

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castello, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Estos trabajos abarcan las siguientes especialidades: Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares, que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Este trabajo fue realizado con una Beca en el Extranjero, 1976. Departamento de Ciencias Agrarias.

Fundación Juan March



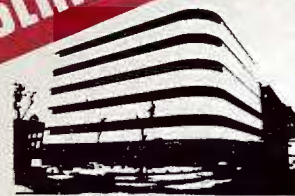
FJM-Uni 43-San
Virus de insectos : multiplicación,
Santiago-Alvarez, Cándido.
1031633



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de *Baculovirus*

Cándido Santiago-Alvarez

FJM

Uni-
43

San

43

Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de baculovirus/Cándido Santiago-Alvarez

Fundación Juan March
Serie Universitaria



43

Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de *Baculovirus*

Cándido Santiago-Alvarez



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

***La Fundación Juan March no se solidariza
necesariamente con las opiniones de los
autores cuyas obras publica.***

Depósito Legal: M - 38522-1977

I.S.B.N. 84 - 7075 - 069 - 0

Ibérica, Tarragona, 34.— Madrid-7

INDICE

	Página
I.— INTRODUCCION	9
I.2.— Los virus de insectos	11
I.2.1.— Clasificación	12
I.2.2.— Nomenclatura	13
I.2.3.— Importancia relativa de las virosis de insectos	13
I.2.4.— El género Baculovirus	14
I.2.4.1 Poliedrosis nucleares	14
I.2.4.1.1. Características del poliedro	16
I.2.4.1.2. La partícula viral	18
I.2.4.2.— Huéspedes y tejidos afectados	19
I.2.4.3.— Sintomatología	19
I.2.4.4.— Proceso infeccioso en lepidópteros	21
I.3.— Las poliedrosis nucleares en el control de plagas	24
I.3.1.— Selección de una poliedrosis nuclear para insecticida	26
I.3.2.— Multiplicación del virus en el laboratorio	29
I.3.3.— Formulaciones	30
I.3.4.— Métodos de aplicación	32
I.3.5.— Compatibilidad con otros insecticidas	32
I.3.6.— Factores que afectan la efectividad y persistencia de las nucleopoliedrosis	33
I.4.— Spodoptera littoralis	36
II.— MATERIALES Y METODOS	
II.1.— Multiplicación de Spodoptera littoralis	37
II.2.— Multiplicación y aislamientos del virus	37
II.3.— Materiales biológicos	39
II.4.— Bioensayos	40
II.5.— Tratamientos	41
III.— RESULTADOS	
III.1.— Respuesta de las larvas de Spodoptera littoralis a Bactospeine 16.000 y a las poliedrosis nucleares	42
III.2.— Acción conjunta de Bactospeine 16.000 y las poliedrosis sobre larvas L ₁ y L ₂	43
III.3.— Respuesta de las larvas de 3ª y 4ª edad	44
IV.— DISCUSION	45
BIBLIOGRAFIA, CUADROS Y GRAFICAS	48

VIRUS DE INSECTOS: MULTIPLICACION Y AISLAMIENTO
DE Baculovirus; COMPARACION DE SU ACTIVIDAD CON
LA DE UN PREPARADO COMERCIAL A BASE DE Bacillus
thuringiensis SOBRE Spodoptera littoralis (Lep.
Noctuidae).

El presente trabajo ha sido realizado gracias a una ayuda de la FUNDACION JUAN MARCH a la cual el autor desea expresar públicamente su agradecimiento. Asimismo, debo hacer constar mi gratitud a M. Hurpin, Directeur de la Station de Recherches de Lutte Biologique (INRA), La Miniere, que amablemente accedió a mi solicitud de estancia en el mencionado centro; a M. Burgerjon, director del trabajo y que sugirió el tema y de quien recibí orientación y ayuda para su desarrollo y a todas aquellas personas de la Station que de una manera u otra facilitaron la realización de este trabajo.

Finalmente debo mencionar a los Profesores M. Arroyo y A. Alfaro por su ayuda en la revisión del manuscrito y muy especialmente quiero agradecer a R. Albajes su inestimable ayuda en múltiples aspectos.

I.1.- INTRODUCCION

El uso indiscriminado de insecticidas de naturaleza química en los agrosistemas, ha originado la desaparición de parásitos, depredadores, polinizadores y otras formas de vida útil, con la consiguiente perturbación del equilibrio ecológico. A esto debe unirse la aparición entre los insectos de razas resistentes a los insecticidas que obligan a emplear dosis más elevadas, agravándose el problema y aumentando la contaminación ambiental. Tampoco debemos olvidar la elevada toxicidad de gran parte de los insecticidas químicos para los animales superiores y que muchos, al ser de difícil degradación, presentan problemas de residuos en aquéllos productos agrícolas de consumo directo por el hombre o animales domésticos, y de acumulación progresiva en las cadenas tróficas que llega a ser letal para uno o más eslabones de la misma.

Por todo esto, una de las preocupaciones más grandes de la Protección de Cultivos, es la puesta a punto de medios y métodos de lucha contra plagas que mantengan, y en la medida de lo posible restablezcan, el equilibrio ecológico en un principio existente en la Naturaleza, sin poner en peligro ninguna forma de vida. La propia

Naturaleza dispone de armas que, empleadas debidamente, contribuyen con eficacia a resolver los problemas causados por las plagas y su control químico. El empleo de parásitos y depredadores de insectos fitófagos (Lucha Macrobiológica) o de los microorganismos causantes de enfermedades a éstos (Lucha Microbiológica) forman en conjunto lo que se conoce por Lucha Biológica en su sentido más estricto.

La especificidad de muchos microorganismos es la característica más apreciable para su estudio con vistas a la aplicación práctica. Además, muchos de éstos, las bacterias y los virus principalmente, son susceptibles de preparación y aplicación como insecticidas convencionales, pudiéndose emplear conjuntamente con estos en programas de lucha integrada.

Los virus de insectos, concretamente las Poliedrosis Nucleares y Citoplásmicas y las Granulosis, presentan elevada especificidad contra especies o géneros concretos (SMITH, 1975), siendo muy virulentos para sus huéspedes e infinitamente menos peligrosos para otras formas de vida que los agentes químicos (HEIMPEL, 1971), motivos éstos por los que en los últimos 15 años se han intensificado los trabajos de investigación, tratando de desarrollar insecticidas virales para la lucha contra las especies de mayor incidencía agrícola o forestal.

A este respecto, las dificultades que presenta la lucha química contra los noctuidos, ha forzado la búsqueda de insecticidas biológicos, sobre todo en el área de las poliedrosis nucleares que suelen padecer estas especies. El presente trabajo tiene por objeto el estudio de la multiplicación de los virus de las poliedrosis nucleares y su preparación en forma pulverulenta, para su empleo como insecticidas, y en el ensayo comparativo de la actividad de estos productos con un "insecticida microbiológico" a base de la bacteria esporígena Bacillus thuringiensis Berl.

I.2.- LOS VIRUS DE INSECTOS

La primera alusión a una virosis de insectos identificable solamente por sintomatología externa, la hace en 1527 el poeta italiano VIDA en su poema sobre el gusano de seda, pero hasta mediado el siglo pasado no se reconocen los --- agentes causantes de las enfermedades viróticas por CORNELIA, MAESTRI y BOLLE (de STEINHAUS, 1956). Hoy existe un gran acúmulo de conocimientos sobre virus de insectos (MARAMOROSCH, 1.968; SMITH, 1967; SMITH, 1976, entre otras revisiones a las que hemos de remitir al lector para completar la brevedad de esta introducción). Es constante la descripción de nuevas virosis, conociéndose hasta el momento más de 400 virus pa

tógenos para gran número de especies en casi to dos los órdenes (SMITH, 1975), entre las que se citan más de 260 especies de interés agrícola, (FAO/OMS, 1974).

I.2.1.- Clasificación

En la actualidad para la clasificación de los virus se atiende a la composición y morfología de la partícula viral (WILDY, 1971) reconociéndose dos grandes grupos: a) Virus ADN y b) Virus ARN. Con los virus de insectos, una posterior división dentro de estos grupos se hace en base a si la partícula viral tiene una matriz proteica o es libre. Finalmente estos nuevos -- grupos se subdividen por caracteres morfológicos, fisiológicos y químicos (CANTWELL, 1974). Los virus de insectos conocidos hasta hoy se in cluyen en seis géneros, un grupo y un número in determinado que permanece sin clasificar (DAVID 1975).

En el cuadro Nº 1 se hace un resumen de la clasificación de los virus de insectos de acuerdo con BELLETT et al. (1973), CANTWELL (1974) y DAVID (1975). No obstante SMITH (1976) reconoce que aun se necesita profundizar en los métodos de caracterización de estas virosis, para establecer un sistema firme de clasificación, basado en propiedades fundamentales de la propia -- partícula viral: relaciones serológicas, tamaño

y forma de la partícula, su ultraestructura y el análisis bioquímico detallado del propio ácido nucleico.

I.2.2.- Nomenclatura

No existe un criterio muy definido en cuanto a la nomenclatura de las distintas virosis. Hasta el momento, el Comité Internacional de Nomenclatura de Virosis ha aprobado los nombres de Baculovirus para las Poliedrosis Nucleares y las Granulosis, e Iridovirus para el grupo de Virus Iridescientes (SMITH 1976), permaneciendo aun en uso los nombres asignados a las restantes virosis por autores que las han estudiado inicialmente, tal y como se indica en el Cuadro I.

I.2.3.- Importancia relativa de las virosis de insectos.

Todos los géneros de virus tienen al parecer grandes posibilidades de utilización práctica como insecticidas biológicos (DAVID 1975; --- STAIRS 1973), pero hasta el momento los mayores resultados se han alcanzado con el género Baculovirus, principalmente con las Poliedrosis Nucleares (STAIRS 1971) por las características que más adelante se comentarán y por la especificidad de su acción y su virulencia para sus huéspedes (SMITH 1975).

I.2.4.- El género Baculovirus

Las partículas virales de este grupo tienen forma de varilla, están compuestas de ADN de cadena doble, tienen simetría helicoidal y una matriz proteica (BELLETT et al., 1973, CANTWELL, 1974). Se desarrollan en el núcleo de las células atacadas (BERGOLD, 1963b, HUGER, 1963; SMITH, 1967).

El género lo componen dos subgrupos de virosis diferenciables por el tamaño de la matriz proteica y el número de viriones que ésta encierra. El subgrupo A son las Poliedrosis Nucleares, fácilmente reconocibles con el microscopio óptico y que pueden encerrar uno o varios viriones dependiendo de la cepa del virus (BERGOLD, 1963b, ---- HARRAP, 1972c, SMITH, 1967). El subgrupo B está integrado por las Granulosis cuyas dimensiones están en el límite de la resolución del microscopio óptico y sólo encierran un virión (HUGER, 1963; SMITH, 1967).

I.2.4.1.- Poliedrosis Nucleares.

La característica principal de este tipo de enfermedad es la presencia de gran número de cuerpos poliédricos, en los núcleos de las células afectadas, que son realmente pequeños cristales proteicos que engloban los viriones. El diámetro de los poliedros es variable con las especies y va desde 0,5 a 15 micras (BERGOLD, 1963b). A es-

tos poliedros se les puede considerar como un medio de protección de la partícula viral infectiva por su elevada resistencia a los tratamientos físicos y químicos, y conservar el poder infeccioso después de años de almacenamiento, (STEINHAUS,--- 1960). Una vez incorporadas las partículas virales en los poliedros no tienen posterior función infecciosa dentro de la misma larva huésped ----- (HARRAP y ROBERTSON, 1968).

La forma y tamaño de los poliedros es variable en las diferentes especies de insectos y aún dentro del mismo insecto, pero tienden a ser de idéntico tamaño en cada célula (SMITH, 1967). En el caso de Bombyx mori L. prevalece la forma dodecaédrica mientras que en Lymantria monacha las inclusiones son tetraédricas, en Hyphantria cunea se pueden dar dos tipos de inclusiones, hexaédricas y tetraédricas y en Porthetria dispar la forma es irregular (BERGOLD, 1963b).

Los poliedros son fácilmente visibles con el microscopio óptico, en campo oscuro o con contraste de fase, diferenciándose claramente de las gotas de grasa y otras partículas intracelulares -- por sus bordes afilados y esquinas angulosas. No obstante, para un diagnóstico más preciso debe recurrirse a la tinción del material a estudiar --- (WEISER y BRIGGS, 1971). La tinción más sencilla es la de Giemsa fijando el material por calor, per

maneciendo los poliedros sin teñir en contraste con la célula coloreada (SMITH 1967); si pre-viamente a la aplicación del colorante se trata la preparación con NaOH al 0,1 % los poliedros tomarán un color azul (WEISER y BRIGGS, 1971). Para estudio de dimensiones y otras caracterísitcas -- morfológicas de los poliedros liberados de los tejidos, resulta interesante la tinción de SMIRNOFF (1961), y para estudios histopatológicos la tin-ción histológica desarrollada por VAGO y AMARGIER (1963).

I.2.4.1.1.- Características del poliedro.

La verdadera naturaleza del poliedro y la --- identidad de la unidad infecciosa se reconoció -- con el microscopio electrónico. BERGOLD (1963 b) demostró que el poliedro tenía una estructura en red con una distribución cúbica de las moléculas proteicas que componen el cristal. Esta disposi-ción cúbica la originan unidades proteicas esféricas cada una de las cuales tiene seis puntos de contacto con las unidades vecinas. Recientemente HARRAP (1972 a) apoyó esta hipótesis, pero indica que la disposición cúbica se consigue con unida-des proteicas de seis ramas.

La composición en aminoácidos de la proteína poliedral es muy similar en todas las poliedrosis nucleares estudiadas e independientemente de si el poliedro deriva de un lepidóptero o himenópte-ro, encontrándose sólo diferencias cuantitativas

(BERGOLD, 1963b; KAWASE, 1964; SHIGEMATSU, y SUZUKI, 1971). Además en la composición de los cuerpos poliédricos entra el silicio (ESTES y FAUST, 1966, FAUST y ADAMS, 1966) confiriéndole al cristal propiedades fisico-químicas de marcada significación en el proceso infeccioso. Se han encontrado trazas de diversos elementos Fe, Mg, Cu, y Zn y existen muchos datos sobre la presencia de un ARN, probablemente mensajero, pero no hay completo acuerdo de si es una parte integral del poliedro o solamente un contaminante (PADHI y CHASE 1976).

Los cuerpos poliédricos son insolubles en agua y en disolventes orgánicos como el alcohol, éter, cloroformo o acetona. Sin embargo se disuelven en solución acuosa de NaOH, KOH, H₂SO₄ y ---- CH₃COOH. Tampoco son digeridos por proteínas como la papaína (a pH 8,3), la tripsina (a pH 6,8) o la pepsina (entre 3,3 y 4,0 de pH), pero sí por la pepsina a pH entre 2,0 y 2,9 y por la tripsina y papaína después de tratamiento con un álcali (de BERGOLD, 1963b).

Es preciso que se disuelvan los cuerpos poliédricos para que las partículas virales queden libres y provoquen la infección. Esta disolución se produce en el mesenteron de las larvas por --- efecto fundamentalmente de la composición alcalina de los jugos intestinales y no por una acción proteolítica (FAUST y ADAMS, 1966).

Se ha comprobado también la marcada influencia del pH del tubo digestivo y diversos agentes ruptores de enlaces hidrógeno (CROZIER y MENADIER 1972; EGAWA y SUMMERS, 1972; KAWANISHI et al. en 1972a).

I.2.4.1.2.- La partícula viral.

Las partículas virales tienen ADN en cantidades variables según las distintas enfermedades, pero tienen todas forma de varilla entre 20 y 50 nm de diámetro y unos 200 a 400 nm de longitud. Cada virión se compone de una masa central de ADN de cadena doble, que consta de subunidades dispuestas en forma helicoidal, y rodeada de una membrana llamada íntima, todo a su vez recubierto por otra membrana llamada de desarrollo (BERGOLD, --- 1963a). En líneas generales esta estructura se admite por todos los autores, aunque se pone en duda la existencia de la íntima como estructura independiente; así, HUGHES (1972), considera que realmente no se la puede diferenciar de la cápsida viral. A diferencia de las granulosis, la membrana de desarrollo, en las poliedrosis nucleares puede envolver a una o varias nucleocápsidas ---- (BERGOLD, 1963a; HARRAP, 1972; KAWAMOTO y ASAYAMA 1975) y el número total de nucleocápsidas en una envoltura depende de la especie huésped (BERGOLD 1963a) y de los diferentes tejidos y órganos en la misma especie (ARUGA et al. 1963).

I.2.4.2.- Huéspedes y tejidos afectados.

La inmensa mayoría de las Poliedrosis Nucleares descritas lo han sido sobre especies de lepidópteros, siguiéndoles en número las de Hymenópteros y Dípteros. Hay, además, citas relativas a Coleópteros, Ortópteros, Neurópteros y Trichópteros (DAVID, 1975) (ver cuadro nº1).

El mayor acúmulo de conocimientos lo tenemos en Lepidópteros e Hymenópteros, donde la enfermedad presenta una sintomatología similar, pero con marcada diferencia a nivel histopatológico. En Hymenópteros sólo atacan a los núcleos de las células epiteliales del mesenteron (SMITH, 1967), mientras que en Lepidópteros son susceptibles el cuerpo graso, epitelio traqueal, epidermis, células sanguíneas (STAIRS 1968) y ocasionalmente el epitelio del mesenteron. LAUDEHO y AMARGIER (1963) señalan una Poliedrosis nuclear de desarrollo en células del mesenteron de Plusia chalcites Esp. y recientemente KAWASE et al. (1973) han descrito una Poliedrosis Nuclear en las células columnares del mesenteron de Bombyx mori.

I.2.4.3.- Sintomatología.

No se puede dar una sintomatología general de todas las enfermedades producidas por Polie-

drosis Nucleares, pues los síntomas están estrechamente vinculados al tejido afectado (SMITH, 1967). Hay, no obstante, una serie de síntomas que más o menos se observan en todas las larvas afectadas, aunque es preciso en cada caso particular unir a la observación de los síntomas externos una posterior comprobación con el microscopio óptico.

En los primeros días de la infección, casi como norma general, las larvas de Lepidópteros no presentan otros síntomas que movimientos más lentos y pérdida del apetito (SMITH 1967); después, a medida que progresa la infección, se hinchan, se vuelven flácidas (VAIL y JAY 1973) y se hacen frágiles por lo que a la menor presión rompe el tegumento, liberando el contenido corporal saturado de poliedros (VAIL et al., 1972, AIZAWA 1963). Esta característica es común con las Granulosis y distingue a ambos tipos de enfermedad de las poliedrosis citoplásmicas (SMITH 1967).

Es característico en el estado final de la enfermedad, que las larvas busquen las partes más altas de la planta huésped o las tapas de las cajas de cría y mueran pendientes del último par de patas (SMITH 1967). No obstante este síntoma puede darse con bacteriosis, aunque en este caso las larvas muertas presentan aspecto momificado (RUPEREZ, 1962).

En ocasiones hay un cambio claro de color del tegumento que sirve para detectar la enfermedad, como por ejemplo en el gusano rosado, (Pectinophora gossypiella) que toma gradualmente un color blanquecino (VAIL et al., 1972), o el gusano de seda (RUPEREZ 1962) que adquiere una tonalidad amarilla. VAIL y HALL (1969) señalan un color blanquecino opaco para las larvas de Trichoplusia ni afectadas por su Poliedrosis, tipo de síntoma que nosotros hemos observado en larvas de Spodoptera littoralis.

I.2.4.4.- Proceso infeccioso en Lepidópteros.

En la naturaleza, un huésped susceptible puede infectarse por su virus patógeno de muy diversas formas: por ingestión del alimento contaminado por los cadáveres de otros insectos, (que es la forma más generalizada, según HARRAP, 1973) por transmisión "intra ovo" o "trans ovum" ---- (TANADA, 1963) de padres a la descendencia como se ha demostrado con varias especies, Colias eurytheme (MARTIGNONI y MILSTEAD, 1962) Heliothis zea (HAMM y YOUNG, 1974), Porthetria dispar (DOANE, 1969), Thymelicus lineola (SMIRNOFF et al. 1976), Prodenia litura (HARPAZ y SHAKED 1964), etc.; o por inyección intrahemocélica por los himenópteros parásitos (STAIRS 1968) que pican con su oviscapto sucesivamente a un huésped infectado y a otro sano. BEEGLE y OATMAN (1975) encontraron que un 60 % de las hembras de Hypo-

soter exiguae (Hymenoptera: Ichneumonidae) producen infección en un 6 % de los huéspedes sanos (Trichoplusia ni) expuestos al parasitismo alternativo con huéspedes sanos.

Todas las rutas de infección son diferentes unas de otras, pero los virus se desarrollan dentro del huésped de forma característica sin tener en cuenta la vía de penetración. En el caso de contaminación oral los poliedros ingeridos -- permanecen intactos hasta llegar al mesenteron, donde por efecto del contenido alcalino del mismo son disueltos, dejando libres las partículas virales que pasan a la hemolinfa y de ésta van a los núcleos de las células de los tejidos susceptibles (STAIRS 1968).

El paso intermedio para la invasión del hemocoele e infección de los otros tejidos parece ser la multiplicación del virus, sin incluirse en poliedros, en las células columnares del mesenteron como se ha visto en Aglais urticae ---- (HARRAP y ROBERTSON, 1968 ; HARRAP, 1970), Pseudaletia unipuncta (TANADA et al. 1975; TANADA y HEES, 1976), Tineola bisselliella (HUNTER et al. 1973). En estas últimas especies observaron los autores la formación de poliedros en las células columnares en mayor o menor extensión por lo que otra de las vías de invasión del hemocoele parece ser el espacio intercelular entre las células columnares.

La penetración de las nucleocápsidas en el citoplasma de las células columnares se realiza por la fusión de la membrana de desarrollo y la membrana de las microvillas (HARRAP, 1970; ----- KAWANISHI et al. 1972 b; TANADA et al. 1975). Una vez dentro del citoplasma, la nucleocápsida emigra al poro nuclear y descarga en éste su contenido, probablemente sólo ADN viral (TANADA y --- HESS, 1976). La envoltura de la nucleocápsida parece ser esencial para la invasión de las células columnares (HARRAP, 1970; TANADA y HESS, 1976) pero no para las células de otros tejidos ----- (TANADA y HESS, 1976).

La multiplicación de los virus en los núcleos de las diversas células sigue un modelo idéntico. El primer cambio citopático que se observa en las células afectadas es el hinchamiento del núcleo y la formación de una masa central Feulgen-positiva (SMITH 1967), éste es el estroma virogenético (XEROS, 1955 y 1956) que está relacionado con la síntesis del ADN viral dado que dentro de él aparecen varillas del virus aparentemente al azar (DALGARNO y DAVEY, 1973; TANADA y HESS, 1976).

Hay dos teorías para explicar el desarrollo de las partículas virales de las nucleopoliedrosis: la primera se debe a BERGOLD (1950) que señala que el desarrollo viral comienza con uno o varios cuerpos esféricos que crecen dentro de

una membrana y finalmente aparecen como varillas rectas y se envuelven con la íntima. La segunda debida a SMITH y XEROS (1953 y 1954) y XEROS --- (1955) considera que las partículas virales empiezan como finas varillas que se proyectan desde la masa cromática central de los núcleos infectados; estas varillas aumentan de tamaño y cuando están totalmente formadas quedan libres y empiezan a envolverse por las membranas. BIRD (1964) trabajando con una poliedrosis nuclear de Choristoneura fumiferana confirmó la teoría de SMITH y XEROS que parece la más ajustada a ese caso (SMITH, 1967).

Simultáneamente con el crecimiento y maduración de las varillas virales, se acumula gradualmente proteína en el núcleo. Esta proteína cristaliza alrededor de los viriones incluidos en su membrana de desarrollo y lo hace de forma característica y específica de la cepa del virus más que del huésped. La oclusión de los viriones en los poliedros es aleatoria y no afecta la regularidad de la matriz proteica cristalina en poliedros maduros (ENGSTROM y KILKSON, 1968). Aun en tejidos distintos del mesenteron no todas las partículas virales quedan ocluidas en los poliedros (DALGARNO y DAVEY, 1973).

I.3.- Las Poliedrosis Nucleares en el control de plagas.

El estudio de las causas de mortandad en --

campo de diversas especies, Pseudaletia unipuncta (TANADA 1961), Porthetria dispar (DOANE, 1969), Hemerocampa pseudotsugata (DAHLSTEN y THOMAS 1969), ponen en evidencia la aparición de epizootías naturales causadas por Poliedrosis Nucleares y el mantenimiento de la enfermedad en condiciones enzooticas. Las epizootías naturales proporcionan cierto grado de control de plagas, pero no son su suficientes para proteger el cultivo de los daños, (MAKSYMUK 1975) por lo que debe recurrirse a las aplicaciones en campo. No obstante, el conocimiento de los pri cipios que gobiernan las enzootías y su ecología pueden ayudar a aumentar el efecto de las nucleopoliedrosis sobre las poblaciones naturales de insectos (BURGES, 1973).

La aplicación de los productos virales en campo puede hacerse de dos formas: 1) Introducción dolas en la población y esperar que se dispersen por el ecosistema al igual que se hace con parásitos y depredadores (agentes de control densidad-dependientes) o 2) como un insecticida convencional (agentes de control densidad-independientes) (BAILEY, 1973; HALL, 1963).

La simple introducción del virus en la población entomológica es de acción lenta y sólo -- aplicable cuando se tolera elevados niveles de daño (IGNOFFO, 1968) por lo que es más aconsejable para los ecosistemas forestales que para los agrícolas; además se precisa conocer todos los factores abióticos y bióticos que influyan sobre la re

lación huésped-patógeno para el éxito de la aplicación. (TANDA, 1973).

Las nucleopoliedrosis aplicadas a nivel de insecticidas son de acción más rápida, aunque este tipo de aplicación representa un gran despilfarrero de material biológico (IGNOFFO, 1968). Desde el punto de vista agrícola este sería el método más eficaz, pero la puesta a punto de insecticidas virales con vistas a su aplicación práctica, requiere grandes esfuerzos de investigación para el desarrollo de técnicas, unas generales, como formulación de productos, modo de aplicación, etc y otras para cada virus en particular, como son la multiplicación del huésped, modo de obtención del virus según el insecto, ensayos de virulencia (BURGERJON, 1973).

I.3.1.- Selección de una poliedrosis nuclear para insecticida.

La característica más apreciable de una Poliedrosis Nuclear, desde el punto de vista ecológico, es que con frecuencia son o pueden ser específicos y, en su sentido más estricto, con multiplicación del virus en una sola especie huésped, aunque este hecho en la práctica limita las posibilidades económicas de explotación; de aquí el interés de disponer de virosis de especificidad dentro de la Clase Insecta para géneros, familias e incluso Ordenes (BURGERJON, 1973).

A estos efectos, BURGERJON et al. (1975) han definido un "Índice de Diferencia de Especificidad" para apreciar de forma cuantitativa la amplitud de las diferencias de actividad de dos virus frente a dos especies de insectos. Estos índices calculados para un gran número de virosis y de especies filogenéticamente relacionadas, se pueden tomar como indicación del espectro de acción de cada virus, lo que permitirá seleccionar el más virulento a nivel género o familia.

Con las virosis que se seleccionen a partir de este tipo de prospección se procederá al estudio minucioso de su especificidad global y selectividad, así como a la determinación del potencial de mutación (REICHELDERFER, 1975).

Además, antes de poner a punto una formulación aplicable en la práctica, debe realizarse un examen periódico de la integridad del inóculo y estudiar en el producto final no formulado: 1) el nivel de contaminación por bacterias extrañas, que no debe exceder de 10^7 col./gr.; 2) la ausencia de patógenos (v.gr. Salmonella, Shigella, Vibrio); inocuidad para ratas, determinada por inyección intra peritoneal y alimentación oral con métodos tipificados y 4) integridad de la materia viral, determinada por los test serológicos más sensibles, (de FALCON, 1976). Tampoco debe descuidarse la posible aparición de resistencia y deben realizarse estudios en este sentido (KALMAKOFF et al.

1977).

Por otra parte, la comprobación de que la poliedrosis nuclear seleccionada no es patógena para el hombre y otros vertebrados (FALCON, 1976) obligará, en un futuro, a esclarecer el papel de los anticuerpos encontrados en el hombre y otros vertebrados que reaccionan con las poliedrosis nucleares de insectos (TINSLEY, et al. 1973).

Todos los estudios habrán de aplicarse de momento, como ya se dijo, a grupos de insectos cuya importancia económica y cuyas dificultades de control por los métodos habituales de lucha química principalmente justifiquen plenamente el costoso desarrollo técnico requerido. Entre los lepidópteros, la familia Noctuidae es la que más atención esté recibiendo para el desarrollo de insecticidas virales a base de poliedrosis nucleares con amplio espectro de acción.

La FAO ha propuesto una lista de nucleopoliedrosis sobre las que se recomienda intensificar su estudio y estimular el desarrollo de nuevos insecticidas aplicables en control integrado. Estas nucleopoliedrosis son: 1) Virus del complejo Spodoptera que incluye especies tan importantes como littoralis, exigua, frugiperda, litura, y exempta. En el momento actual incluye un complejo de virus del que se espera conseguir un producto microbiano efectivo para todas las especies del género. 2) Virus del complejo Heliothis: armigera, zea y virescens

3) Virus de Plusiinae v.gr. Trichoplusia ni, Plusia sp. y Pseudoplusia sp. y 4) La poliedrosis nuclear de Autographa californica que tiene infectividad cruzada para géneros de diversas familias de lepidópteros (de DAVID, 1975). (+)

I.3.2.- Multiplicación del virus en el laboratorio

Los virus de insectos y en particular las poliedrosis nucleares se multiplican "in vivo" sobre su huésped e incluso "in vitro" sobre cultivos celulares. En la literatura existen datos relativos a este método de multiplicación (QUIOT, et al. 1970; VAIL, et al. 1973 entre otros) que señalan la obtención de poliedrosis nucleares virulentas y recientemente IGNOFFO et al. (1974) en bioensayos de laboratorio y campo han demostrado que las nucleopoliedrosis de Autographa y Trichoplusia producidas "in vitro" eran tan efectivas como las producidas "in vivo".

La multiplicación sobre cultivos celulares presenta ventajas respecto a la multiplicación -- "in vivo", pues los tejidos cultivados están relativamente libres de biotipos secundarios, pueden ser almacenados, regulados fácilmente y su coste es menor que el de los sistemas "in vivo". No obstante, antes de su empleo a escala comercial ----

(+) Este orden no indica prioridades

(IGNOFFO y HINK 1971) deben perfeccionarse en varios aspectos: 1) Desarrollando una línea celular prolífica, capaz de producir gran número de unidades infecciosas rápidamente. 2) Las células deben ser susceptibles a los tipos de virus que puedan interesar. 3) Hay que simplificar los medios de cultivo de tejidos para rebajar su coste y 4) Desarrollar una tecnología de producción a gran escala que permita la multiplicación sistemática, continua y segura.

Hoy por hoy, la producción a gran escala se hace "in vivo" empleándose larvas de las especies huésped o alguna próxima que presente una susceptibilidad al virus similar a la de su propio huésped. Los insectos se crían en cautividad sobre un medio artificial o una planta huésped con metodología variable según la especie.

I.3.3.- Formulaciones.

Una vez obtenidas las poliedrosis por un método adecuado a cada caso, se preparan en forma de insecticida convencional agregándole diversos agentes mojantes, de extensión, adherentes, controladores de viscosidad, antiespumantes, antieva^uporantes, protectores de rayos ultravioletas, tam^uponadores de pH, etc. (ANGUS y LUTHY, 1971, ---- MAKSYMIUK y NEISSES, 1975, STELZER et al. 1975; YENDOL y HAMLEN, 1973) que aumentan la eficacia del tratamiento.

Estos ingredientes deben ser puros y químicamente definidos para evitar que la formulación -- sea medio favorable al crecimiento de microorganismos extraños capaces de infectar la formulación o de producir toxinas (MAKSYMIUK, 1975).

La forma más corriente de empleo de las nucleopoliedrosis es como pulverización de suspensiones acuosas. No son de gran uso ni las emulsiones ni como espolvoreo (MAKSYMIUK, 1975). Para aumentar la efectividad se están ensayando actualmente formulaciones tipo cebo a base de mezclar el virus con materiales de fácil consumo y apetitivos. MONTROYA et al. fueron los primeros en estudiar este tipo de formulaciones con las nucleopoliedrosis de Heliothis. La mezcla de esa poliedrosis con aceite de semilla de algodón es el cebo más prometedor contra Heliothis sp. (Mc LAUGHLIN et al. 1971) pues aumenta el consumo y por ende se acelera el desarrollo de la enfermedad.

Desgraciadamente, muchos de los materiales que estimulan el consumo del cebo no son específicos, y especies distintas de la que queremos combatir pueden comer también en la formulación cebo; no obstante, los insectos no susceptibles proporcionan un vehículo para la dispersión del virus (ANDREWS, 1975).

Para aumentar la persistencia de los productos virales en campo se ha empleado la técnica del microencapsulado con microcápsulas de etil ce

celulosa (YENDOL y HAMLEN, 1971) e IGNOFFO y ---- BATZER (1971) vieron que la microencapsulación de las nucleopoliedrosis de Heliothis aumentaban su persistencia, aunque combinaciones de virus no en capsulados con coadyuvantes de extensión eran tan persistentes como los virus encapsulados. Este es uno de los puntos que más atención está recibiendo hoy de los investigadores.

I.3.4.- Métodos de aplicación.

Los insecticidas de tipo microbiológico son susceptibles de aplicación por todos los métodos conocidos en una aplicación fitosanitaria corriente: con pulverizadores de mano, a bajo y ultrabajo volumen con avionetas o helicópteros (BOVING, et al. 1971). El equipo de aplicación debe ser adecuado para proporcionar una suspensión uniforme del virus y un tamaño óptimo de gotas para obtener una perfecta cobertura y minimizar la deriva (MAKSYMIUK, 1975). El conocimiento exacto de la biología, comportamiento y fenología de la plaga son fundamentales para el éxito de todo tratamiento con poliedrosis nucleares (de FALCON 1976).

I.3.5.- Compatibilidad con otros insecticidas.

El conocimiento actual en este sentido no es del todo completo, disponiéndose de datos que ponen en evidencia las posibilidades de empleo conjunto de poliedrosis e insecticidas químicos en

programas de lucha integrada. IGNOFFO y MONTOYA (1966), en un ensayo de compatibilidad de la nucleopoliedrosis de Heliothis con endrin, DDT, toxafeno, carbaril y metilparation, encontraron que sólo este último inactivaba el virus.

Con el efecto de los insecticidas químicos puede activarse el desarrollo de epizootías severas y la combinación de aquéllos con los microorganismos patógenos puede ser un medio eficaz para solucionar problemas de razas resistentes a los insecticidas (BENZ, 1971).

I.3.6.- Factores que afectan la efectividad y persistencia de las nucleopoliedrosis.

La eficacia de los tratamientos en campo con nucleopoliedrosis se puede ver afectada por las temperaturas extremas, la lluvia, la luz, el pH, y las interacciones del parásito con la planta huésped.

Se tienen bastantes datos, de laboratorio y campo, sobre la inactivación de las poliedrosis nucleares por efecto de la exposición a la luz poco después de su aplicación y los conocimientos actuales señalan como causa principal de esta inactivación a los rayos ultravioletas (YENDOL y HAMLEN, 1973). No obstante, son más resistentes a esta inactivación las poliedrosis que proceden de la descomposición de insectos muertos o bien los depósitos de virus aplicados con materiales

que les den color obscuro (JAQUES, 1975).

Por ensayos de laboratorio se sabe que las temperaturas normales de campo (10-30°C) no inhiben la actividad o desarrollo viral en las larvas enfermas y que la exposición continuada a altas temperaturas (35-45°C) puede afectar la estabilidad del virus e inhibir su multiplicación. En este sentido, los estudios de estabilidad térmica de los virus se encaminan a establecer su capacidad de supervivencia bajo condiciones de temperaturas los más parecidas a las que se encuentran en el campo, (de IGNOFFO, 1968). La temperatura también tiene su efecto en la relación huésped-parásito y por eso es difícil diferenciar entre la acción de la temperatura sobre el patógeno y sobre la actividad del insecto. Las temperaturas extremas en uno u otro sentido pueden afectar la ingestión de alimentos y si estas temperaturas se prolongan por periodos de tiempo largos tendrán clara incidencia sobre la enfermedad virótica --- (de IGNOFFO, 1968).

La lluvia no afecta directamente la actividad de los virus lavando sus depósitos en el follaje. No obstante, JAQUES (1967a) cree que puede actuar indirectamente humidificando, con lo que pasan a ser más susceptibles a la inactivación por rayos ultravioletas, reduciéndose su persistencia efectiva.

Por otros lado, bajo condiciones epizooticas

o en aplicaciones repetidas, gran cantidad de los virus caen al suelo por goteo de los cadáveres de los insectos muertos o por efecto de la lluvia, reteniendo aquél la infectividad durante periodos de tiempo más o menos largos (JAQUES, 1967b). Se sabe que las partículas del suelo absorben las poliedrosis nucleares (JAQUES, 1975), por lo que no son fácilmente eliminables de las capas superiores del suelo por la lluvia o agua de riego y así contaminan el follaje cuando el viento o la lluvia lo salpica. Este tipo de dispersión es indudablemente importante para insectos que se alimentan de hojas próximas al suelo, pero no tanto para hojas situadas a cierta altura (YENDOL y HAMLEN, 1973).

TANADA y OMI (1974) encuentran que en un ecosistema de alfalfa, cinco virosis pertenecientes a los tres grupos de virus de partícula oculta, patógenos para cinco especies de insectos: Auto-grapha californica, Colias eurytheme, Pseudaletia unipuncta, Trichoplusia ni y Spodoptera exigua persisten en el suelo, en el follaje y en los hués

pedes alternativos.

Todo indica que los virus de insectos han estado presentes en los campos y en las cosechas recogidas durante muchos años. No se sabe que la exposición de los virus a diferentes condiciones ambientales durante tan largos periodos de tiempo haya alterado su espectro de huéspedes. Además, su

amplia distribución sugiere que la humanidad y los animales han tenido una larga historia de exposición a los virus por contacto directo y a través de los alimentos sin que nunca se hayan encontrado efectos nocivos que le sean atribuibles --- (DAVID, 1975; JAQUES, 1975). Por todo ello se considera que el incremento de las poliedrosis nucleares no producirá ningún perjuicio a los mamíferos y que en términos ecológicos han de ser productos muy adecuados.

I.4.- Spodoptera littoralis

Es una especie muy polífaga extendida por toda el área mediterránea y que causa considerables daños en cultivos hortícolas, algodón, tabaco, maíz, alfalfa, etc.. No es fácil el control químico de esta especie, además de que la aparición de razas resistentes (BROWN, 1968) ha agravado el problema tanto, que es necesario la puesta a punto de métodos de lucha biológica.

Un Baculovirus de poliedros nucleares ----- (ABUL-NASR, 1956) y el Bacillus thuringiensis se consideran como posibles componentes de un programa de lucha biológica. El presente trabajo tiene por objeto el estudio comparativo de la actividad de estos dos tipos de productos.

II.- MATERIALES Y METODOS

II.1.- Multiplificación de Spodoptera littoralis.

Se siguieron método y medio desarrollados por POITOUT y BUES (1970; 1972; y 1974) para noctuidos. La composición de dicho medio por kg. es la siguiente: agua destilada, 780 ml.; agar, 18 grs, sémola de maíz, 128 gr.; germen de trigo, 32 gr.; levadura de cerveza, 34 gr.; ac.benzoico, 2,5gr.; ac. ascórbico, 4,5 gr.; nipagina, 1,1 gr.; aldehído fórmico, 0,5 ml.; caseína 14 gr.; VDRH (complejo vitamínico), 5 gr.

Este medio es susceptible de modificaciones y así, para el cultivo de permanencia de S.littoralis se cambia la sémola de maíz por igual cantidad de polvo de alfalfa. El medio se reparte en cajas de plástico de 20.14.14 cm. que posteriormente se infestan con unas 200 larvas neonatas. Cuando las larvas llegan al último estado de desarrollo se facilita la crisalidación introduciendo las en cajas con turba humedecida para que se entierran y pupen. Todo el desarrollo de la especie se hace a 25°C y 85 % de H.R. aproximadamente.

II.2.- Multiplificación y aislamiento del virus.

Para la multiplicación del virus se reparte el medio de POITOUT y BUES en bandejas de 36.28.1,5 cm. eliminando de su composición el aldehído fórmico. Antes de que se solidifique el medio se introduce, dejándole que apoye en el fondo de

la bandeja, un armazón rígido, compuesto por láminas de plástico entrecruzadas que forman celdas rectangulares. Las dimensiones de la celda están relacionadas con el tamaño de las larvas que vamos a emplear para la multiplicación del virus. En el caso de S. littoralis, son de 2.2.2,5 cm.

Con un aplicador apropiado se infecta la superficie del medio dentro de cada celda a razón de 1.700 polied./mm²; una vez secas las celdas se introduce una larva de penúltimo estado por celda. Todo el conjunto se cubre con una placa de -- plástico agujereada en coincidencia con las celdas y todas las bandejas así tratadas se dejan a la temperatura de evolución de la especie. A los cuatro días del tratamiento se hacen observaciones retirándose las larvas muertas que se conservan a -20 °C hasta reunir un número suficientemente grande de cadáveres para obtener un preparado viral con alta titulación.

Para el aislamiento de los poliedros y su posterior preparación en forma de polvo, se sigue el método de DULMAGE et al. (1970) que no emplea la centrifugación. Todos los cadáveres se trituran en agua destilada, filtrándose el producto obtenido a través de una malla muy fina para eliminar cápsulas cefálicas, etc.. Del filtrado se determina su riqueza en poliedros por conteo con la célula de MALASSEZ lo que nos dará una --- aproximación de la titulación final del polvo que preparemos.

El resto del proceso es como sigue: se adicionan seis gramos de lactosa por cada 100 ml. de filtrado y se agita la mezcla durante 30 minutos; luego se añaden, removiendo, cuatro volúmenes de acetona y se prosigue la agitación durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se deja reposar durante 10 minutos. Toda la mezcla se filtra por aspiración con un filtro de fibra de vidrio que deja pasar $0,7 \mu\text{m}$ (Ref.:papel de fibra de cristal WATHMAN GF/F). El residuo que queda sobre el filtro se resuspende en acetona, se agita y filtra, repitiendo el proceso tres veces. El residuo de la tercera filtración se pasa a un recipiente y se deja secar a temperatura ambiente y en la obscuridad; una vez seco, se hace la determinación del número de poliedros por gramo de polvo empleándose la célula de MALASSEZ. El preparado obtenido, después de titulado se guarda a 5°C con su correspondiente etiquetación.

De todos los preparados se determina el número de bacterias contaminantes, que no deben exceder de 10^7 col. por gr., debiendo estar ausente de patógenos (Salmonella, Shigella, Vibrio, etc.), a parte de la determinación de su inocuidad para animales superiores.

II.3.- Materiales biológicos

En nuestros ensayos hemos empleado un producto comercial a base de Bacillus thuringiensis, --

"Bactospeine" 16.000 U.I. Anagasta kuehniella/mgr P.M. (Rhon-Poulenc; muestra de 25-5-75) y dos preparados virales de laboratorio de los que se reseña su titulación y la especie huésped empleada para su multiplicación:

- 1) Poliedrosis nuclear de Spodoptera littoralis (cepa de Marruecos) multiplicada sobre la misma especie con un título de 20.10^9 pol./gr. (Registro de laboratorio SL.31.75).
- 2) Poliedrosis nuclear de Autographa californica (de procedencia americana, BURGERJON et al. 1975) multiplicada sobre Trichoplusia ni con un título de 26.10^9 pol./gr. (registro de laboratorio ACTN.15.74).

II.4.- Bioensayos

Los ensayos se hacen con larvas neonatas L₁ a las que se mantiene en contacto con el alimento tratado durante dos estados consecutivos, L₁ y L₂ anotándose a intervalos de tiempo regulares el número de individuos muertos en cada estado. Las lecturas comienzan dos días después del tratamiento y se terminan, bien cuando todas las larvas de una dosis han muerto, o cuando alcanzan el estado L₃, pasándolas entonces a cajas con medio no tratado para conseguir su desarrollo a estado adulto.

Otros ensayos se hicieron a partir de larvas de tercera edad L₃, teniéndolas en contacto con el medio tratado también durante dos estados con-

secutivos, L₃ y L₄, haciéndose idénticas anotaciones que en el caso anterior y pasando las larvas que alcanzan el estado L₅ a medio no tratado.

II.5.- Tratamientos.

Se utilizan cajas de poliestireno de 41 mm. de diámetro y 11 mm. de altura a las que se añade 2 ml. de medio de POITOUT y BUES, esta vez sin aldehído fórmico. El preparado bacteriano y los preparados virales se suspenden en agua con un mojante agrícola (Novemol 2 %) y se pulverizan sobre el medio con una torre de tratamiento como la descrita por BURGERJON (1956), que proporciona una dispersión homogénea y deja un depósito de cantidad conocida sobre la superficie tratada. A la pulverización de 10 ml. de una suspensión cualquiera corresponde el depósito equivalente de 0,005 ml. de dicha suspensión por cm² de superficie --- de medio tratada.

En cada ensayo se emplearon cuatro dosis de cada producto y por cada dosis cuatro repeticiones con 10 larvas por repetición. El testigo consistía en cajas con medio no tratado, dado que se sabe por anteriores ensayos que el mojante no tiene efecto alguno sobre la especie empleada en el bioensayo.

Para ver el efecto conjunto de B. thuringiensis y las poliedrosis nucleares, se hicieron mezclas de ambos productos a distintas dosis procediéndose en todo como en el caso descrito arriba.

III.- RESULTADOS

III.1.- Respuesta de las larvas L₁ y L₂ de *S.littoralis* a Bactospeine 16.000 y a las poliedrosis nucleares.

En el cuadro número 2 se expresan las dosis de los distintos productos empleados, la mortalidad, acumulada en los estados larvarios L₁ y L₂ y la TL₅₀ (tiempo letal para conseguir el 50% de -- mortalidad). Se ha tenido en cuenta la mortalidad de los testigos según la fórmula de ABBOTT (1925).

En las nueve repeticiones del bioensayo la respuesta de las larvas de *S.littoralis* era más uniforme a su poliedrosis que a Bactospeine ---- 16.000 y a la poliedrosis de *Autographa californica*. Sin embargo, la acción de *Bacillus thuringiensis* se revela más rápida que la de las virosis, notándose mortalidad en razón directa con la dosis a las 48 h. del tratamiento, momento en que se inician los controles (fig.1). Con las poliedrosis no aparece mortalidad hasta cuatro días -- después del tratamiento (fig.2) lo que indica que este es el tiempo mínimo para el desarrollo de la infección a la temperatura del experimento.

Las CL₅₀ (concentración letal 50 %) calculadas gráficamente con papel mortandad Probit-log. dosis (en la fig.3 se ha utilizado papel milimetrado corriente con doble escala logarítmica), arrojan valores de 5,2 mgr. para Bactospeine ----

16.000 , 0,031 mgr. para la poliedrosis propia de S. littoralis (SL 31.75) equivalentes a 3,1 pol. mm² y 3,7 mgr. para la poliedrosis de A. californica (ACTN 15.74) equivalentes a 495,5, pol.mm². La simple comparación de estos valores pone en evidencia que la poliedrosis propia es 100 veces más activa que la de A. californica y 150 veces más activa que Bactospeine 16.000.

En lo que respecta al valor de las TL₅₀ hay marcadas diferencias entre Bactospeine 16.000 y las virosis y entre éstas a su vez. Para Bactospeine 16.000 el valor medio de la TL₅₀ a la dosis más elevada es de 2,6 días. Con las nucleopoliedrosis, este valor está en relación inversa con las dosis variando en la nucleopoliedrosis propia entre 9,6 días y 6,7 días y en la de A. californica entre 11,2 y 8,9 días. El periodo de tiempo durante el que se observa mortalidad con B. thuringiensis es de quince días al igual que con las nucleopoliedrosis de Autographa californica notándose que con las nucleopoliedrosis propia este valor se va reduciendo con la dosis.(fig.2).

III.2.- Acción conjunta de Bactospeine 16.000 y las poliedrosis sobre larvas L₁ y L₂.

En el cuadro número 3 se indican las dosis de mezcla de Bactospeine 16.000 con cada una de las poliedrosis nucleares y el porcentaje de mortalidad obtenido que se compara con los valores de cada componente individual. La combinación Bac

tospeine 16.000 y la poliedrosis propia supera en todas las dosis el valor del Bactospeine 16.000, pero no el de la poliedrosis, excepto a las dosis más bajas. Por el contrario, la combinación Bactospeine 16.000 y la poliedrosis de A. californica supera en muy baja proporción el valor de ambas componentes por separado excepto a las dosis más bajas que se mantiene por debajo de las dos. El gráfico nº 4 pone en evidencia que no hay efecto sinérgico en la combinación B. thuringiensis y las poliedrosis nucleares.

Lo que se mejora con la combinación es el tiempo de mortalidad, notándose un valor alto de ésta con todas las dosis de la combinación a las 48 h. del tratamiento y reduciéndose las TL₅₀ con respecto a las del virus (fig.5).

III.3.- Respuesta de las larvas de 3ª y 4ª edad.

Con estas larvas se hizo un único bioensayo que consideramos preliminar, pero cuyos resultados nos indican la mayor resistencia de estas larvas tanto a Bactospeine 16.000 como a las correspondientes virosis. En el cuadro nº 4 se reflejan las dosis empleadas y los resultados obtenidos. Dosis cuatro veces superior de Bactospeine ----- 16.000, no son suficientes para conseguir una clara respuesta de S. littoralis a B. thuringiensis en los estados larvarios tercero y cuarto. Con las nucleopoliedrosis propia a dosis 25 veces superiores se consigue una respuesta muy uniforme

que nos permite orientarnos en la posible CL_{50} para este producto en los estados larvarios comentados; por determinación gráfica se obtiene un valor de 3,35 mgr. equivalentes a 335 pol. mm². Con la nucleopoliedrosis de A. californica a dosis -- 125 veces superiores a las empleadas para los dos primeros estados larvarios no se consigue respuesta alguna.

La combinación de Bactospeine 16.000 y las nucleopoliedrosis no dan mejores resultados que la virosis propia sola (cuadro nº 5).

IV.- DISCUSION

La poliedrosis nuclear de Autographa californica presenta infectividad cruzada para diversas especies de lepidópteros (VAIL et al. 1971; VAIL et al. 1973) y se considera la posibilidad de desarrollar, a base de ella, un insecticida viral de amplio espectro. No obstante, BURGERJON et al. (1975) han puesto en evidencia que para la lucha biológica contra Mamestra brassicae y Scotia segetum tienen menos interés que las respectivas poliedrosis propias.

Nuestros resultados sobre S. littoralis, comparando la actividad de su propia poliedrosis a la de A. californica, se alinean a los presentados por BURGERJON et al. para dos especies de noctuidos de tan gran importancia en Europa como los ya citados más arriba. La poliedrosis de S.litto-

ralis es 100 veces más activa que la de A. californica, lo que justifica emprender estudios sobre aquélla para el desarrollo de un insecticida propio que sea aplicable a programas de lucha biológica contra ella.

La respuesta de S. littoralis a Bactospeine 16.000 es del mismo orden que la señalada para otros insecticidas microbiológicos a base de Bacillus thuringiensis (ALTAHTAWY y ABALESS, 1973; AFIFY y MERDAN, 1969). Este producto se muestra menos efectivo que la poliedrosis propia y sin embargo presenta, desde el punto de vista práctico, de una acción más rápida como lo ponen de manifiesto los valores de los respectivos TL_{50} . Una posible explicación puede estar en que B. thuringiensis produce la muerte de las larvas por toxemia y posterior septicemia (HEIMPEL y ANGUS, 1963) mientras que las nucleopoliedrosis precisan un tiempo más o menos largo (AIZAWA, 1959) para invadir las células de los tejidos susceptibles y producir la infección.

No está totalmente claro el modo de acción de B. thuringiensis sobre Noctuidos. MARTOURET (1961) señala que la gran mayoría de las especies no son susceptibles a la toxina del cristal aunque estudios recientes indican claras diferencias dentro de la familia; así, mientras Pseudaletia unipuncta y Trichoplusia ni (SOMERVILLE et al. 1970) parecen susceptibles al cristal, Spodoptera

litura (NARAYANA et al. 1976) es resistente. Por ello parece de interés estudiar a fondo esta familia para aprovechar al máximo el potencial insecticida de B. thuringiensis.

La posibilidad de que la virulencia de ciertos patógenos de insectos pueda aumentar asociándolos con otros microorganismos patógenos (VAGO, 1963) nos llevó a mezclar Bactospeine 16.000 con preparados de las poliedrosis nucleares para ver el efecto conjunto. No observamos efecto sinérgico lo que puede ser debido a que se reduce la alimentación de las larvas de S. littoralis por efecto de B. thuringiensis y no ingieren quizás una cantidad suficiente de alimento contaminado ---- (BURGERJON y BARJAC, 1962; BURGERJON y BARJAC en MARTOURET, 1961). Además, observamos que las larvas de S. littoralis comían sobre el medio artificial haciendo hoyos de cierta profundidad siendo más evidente este comportamiento en las larvas de tercera y cuarta edad lo que puede también contribuir a reducir el consumo de poliedros. Una ausencia de efecto entre estos dos tipos de microorganismos ha sido señalada ya para otras especies de Noctuidos (SEMEL, 1961) en Trichoplusia ni, Malacosoma fragile (STELZER, 1965) y Spodoptera litura (HWANG y DING, 1975).

El único método rápido y seguro para evaluar el poder insecticida de los productos microbiológicos es el bioensayo (DULMAGE et al. 1976) que realizado sobre medio artificial -----

(SPLITTSTOESSEN y MCEVEN, 1961) consigue uniformidad en los ensayos y repetibilidad de resultados. De nuestro resultado se desprende la utilidad básica del medio de POITOUT y BUES (1974) para bioensayos con poliedrosis nucleares y Bacillus thuringiensis sobre S. littoralis aunque en el caso de B. thuringiensis se encuentre alguna variabilidad entre ensayos y puedan realizarse ciertos ajustes lo que será objeto de una posterior comunicación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABBOTT, W.S., 1925.- J.econ. entomol. 18:265-267
- AFIFY, A.M. y MERDAN, A.I., 1969.- Z.angnew.Ent. 63:263-267
- AIZAWA, K., 1959.- J.Insect Pathol. 1:67-74
- AIZAWA, K., 1963.- En Insect Pathology. An Advanced Treatise. (ed. STEINHAUS) vol.I: 381-412. A. Press.
- ALTAHAWY, M.M. y ABALESS, I.M., 1973.- Z.Agewand Ent. 74:255-263
- ANDREWS, G.L., 1975.- En: Baculovirus for Insect Pest Control: Safety Considerations (Ed. M. Summers et al.) Am. Soc. Microb. Washington pp.129-130
- ANGUS, T.A. y LUTHY, P., 1971.- En: Microbial Control of Insects and Mites (ed. Burges y Hussey). A. Press pp.623-638
- ARUGA, H. FUKUDA, S. y YOSHITAKE, N., 1963.- J.sericul. Sci. Japan 32:213-218.

- BELLET, FENNER y GIBBS, 1973.- En: Virosis and Invertebrates (ed. Gibbs) North Holland Pub. Co. Amsterdam pp:41-48
- BEEGLE, C.C. y OATMAN, E.R., 1975.- J. Inverteb. Pathol. 25:59-71
- BERGOLD, G.H., 1950.- Can. J. Zool. 29(1):17-23
- BERGOLD, G.H., 1963a.- J. insect pathol. 5:111-128
- BERGOLD, G.H., 1963b.- En: Insect Pathology. An advanced Treatise (ed. Steinhaus) vol. I:423-456.
- BIRD, F.T., 1964.- Can. J. Microbiol. 10:49-52.
- BOVING, P.A. MAKSYMUK, B., WINTERFELD, R.G. y ORCHARD R.D., 1971.- Am. Soc. Agric. Ent. Trans. 24:48-51
- BURGES, H.D., 1973.- Ann. N.Y. Acad. Sci. 217:31-49
- BURGERJON, A., 1956.- Ann. Epiph. 4:675-684
- BURGERJON, A., 1973.- Vth. Int. Colloq. Insect Pathol. Microbial Control. Oxford, 24
- BURGERJON, A. y BARJAC, H. de, 1962.- C.R. XIe Congres Intern. Entomologie, Vienne, pp:835-839
- BURGERJON, A., BIACHE, G. y CHAUFAX, J., 1975.- Entomophaga, 20:153-160
- CANTWELL, G.E., 1974.- Insect Diseases. Marcel Dekker Inc. 2 vol.
- CROZIER, G. y MEYNADIER, G., 1972.- Entomophaga 17:231-239.
- DAHLSTEN, D.L. y THOMAS, G.M., 1969.- J. Inverteb. Pathol. 13:264-271

- DAVID, W.A.C., 1975.-Ann.Rev.Entom. 20:97-117
- DOANE, C.C., 1969.-J.Inverteb.Pathol. 14:199-210
- DULMAGE, H.T., MARTINEZ, A.J. y CORREA, J.A., 1970.-
J.Inverteb.Pathol. 16:80-83
- DULMAGE, H.T., MARTINEZ, A.J. y PEÑA, T., 1976.-Techn.
Bull. nº1528, ARS-USDA 15pp.
- EGAWA, K. y SUMMERS, M.D., 1972.-J.Inverteb.Pathol.
19:395-404.
- ENGSTROM, A. y KILKSON, R., 1968.- Exp.Cell.Res. 53:
308-310.
- ESTES, Z.E. y FAUST, R.M., 1966.-J.Inverteb.Pathol.
8:145-159.
- FALCON, L.A., 1976.-AnnRev.Entom. 21:305-325.
- FAO/OMS, 1974.- Informe de una reunión conjunta
FAO-OMS sobre virus de insectos. Ginebra
22-26 nov. 1972. Roma 59 pp.
- FAUST, R.M. y ADAMS, J.R., 1966.- J.Inverteb.Pathol.
8:526-530.
- HALL, I.M., 1963.- En: Insect Pathology. An Advanced Treatise (Ed. Steinhaus). Vol. II:
pp. 477-517.
- HAMM, J.J. y YOUNG, J.R., 1974.-J.Inverteb.Pathol.
24: 70-81.
- HARRAP, K.A. 1970.- Virology 42:311-318
- HARRAP, K.A. 1972a.-Virology 50:114-123
- HARRAP, K.A. 1972b.-Virology 50:124-132
- HARRAP, K.A. 1972c.-Virology 50:133-139
- HARRAP, K.A. y ROBERTSON, J.S., 1969.-J.Gen.Virol.:
3:221-225.

- HARPAZ, I. y SHAKED, B.Y., 1964.-J. Insect Pathol. 6: 127-130.
- HEIMPEL, A.M., 1971.-En: Microbial Control of Insects and Mites (ed. Burges and Hussey), A. Press pp. 469-495.
- HEIMPEL, A.M. y ANGUS, T.A., 1963.-En: Insect Pathology. An advanced Treatise. (ed. Steinhaus) vol. II pp. 24-73
- HUGER, 1963.-En: Insect Pathol. id. Vol. I pp. 434-52
- HUGHES, K.M., 1972.-J. Inverteb. Pathol. 19: 198-207.
- HUNTER, D.K. y HOFFMANN, D.F. y COLLIER, S.J., 1973.-J. Inverteb. Pathol. 21: 91-100.
- IGNOFFO, C.M., 1969.-Rep. Biot. Intern. Min. Chem.
- IGNOFFO, C.M. y BATZER, O.F., 1971.-J. econ. entomol. 64: 850-853
- IGNOFFO, C.M. y HINK, W.F., 1971.-En: Microbial Control of Insects and Mites (ed. Burges y Hussey) A. Press. pp. 541-580.
- IGNOFFO, C.M., HOSTETTER y SHAPIRO, M., 1974.-J. Inverteb. Pathol. 24: 184-187.
- JAQUES, R.P., 1967a.- Can. Entomol. 99: 785-794
- JAQUES, R.P. 1967b.- Can. Entomol. 99: 820-829
- JAQUES, R.P., 1975.- En: Baculovirus for Insect Pest Control= Safety Considerations (ed. M. Summers et al.) Am. Soc. Microb. Washington. pp. 90-99.
- KALMAKOFF, J., WILLIAMS, B.R.G. y AUSTIN, F.J., 1977.-J. Inverteb. Pathol. 29: 44-49.
- KAWAMOTO, K. y SAYAMA, T., 1975.-J. Inv. Pathol. 26: 47-

- KAWANISHI, C.Y. SUMMERS, M.D., STOLTZ, D.B. y
 ARNOTT, H.J., 1972.- J. Inverteb. Pathol. 20:104-108
- KAWASE, S., 1964.- J. Insect Pathol. 6:156-163
- KAWASE, S., KAWAMOTO, F. y YAMAGUCHI, K., 1973.- J. In-
verteb. Pathol. 22:266-272
- LAUDEHO, Y. y AMARGIER, A., 1963.- Rew. Pathol. Veg.
Ent. Agr. Fr. 42:207:210
- MAKSYMUK, B., 1975.- En: Baculovirus... pp.123-128
- MAKSYMUK, B. y NEISESS, J., 1975.- J. Econ. Entomol.
 68:407-410
- MARAMOROSCH, K., 1968.- Insect Viruses. Springer N.Y.
- MARTIGNONI, M.E. y MILSTEAD, J.E., 1962.- J. Insect
Pathol. 4:113-121.
- McLAUGHLIN, R.E. ANDREWS, G. y BELL, M.R., 1971.-
J. Inverteb. Pathol. 18:304-305
- MARTOURET, D., 1961.- C.R.XIII^e Symposium Phyto-
 pharmacie et Phytriatrie. Gand. Mede-
 del. Landbounhog. Ghent. 26:1116-1126.
- MONTOYA, E.L., IGNOFFO, C.M. y MCGARR, R.L., 1966.-
J. Inverteb. Pathol. 8:320-324
- NARAYANAN, K., JAYARAJ, S. y GOVINDARAJAN, R., -J. In-
verteb. Pathol. 28:269-270.
- PADHI, S.B. y CHASE, T., 1976.- J. Inverteb. Pathol.
 28:137-142.
- POITOUT, S. y BUES, R., 1970.- Ann. Zool. Eccl. Anim.
 1:245-264.
- POITOUT, S. y BUES, R., 1972.- C.R. Acad. Sci. Fr.
 Serie D. 274:3113-3115.
- POITOUT, S. y BUES, R., 1974.- Ann. Zool. Ecol. Anim.
 4:431-441.

- QUIOT, J.M., VAGO, C. y PARADIS, S., 1970.- Entomophaga 15:437-443.
- REICHELDERFER, C.F., 1975.- En: Baculovirus... p.73-76
- RUPEREZ, A., 1962.- Virosis de insectos. Servicio de Plagas Forestales. Mº Agricultura. Don. Gral. de Montes, Caza y Pesca Fluvial. Madrid. 92p.
- SEMEL, M., 1961.- J.econ.entomol. 54:698-701
- SHIGEMATSU, M. y SUZUKI, S., 1971.- J.inverteb.pathol 17:375-382.
- SMITH, K., 1967.- Insect Virology. A.Press. 256 pp.
- SMITH, K.M., 1976.- Virus-insect relationship. Longman. London 291 pp.
- SMITH, K.M. y XEROS, N., 1953.- Nature 172:670.
- SMITH, K.M. y XEROS, N., 1954.- Parasitology 44:71-80
- SMIRNOFF, W.A., 1961.- J.insect pathol. 3:218-220
- SMIRNOFF, W.A. McNEIL, J.N. y VALERO, J.R., 1976.- Can.Entomol. 108:1221-1222
- SOMERVILLE, H.J., TANADA, Y. y ORIE, F.M., 1970.- J.Inverteb.Pathol. 16:241-248.
- SPLITTSTOESSEN, C.B. y McEVEN, F.L., 1961.- J.insect pathol. 3:394-398
- STAIRS, G.R., 1968.- Current Topics in Microbiology and Immunology 42:1-23
- STAIRS, G.R., 1971.- En: Microbial Control... p.97-124
- STAIRS, G.R., 1973.- Ann.N.Y.Acad.Sci. 217:58-64
- STELZER, M.J., 1965.- J.invert.pathol. 7:122-125
- STELZER, M.J., NEISSES, J. y THOMPSON, C.G., 1975 J.econ.entomol. 68:269-272
- STEINHAUS, E.A., 1956.- Hilgardia 26:107-159
- STEINHAUS, E.A., 1960.- J.insect pathol. 2:225-229

- TANADA, Y., 1961.- J.insect pathol. 3:310-323
- TANADA, Y., 1963.- En: Insect Pathol... II:423-475
- TANADA, Y., 1973.- Ann.N.Y.Acad.Sci. 217:120-130.
- TANADA, Y. y HESS, R.T., 1976.- J.Invert.pathol.
- TANADA, Y. y OMI, E.M., 1974.- id. 23:360-365
- TANADA, Y., HESS, R.T. y OMI, E.M., 1975.- id. 26:99-104
- VAGO, C., 1963.- En: Insect Pathol. I:339-379
- VAGO, C. y AMARGIER, A., 1963.- Ann.Epiph. 14:269-274
- VAIL, P. y HALL, I.M., 1969.- J.invert.pathol. 13:188-198.
- VAIL, P.V. y JAY, D.L., 1973.- id. 21:198-204
- VAIL, P.V., JAY, D.L., HUNTER, D.K. y STATEN, R., 1972.-
J.Inverteb.pathol. 20:124-128.
- VAIL, P.V., JAY, D.L. y HINK, W.F., 1973.- id. 22:231-237
- WEISER, J. y BRIGG, J.D., 1971.- En: Microbial Control
pp.13-66.

ADICION A LAS REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- FINNEY, D.J., 1971.- Probit Analysis. Third ed.
Cambridge Univ.Press 333 pp.

VIRUS ADN			VIRUS ARN			sin clasificar
virus con hélice doble de ADN		virus con hélice simple	virus con hélice doble	virus con hélice simple	otros virus	
virus con simetría helicoidal virión oculto.		virus con simetría cúbica. virión libre.				
baculovirus	poxvirus	iridovirus	parvo-virus	rhado-virus	entero-virus	
	granulosis GV	entomo-poxvirus	denso-nucleosis		picornia-virus	
Ortopt.	Lepid.	Ortopt.	Hemip.	Lepid.	Dipter.	Dipt.
Neurop.		Lepid.	Lepid.	Lepid.	Ortop.	Ortop.
Trichop.		Coleo.	Coleo.	Hymen.	Lepi.	Isop.
Lepidop.		Dipter.	Hymen.	Dipt.	Coleo.	Hemip.
Coleopt.			Dipt.		Hymen.	Neuro.
Hymenop.						Lepi.
Dipter.						Coleo.
						Hymen.

Cuadro I.- Clasificación de los virus de insectos de acuerdo con Bellet et al. (1973); Cantwell (1974) y David (1975).

BACTOSPEINE 16.000		SL.31.75		ACTN.15.74	
Dosis %mortal. TL50		Dosis %mort. TL50		Dosis %mort. TL50	
1,25	19,17	-	0,008	19,24	-
2,50	34,70	-	0,040	58,92	9,6
5,00	43,98	-	0,200	91,95	7,1
10,00	66,10	2,6	1,000	99,39	6,7
					11,2
					8,9

Cuadro nº 2.- Porcentajes de mortalidad conseguida con los dis-tintos productos a las dosis que se indican y TL50 expresada en días. Las dosis se expresan en mgr. por 10 ml. de agua.

Bactospeine SL.31.75		% mort.		Bactospeine ACTN.15.74		% mort.	
dosis		dosis		dosis		dosis	
1,25	0,00	24,00	1,25	0,00	24,00	0,00	24,00
2,50	0,00	43,25	2,50	0,00	43,25	0,00	43,25
5,00	0,00	55,58	5,00	0,00	55,58	0,00	55,58
0,00	0,008	19,17	0,00	0,40	22,70	0,40	22,70
0,00	0,040	63,58	0,00	2,00	42,28	2,00	42,28
0,00	0,200	96,18	0,00	10,00	66,95	10,00	66,95
1,25	0,008	32,12	1,25	0,40	16,29	0,40	16,29
2,50	0,040	63,44	2,50	2,00	46,37	2,00	46,37
5,00	0,200	94,62	5,00	10,00	69,96	10,00	69,96

Cuadro nº3.- Porcentajes de mortalidad conseguida con la combina-ción de Bactospeine 16.000 y cada una de la virosis.



Bactospeine 16.000		SL.31.75		ACTN.15.74	
dosís	% mortalidad	dosís	% mortal.	dosís	% mortal.
5,0	0,00	0,2	15,79	5	0,00
10,0	0,00	1,0	18,48	25	0,00
20,0	0,00	5,0	50,00	125	0,00
40,0	15,79	25,0	89,47	625	0,00

Cuadro nº4.- Respuesta de larvas de tercera y cuarta edad a Bactospeine 16.000 y las dos nucleopoliedrosis.

Bactospeine y SL.31.75		Bactospeine y ACTN.15,74	
dosís	% mortal.	dosís	% mortal.
5,0	0,2	5,0	2,50
10,0	1,0	25,0	0,00
20,0	5,0	125,0	2,50

Cuadro nº 5.- Respuesta de las larvas de tercera y cuarta edad a la combinación de Bactospeine y las poliedrosis nucleares.

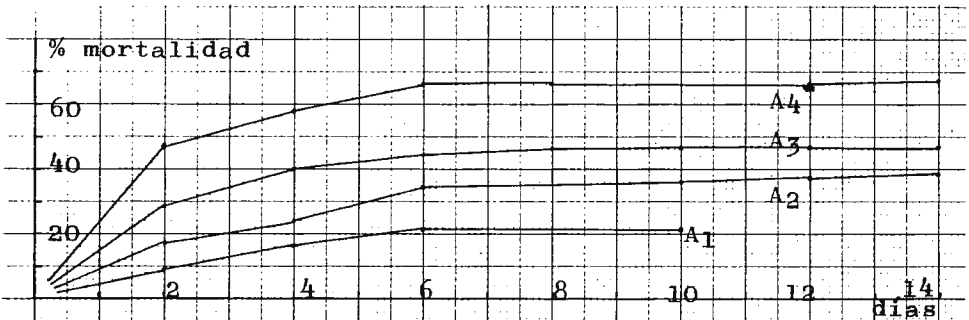


Fig. 1.- Curvas mortalidad-tiempo de los dos primeros estados larvarios de *S. littoralis* tratados con distintas dosis de Bactospeine 16.000

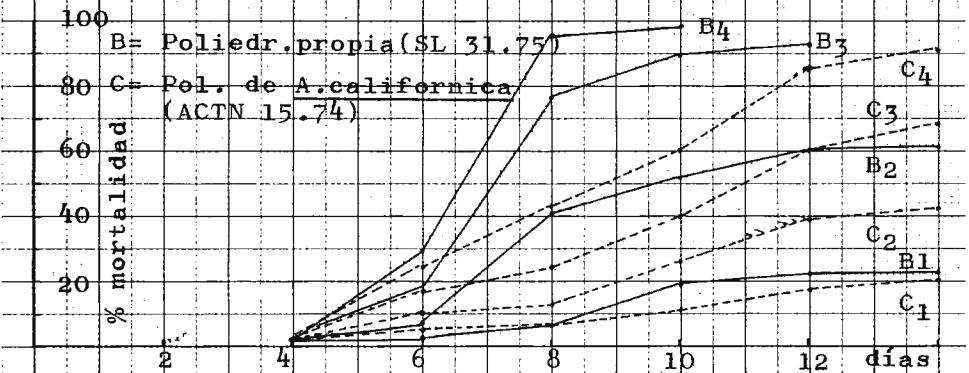


Fig. 2.- Curvas mortalidad-tiempo de los dos primeros estadios larvarios de *S. littoralis* tratados con distintas dosis de dos nucleopoliedrosis B y C.

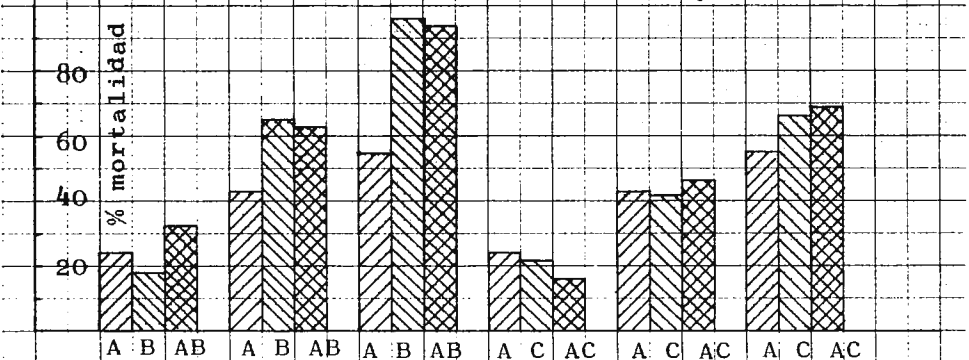


Fig. 4.- Mortalidades comparativas de la combinación de Bactospeine 16.000 con distintas virosis y éstas mismas por sí solas.

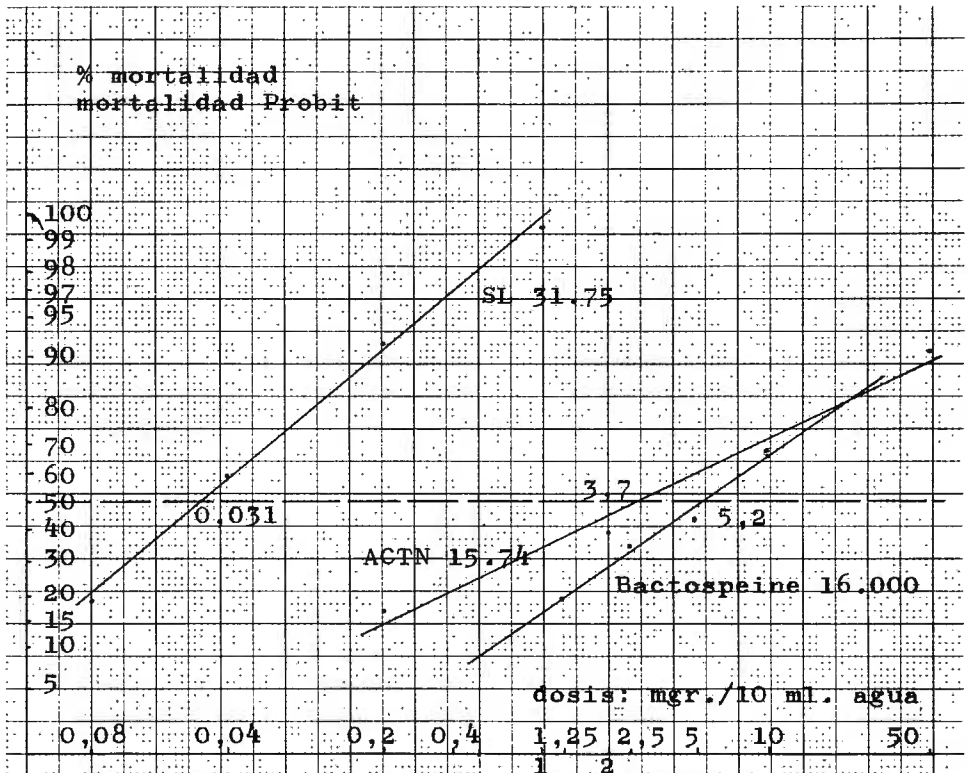


Fig. 3.- Rectas de regresión de mortalidad de los dos primeros estadios larvarios de *S. littoralis*, dosis de los productos empleados.

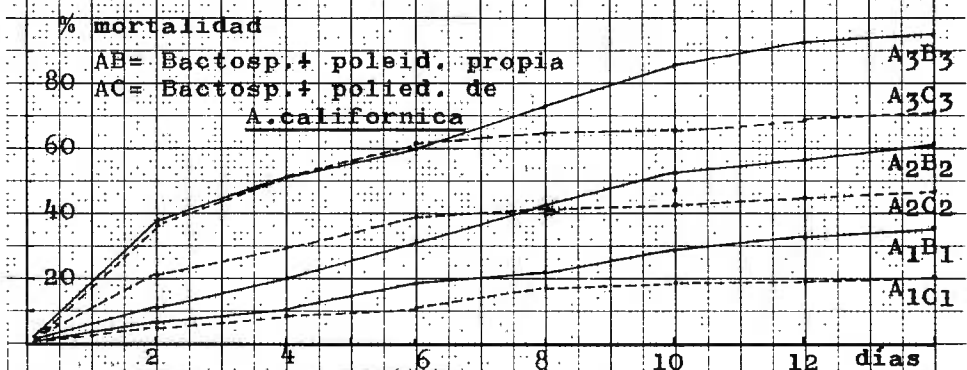


Fig. 5.- Curvas mortalidad-tiempo de los dos primeros estadios de *S. littoralis* tratados con distintas combinaciones de Bactospeine 16.000 y cada una de las poliedrosis.



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

Títulos Publicados:

- 1.— *Semántica del lenguaje religioso* / A. Fierro
(Teología. España, 1973)
- 2.— *Calculador en una operación de rectificación discontinua*/A. Mulet
(Química. Extranjero, 1974)
- 3.— *Skarns en el batolito de Santa Olalla*/F. Velasco
(Geología. España, 1974)
- 4.— *Combustión de compuestos oxigenados*/J.M. Santiuste
(Química. España, 1974)
- 5.— *Películas ferromagnéticas a baja temperatura*/José Luis Vicent López
(Física. España, 1974)
- 6.— *Flujo inestable de los polímeros fundidos*/José Alemán Vega
(Ingeniería. Extranjero, 1975)
- 7.— *Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental*
José Antonio Salva Lacombe (Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1973)
- 8.— *Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos*/José Plá Carrera
(Matemáticas. España, 1974)
- 9.— *El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.*
Francisco Fernández-Longoria Pinazo (Urbanización del Plan Europa 2.000
a través de la Fundación Europea de la Cultura)
- 10.— *El teatro español en Francia (1935—1973)* / F. Torres Monreal
(Literatura y Filología. Extranjero, 1971)
- 11.— *Simulación electrónica del aparato vestibular*/J.M. Drake Moyano
(Métodos Físicos aplicados a la Biología. España, 1974)
- 12.— *Estructura de los libros españoles de caballerías en el siglo XVI.*
Federico Francisco Curto Herrero (Literatura y Filología. España, 1972)
- 13.— *Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos*
M. Paloma Fernández García (Geología. España, 1975)
- 14.— *La obra gramatical de Abraham Ibn c Ezra*/Carlos del Valle Rodríguez
(Literatura y Filología. Extranjero, 1970)

- 15.— *Evaluación de Proyectos de Inversión en una Empresa de producción y distribución de Energía Eléctrica.*
Felipe Ruiz López (Ingeniería. Extranjero, 1974)
- 16.— *El significado teórico de los términos descriptivos/Carlos Solís Santos*
(Filosofía. España, 1973)
- 17.— *Encaje de los modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos relativos de política económica./ Gumersindo Ruiz Bravo*
(Sociología. España, 1971)
- 18.— *La imaginación natural (estudio sobre la literatura fantástica norteamericana). / Pedro García Montalvo*
(Literatura y Filología. Extranjero, 1974)
- 19.— *Estudio sobre la hormona Natriurética. / Andrés Purroy Unanua*
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. Extranjero, 1973)
- 20.— *Análisis farmacológico de las acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-Adrenérgicos./ José Salvador Serrano Molina*
(Medicina, Farmacia y Veterinaria. España, 1970)
- 21.— *El hombre y el diseño industrial./Miguel Durán-Lóriga*
(Artes Plásticas. España, 1974)
- 22.— *Algunos tópicos sobre teoría de la información./ Antonio Pascual Acosta*
(Matemáticas. España, 1975)
- 23.— *Un modelo simple estático. Aplicación a Santiago de Chile*
Manuel Bastarache Alfaro (Arquitectura y Urbanismo. Extranjero, 1973)
- 24.— *Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo*
Teoría y realizaciones. /Juan Manuel Martín Sánchez
(Ingeniería. España, 1973)
- 25.— *Neurobiología (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 26.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 27.— *Genética (I Semana de Biología. Conferencias-coloquio sobre Investigaciones biológicas 1977)*
- 28.— *Investigación y desarrollo de un analizador diferencial digital (A.D.D.) para control en tiempo real. /Vicente Zugasti Arbizu*
(Física. España, 1975)
- 29.— *Transferencia de carga en aleaciones binarias./ Julio A. Alonso*
(Física. Extranjero, 1975)
- 30.— *Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas. / José Luis Sebastian Franco.*
(Física. Extranjero, 1974)

- 31.— *Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.* Juan Zapata Ferrer. (Ingeniería. Extranjero, 1975).
- 32.— *Estudio sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico.* / Eduardo Acosta Mendez (Filosofía. España, 1973)
- 33.— *Las Bauxitas Españolas como mena de aluminio.* / Salvador Ordoñez Delgado (Geología. España, 1975).
34. *Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obrero y empleados.* / Federico Durán López (Derecho. España, 1975)
- 35.— *Obtención de Series aneuploides (monosómicas y ditelosómicas) en variedades españolas de trigo común.* / Nicolás Jouve de la Barreda. (Ciencias Agrarias. España, 1975).
- 36.— *Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.* / Enrique Alarcón Alvarez. (Ingeniería. España, 1975).
- 37.— *Lenguaje en periodismo escrito.* / Fernando Lázaro Carreter, Luis Michelena Elissalt, Robert Escarpit, Eugenio de Bustos, Víctor de la Serna, Emilio Alarcos Llorach y Juan Luis Cebrián. (Seminario organizado por la Fundación Juan March los días 30 y 31 de mayo de 1977).
- 38.— *Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera, Beta vulgaris L.* / José Manuel Lasa Dolhagaray y Antonio Silván López. (Ciencias Agrarias. España, 1974).
- 39.— *Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos. Productos finitos de espacios con topologías proyectivas de funciones reales.* / José Luis Blasco Olcina (Matemáticas. España, 1975).
- 40.— *Estructuras de la épica latina.* / M^a. del Dulce Nombre Estefanía Alvarez. (Literatura y Filología, España, 1971).
- 41.— *Comunicación por fibras ópticas.* / Francisco Sandoval Hernandez (Ingeniería. España, 1975).
- 42.— *Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.* / José Antonio Pero-Sanz Elorz (Ingeniería. España, 1974).

