.17abA	37.38 \pm 1.72cdB	37.75 \pm 3.71eB
Total 18:3n-3	2.74 \pm 0.198abA	2.41 \pm 0.82abcA	4.55 \pm 0.30 aAB	5.56 \pm 0.61bB
Total AGP	23.93 \pm 2.88acA	25.15 \pm 2.89cdA	41.93 \pm 2.01dB	43.31 \pm 4.30eB

Medias con las mismas letras minúsculas por columna y mayúsculas por fila no son significativamente diferentes ($p > 0.5$). ANOVA, Tukey test para separar medias: ^aF_{10,22} = 56.3, ^bF_{10,22} = 16.7, ^cF_{10,22} = 121, ^dF_{10,22} = 254 $p < 0.0001$. Los valores de *P* significativos y no significativos por fila o ácido graso oscilaron entre 0.003-0.001 y 0.12-0.66, respectivamente.

6.4. Influencia del EDTA sobre la actividad de un bioformulado líquido del aislamiento YUC-SfMNPV en dos condiciones de temperatura

Al momento de la elaboración de los bioformulados (mes 0), se registró una mortalidad larvaria de ~70% para los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA (Cuadro 8). Después de 3 meses de almacenamiento, la mortalidad se incrementó en un rango entre 78.9 a 92.1% considerando ambas condiciones de temperatura y tratamientos. En contraste, el promedio de muerte declinó significativamente a los 6 meses de almacenamiento en un rango entre 28.2 a 32.5% (Cuadro 8). La presencia de CI activos se confirmó por la concentración de ADN viral, la cual estuvo en un rango entre 23.4 \pm 13.4 y 63.2 \pm 14.7 ng/ μ l

y excepcionalmente de 113.1 ± 15.1 ng/ μ l para el tratamiento YUC-SfMNPV + EDTA al inicio de del experimento (mes 0, 63.2-113.1 ng/ μ l) y los 3 y 6 meses de almacenamiento (rango de 23.4 a 54.6 ng/ μ l). No se observaron diferencias significativas entre los valores de los 3 y 6 meses de almacenamiento (datos no mostrados).

Cuadro 8. Porcentajes de mortalidad de larvas segundo instar de *S. frugiperda* (\pm EE) y la concentración de ADN viral (\pm EE) obtenidos en los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA al inicio del experimento, dos tiempos de almacenamiento y dos temperaturas.

Temperatura (°C)	Tratamiento	Meses de almacenamiento	Mortalidad (\pm EE)
-	YUC-SfMNPV	0	70.1 \pm 8.30 b
-	YUC-SfMNPV + EDTA	0	68.6 \pm 15.5 b
25	YUC-SfMNPV	3	93.4 \pm 2.80 b
25	YUC-SfMNPV + EDTA	3	89.7 \pm 5.10 b
4	YUC-SfMNPV	3	78.9 \pm 11.9 b
4	YUC-SfMNPV + EDTA	3	92.1 \pm 3.30 b
25	YUC-SfMNPV	6	28.2 \pm 3.60 a
25	YUC-SfMNPV + EDTA	6	30.6 \pm 3.40 a
4	YUC-SfMNPV	6	30.3 \pm 8.20 a
4	YUC-SfMNPV + EDTA	6	32.5 \pm 4.30 a

^{a,b}Medias dentro de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, ^aF_{8,28} = 15.56, Tukey-Kramer test para separar medias, $P > 0.001$).

No se observaron diferencias significativas en las condiciones de pH que prevalecieron en los tratamientos al momento de su preparación (mes 0, rango de 7.55 a 7.77) (Cuadro 9). Sin embargo, los niveles de pH se incrementaron significativamente después de 3 y 6 meses de almacenamiento (rango de 7.79 a 8.91) (Cuadro 9). Desde el momento de la preparación de los tratamientos (YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA), el promedio de bacterias mesófilas (3.9 y 3.7×10^5 UFC/mL) y coliformes totales (2.6 y 3.5×10^5 UFC/mL) se incrementó significativamente con respecto a los 6 meses de almacenamiento en ambos tratamientos y temperaturas (Cuadro 10). Sin embargo, el promedio de coliformes totales (2.6 y 3.5×10^5 UFC/mL) no tuvo cambios significativos entre tiempos y temperaturas (Cuadro 10).

Cuadro 9. Valores de pH entre los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA al inicio del experimento, dos tiempos de almacenamiento y dos temperaturas.

Temperatura (°C)	Tratamiento	Meses de almacenamiento	pH (\pm EE) ^a
25	YUC-SfMNPV	0	7.55 \pm 0.15 a
25	YUC-SfMNPV + EDTA	0	7.77 \pm 0.00 a
4	YUC-SfMNPV	0	7.76 \pm 0.07 a
4	YUC-SfMNPV + EDTA	0	7.70 \pm 0.04 a
25	YUC-SfMNPV	3	8.76 \pm 0.13 b
25	YUC-SfMNPV + EDTA	3	8.09 \pm 0.63 b
4	YUC-SfMNPV	3	8.82 \pm 0.14 b
4	YUC-SfMNPV + EDTA	3	8.09 \pm 0.63 b
25	YUC-SfMNPV	6	8.91 \pm 0.13 b
25	YUC-SfMNPV + EDTA	6	8.39 \pm 0.64 b
4	YUC-SfMNPV	6	8.30 \pm 0.57 b
4	YUC-SfMNPV + EDTA	6	7.79 \pm 0.15 b

^aMedias dentro de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba de Kruskal Wallis, g.l.= 2, P = 0.019).

Cuadro 10. Bacterias mesófilas aerobias y coliformes totales (UFC/ml) determinadas en los formulados del aislamiento YUC-SfMNPV, recientemente preparados (0 meses) y después de 6 meses de almacenamiento en dos temperaturas.

Temp. (°C)	Tratamiento	Meses de almacenamiento	Bacterias ^a mesófilas UFC/ml	Coliformes ^b totales UFC/ml
-	YUC-SfMNPV	0	3.9 \times 10 ⁶ \pm 6.6 \times 10 ³ a	2.6 \times 10 ⁵ \pm 3.3 \times 10 ³ a
-	YUC-SfMNPV + EDTA	0	3.7 \times 10 ⁶ \pm 1.8 \times 10 ⁴ a	3.5 \times 10 ⁵ \pm 2.3 \times 10 ³ a
25	YUC-SfMNPV	6	6.7 \times 10 ⁸ \pm 8.8 \times 10 ⁷ b	1.9 \times 10 ⁶ \pm 1.0 \times 10 ⁶ a
25	YUC-SfMNPV + EDTA	6	6.0 \times 10 ⁸ \pm 2.9 \times 10 ⁷ b	2.7 \times 10 ⁶ \pm 6.8 \times 10 ⁵ a
4	YUC-SfMNPV	6	5.3 \times 10 ⁸ \pm 3.3 \times 10 ⁷ b	7.0 \times 10 ⁵ \pm 5.7 \times 10 ⁵ a
4	YUC-SfMNPV + EDTA	6	6.0 \times 10 ⁸ \pm 8.7 \times 10 ⁷ b	2.0 \times 10 ⁶ \pm 1.5 \times 10 ⁶ a

^aValores dentro de la misma columna seguidas de la misma letra no son significativamente diferentes. ^aANOVA, F_{5,12} = 33.64, Tukey test para separar medias, P > 0.001; ^bPrueba de Kruskal Wallis, g.l.= 5, P = 0.063.

6.5. Efecto del EDTA en un formulado del aislamiento YUC-SfMNPV en larvas de *S. frugiperda* sobre plantas de maíz.

En la evaluación en plantas de maíz, la mortalidad larvaria causada por el SfMNPV ($99.31 \pm 0.7\%$) no fue significativamente mayor comparada con la mortalidad causada por el tratamiento SfMNPV + EDTA ($93.75 \pm 3.0\%$) (Kruskal-Wallis = 13.56, $P = 1.667$). La mortalidad en el testigo no supero el 3% (Figura 6).

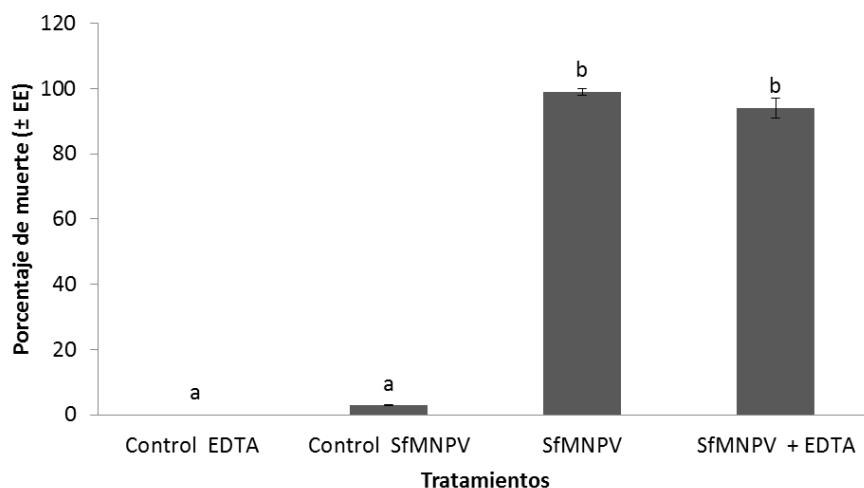


Figura 6. Tasa de mortalidad entre los tratamientos YUC-SfMNPV y YUC-SfMNPV + EDTA con sus respectivos testigos. Barras con la misma letra no son significativamente diferentes (Kruskal-Wallis = 13.57, $P = 1.667$).

VIII. DISCUSIÓN

La producción *in vivo* de los baculovirus a escalas masivas y semi-masivas requieren de alternativas que aumenten los estándares de calidad en los procesos de infección, el desarrollo del insecto huésped, la recolección del virus producido y el almacenaje de los bioformulados (Costa *et al.*, 2021). Los resultados obtenidos en el presente estudio mostraron que el peso corporal de las larvas del cuarto al sexto instar de *S. frugiperda*, la producción *in vivo* del SfMNPV y la mortalidad larvaria no tuvieron diferencias al utilizar una dieta estándar y una simplificada fría. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zamora-Avilés *et al.* (2017a), quienes observaron que las larvas del gusano soldado, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), que se alimentaron con la dieta simplificada fría mostraron un incremento de peso, misma que no difirió significativamente con las larvas que se alimentaron con una dieta basada en agar durante un período de 24 h. Además, no se observaron diferencias significativas en la producción de CI del nucleopoliedrovirus múltiple de *S. exigua* (SeMNPV) cuando cada tipo de dieta se usó para inocular grupos de larvas en contenedores de plástico. En otro estudio, Gervasio-Rosas (2019) observó que tres dietas

elaboradas a base de harina de soya, sémola de maíz o harina de garbanzo, permitieron un adecuado desarrollo de las larvas de *S. frugiperda* sin diferencias entre dietas, favoreciendo la producción del SfMNPV. Los resultados obtenidos en la presente investigación reflejan dos aspectos fundamentales: 1) ambas dietas muestran la misma perspectiva de ser utilizadas en un sistema de producción masiva y 2) la selección de la dieta simplificada fría podría reducir el tiempo de su elaboración y los costos de producción del virus sin comprometer la tasa de producción de las partículas infectivas.

Otras de las ventajas del uso de la dieta simplificada fría incluyen la reducción del riesgo de inactivación del virus por temperatura y una homogénea dispersión del inóculo dentro de la dieta. En contraste, una dieta elaborada con base en agar, necesita una temperatura mayor a 65°C para que el gelificante pueda fundirse (Claus & Sciocco de Cap, 2001; Lacey, 2012), incrementa el riesgo de inactivar al virus si se añade a una temperatura mayor de 40°C y disminuye la posibilidad de una adecuada distribución del patógeno en la mezcla (Grzywacz, 2017). Por otro lado, a diferencia de los estudios de Zamora-Avilés *et al.* (2017a), en el presente estudio se incorporó un complejo de vitaminas en la dieta simplificada fría (ejemplo, riboflavina, D-Pantotenato de Calcio, B12 y A, entre otras), lo cual posiblemente incrementó la biomasa de las larvas y por consecuencia la producción del virus. También se observó que las larvas que no fueron expuestas al virus, lograron concluir su desarrollo hasta el estado de pupa (datos no mostrados). Sin embargo, este resultado es preliminar y se requieren más estudios para determinar que este tipo de dieta también permite una óptima reproducción del insecto.

La producción de CI por larva y por mg de peso tuvo una tendencia de incremento conforme al tiempo post-infección. Claramente, la producción de CI es muy sensible a múltiples factores incluyendo la duración de la infección, tasa de crecimiento y peso del huésped, entre otros (Elvira *et al.*, 2013; Grzywacz *et al.*, 2014; Grzywacz, 2017). Asimismo, un resultado interesante mostró que la productividad del virus no tuvo diferencias estadísticas entre los últimos dos días evaluados (5 y 6), lo cual indica que si la recolección del virus se realiza previo a la ruptura del tejido del insecto (~días 5 post-infección) esto incrementaría la cantidad de inóculo recuperado. Al respecto, Machado *et al.* (2021) reportaron que para lograr una óptima producción viral se requiere una cosecha de larvas a las 96 h post-infección en lotes sin individualizar, ya que a partir de este punto el canibalismo de las larvas reduce considerablemente el número de estas cosechadas a pesar del incremento de biomasa. Sin

embargo, con ayuda de los contenedores de celdas individuales utilizados en la presente investigación para el mantenimiento del huésped se puede evitar la pérdida del virus por este efecto.

Recientemente, Ruíz-Moreno (2022) observó que la recolección diaria e individual de larvas de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) durante la multiplicación del su virus homólogo (HearNPV), incrementó significativamente la cantidad de inóculo recuperado en comparación con una infección por lote de larvas, en donde se recolectaron tanto las larvas muertas (entre 40 y 80%) como las moribundas con síntomas de infección viral. En otro estudio, Gervasio-Rosas (2019) observó que las larvas de *S. frugiperda* infectadas con el SfMNPV tuvieron la misma producción de CI en un sistema individualizado comparado con un sistema de confinamiento común. Sin embargo, en este último se obtuvo una pérdida de 29% por efecto de canibalismo. Debido a ello, las técnicas de recuperación del inóculo producido aun requieren de varios estudios que permitan optimizar la cantidad de partículas virales producidas y los costos para realizar este proceso (Valicente *et al.*, 2013).

Por otra parte, la cosecha de larvas muertas por virus después de que el ciclo de infección ha concluido puede provocar pérdida del inóculo por rompimiento del tegumento del huésped. Además, se incrementa la invasión de bacterias relacionadas a la descomposición de tejidos al momento de su muerte. En las larvas aún vivas, los niveles bacterianos pueden ser relativamente bajos con alrededor de 1×10^6 bacterias por insecto, mientras que en larvas muertas, los totales bacterianos pueden ser mucho más altos, alrededor de 1×10^9 bacterias totales por larva (Grzywacz *et al.*, 2004). Este efecto se observó en el presente estudio, debido a que el virus utilizado para realizar los formulados procedió de larvas de *S. frugiperda* muertas y con ruptura de tegumento. Las bacterias mesófilas ($3.9-3.7 \times 10^6$ UFC/mL) y coliformes totales ($2.6-3.5 \times 10^5$ UFC/mL) estuvieron presentes desde la elaboración de los formulados. En el caso de las bacterias mesófilas, los niveles se incrementaron después de 6 meses de almacenamiento (rango de 5.3×10^8 a 6.7×10^8 UFC/mL). Algunos estudios han reportado que, aunque la contaminación bacteriana aparentemente no tiene un impacto directo en la viabilidad de los CI en los formulados líquidos (Cherry *et al.*, 1996; Lasa *et al.*, 2008), estos microorganismos podrían estar involucrados en procesos químicos que aceleran la inactivación del virus.

Como se mencionó anteriormente, otra posible fuente de contaminación en los formulados de baculovirus es la presencia de los ácidos grasos (AGs),, proteínas de acción enzimática que se liberan de las larvas que mueren a causa de la infección por virus (Cherry *et al.*, 1996). Estas moléculas son liberadas durante la maceración de las larvas y acarreadas en los posteriores procesos de purificación de los CI. Debido a ello, es posible que ocurra un proceso de oxidación de los AGs liberando radicales libres que pueden degradar el ADN viral y disminuir la mortalidad del formulado después tres meses de almacenamiento, según lo descrito por Cortes (2010) y Zamora-Avilés *et al.* (2017a).

Es bien conocido que las grasas constituyen la fuente principal de energía de los animales y, en el caso de los insectos, éstos son capaces de sintetizar fosfolípidos (Lländler-Cazares, 2000). Sin embargo, similar a los vertebrados, los insectos particularmente los lepidópteros, no son capaces de sintetizar AGs que contienen dos o más dobles cadenas y, por lo tanto, estos compuestos son adquiridos a través del alimento (Klowden, 2007). En el presente estudio se logró determinar una proporción significativamente igual de AGS, AGM y AGP entre larvas sanas e infectadas en los dos tiempos analizados (24 y 144 h). Además, se observó una mayor cantidad de AGS totales al inicio de la infección, los cuales fueron disminuyendo conforme al incremento del tiempo. Estos resultados pueden ser esperados, ya que los AGS son necesarios para las funciones fisiológicas-estructurales y pueden ser acumulados en forma de reserva y, por tanto, son sintetizados por el propio insecto desde su emergencia del huevo (Stanley-Samuelson & Dadd, 1983; Santurino *et al.*, 2016). Por ejemplo, el AGS c16 es el primero que se produce, pero según las necesidades metabólicas del insecto, éste puede ser transformado en otros AGs después de diversos mecanismos de elongación e instauración (Merino Pérez *et al.*, 2012). Este mecanismo ocurre al interior de las células con el fin de formar reservas de energía, síntesis y mantenimiento de moléculas elementales (Stanley-Samuelson *et al.*, 1988). Esto puede explicar la influencia del factor tiempo en los AGS c16.

Por el contrario, la cantidad de AGM y AGP tendió a incrementar con el tiempo, lo cual se podría explicar debido a que pudieran ser adquiridos de forma exógena y acumulados como consecuencia de su constante alimentación (Arrese & Soulages, 2010). Tal es el caso del ácido graso linoleico (18:2n-6), único representante de la serie omega 6 en este estudio, el cual es usado también como reserva de energía y como respuesta en secreciones de defensa (Stanley Samuelson *et al.*, 1988). Además, se conoce que los AGs insaturados son

componentes esenciales de las membranas celulares; sin embargo, éstos son altamente susceptibles ante el estrés oxidativo con una consecuente generación de radicales libres (RL) (Venereo-Gutiérrez, 2002). Debido a ello, es probable que la presencia de los AGs insaturados que pueden estar favoreciendo la producción de RL durante el aislamiento y formulación del SfMNPV, sean principalmente del tipo oléico, palmitoléico, linoléico y linolénico (Cuadro 5). Un aspecto muy interesante mostró que el ácido graso c20 fue el único caso en donde el factor tiempo y el factor virus tuvieron un efecto significativo. Hasta nuestro entendimiento Sin embargo, esto fue principalmente influenciado por una disminución de éste en el testigo a las 144 h (4.41%). Hasta nuestro conocimiento, este es el primer estudio que determina la cantidad y tipo de AGs durante el proceso de infección de un baculovirus. Debido a ello, no tenemos una explicación clara de las diferencias en la cantidad de los ácidos grasos a través del tiempo. Aunque una posible explicación, podría relacionarse con el proceso de biosíntesis y demanda energética del propio insecto huésped. La identificación de la muestra y derivatización. La identificación de estos AGs es importante debido a puede dar pauta a futuros estudios que identifiquen compuestos antioxidantes más específicos que pueden reducir el impacto negativo de los RL en los formulados de baculovirus.

En general, el perfil de los AGS de las larvas infectadas o sanas de *S. frugiperda* es similar al observado en otros insectos. Por ejemplo, el AG c16 y Total n-6 de las larvas de *Tenebrio molitor* (L.) y *Zophoba morio* (Fab.) y adultos de *Acheta domesticus* (L.) y *Locusta migratoria* (L.) (Santurino *et al.*, 2016) y de varios insectos terrestres (Yang *et al.*, 2006) también fueron los de mayor proporción (rango 20-31 y 16-20 gr/100 de grasa, respectivamente). Torres-Sifuentes *et al.* (2015) también determinaron la presencia de los AGS c16, c18, c18-1 y c18-0, entre otros, en larvas del escarabajo melolóntido *Ancognata ustulata* Burmestier.

En el presente estudio, se planteó la hipótesis de que la incorporación del estabilizante EDTA a una concentración de 5 Mm podría ayudar a la estabilidad del formulado debido a un efecto inactivador de enzimas (Cisneros & Williams, 2001). Sin embargo, la incorporación de este compuesto no evitó una reducción de la mortalidad larvaria durante seis meses de almacenamiento a temperatura ambiente. Es posible que la concentración usada en este estudio no fue suficiente para generar un efecto significativo en el formulado. En otros estudios, Lasa *et al.* (2008) y Zamora-Avilés *et al.* (2017a) evaluaron el efecto de distintos compuestos y/o condiciones de temperatura sobre la estabilidad del SeMNPV. De

la misma forma, estos autores observaron una disminución de la actividad biológica del baculovirus conforme el incremento del tiempo a temperatura ambiente. Una de las razones fue que se relacionaron por una alta degradación de ADN aunado a un incremento de contaminación de la suspensión del virus (Lasa *et al.*, 2008). En este estudio, no se observaron notables diferencias en la concentración de ADN en el transcurso del estudio. Cabe resaltar que, aunque no existen estudios al respecto, es probable que los metabolitos resultantes por la fermentación del formulado sean en parte responsables de la modificación del pH en los formulados. Además, posiblemente estos metabolitos puedan estar implicados en la disminución de la mortalidad del formulado a causa de su interacción con los CI. Cabe señalar que, aunque el nivel de pH registrado en el presente estudio tendió a ser alcalino a partir de los 3 meses de almacenamiento; no se observó un efecto de degradación claro sobre los CI debido a que se observaron de manera permanente en los conteos realizados a 400x.

Finalmente, en el presente estudio se observó una alta mortalidad larvaria causada por dos formulados distintos y sin influencia significativa por el EDTA sobre las hojas de maíz: el YUC-SfMNPV solo (99.3%) y el YUC-SfMNPV + EDTA (94%). Similarmente, Rodríguez-Zintzún (2020) observó una alta mortalidad (93%) en larvas del segundo estadio de *S. frugiperda* por el consumo de hoja de maíz tratada con el virus SfMNPV + melaza al 10%. Gámez-Reyes (2017) observó que el uso del SMNPV solo y en combinación con un abrillantador óptico (Tinopal CBS al 1%) sobre plantas de maíz, provocó una alta mortalidad (~80%) en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*. Estos estudios indican el potencial que tiene el SfMNPV para el control del gusano cogollero, como también ha sido observado por García-Banderas *et al.* (2019). Sin embargo, hacen falta estudios al respecto para comprobar la efectividad del EDTA como un agente estabilizador a mayores concentraciones y si este aumento en la concentración no interviene en el proceso de infección en campo.

VII. CONCLUSIONES

- La producción semi-masiva del aislamiento YUC-SfMNPV es similar con el uso de una dieta convencional y una simplificada fría; sin embargo, ésta última tiene la ventaja de requerir un menor tiempo de preparación y un menor número de componentes.
- Bajo las condiciones del estudio, el tiempo óptimo de cosecha del aislamiento YUC-SfMNPV se encuentra entre el quinto y sexto día post-inoculación.
- La condición de las larvas, sanas o infectadas, no tuvo influencia sobre el tipo de AG.
- El tiempo fue un factor influyente en los AGS de las larvas sanas o infectadas, ya que éstos fueron más abundantes al inicio de la infección, mientras que el porcentaje de AGM y AGP tendió a incrementar con el tiempo.
- La incorporación del EDTA, a una concentración de 5 mM en la suspensión de CI, no redujo el deterioro de la actividad biológica, lo que puede deberse a una alta saturación inicial de los RL y/o a un efecto de concentración utilizada.
- El aislamiento YUC-SfMNPV provocó una alta mortalidad (~90%) larvaria independientemente si se aplicó solo o combinado con el estabilizador EDTA.

VIII. LITERATURA CITADA

- Almeida, A.F., Macedo, R.C., Chan, L.C. & Pedrini, M.R. (2010). Kinetic Analysis of *in vitro* Production of Wild-Type *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53(2), 285-291 pp.
- Aragón, F., Taba, S., Hernández, C. J., Figueroa, J.C., Serraní, A.V. & Castro. G.F. (2006). Catálogo de maíces criollos de Oaxaca. *INIFAP-SAGARPA: Libro Técnico*. Oaxaca, Oaxaca. 6, 344 pp.
- Arrese, E. L., & Soulages, J.L. (2010). Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*. 55, 207–225.
- Armenta, R., Martínez, A.M., Chapman, J.W., Magallanes, R., Goulson, D., Caballero, P. & Penagos, D. I. (2003). Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in southern Mexico. *Journal of Economic Entomology*. 96(3), 649-661pp.
- Barrera, G., Simón, O., Villamizar, L., Williams, T. & Caballero, P. (2011). *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control*. 58, 113-120.
- Blanco, C.A., Pellegaud, J.G., Nava-Camberos, U., Lugo-Barrera, D., Vega-Aquino, P., Coello, J., Terán-Vargas, A.P., & Vargas-Camplis, J. (2014). Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *Journal of Integrated Pest Management*. 5, 1-9pp.
- Beas-Catena, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Contreras-Gómez, A., & Molina-Grima, E. (2014). Baculovirus biopesticides: An overview. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 24(2), 362-373pp.
- Bernal, A., Oihane, S., Williams., Muñoz, D., & Caballero, P. (2018). Remarkably efficient production of a highly insecticidal Chrysodeixis chalcites nucleopolyhedrovirus (ChchNPV) isolate in its homologous host. *Pest management science*. 74(7), 1586-1592 pp.
- Berreta, M. F., Ríos, M. L., & Sciocco de Cap, A. (1998). Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71, 280-282.
- Beperet, I., Simón, O., López-Ferber, M., van Lent, J., Williams, T., & Caballero, P. (2021). Mixtures of Insect-Pathogenic Viruses in a Single Virion: towards the Development of Custom-Designed Insecticides. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(3), 1-5.
- Jones, K.A. & Burges, H.D. (1998). Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht*. 34-87.
- Caballero, P., Rosa, M., Muñoz, D., & Williams, T. (2009). The nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) as a biopesticide: analysis of recent advances in Spain". *Revista Colombiana de Entomología*. 35, 105-15.
- Cherry, A., Parnell, M. A., Grzywacz, D., Brown, M., & Jones, K. A. (1996). Long-term storage of baculovirus preparations. In Proceedings of the 29th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, 1-7 pp.
- Cherry, A.J., Parnell, M., Grzywacz, D., Brown, M., & Jones, K.A., (1997). The optimization of *in vivo* nuclear polyhedrosis virus production of *Spodoptera exempta* (Walker) and *Spodoptera exigua* (Hubner). *Journal Invertebrate Pathology*. 70, 50-58pp.
- Claus, J. D., & Sciocco de Cap., A. (2001). Producción masiva de baculovirus. En: Caballero, P., Williams, T., López-Ferber, M. (eds.). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. *Phytoma S.L.*, Valencia, España. 257-312 pp.

- Cjuno, J. y Arroyo, J. (2014). Inhibición de la actividad enzimática de la tirosina con EDTA, quitosano y papaína. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 12 (2), 42–48pp.
- Cortes, M. (2010). Aditivos Antioxidantes. Instituto de Medicina Biológica y Antienvejecimiento. 1-6pp.
- Costa Paiva, C. E., De Carvalho, J. R., Machado, L. C., Zago, H. B., Valicente, F. H., & Dos Santos, H. J. G. (2021). Analysis of baculovirus *Spodoptera virulence* in fall armyworm fed with cassava leaves. *Comunicata Scientiae*. 12.
- Du Plessis, H., Schlemmer, M. L., & Van den Berg, J. (2020). The effect of temperature on the development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*. 11(4).
- Elvira, S., Ibargutxi, M.A., Gorria, N., Muñoz, D., Caballero, P., & Williams, T., (2013). Insecticidal characteristics of two commercial *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus strains produced on different host colonies. *Journal Economic Entomology*. 106, 50-56
- Escribano, A., Williams, T., Goulson, D., Cave, R.D., Chapman, J.W. & Caballero, P, (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology*. 92, 1079-1085 pp.
- FAO. (2018). “Integrated management of the Fall Armyworm on maize A guide for Farmer Field Schools in Africa”. 34. roma: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- FAO. (2020). “Forecasting threats to the food chain affecting food security in countries and regions”. Roma: 34.
- FIRA. (2016). “Panorama agroalimentario”. México: Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial.
- Gamez, R. (2017) “Mezcla de un nucleopoliedrovirus con compuestos fotoprotectores para el control de *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)” Intituto Tecnológico del Valle de Morelia.
- García, G. (2019). Interacciones multitróficas maíz-micorriza-insecto-baculovirus. *Maestría en Producción Agropecuaria. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.
- García, C., González, M. B. & Cortez, E. (2012). Use of natural enemies and biorational pest control of corn. *Ra Ximhai*. 8, 57–70pp.
- García-Banderas, D., Tamayo-Mejía, F., Pineda, S., de la Rosa, J. I. F., Lasa, R., Chavarrieta-Yáñez, J. M., Gervasio-Rosas, E., Zamora-Avilés, N., Morales, S. I., Ramos-Ortiz, S., Valle, J., & Martínez-Castillo, A. M. (2020). Biological characterization of two *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus isolates from Mexico and evaluation of one isolate in a small-scale field trial. *Biological Control*. 149 , 104316.
- Gasic, S., & Tanovic, B. (2013). Biopesticide formulations, possibility of application and future trends. *Pesticidi i Fitomedicina*. 28(2), 97-102pp.
- Gervasio, E. (2019). Producción semi-masiva de un baculovirus y uso de fotoprotectores en sus formulados para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. *Maestría en Producción Agropecuaria, Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*.
- Goergen, G., Kumar, P. L., Sankung, S. B., Togola, A., & Tamó, M. (2016). First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PLoS ONE*. 11(10), 1-9pp.
- Gómez, J. & Villamizar, L. (2013). Baculovirus: Hospederos y especificidad. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 15: 10.15446

- González-Cortés, Nicolás, Silos-Espino, Héctor, Estrada Cabral, Juan Carlos, Chávez-Muñoz, José Archivaldo, & Tejero Jiménez, Leonardo. (2016). Características y propiedades del maíz (*Zea mays* L.) criollo cultivado en Aguascalientes, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 7(3), 669-680.
- González, R.K., Salazar, A. & Martínez, S. (2011). Vulnerabilidad del mercado nacional de maíz (*Zea mays* L.) ante cambios exógenos internacionales. *Agrociencia*. 45, 733-44pp.
- Granados, R. R. & Williams, K. A. (1986). *In vivo* infection and replication of baculoviruses. En: Granados, R. R. and B. A. Federici (eds.) *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 89-196pp.
- Grzywacz, D., Rabindra R.J., Brown M., Jones, K. & Parnell, M. (2004) *Helicoverpa armigera* NPV production manual. *Natural Resources Institute*. Chatham. 107-154pp.
- Grzywacz, D., Moore, D. & Rabindra, R.J (2014). Mass production of entomopathogens in less industrialized countries. *Mass production of beneficial organisms*. 519-561pp.
- Grzywacz, D., (2017). Basic and Applied Research: Baculovirus. In: Lacey, L.A. (Ed.), *Microbial Control of Insect and Mite Pests*. 27–46pp.
- Hammer, Ø., Harper, D. A., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 9pp.
- Harrison, R. D., Thierfelder, C., Baudron, F., Chinwada, P., Midega, C., Schaffner, U. & van den Berg, J. (2019). Agro-ecological options for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* JE Smith) management: Providing low-cost, smallholder friendly solutions to an invasive pest”. *Journal of Environmental Management*. Academic Press.
- Haase, S., Sciocco de Cap, A. & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*. 7, 2230-67pp.
- Hughes P. R. & H. A. Wood. (1981). A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology*. 37 (2). 154-159pp.
- Kala, S., Sogan, N., Agarwal, A., Naik, S. N., Patanjali, P. K., & Kumar, J. (2019). Biopesticides: Formulations and delivery techniques. *In Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control*. 209–220pp.
- Khalil, Z. & Khodr, B. (2001). A role for free radicals and nitric oxide in delayed recovery in aged rats with chronic constriction nerve injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 31(4), 430-439pp.
- Klowden, Marc. (2007) *Sistemas fisiológicos en insectos*. Second Edition. *university of Idaho Moscow, Idaho*.
- Kinkar, M., Delbianco, A., & Vos, S. (2020). Pest survey card on *Spodoptera frugiperda*. *European Food Safety Authority*.
- Lacey, L.A. (2012). *Manual of techniques in invertebrate pathology*. Second Edition. *Academic Press, London*. 470.pp
- Lasa, R., Williams, T. & Caballero, P. (2008). Insecticidal Properties and Microbial Contaminants in a *Spodoptera exigua* Multiple Nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) Formulation Stored at Different Temperatures. *Journal of Economic Entomology*. 101(1), 42-49pp.
- Lasa, R., Guerrero-Analco, JA, Monribot-Villanueva, JL, Mercado, G., & Williams, T. (2018). ¿Por qué los cuerpos de oclusión de múltiples nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* pierden actividad insecticida en el amaranto (*Amaranthus hypocondriacus* L.)? *Control Biológico*, 126, 74-82pp.
- Li, X. J., Wu, M. F., Ma, J., Gao, B. Y., Wu, Q. L., Chen, A. D., Liu, J., Jiang, Y. Y., Zhai, B. P., Early, R., Chapman, J. W., & Hu, G. (2020). Prediction of migratory routes of the invasive fall

- armyworm in eastern China using a trajectory analytical approach. *Pest Management Science*. 76(2), 454-463pp.
- Llenderal, Cázares. (2000) Introducción a la fisiología de insectos. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, México- 190pp.
- Machado, L. C., dos Santos, H. J. G., Mauri, L. V. R., Soler Guilhen, J. H., & Costa Paiva, C. E. (2021). Improvement of *in vivo* mass production technique of baculovirus spodoptera. *Revista Em Agronegocio e Meio Ambiente*. 14(3).
- Méndez, W. A., Valle, J., Ibarra, J. E., Cisneros, J., Penagos, D. I., & Williams, T., (2002). Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control*. 25, 195-206pp.
- Merino Pérez, J., José, M., & Borge, N. (2012). Vías metabólicas de síntesis. Fisiología General. Universidad de Cantabria.
- Moggia, B., & Buono-Core, G. (2001). Desarrollo de formulaciones de pesticidas botánicos derivados de plantas endémicas de la V Región. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. *Programa Cybertesis*. 2-14pp
- Moshi, A.P. & Matoju, I. (2017). The status of research on and application of biopesticides in Tanzania. *Crop Protection*. 92, 18-28pp.
- 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. *Biological Control*. 38: 157-165
- Murúa, M. G., Molina, J. & Coviella, C. (2006). Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in Northwestern Argentina. *Florida Entomologist*. 89. 175-182pp.
- Muñoz, D., R. Murillo, P. J. Krell, J. M. Vlask, y P. Caballero. (1999). Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeSP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. *Virus Research* 59(1). 61-74pp.
- Pacheco, M. F. (1994). Plagas de los cultivos oleaginosos en México. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Cd. Obregón, Sonora, México. *INIFAP*. 600 pp.
- Passarelli, L. (2011). Barrier to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections. *Virology*. 411, 383 - 392pp.
- Poitout, S. & Bues, R. (1974) Élevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères noctuidae et de deux espèces d'artctiidae ser milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces. *Annales de Zoologie, Écologie Animale*. 6, 431-441.
- Reid, S., Chan, L., & van, M. M. (2014). Production of entomopathogenic viruses. In J. A. Morales-Ramos, G. M. Rojas, y I. D. Shapiro-Ilan (Eds). Mass production of beneficial organisms, London. UK. *Academic Press*. 437-582pp.
- Rice, E. (2017). "Preguntas sobre el gusano cogollero del maíz". Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- Ríos, C., Gallegos, M. G., Del Rincón, M. C., Cerna, C. E., Sánchez, P. S. & Cepeda, S. M. (2011). Insecticidal activity of native isolates of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus from soil samples in Mexico. *Florida Entomologist*. 94, 716-718pp.
- Ríos-Velasco, G Gallegos-Morales, J Cambero-Campos, E Cerna-Chávez, MC Del Rincón-Castro, R Valenzuela-García. (2011). Enemigos naturales del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en Coahuila, México. *Florida entomologist* 94, 723–726pp.

- Rodríguez, M. & de León, C. (2008). El cultivo del maíz temas selectos. México. Colegio de Postgraduados. Mundi Prensa. 1ed)152-180pp.
- Ruiz, M. (2002). Nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera* HearNPV: mejoramiento del proceso de producción en condiciones in vivo en larvas de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Maestría Diseño y Gestión de Procesos Énfasis Bioprocesos. Universidad la Sabana.
- Santos, A.M., Uribe, A.L., Ruiz, J.C., Gómez, L.T.A., & Villamizar L.F. (diciembre 2014.) “Nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* SfNPV003: compatibilidad con agroquímicos y estabilidad en condiciones de almacenamiento”. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 15, 219-28pp.
- Santurino, C., García-Serrano, A., Molina-García, J., Sierra-Fernández, P., Castro-Gómez, M.P., Calvo, M. v, & Fontecha, J. (2016). Los insectos como complemento nutricional de la dieta: fuente de lípidos potencialmente bioactivos. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 23(2), 50–56.
- SAGARPA (2017). Maíz Grano Blanco y Amarillo Mexicanos. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación*.
- SIAP (2022) Maíz grano. *Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera*. <https://www.gob.mx/siap/articulos/maiz-grano?idiom=es#:~:text=De%20acuerdo%20con%20cifras%20del,concentra%20en%20M%C3%A9xico%20y%20Chiapas> (consultado en octubre de 2022)
- Stanley-Samuelson, D.W., & Dadd, R.H. (1983). Long-chain polyunsaturated fatty acids: Patterns of occurrence in insects. *Insect Biochemistry*. 13(5), 549–558.
- Stanley-Samuelson, D. W., Jurenka, R. A., Cripps, C., Blomquist, G. J., & de Renobales, M. (1988). Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 9(1), 1–33
- Szewczyk, B., Hoyos, L., Paluszek, M., Skrzecz, I., & Lobo de Souza, M., (2006). Baculoviruses. Re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*. 24, 143-160 pp.
- Valicente, F.H., Tuelher, E.S., Pena, R.C., Andrezza, R. & Guimarães, M.R.F., (2013). Cannibalism and virus production in *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae fed with two leaf substrates inoculated with Baculovirus *Spodoptera*. *Neotropical Entomology*. 42, 191–199.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133pp.
- Villamizar L, Cuartas P, Correal C, Lopez-Ferber M. (2018.) Virus entomopatógenos en el control biológico de insectos. *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*; Cap. 7. 372–409.pp
- Walter, A. M., Valle, J., Ibarra, J.E., Cisneros, J., Penagos, D.I. & Williams, T. (2002). Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological control*. 25, 195-206.
- Williams, T., Hajek, A. E., Shapiro, I. & David, I. (2018). Viruses. In *Ecology of Invertebrate Diseases*. Cornell University, Ithaca New York. US. 213-285 pp.
- Williams, T., Goulson, D., Caballero, P., Cisneros, J., Martínez, A.M., Chapman, J.W., Roman, X.W. & Cave, R.D. (1999). Evaluation of a Baculovirus Bioinsecticide for Small-Scale Maize Growers in Latin America. *Biological Control*. 14, 67-75.
- Williams, T. & Cisneros, J. (2001). Formulación y aplicación de los baculovirus bioinsecticidas. En: Caballero, P., M. López-Ferber y T. Williams (eds.), *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Valencia, España. *Phytoma S. A.* 313-372 .

- Wilson, K., Grzywacz, D., Curcic, I., Scoates, F., Harper, K., Rice, A., Paul, N., & Dillon, A. (2020). A novel formulation technology for baculoviruses protects biopesticide from degradation by ultraviolet radiation. *Scientific Reports*, 10(1).
- Yang, L. F., Siriamornpun, S., & Li, D. (2006). Polyunsaturated fatty acid content of edible insects in Thailand. *Journal of Food Lipids*, 13(3).
- Zamora-Avilés, N. (2017a). El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioinsecticida para control de este insecto: un análisis genético, biológico y de producción masiva. *Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales*
- Zamora-Avilés, N., Martínez, A.M., Pineda, S., Bravo, I., Figueroa, I. & Lasa, R. (2017b). Cool-textured diets for use in baculovirus Production. *Biocontrol Science and Technology*. 27(11), 1327-1338 pp.
- Zhao, Zhenjun, Linmei Wang, Dongmei Yue, Bo Ye, Peipei Li, Bo Zhang, Qi Fan. (2019). Evaluación de genes de referencia para la normalización de datos de expresión génica de RT-qPCR para células *Trichoplusia ni* durante la Infección del Nucleopolyhedrovirus Multicapside de *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae), (AnpeNPV) *Journal of Insect Science* , 19(1), 4pp.
- Ziennicka, J. (2007). Mass production of nucleopolyhedrovirus of the satin moth *Leucoma salicis* (LesanNPV). *Journal of Plant Protection Research*. 48(1), 23-48 pp.