

CAPÍTULO 1.

Reconocimiento de aislamientos nativos del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* en Colombia

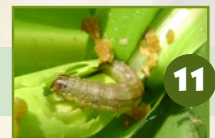
JULIANA GÓMEZ cPh.D., GLORIA BARRERA cPh.D.,
JUDITH GUEVARA cPh.D., LAURA VILLAMIZAR Ph.D.

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de alternativas para la implementación de programas de manejo integrado de plagas, los entomopatógenos y especialmente el grupo de los baculovirus, juegan un rol importante. En este sentido, un requisito fundamental es aislar las cepas patógenas candidatas con miras a seleccionar la más promisoría. En referencia a los nucleopoliedrovirus, está comprobado que su actividad insecticida varía dependiendo de su ubicación geográfica, sus características genéticas y el hospedero del cual fue aislado, entre otros (Lobo de Souza y Lecuona, 1996).

El nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (SfMNPV) ha sido aislado de poblaciones del insecto a lo largo del continente americano (Loh *et al.*, 1982; Shapiro *et al.*, 1991; Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999) y varios de estos virus han demostrado un alto potencial para ser usados como bioplaguicidas en programas de control del gusano cogollero (Williams *et al.*, 1999; Armenta *et al.*, 2003). En Brasil se evaluaron aislamientos de NPV para el control tanto de *S. frugiperda* como de *Spodoptera exigua* y se obtuvieron mortalidades de las dos especies del insecto, significativamente superiores que las obtenidas con los productos químicos (Guimarães *et al.*, 2003). Igualmente, se han adelantado trabajos en el desarrollo de formulaciones, como lo hizo Embrapa (Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria), que desarrolló un producto formulado como un polvo mojable a base de un aislamiento de este virus y estandarizó un sistema de producción a escala (Valicente y Da Costa, 1995).

En cuanto a productos registrados en el mundo, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) reporta actualmente cinco nucleopoliedrovirus para su venta como bioplaguicidas, de los cuales ninguno se recomienda para el control de *S. frugiperda* (EPA, 2010).



En Colombia, el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica no contaba con aislamientos nativos del virus, pero realizó algunos trabajos evaluando aislamientos foráneos de SfNPV alcanzando mortalidades de larvas de *S. frugiperda* superiores al 90% bajo condiciones de laboratorio (Villamizar *et al.*, 2009), lo que motivó la idea de buscar aislamientos colombianos que pudieran estar mejor adaptados a las condiciones agroclimáticas del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del insecto

Los insectos utilizados para la presente investigación fueron obtenidos a partir de la cría de *S. frugiperda* ubicada en el Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica (Mosquera, Cundinamarca) y establecida a partir de larvas colectadas en cultivos de maíz en el municipio de El Espinal (Tolima). Los insectos se mantuvieron en un cuarto a 26 ± 2 °C y 60% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 horas. Las larvas fueron manejadas de manera individual en recipientes plásticos de 25 mL, que contenían 15 mL de dieta artificial (Gómez *et al.*, 2010).

Colecta de larvas

La búsqueda de aislamientos de NPV se realizó durante el año 2008 en los departamentos de Córdoba, Tolima y Meta (Colombia) (Figura 2). En dichos departamentos se seleccionaron fincas con cultivos de maíz, sorgo, algodón y otros en los que se hubiera detectado la presencia de la plaga. En cada cultivo se observaron las plantas, las hojas y los cogollos en busca de las larvas de *S. frugiperda*, las cuales se ubicaron individualmente en vasos con dieta artificial. Las larvas muertas o que presentaban algún síntoma de infección viral se recogieron individualmente en tubos Eppendorf con 1 mL de solución salina estéril (Gómez *et al.*, 2010).

Las muestras se transportaron al Laboratorio de Control Biológico de Corpoica para su análisis y se mantuvieron en cuarentena en un

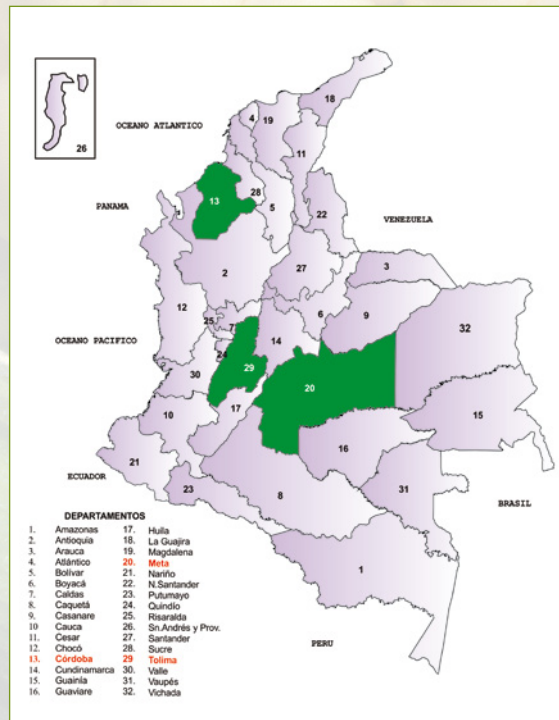


Figura 2. Departamentos de Colombia donde se realizaron los muestreos de larvas de *S. frugiperda* para búsqueda de aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus.

cuarto de bioensayos con las condiciones de temperatura y humedad mencionadas anteriormente. Los vasos con dieta y con los insectos se rotularon con los datos de los sitios de recolección (Gómez *et al.*, 2010).

Búsqueda de virus en las larvas colectadas

Las larvas se mantuvieron en cuarentena y se revisaron diariamente registrando todo cambio en su comportamiento o características morfológicas. Cada larva muerta o con síntoma de infección viral se maceró en solución salina y la suspensión obtenida se observó en el microscopio óptico (400x) para la búsqueda de los cuerpos de inclusión del virus, los cuales tienen una forma poliédrica característica (Gómez *et al.*, 2010).

Las muestras que presentaron posibles cuerpos de inclusión o sintomatología de infección viral se utilizaron para reproducir los síntomas de la enfermedad. Para ello se tomaron 100 µL de la muestra y se mezclaron con 100 µL de una solución que contenía sacarosa al 4% y un colorante azul de alimentos Tuska® al 1%. Dicha suspensión fue suministrada por vía oral a un grupo de larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio que sometido previamente a 24 horas de ayuno, empleando el método de la gota descrito por Hughes y Wood (1981).

Las larvas inoculadas fueron ubicadas individualmente en vasos con dieta artificial e incubadas en un cuarto de bioensayos a 26 ± 2 °C. A partir del quinto día de incubación se realizó una revisión diaria y se separaron aquellas larvas que presentaron sintomatología típica de la infección viral (coloración blanca lechosa a café clara, pérdida de turgencia y fragilidad del tegumento). Los aislamientos de nucleopoliedrovirus recuperados y multiplicados en las larvas de *S. frugiperda* se conservaron en solución salina estéril a -70 °C y fueron ingresados al Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Corpoica (Gómez *et al.*, 2010).

Producción y purificación viral

La producción de los virus a ser empleados en los bioensayos se realizó mediante la inoculación de larvas de *S. frugiperda* de tercer estadio, con suspensiones de cada uno de los aislamientos, empleando la misma metodología descrita anteriormente (Gómez *et al.*, 2010).

Para la purificación viral se empleó el método descrito por Valicente *et al.* (1989) modificado. Las larvas infectadas de cada aislamiento fueron homogeneizadas en un mortero estéril de porcelana con solución de sodio-dodecil-sulfóxido (SDS) al 0,1% estéril y posteriormente se filtraron por tres capas de velo suizo para retirar el tejido del insecto. El líquido se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante, el cual se centrifugó a 15.000 rpm por 30 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 mL de tampón Tris HCl 0,1 M pH 6,0 y se ubicó sobre un gradiente de sacarosa del 40% y 60%. Luego se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 minutos, se retiró la banda correspondiente al virus y se realizaron dos lavados con el mismo tampón. La suspensión purificada obtenida se guardó en congelación a -20 °C (Gómez *et al.*, 2010).



Estudio de la diversidad genética de los aislamientos

Con el propósito de determinar la diversidad genética de los aislamientos de NPV en Colombia se realizó un análisis mediante perfiles de restricción (REN). Para tal fin, se tomaron las muestras de los aislamientos de NPV nativos encontrados en el departamento de Córdoba (por ser el departamento en el que se encontró la mayor cantidad de larvas de *S. frugiperda* infectadas) y se realizó su purificación ajustando a una concentración de 1×10^8 CI/mL. A 100 μ L de suspensión viral se le adicionaron 100 μ L de carbonato de sodio (0,5 M), 50 μ L de SDS (10%) y 250 μ L de agua ultrapura. Las muestras se incubaron a 60 °C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 5.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue digerido con 50 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) a 50 °C por una hora. Para la extracción del ADN se realizaron dos pases por fenol equilibrado y un pase con cloroformo, utilizando centrifugaciones intermedias a 13.000 rpm. La precipitación del ADN se realizó con etanol absoluto frío y acetato de sodio 3 M. El ADN fue resuspendido en tampón TE (0,1%).

Para la comparación de los aislamientos se realizaron digestiones de ADN utilizando las enzimas de restricción *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Nde*I, *Bgl*II, *Sma*I, *Kpn*I. Una muestra de 2 μ g de ADN viral se mezcló con 10 U de cada una de las enzimas por 6 a 12 horas a 37 °C. Las reacciones de digestión se detuvieron con 4 μ l de solución tampón (azul de bromofenol 0,25% w/v, sacarosa 40% w/v) y se cargaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA; pH 8,0). Los fragmentos de ADN se separaron a 20 V por 10 a 24 horas. El ADN se visualizó bajo luz UV por tinción con bromuro de etidio (Chemi-Doc, BioRad, California, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se realizaron cinco muestreos de larvas de *S. frugiperda* para la búsqueda de aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus en los departamentos de Córdoba, Meta y Tolima (Colombia) durante los meses de enero a octubre de 2008. Se recolectaron en total 2.140 larvas en los tres departamentos a partir de diferentes cultivos (Tabla 1) (Gómez *et al.*, 2010).

Tabla 1. Número total de larvas colectadas en cada departamento y número de larvas según su causa de mortalidad (Gómez *et al.*, 2010).

Depto.	Larvas sanas	Larvas muertas				Total
		Hongos y parasitoides	Nucleo-poliedrovirus (NPV)	Granulovirus (GV)	Infección mixta (NPV y GV)	
CÓRDOBA	555	32	38 (Cultivo: Pastos)	15 (Cultivo: Pastos)	9 (Cultivo: Pastos)	649
TOLIMA	401	12	1 (Cultivo: Maíz)	0	0	414
META	758	315	4 (Cultivo: Sorgo)	0	0	1.077
TOTAL	1.714	359	43	15	9	2.140

Las larvas que murieron durante la cuarentena se analizaron mediante microscopía de luz, encontrando 43 muestras (2%) con cuerpos de inclusión poliédricos característicos de los NPV (Figura 3). El departamento con mayor incidencia viral fue Córdoba con 38 muestras positivas, seguido de Meta con cuatro y por último Tolima donde se encontró una sola muestra positiva. Sin embargo, las larvas se colectaron en el mismo sitio de muestreo en cada departamento, razón por la cual se seleccionó una sola muestra de cada sitio y se consideró como un aislamiento viral (Gómez *et al.*, 2010).

En total se aislaron tres nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* en Colombia, lo que corresponde a un 0,14% de ocurrencia de este entomopatógeno. Resultados similares fueron encontrados en Brasil, en donde se realizó un muestreo de larvas de *S. frugiperda* para la búsqueda de diferentes enemigos naturales del insecto y a partir de 14.000 larvas recolectadas se encontraron 21 aislamientos de nucleopoliedrovirus (0,15% de ocurrencia) (Valicente, 1989; Valicente y Barreto, 1999), lo cual sugiere que probablemente en poblaciones de campo del insecto en Colombia y Brasil hay una incidencia de nucleopoliedrovirus promedio de 0,14% (Gómez *et al.*, 2010).

Los tres aislamientos encontrados fueron codificados como NPV003 (Córdoba), NPV009 (Meta) y NPV011 (Tolima) (Figura 3).

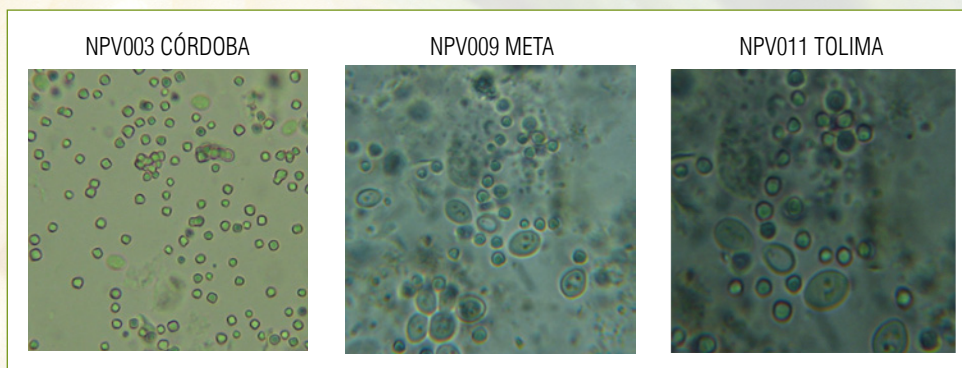


Figura 3. Cuerpos de inclusión de los aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* detectados en la hemolinfa de larvas infectadas por microscopía de luz (400X) (Gómez *et al.*, 2010).

Los síntomas característicos de las larvas infectadas por NPV fueron: pérdida de apetito y movilidad, cambio en la coloración desde blanco hasta café, fragilidad y ruptura del tegumento (Figura 4), síntomas descritos para este tipo de virus (Caballero *et al.*, 2001; Vásquez *et al.*, 2002). No obstante, dicha sintomatología solo fue evidente en las larvas mantenidas bajo condiciones de laboratorio, ya que en campo únicamente una larva colectada en el departamento de Córdoba presentó sintomatología típica de infección (Gómez *et al.*, 2010). Esta dificultad para encontrar larvas sintomáticas en campo fue mencionada por Laarif *et al.* (2003), quienes estudiaron la epidemiología de un baculovirus de *P. operculella* en Túnez concluyendo que los síntomas de infección exhibidos en campo son difíciles de encontrar y algunas larvas infectadas pueden ser completamente asintomáticas.



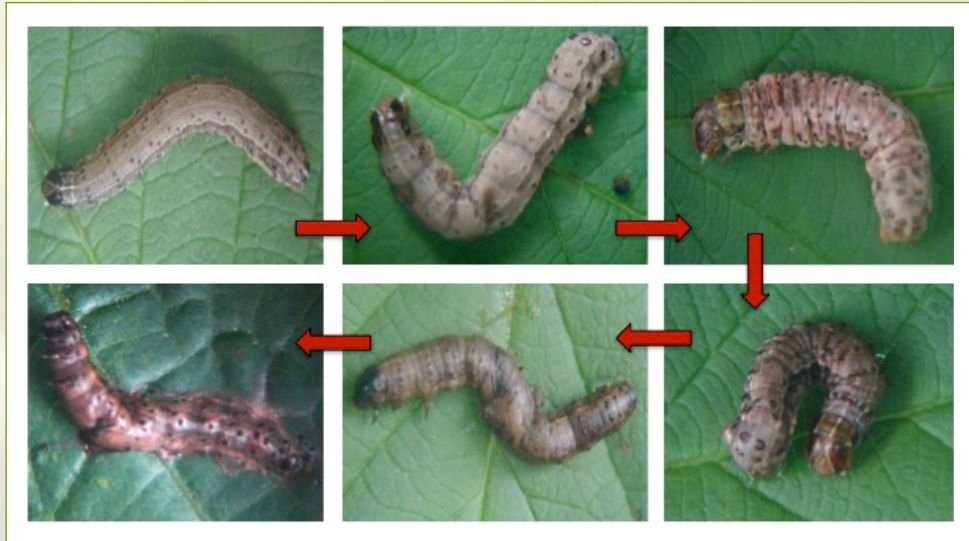


Figura 4. Sintomatología y progreso de la infección por nucleopoliedrovirus en larvas de *S. frugiperda*.

Por otra parte, y aunque no era el propósito del muestreo, en el departamento de Córdoba se encontraron larvas afectadas por un virus del género granulovirus (Tabla 1), lo cual se evidenció por la presencia de un color blanco lechoso y flacidez sin ruptura del tegumento. Al observar la hemolinfa en microscopio de luz se observaron pequeñas partículas con movimiento browniano que fueron confirmadas como granulovirus al observarlas en mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 5). En total se halló una incidencia de este agente viral de 0,04% (Gómez *et al.*, 2010).

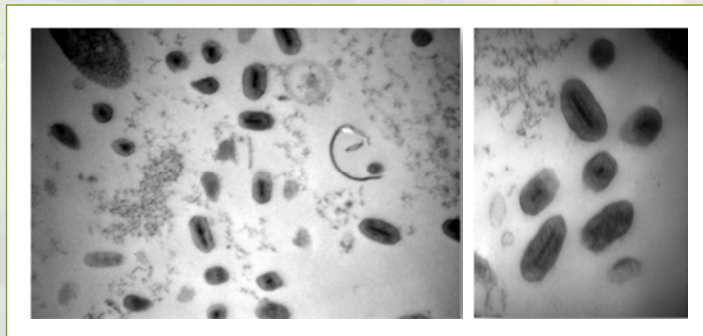


Figura 5. Micrografía de transmisión de los granulovirus encontrados en las muestras de *S. frugiperda*.

Adicionalmente, de las 24 larvas que presentaron infección por granulovirus nueve de ellas presentaron también infección con nucleopoliedrovirus, lo que sugiere una coinfección de estas muestras con los dos agentes virales (Tabla 1) (Gómez *et al.*, 2010). La presencia de dos especies virales puede resultar en cambios en el desarrollo normal

de la enfermedad, en algunos casos aumenta la mortalidad (efecto aditivo o sinérgico) y en otros se reduce (inhibición virus-virus) (Hackett *et al.*, 2000). El efecto sinérgico normalmente se debe a la expresión por parte del GV de una proteína de la familia de las metaloproteasas denominada ‘enhancin’, que aumenta la permeabilidad de la membrana peritrófica del insecto facilitando la entrada de los viriones en las células intestinales (Hoover *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 1999).

Por último, con respecto al análisis de la diversidad, los perfiles REN demostraron la existencia de cuatro perfiles con diferencias en el número y el tamaño de las bandas generadas a partir de los 38 aislamientos evaluados (Figura 6).

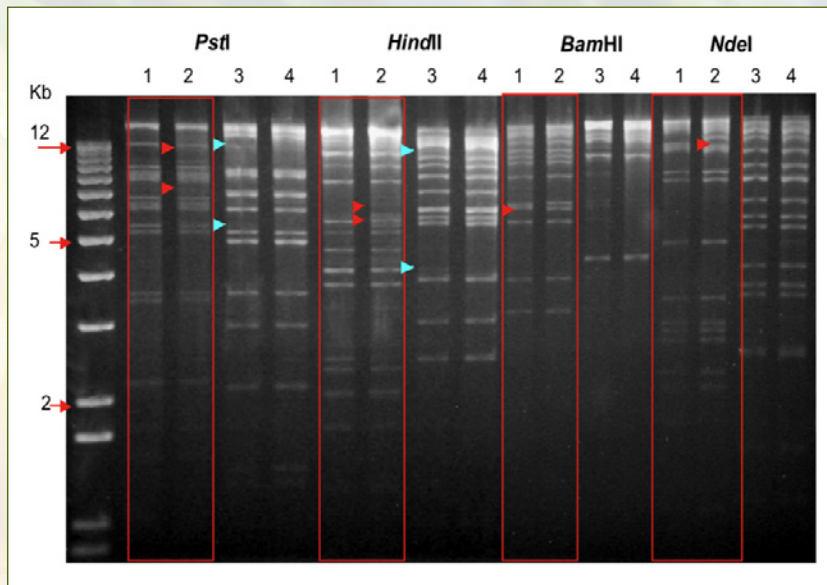


Figura 6. Perfiles de restricción con las enzimas *PstI*, *HindIII*, *BamHI* y *NdeI* de cuatro aislamientos colombianos de NPV de *S. frugiperda*. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular.

Los carriles 1 y 2 correspondieron al SfNPV, el cual se encontraba mezclado con el granulovirus, como se mencionó anteriormente, mientras que los carriles 3 y 4 correspondieron al SfNPV puro.

Las frecuencias de cada perfil fueron las siguientes: Perfil 1: 5,4%; Perfil 2: 2,7%; Perfil 3: 5,4%; Perfil 4: 86%. Esto indica que de las 38 muestras positivas para NPV colectadas en Córdoba 35 mostraron un perfil REN idéntico con las seis enzimas evaluadas (Perfil 4), sugiriendo que los 35 aislamientos son la misma cepa viral y demostrando que los virus aislados en un mismo sitio geográfico presentan una baja diversidad genética. Las diferencias con el otro perfil puro encontrado (Perfil 3) fueron muy pocas, lo cual es común entre estos aislamientos virales debido a mutaciones puntuales y deleciones e inserciones pequeñas (Chen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

CONCLUSIÓN

Se encontraron tres aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* en Colombia y un aislamiento de granulovirus. Los SfNPV encontrados mostraron forma poliédrica característica y causaron infección sobre larvas de *S. frugiperda*. Dichos aislamientos representan la base para el desarrollo de un bioplaguicida para el control de esta plaga.

Bibliografía

- ARMENTA, R.; MARTÍNEZ, A.; CHAPMAN, J.; MAGALLANES, R.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CAVE, R.; CISNEROS, J.; VALLE, J., CASTILLEJOS, V.; PENAGOS, D.; GARCÍA, L. F.; WILLIAMS, T.** (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: 649-661.
- BERRETTA, M.; RÍOS, M.; SCIOCCO DE CAP, A.** (1998). Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 280-282.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. España. 517 p.
- CABALLERO, P.; WILLIAMS, T.** (2008). Virus Entomopatógenos. En: Control Biológico de Plagas Agrícolas. Eds. J. A. Jacas y A. Urbaneja. Fascículo número 04. Phytoma, España. Noviembre - diciembre de 2008. pp. 121-136.
- CHEN, X.; ZHANG, W.; WONG, J.; LU, A.; MCCUTCHEN, B.; PRESNAIL, J.; HERRMANN, R.; DOLAN, M.; TINGEY, S.; HU, Z.; VLAK, J.** (2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 83, 673-684.
- DAUTHUILLE, D.; CROIZIER, G.; FERRÓN, P.** (1988). A Newly isolated Granulosis Virus from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in French Guiana. *L'Agromonie tropicale* 43 (1): 64-76
- DIEZ, S.; LORENZATTI, D.** (1986). Presencia de virus de Poliedrosis Nuclear y de Granulosis en poblaciones de *Spodoptera frugiperda* atacando soja en el área de la EEA Ol. IX Reunión Técnica Nacional de Soja. Resistencia, Chaco. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Oliveros. República Argentina.
- EPA.** (2010). Pesticides: Regulating Pesticides. Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>. (Consulta: marzo 21 de 2010).
- ESCRIBANO, A.; WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CAVE, R.; CHAPMAN, J. W.; CABALLERO, P.** (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): estructural, genetic and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology*. 92: 1079-1085.

- FUXA, J.** (1982). Prevalence of viral infections in populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in southeastern Louisiana. *Environmental Entomology* 11: 239-242.
- GÓMEZ, J.; GUEVARA, J.; BARRERA, G.; COTES, A.; VILLAMIZAR, L.** (2010). Aislamiento, identificación y caracterización de nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 63(2): 5511-5520.
- GUIMARÃES, F.; BESERRA, E.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; VARGAS-OSUNA, E.** (2003). Patogenicidade do nucleopolyhedrovirus (NPV) (Baculoviridae) isolados em larvas de *Spodoptera exigua* e *S. littoralis* sobre larvas de *S. frugiperda*. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (CATIE - Costa Rica)*. 70: 74-77.
- HACKETT, K.; BOORE, A.; DEMING, C.; BUCKLEY, E.; CAMP, M.; SHAPIRO, M.** (2000). *Helicoverpa armigera* granulovirus interference with progression of *H. zea* nucleopolyhedrovirus disease in *H. zea* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 75 (2): 99-106.
- HOOVER, K.; HUMPHRIES, M.; GENDRON, A.; SLAVICEK, J.** (2010). Impact of viral enhancer genes on potency of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic matrix. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104 (2): 150-152.
- HUGHES, P.; WOOD, H. A.** (1981). A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 154-159.
- LAARIF, A.; FATTOUCH, S.; ESSID, W.; MARZOUKI, N.; BEN SALAH, H.; BEN HAMMOUDA, M.** (2003). Epidemiological survey of *Phthorimaea operculella* granulosis virus in Tunisia. *Bulletin OEPP/EPPO* 37: 335-338.
- LAU, W. H.; SAJAP, A. S.; SAMAD, N.** (2006). A pathogenic insect virus, *Spodoptera litura* granulovirus, to the armyworm, *Spodoptera litura*. *Agro-Search* 11(1):35-41.
- LOBODESOUZA, M.; LECUONA, R.** (1996). Virus entomopatógenos. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas. *Talleres Gráficos Mariano Mas*. Buenos Aires, Argentina. pp. 73-86.
- LOH, L.; HAMM, J.; KAWANISHI, C.; HUANG, E.** (1982). Analysis of the *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome by restriction endonucleases and electron microscopy. *Journal of Virology* 44: 747-751.
- NARAYANAN, K.** (2002). Occurrence of granulosis virus of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological control of lepidopteran pests. Proceedings of the Symposium of Biological Control of Lepidopteran Pests, Bangalore – India.*
- PENG, J.; ZHONG, J.; GRANADOS, R.** (1999). A baculovirus enhancing alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology*. 45 (2): 159-166.
- SHAPIRO, D.; FUXA, J.; BRAYMER, H.; PASHLEY, D.** (1991). DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 58, 96-105.
- TANADA, Y.** (1959). Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Pathology*. 1: 215-231.
- VALICENTE, F.** (1989). Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. *Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*. 18: 119-130.
- VALICENTE, F.; BARRETO, M.** (1999). Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. *Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*. 28: 333-337.
- VALICENTE, F.; DA COSTA, E.** (1995). Controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), com o *Baculovirus spodoptera* aplicado via água de irrigação. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 24(1): 61-67.



- VALICENTE, F.; PEIXOTO, M.; PAIVA, E.; KITAJIMA, E.** (1989). Identificação e purificação de um vírus de poliedrose nuclear da-lagarta-de-cartucho *Spodoptera frugiperda*. Anais da Sociedade Entomológica Brasileira. 18: 71-82.
- VÁSQUEZ, J.; ZEDDAM, J.; TRESIERRA, A.** (2002). Control biológico del “Cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SFVPN, en Iquitos-Perú. Folia Amazónica. 13: (1-2) 25-39.
- VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; COTES, A.** (2009). Efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología 35 (2): 116-121.
- WANG, Y.; CHII, J.; ROH, J.; WOO, S.; JIN, B.; JE, Y.** (2008). Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura* granulovirus. Journal of Microbiology (Seoul, Korea) 46(6): 704 – 708.
- WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CISNEROS, J.; MARTÍNEZ, A. M.; CHAPMAN, J. W.; ROMAN, D. X. AND CAVE, R.** (1999). Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. Biological Control 14: 67-75.
- ZHANG, C.; MA, X.; GUO, Z.** (2005). Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. Virology 333, 190–199.