

# Caracterización y utilización de un Nucleopoliedrovirus patógeno a *Spodoptera eridania* y *S. ochrea*

Juana Luna Rodríguez<sup>1</sup>  
Juan Carlos Cabrera-La Rosa<sup>1</sup>  
Ernesto Pinedo<sup>2</sup>  
Delia Pinto<sup>2</sup>  
Jean-Louis Zeddam<sup>3</sup>

**RESUMEN.** Los virus entomopatógenos han demostrado su eficacia como agentes de control biológico. Entre éstos, los Virus de la Poliedrosis Nuclear (NPV) se han utilizado con éxito para el control de varias plagas de importancia económica. Un virus que pertenece al género de los Nucleopoliedrovirus (familia *Baculoviridae*) fue aislado de larvas de *Spodoptera* sp. recolectadas en Perú. Los cuerpos de inclusión (CI) de este virus, denominado SpocNPV, tienen una simetría cúbica. El SpocNPV fue patogénico para las plagas *Spodoptera eridania* y *S. ochrea*. La dosis letal media (DL<sub>50</sub>) para larvas de tercer instar de *S. eridania* fue determinada en aproximadamente 80 225 CI/individuo. Las aplicaciones de suspensiones acuosas del SpocNPV (en dosis equivalentes a 4,3 x 10<sup>12</sup> CI/ha) permitieron controlar totalmente *S. eridania* en parcelas de camote. En plantaciones de tomate infestadas por *S. eridania* y *S. ochrea*, la aplicación de 3,3 x 10<sup>12</sup> CI/ha produjo una reducción de casi 80 % en las poblaciones de las plagas.

**Palabras clave:** Entomopatógeno, Nucleopoliedrovirus, NPV, Control biológico, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera ochrea*, Camote, Tomate.

**ABSTRACT. Characterization and utilization of a Nucleopolyhedrovirus pathogenic to *Spodoptera eridania* and *S. ochrea*.** Entomopathogenic viruses have demonstrated their efficacy as biological control agents. Amongst these, the Nucleopolyhedrovirus (NPV) has been successfully utilized for the control of several economically important pests. A virus belonging to the Nucleopolyhedrovirus genus (family *Baculoviridae*) was isolated from *Spodoptera* sp. larvae collected in Peru. The inclusion bodies (IB) of this virus, denominated SpocNPV, are cubic symmetrical. SpocNPV was pathogenic to *S. eridania* and *S. ochrea* pests. The medium lethal dose (LD<sub>50</sub>) for third instar larvae of *S. eridania* was approximately determined as 80 225 IB/individual. Application of aqueous suspensions of SpocNPV (in doses equivalent to 4.3 x 10<sup>12</sup> IB/ha) provided total control of *S. eridania* in sweet potato plots. Application of 3.3 x 10<sup>12</sup> IB/ha produced a reduction of 80% in the pest populations in tomato plantations infested by *S. eridania* and *S. ochrea*.

**Key words:** Entomopathogen, Nucleopolyhedrovirus, NPV, Biological control, *Spodoptera eridania*, *Spodoptera ochrea*, Sweet potato, Tomato.

## Introducción

Los Noctuidae constituyen la familia del orden Lepidoptera que mayor daño causa a los cultivos. En esta familia, el género *Spodoptera* agrupa a numerosas especies plaga que están distribuidas en todo el mundo y que afectan diversas plantas.

En la costa del Perú, *Spodoptera eridania* Cramer y *Spodoptera ochrea* Hampson son los principales defoliadores del cultivo de camote y tomate, respectivamente (Sánchez y Vergara 1996).

*S. eridania* es una especie polífaga, considerada como una de las plagas de mayor importancia económica porque afecta a diversos cultivos. Esta plaga se alimenta del follaje de camote, tomate, algodón, papa, alfalfa, yuyo (*Ricinus communis*), verdolaga, entre otros y se ha informado que por ser las dos últimas es-

<sup>1</sup> CIP. Apartado 1558, Lima, Perú.

<sup>2</sup> UNALM, Apartado 456, Lima, Perú.

<sup>3</sup> CIP. Lima Perú. Dirección actual: IRD, 213, rue La Fayette, 75480 Paris Cedex 10, Francia. jzeddam@yahoo.com

pecies malezas y encontrarse frecuentemente en el campo, constituyen la fuente primaria de infestación (Sánchez y Vergara 1996). *S. eridania* se distribuye en toda América tropical hasta las regiones templadas al norte de New York (Todd y Poole 1980).

*S. ochrea* se encuentra distribuida en Centro América y América del Sur e infesta diversos cultivos. Es defoliador pero afecta también los frutos del tomate al realizar rasgaduras profundas, lo cual disminuye su valor comercial y provoca su pudrición debido a la invasión de otros organismos (Sánchez y Vergara 1996).

La aplicación exclusiva, y a menudo excesiva, de insecticidas para el control de estas plagas causa daños al ambiente e incluso puede inducir el surgimiento de resistencia por las plagas a estos insecticidas. Por tanto, la búsqueda de métodos alternativos de control adquiere importancia en la protección de los cultivos, por lo cual es esencial evaluar el potencial de los agentes de control biológico como depredadores, parasitoides y microorganismos patógenos, para la regulación de las plagas.

Entre estos microorganismos, los virus entomopatógenos se han usado con gran éxito para el control de otras plagas. El virus de la Poliedrosis Nuclear o Nucleopoliedrovirus (NPV)<sup>4</sup> es un agente promisorio para el control de especies plaga antes mencionadas. Los NPV son virus que pertenecen a la familia de los *Baculoviridae*. Se caracterizan por la producción de cuerpos de inclusión (CI) al final del ciclo viral. Los CI están constituidos por una matriz proteica cristalina cuyo componente principal es la poliedrina (con un peso molecular entre 25-33 kDa). Cada CI, de forma polidrial y de tamaño 0,1 a 15  $\mu$ m, incluye a muchos viriones. Los viriones corresponden a una o varias nucleocapsides (NC) alargadas (30-60 nm de diámetro y 250-300 nm de largo) envueltas dentro de una membrana. Cada NC contiene una molécula de ADN doble cadena circular de tamaño 80-180 x 10<sup>3</sup> bases (ICTV 2000).

Los NPV poseen diversas características específicas que los convierten en excelentes candidatos para su uso como controladores biológicos (Hunter *et al.* 1984, Bohmfalk 1986, Cuningham 1995, Moscardi 1999). Esta constituye una de las razones por las cuales los NPV son uno de los grupos de virus entomopatógenos más estudiados. Los trabajos realizados en diferentes países han permitido que ciertos NPV

(aislados de plagas de mayor interés económico) sean empleados de forma artesanal o a gran escala para reducir los daños causados a las cosechas por plagas entomológicas (Betz 1986, Huber 1986, Bustillo 1989, Cisneros 1995, Moscardi 1997). Los NPV sólo infectan a los invertebrados y principalmente a los del orden Lepidoptera (ICTV 2000). Ningún miembro de este género de virus se ha reportado infectando a vertebrados o plantas (Gröner 1986). La utilización de estos patógenos como agentes de control biológico ha recibido el respaldo de la Organización Mundial de la Salud (OMS/FAO 1973).

El objetivo del trabajo fue la búsqueda de virus patógenos presentes en las poblaciones naturales de *S. eridania* y *S. ochrea*, así como su caracterización y evaluación bajo condiciones de laboratorio y campo.

## Materiales y métodos

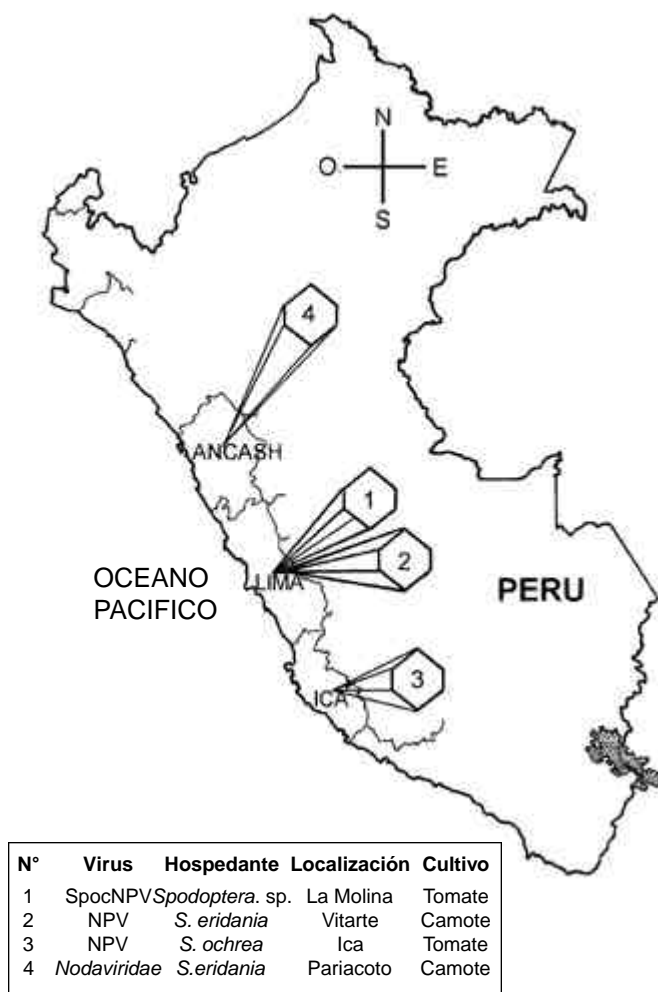
**Ubicación del experimento:** La crianza masiva de *S. eridania* y *S. ochrea* se realizó en un ambiente controlado (temperatura de 15,4 °C y HR 80%) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM). Los análisis bioquímicos y microscópicos así como los bioensayos se realizaron en el Departamento de Entomología del Centro Internacional de la Papa (CIP), localizado en La Molina, Perú. En esta localidad la temperatura promedio fue de 24 °C y la HR 70%.

**Recolección de especímenes infectados por el virus:** Se recolectaron larvas de *S. eridania* y *S. ochrea* muertas o que mostraban síntomas de enfermedad tales como cambios en la coloración de los tegumentos y comportamiento no habitual, con el propósito de detectar y aislar los virus que las infectaban. Los sitios en los cuales se realizaron las recolecciones fueron Ica, Vitarte, La Molina y Pariacoto (Fig. 1), específicamente en los cultivos de camote y tomate

**Identificación de los virus:** Los NPV fueron identificados por observación directa de los cuerpos de inclusión o poliedros presentes en los tejidos de los especímenes infectados. El examen se realizó con un microscopio fotónico a una magnificación de 400 x. Los virus que pertenecían a grupos diferentes de los NPV fueron visualizados usando un microscopio electrónico.

**Multiplicación y purificación de los NPV:** Los NPV fueron suministrados a larvas de cuarto instar de *S. eridania* mediante la contaminación de su alimento. Las larvas muertas por la infección viral fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

<sup>4</sup> De acuerdo a la taxonomía de ICTV. Antes citado como VPV



**Figura 1.** Lugares de procedencia de los virus aislados de *S. eridania* y *S. ochrea*.

La purificación de los NPV se realizó a partir de un homogenizado de larvas infectadas según la metodología de Alves (1986). Este proceso incluye una centrifugación (1 h/ 30000 rpm) sobre un gradiente lineal de sacarosa de concentración 45% a 80% (p/v).

**Electroforesis en gel de poliacrilamida:** El peso molecular de la poliedrina (proteína constitutiva del cuerpo de inclusión) de los diferentes NPV encontrados fue determinado por electroforesis en gel de poliacrilamida de acuerdo al método de Laemmli (1970).

**Cuantificación del número de cuerpos de inclusión:** El número de CI presentes en las suspensiones virales fue calculado a partir de conteos realizados con la cámara de Neubauer.

**Determinación de la DL<sub>50</sub>:** Para determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) se utilizaron larvas de *S. eridania* de tercer instar. Grupos de 30 especímenes fueron alimentados con dieta contaminada con diferentes cantidades de una suspensión purificada del NPV. Se evaluaron siete dosis del virus (487800, 223100, 162600,

148000, 46200, 41500 y 21600 CI/larva, respectivamente). Se registró la mortalidad diariamente por un período de 17 días. Todas las larvas muertas fueron observadas para determinar la presencia de CI utilizando un microscopio de luz. Para cada experimento se mantuvo un tratamiento testigo.

Los datos obtenidos de los bioensayos fueron analizados mediante el programa Analyse de la dose léthale 50; version 3.0" (Angeles y Alcázar 1995).

**Producción de antisuero y prueba de ELISA:** El antisuero anti-NPV fue obtenido utilizando conejos a los cuales se les aplicaron repetidas inyecciones intramusculares del virus purificado. Se utilizó el método indirecto de la técnica Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay o ELISA (Clark y Adams 1977, Brown *et al.* 1982) para detectar los NPV en homogenizados de larvas infectadas por estos virus.

**Evaluación en condiciones de campo:** Se aplicaron suspensiones acuosas del SpocNPV (con 0,1% de dispersante) una sola vez en plantaciones de camote y tomate usando un pulverizador manual. En cada uno de los ensayos se usaron tres parcelas de 100 m<sup>2</sup> cada una, más una parcela testigo. El diseño experimental fue de bloques completamente al azar. Las evaluaciones de las poblaciones se realizaron antes del tratamiento así como 3 y 6 días después. Para ello, se contaron todas las larvas presentes en tres plantas por parcela. En Cañete se realizaron dos experimentos en plantaciones de camote infestados naturalmente por *S. eridania*. Las dosis evaluadas fueron 8,4 x 10<sup>12</sup> y 4,3 x 10<sup>12</sup> CI/ha.

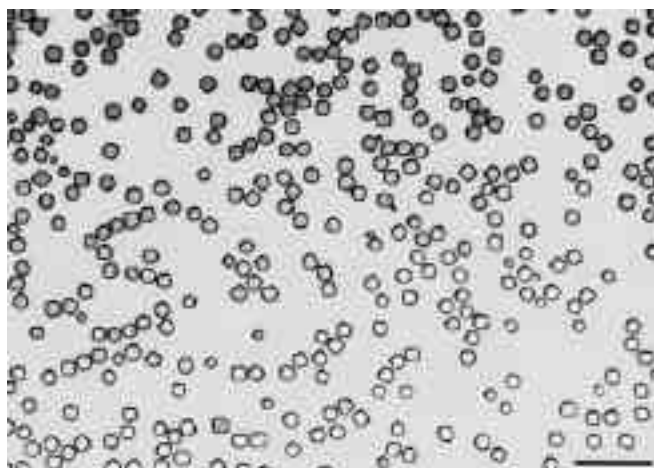
Un tercer experimento se realizó en La Molina en una plantación de tomate infestada en forma natural por *S. eridania* y *S. ochrea* simultáneamente. El ensayo fue realizado cuando las larvas se encontraban entre el primer y el tercer instar. Se comparó la reducción de las poblaciones de las plagas después de la aplicación de NPV (3,3 x 10<sup>12</sup> CI/ha) con respecto al efecto del uso de varios insecticidas sintéticos de uso común en la zona (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Dosis de NPV y cinco insecticidas sintéticos utilizados como comparadores de la eficiencia del virus para el control de *S. eridania* y *S. ochrea*, en el cultivo del tomate.

Tratamientos	Dosis/ha
SpocNPV	3,3 x 10 <sup>12</sup> CI
Clorpirifos (Lorsban)	0,3 L
Permetrina (Pounce)	0,5 L
a-cypermctrina (Fastac)	0,6 L
b-cyflutrina (Bulldock)	0,5 L
Cyflutrina (Baytroide)	0,5 L

## Resultados y discusión

**Virus entomopatógenos aislados:** Como resultado de los muestreos realizados, se encontraron tres virus de Poliedrosis Nuclear (NPV) en larvas de *Spodoptera* sp. procedentes de La Molina, Vitarte e Ica, respectivamente. Además, en un grupo de larvas de *S. eridania* provenientes de Pariacoto (Departamento de Ancash), mantenidas en crianza, se encontró un *Nodaviridae* (Fig. 2) (Zeddám *et al.* 1999).



**Figura 2.** Cuerpos de inclusión del SpocNPV (barra: 10 µm).

Los CI de los diferentes aislamientos de NPV difieren en su forma y tamaño. Además, la poliedrina, de cada uno de ellos, tiene un peso molecular particular. Estos resultados, incluidos en el Cuadro 2, demuestran que existen por lo menos tres NPV diferentes que afectan al complejo *S. eridania* y *S. ochrea*.

El NPV recolectado en La Molina (Fig. 1) fue utilizado para el desarrollo de las siguientes etapas de investigación. De conformidad con las reglas del Inter-

national Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), este virus fue denominado SpocNPV (ICTV 2000).

**Síntomas provocados por la enfermedad viral:** Los primeros experimentos realizados en condiciones de laboratorio permitieron establecer que el SpocNPV mostró alta patogenicidad en larvas de ambas especies de *Spodoptera*. La mortalidad provocada por el NPV proveniente de Vitarte fue más lenta. El NPV aislado de larvas de *S. ochrea* provenientes de Ica no se logró multiplicar sobre larvas de *S. eridania*.

Los especímenes infectados por el SpocNPV presentaron los siguientes síntomas: una reducción y posterior paralización de la alimentación, simultáneamente comenzaron a desplazarse en el medio de manera inusual, en forma errática (las larvas se dispersaron en las cajas al azar sin tener en cuenta el sitio donde se depositó la comida). También las larvas se tornaron más claras. Frecuentemente, y poco antes de morir, las larvas se colgaron de sus propatas, con la cabeza hacia abajo, en las partes altas de las plantas. En esa fase de la enfermedad, la mayoría de ellas presentan un aspecto blanquecino. La velocidad de acción del virus depende de la dosis ingerida y más importante aún, del instar, siendo las larvas pequeñas afectadas mucho más rápido que las de mayor tamaño.

**Dosis letal media:** En los bioensayos se determinó una dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de aproximadamente 80 225 poliedros por larva de tercer instar de *S. eridania* (Cuadro 3). La  $DL_{50}$  para *S. ochrea* no se pudo calcular debido a que SpocNPV resultó ser extremadamente patógeno a esa especie, así que logró 100% de mortalidad con todas las dosis del virus evaluadas.

**Producción viral:** El número de CI encontrados en larvas de quinto y sexto instar fue ligeramente dife-

**Cuadro 2.** Características morfológicas y bioquímicas de tres NPV aislados de *S. eridania* y *S. ochrea*.

Virus	Hospedante	Lugar de recolección	Morfología de los poliedros	Diámetro de los poliedros (en micras)	Peso molecular de la poliedrina (en Da)
NPV	<i>Spodoptera</i> sp.	La Molina	Cúbico	2,22 ± 0,57	29 400 ± 200
NPV	<i>S. eridania</i>	Vitarte	Poliédrico	1,43 ± 0,30	28 750 ± 200
NPV	<i>S. ochrea</i>	Ica	Poliédrico	1,05 ± 0,11	28 100 ± 200

**Cuadro 3.**  $DL_{20}$ ,  $DL_{50}$  y  $DL_{90}$  del SpocVPN sobre larvas de tercer instar de *S. eridania*.

Dosis letal	Dosis promedio (CI/larva)	Límite inferior (CI/larva)	Límite superior (CI/larva)
$DL_{90}$	638 303	363 064	1 122 203
$DL_{50}$	80 225	59 561	108 058
$DL_{20}$	20 550	12 486	33 824

rente en las dos especies de *Spodoptera*. Se observó que, en promedio, *S. ochrea* moría con un nivel de infección menor. La producción viral está relacionada con la edad de las larvas, siendo las más grandes las más infectadas. En general, en relación con los instares y especies, el rango de producción viral varió entre 1 y 3 billones de CI por larva (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Número estimado de cuerpos de inclusión del SpocNPV producidos por larva de quinto y sexto instar de *S. eridania* y *S. ochrea* y sus respectivas equivalencias en el número de la DL<sub>50</sub>.

Especie	Instar	Promedio de CI/larva	Equivalencias en el número de DL <sub>50</sub>
<i>S. eridania</i>	Larva V	2,04 x 10 <sup>9</sup>	25 400
<i>S. eridania</i>	Larva VI	3,05 x 10 <sup>9</sup>	38 000
<i>S. ochrea</i>	Larva V	1,32 x 10 <sup>9</sup>	16 450
<i>S. ochrea</i>	Larva VI	2,40 x 10 <sup>9</sup>	29 900

En todos los casos, esto se traduce al final en una multiplicación considerable de la cantidad del patógeno que se usó para iniciar la infección de los individuos. Por ejemplo, se calcula que la cantidad de poliedros recuperada de una larva de sexto instar de *S. eridania* corresponde aproximadamente a 38 000 DL<sub>50</sub> (basándose en el valor de la DL<sub>50</sub> establecido para una larva de tercer instar).

**Prueba Elisa:** Mediante esta prueba se determinó que la sensibilidad del ensayo para la detección de las proteínas del SpocNPV correspondió a una concentración de 4 x 10<sup>6</sup> CI/ml. Esta prueba comparada con la observación de los poliedros en la hemolinfa de las larvas evaluadas resultó ser extremadamente sensible para la detección del virus, confirmándose la presencia de infección en las larvas tratadas en 81,8% de la población al cabo de 54,5 h mientras que la observación visual de una proporción cercana no era posible sino hasta aproximadamente 147,5 h después de la ingestión del alimento contaminado (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Comparación de la precocidad del diagnóstico de la presencia del SpocVPN entre observaciones con microscopio fotónico versus la prueba ELISA.

Nº de horas posteriores a la infección	Porcentaje de larvas detectadas positivas	
	Por microscopía fotónica	Por el método ELISA
54,5	18,2	81,8
95,0	27,3	100
147,5	68,2	100
194,5	90,9	100

#### Aplicación del SpocNPV en plantaciones de camote:

En el primer experimento que se realizó, en el cultivo de camote, en Cañete, se determinó que las larvas de *S. eridania* fueron controladas en su totalidad aplicando una dosis de virus equivalente a 8,4 x 10<sup>12</sup> CI/ha. Es decir que tres días después de la aplicación del virus el 100% de la población larval había muerto en las parcelas donde se realizaron las aplicaciones mientras que el testigo no mostraba variaciones en el nivel de la plaga (Cuadro 6). Estos resultados fueron similares en todas las parcelas aunque existían diferencias en cuanto a las densidades iniciales de la población de la plaga.

En el segundo ensayo realizado en Cañete en una plantación de camote, se obtuvieron resultados idénticos a los previos usando 4,3 x 10<sup>12</sup> CI/ha, que corresponde a la mitad de la concentración viral aplicada en el primer experimento, aunque las poblaciones larvales fueran en promedio mucho más altas (Cuadro 7).

#### Aplicación del SpocNPV en plantaciones de tomate:

La aplicación de SpocNPV en dosis de 3,3 x 10<sup>12</sup> CI/ha, en una plantación de tomate infestado simultáneamente por *S. eridania* y *S. ochrea*, también logró una reducción del 78% de la población de ambas plagas. El control logrado por los insecticidas sintéticos excepto para la cyflutrina después de seis días fue en general mejor (Cuadro 8), que el obtenido con la preparación del virus. No obstante, podrían emplearse dosis

**Cuadro 6.** Efecto del SpocNPV sobre poblaciones de larvas de primer instar de *S. eridania* en camote var. Milagroso.

Tratamiento	Parcelas	Número de larvas/unidad de evaluación		
		1 día antes aplicación	3 días después aplicación	6 días después aplicación
SpocNPV	I	70	0	0
	II	21	0	0
	III	157	0	0
Testigo	IV	77	75	72

**Cuadro 7.** Efecto del SpocNPV sobre poblaciones de larvas de primer instar de *S. eridania* en camote var. Jonathan. Número de larvas/unidad de evaluación

Tratamiento	Parcelas	Número de larvas/unidad de evaluación		
		1 día antes aplicación	3 días después aplicación	6 días después aplicación
SpocNPV	I	176	0	0
	II	157	0	0
	III	164	0	0
Testigo	IV	212	212	212

**Cuadro 8.** Efecto del SpocNPV sobre larvas de primer instar de *S. eridania* y *S. ochrea* en tomate var. Cheff.

Tratamientos	% de reducción en las poblaciones plaga	
	3 días después aplicación	6 días después aplicación
SpocNPV	78,0	77,3
Clorpirifos	97,0	98,3
Permetrina	99,6	99,3
-cypermetrina	99,3	100,0
-cyflutrina	94,0	95,0
Cyflutrina	86,0	75,0

más altas del virus para lograr una tasa de protección similar para los dos tipos de productos. De hecho, la dosis evaluada en este experimento fue un poco inferior a la utilizada ( $4,3 \times 10^{12}$  CI/ha) en el experimento anterior, la cual provocó una reducción de 100% en las poblaciones de la plaga.

Con respecto a la naturaleza de la planta hospedante se ha señalado que ésta influye sobre la susceptibilidad de *Spodoptera* a los Nucleopoliedrovirus (Santiago-Alvarez y Ortiz-García 1992).

Sin embargo, los resultados obtenidos con los dos tipos de productos evaluados son en general similares. No obstante, el uso del producto biológico podrá permitir una mejor preservación de las poblaciones de parasitoides y depredadores que también participarán a la regulación de *Spodoptera* (Cisneros 1995, Moscardi 1997).

Los resultados obtenidos muestran el potencial del uso del SpocNPV en la zona de presencia de sus especies hospedantes. Debe destacarse que las técnicas desarrolladas para la producción (Shapiro 1986, Grzywacz *et al.* 1998) y la formulación (Young y Yearian 1986, Black *et al.* 1997) de NPV que afectan a otras especies de *Spodoptera*, podrían ser utilizadas para SpocNPV, lo que permitiría el uso de este nuevo virus en áreas mucho más extensas.

## Conclusiones

Se estableció por primera vez que las poblaciones naturales de *S. eridania* y *S. ochrea*, dos importantes plagas en Perú son afectadas por varios virus entomopatógenos de la familia *Baculoviridae*. Uno de los Nucleopoliedrovirus aislados, el SpocNPV, es capaz de infectar a ambas especies.

La producción y cuantificación de este virus fue sencillo, lo cual permite su evaluación tanto en condiciones de laboratorio como de campo. Los resultados muestran la potencialidad que tiene este patógeno, aún como formulación sencilla, para controlar a ambas especies de *Spodoptera*. Esto tiene gran importancia porque el uso de este microorganismo permitiría reducir la cantidad de insecticidas sintéticos utilizados para el control de *S. eridania* y *S. ochrea*.

## Literatura citada

- Alves, S. 1986. Controle microbiano de insetos. Brasil Ed. Manole. 407 p.
- Angeles I; Alcázar, J. 1995. Susceptibilidad de la polilla *Phthorimaea operculella* al virus PoGV. Revista Peruana de Entomología 38: 71-76.
- Betz, F. 1986. Registration of baculoviruses as pesticides. In Granados, RR; Federici, BA. Ed. The biology of baculoviruses. Boca Raton, Florida. vol.2. p. 203-222.
- Black, BC; Brennan, LA; Dierks, PM; Gard, IE. 1997. Commercialization of baculoviral insecticides. In Miller, LK. Ed. The baculoviruses. New York, Plenum. p. 341-388.
- Bohmfolk, GT. 1986. Practical factors influencing the utilization of baculoviruses as pesticides. In Granados, RR; Federici, BA. Ed. The biology of baculoviruses. Boca Raton, Florida. vol.2. p. 223-236.
- Brown, DC; Allen, JC; Bigwell, G. 1982. The use of a protein A conjugate in an indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) of four closely related Baculoviruses from *Spodoptera* species. J. Gen. Virol. 62:375-378.
- Bustillo, A. 1989. Utilización de agentes microbiológicos. In Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura. Estado actual y futuro. Andrews, K; Quezada, R. Ed. Honduras. 623 p.
- Cisneros, F. 1995. Control de plagas agrícolas. Lima. Perú. 313 p.
- Clark, MF; Adams, AM. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475-483.

- Cunningham, J.C. 1995. Baculoviruses as microbial insecticides. *In* Reuveni, R. Ed. Novel approaches to integrated pest management. Boca Raton, Florida, Lewis Publisher p. 261-292.
- Groner, A. 1986. Specificity and safety of baculoviruses. *In* Granados, R.R.; Federici, B.A. Ed. The biology of baculoviruses. Boca Raton, Florida, vol. 1. p. 177-202.
- Grzywacz, D.; Jones, K.A.; Moawad, G.; Cherry, A. 1998. The *in vivo* production of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol. Methods* 71(1):115-122.
- Huber, J. 1986. Use of baculoviruses in pest management programs. *In* Granados, R.R.; Federici, B.A. Ed. The biology of baculoviruses. Boca Raton, Florida, vol. 2. p. 181-202.
- Hunter FR; Crook, NE; Entwistle, PF. 1984. Viruses as pathogens for the control of insects. *In* Grainer, J.M.; Lynch, J.M. Ed. Microbial methods for environmental biotechnology. London, Academic Press. p. 323-347.
- ICTV. 2000. Family *Reoviridae*. *In* van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.; Wickner, R.B. Ed. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, USA, Academic Press. p.445-455,
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44 : 257-289.
- OMS/FAO. 1973. El empleo de virus para combatir plagas de insectos y vectores de enfermedades. Organización Mundial de la Salud. Ser. Inf. Téc. N° 531.5 p.
- Sánchez, G; Vergara, C. 1992. Plagas del cultivo de papa. Dpto. Entomología. Universidad Nacional Agraria La Molina. 97 p.
- Sánchez, G; Vergara, C. 1996. Plagas de hortalizas. Dpto. Entomología. Universidad Nacional Agraria La Molina. 263 p.
- Santiago-Alvarez, B.C.; Ortiz-García, R. 1992. The influence of host plant on the susceptibility of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep.: Noctuidae) larvae to *Spodoptera littoralis* NPV (*Baculoviridae*: Baculovirus). *J. Appl. Ent.* 114: 124 - 130.
- Shapiro, M. 1986. *In vivo* production of baculoviruses. *In* Granados, R.R.; Federici, B.A. Ed. The biology of baculoviruses. Boca Raton, Florida (USA), vol. 2. p. 31-62.
- Todd, E.L.; Poole, R.W. 1980. Keys and illustrations for the armyworm moths of the noctuid genus *Spodoptera* Guenée from the western hemisphere. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 73: 722-738.
- Young, S.Y.; Yearian, W.C. 1986. Formulation and application of baculoviruses. *In* Granados, R.R.; Federici, B.A. Ed. The biology of baculoviruses. Boca Raton, Florida. vol. 2. p. 157-180.
- Zeddani, J.L.; Luna, J.; Ravallec, M.; Lagnaoui, A. 1999. A nodal-like virus isolated from the sweetpotato pest *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lep.; Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 74:267-274.