

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS Y VETERINARIAS
DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGÍA**



Maestría en Agroecología y Cambio Climático

Título:

Efectividad del virus de la Poliedrosis Nuclear *Sa(VPN)* de *Spodoptera albula* bajo condiciones de laboratorio en el Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos, UNAN-León.

Trabajo presentado como requisito para obtener el título de Máster en Agroecología y Cambio Climático.

Presentado por:

Ing. Carlos Iván Real Baca

Tutor:

M.Sc. Pedro Fernando Silva Illescas

León, septiembre del 2023.

“TODAS Y TODOS JUNTOS VAMOS ADELANTE”

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios nuestro señor por estar con mi persona en esta larga trayectoria, en esta nueva etapa tan importante de mi vida, por iluminarme y darme las fuerzas para cumplir con esta meta tan anhelada.

Agradezco a mi Madre por alentarme a seguir adelante a pesar de las adversidades que se me presentaron y que para el día de hoy este culminando con éxito mi estudio de postgrado, a mis amistades por darme ese ánimo y motivación para seguir adelante.

A mi tutor M.Sc. Pedro Fernando Silva Illescas, por brindarme su ayuda, su valioso tiempo, paciencia, apoyo incondicional y aporte de sus conocimientos para mi formación como futuro Máster en Agroecología y Cambio climático y así finalizar con mucho éxito mi Tesis de Maestría.

Le agradecemos especialmente a las señoras Cony Reyes y Marling Cisne por su incondicional ayuda y consejos para la realización de mi investigación.

Agradezco a mi gran amigo y Colega Ing. Conrado Ronaldo Quiroz Medina por ayudarme y brindarme aportes importantes para finalizar mi Investigación.

Agradezco a mi Alma Mater **UNAN-León y el Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB)**, por permitirme realizar mi ensayo en sus instalaciones y así poder culminar mi estudio con éxito.

DEDICATORIA

A Dios mi señor por darme la fuerza para continuar, iluminarme y mantenerme fuerte en esta etapa tan importante de mi vida, logrando una de mis principales metas, ya que sin él no hubiera sido posible.

A mi madre Ivana Baca Lezama por su apoyo, amor incondicional y maravillosos consejos llenos de sabiduría, que me guiaron por el buen camino y así me formaron como persona y también como profesional, porque también a través de ella logre motivarme a culminar con mucho entusiasmo y éxitos mi maestría.

A mi padre, Carlos Alberto Real Lechado por su motivación, palabras de ánimo y consejos llenos de sabiduría para seguir con paso firme en mi trayectoria, a mis valiosos amigos por siempre motivarme y alentarme a seguir adelante por medio de su insistencia en culminar mi postgrado

A mi tutor **M.Sc.** Pedro Fernando Silva Illescas por brindarme su apoyo, tiempo y dedicación incondicional para poder concluir con mi Tesis de maestría.

RESUMEN

Debido a los daños ocasionados por insectos del género *Spodoptera* y manejo inadecuado con insecticidas sintéticos, se ha replanteado la utilización de agentes de control biológico, destacando los virus entomopatógenos. El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de cinco concentraciones del Virus de la Poliedrosis Nuclear Sa(VPN) para el manejo de *Spodoptera albula*. Se realizó un experimento bifactorial con cinco concentraciones virales y cinco instares larvales. El estudio constó de 25 tratamiento más el testigo, cada tratamiento con tres repeticiones y estas con 15 larvas, con población total de 1350 larvas. La toma de datos se realizó a las ocho horas de haber sido infestadas y se monitoreó cada 12 horas, durante 15 días. Se realizó un modelo lineal generalizado para calcular la mortalidad y eficacia según instar larval, concentración y el tiempo con un nivel de confiabilidad de 95%. Los resultados obtenidos establecen que los valores de CL₅₀ y CL₉₀ obtenidos en los distintos instares de *S. albula* con el instar L5 presentó los mayores valores de CL₅₀ (78.952 LE/ 6.15E+08 CIP) y CL₉₀ (165.58 LE/8.69E+11 CIP), sin embargo, obtuvo la menor variabilidad en los mismos. Por otro lado, a medida que incrementó la concentración de VPN, se redujo el TL₅₀ (74.99, 62.88, 51.10, 33.39 y 39.80 horas para las concentraciones 100, 125, 150, 175 y 200 LE respectivamente). También, incrementó el tiempo necesario para la muerte del 50% la población con valores de 16.99, 30.82, 63.48, 53.32 y 97.56 horas para los instar I, II, III, IV y V respectivamente. Se determinó que la combinación de tiempo transcurrido luego de la inoculación, carga viral e instar larval adecuados contribuye a una mayor eficacia, siendo la carga viral el factor con menor peso.

ÍNDICE

León, septiembre del 2023.	1
AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. HIPÓTESIS.....	5
IV. MARCO TEÓRICO	6
4.1. Aspectos generales de Virus Entomopatógenos	6
4.2. Clasificación y morfología del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)	7
4.3. Estructura de los baculovirus.....	7
4.4. Importancia del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)	8
4.5. Modo de acción	10
4.6. Síntomas de infección por VPN.....	11
4.7. Dispersión del VPN.....	11
4.8. Producción del Virus laboratorio.	12
4.9. Uso del Virus de la Poliedrosis Nuclear para el Control de Plagas.....	13
4.10. Determinación de la calidad del insecticida Viral	13
4.11. Formulación	13
4.12. Técnicas de Bioensayo con virus Entomopatógenos	13
4.13. Características biológicas de <i>Spodoptera albula</i>	16
4.14. Distribución	16
4.15. Ciclo de vida de <i>Spodoptera albula</i>	17
4.15.2. Larva:.....	17
4.15.3. Estado pupal:	17
4.15.4. Adulto:.....	17
4.16. Ciclo de vida	18
4.17. Modo de distribución.....	18
4.18. Apariencia general	18
4.19. Daño	18

V.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1.	Ubicación del estudio.....	19
5.2.	Fases de la investigación	19
5.2.1.	Preparación de la solución viral:	19
5.2.2.	Proceso semipurificación del Virus de la Poliedrosis Nuclear <i>Sa</i> (VPN)	19
5.3.	Preparación de las disoluciones.....	20
5.4.	Conteo de cuerpos de inclusión poliedral	20
5.5.	Preparación de las dosis.....	21
5.6.	Diseño experimental	21
5.7.	Análisis estadístico	21
5.8.	Inoculación del virus	22
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1.	Concentración letal media (CL ₅₀) del Virus de la Poliedrosis Nuclear en <i>Spodoptera albula</i>	25
6.2.	Tiempo letal medio (TL ₅₀) del Virus de la Poliedrosis Nuclear en <i>Spodoptera albula</i>	26
6.3.	Eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear en <i>Spodoptera albula</i>	28
VII.	CONCLUSIÓN.....	40
VIII.	RECOMENDACIONES	41
IX.	BIBLIOGRAFIA.....	42
X.	ANEXOS	50

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. <i>Establecimiento del ensayo</i>	26
Cuadro 2 . <i>Descripción de los tratamientos</i>	27
Cuadro 3. <i>Concentración letal 50 y concentración letal 90 de Virus de la Poliedrosis Nuclear en Spodoptera albula Reflejado en Cuerpos de inclusión poliedral (CIP) y Larvas equivalentes (LE). Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos, UNAN-León, 2022</i>	28
Cuadro 4. <i>Criterio de información da Akaike y peso de Akaike de la eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear sobre Spodoptera albula según instar larval, concentración del virus y horas después de inoculación en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022</i>	30
Cuadro 5. <i>Criterio de información da Akaike y peso de Akaike de la eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear sobre Spodoptera albula según instar larval, concentración del virus y horas después de inoculación en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022</i>	33
Cuadro 6. <i>Modelo lineal generalizado efectuado a la variable eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear sobre Spodoptera albula, según instar larval, concentración del virus y horas después de inoculación</i>	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. a) Mortalidad y b) Eficacia de los instares larvales de <i>Spodoptera albula</i> inoculados con diferentes concentraciones de Virus de la Poliedrosis Nuclear en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022.....	34
Figura 2. Eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear según concentración. a) eficacia general; b) eficacia acumulada	35
Figura 3. Eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear según instar larval y concentración. a) eficacia general; b) eficacia acumulada	36
Figura 4. Valores predichos de eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear sobre <i>Spodoptera albula</i> según las horas de inoculación en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022.....	37
Figura 5. Comportamiento de la eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear Sa(VPN) por instar larval en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022	38
Figura 6. Modelo de valor predicho de la eficacia en las diferentes concentraciones del Virus de la Poliedrosis Nuclear Sa(VPN), <i>Spodoptera albula</i> en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022	41
Figura 7. Preparación de suspensión viral Sa(VPN), para la elaboración de las 5 concentraciones virales y inoculación de larvas de <i>Spodoptera albula</i> Laboratorio de Control Biológico UNAN León 2022. a) centrifugado del virus; b) dilución seriada; c) concentraciones finales.....	55
Figura 8. Establecimiento del ensayo. a) inoculación de virus; b) colocación de dieta en tazas; c)dieta preparada	55
Figura 9 Ensayo de larvas de <i>Spodoptera albula</i> inoculadas con las 5 concentraciones virales y un Testigo absoluto Sa(VPN).....	55
Figura 10. Formato de recolección de datos	56

I. INTRODUCCIÓN

Vargas Téllez (2006) expresa que la agricultura ha sido la principal actividad económica en Nicaragua. En los años 40 y 50 el sistema de producción predominante era el de subsistencia, basada en la siembra a escala mediana de una diversidad de cultivos. En los años 60 la agricultura se intensificó, debido al auge de la tecnología con la revolución verde; la siembra intensiva y excesiva de algodón como monocultivo, variedades de alto rendimiento en la utilización de fertilizantes e insecticidas sintéticos, la excesiva mecanización para la siembra y las labores agrícolas en general.

Maxwell, *et al.* (1991) , Delgado y Hernández (2008) y Torres y Cotes (2005) destacan que debido a esto, los agricultores se ven obligados a realizar aplicaciones de insecticidas sintéticos cada vez mayores, lo que ha provocado serios problemas como intoxicaciones crecientes de los trabajadores, resistencia de las plagas contaminación ambiental, destrucción de especies benéficas y una mayor perturbación y desequilibrio en los ecosistemas, por esta razón, los especialistas en protección vegetal han desarrollado a través de los años nuevas estrategias y combinación de métodos agrícolas, culturales y biológicos con el propósito de reducir la tasa de incremento de plagas y la cantidad de daños infligidos a los cultivos.

Pérez *et al.* (2003) indican que la familia Noctuidae, está ubicada dentro del orden Lepidóptera, abarca un total de 20.000 especies y se caracterizan porque sus adultos vuelan de noche y son de colores grisáceos u oscuros. Las especies de esta familia tienen unas características que influyen en su importancia económica en los cultivos. Dentro de la familia Noctuidae encontramos el género *Spodoptera*, cuya zona de distribución mundial actual comprenden el Norte y Sur de África, Oriente Medio, Península Ibérica, Francia, Italia, Mar Negro, Balcanes, Inglaterra y Alemania además de Norteamérica y Latinoamérica.

Según Rizo y Narváez (2001), debido a los daños generados en la agricultura por plagas del género *Spodoptera* y su manejo inadecuado a base de insecticidas sintéticos, se ha replanteado la utilización de agentes de control biológico, dentro de los que

destacan los virus entomopatógenos (Lecuona 1995). Muchos de estos virus se encuentran de forma natural en insectos de importancia agrícola, reduciendo así sus poblaciones.

Los virus entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas multiplicándose en los tejidos de los insectos hasta causar su muerte. Son parásitos intracelulares obligados, pues no pueden reproducirse fuera de la célula huésped, ya que necesitan un organismo vivo para su multiplicación y diseminación (Rizo y Narváez, 2001). Por tanto, los virus son agentes promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos (Evans y Entwistle, 1987).

Lovo y Morales (2006) afirman que desde 1986, el laboratorio de control biológico de la UNAN-León ha venido realizando diversos estudios conducentes al aprovechamiento de los entomopatógenos virales de la familia Baculoviridae como agente de control de plagas insectiles. Para reproducir masivamente estos virus, se hizo indispensable criar también a los propios hospedantes a los que ataca, *Spodoptera frugiperda* S., *Spodoptera sunia*, y *Spodoptera exigua* (Lep.:Noctuidae)

Romero y Cruz (2011), citados por King y Saunders (1984) indican que en el laboratorio de cría de insectos noctuidos una de las especies introducidas para hospeder del virus de la poliedrosis nucleas (VPN) es *Spodoptera sunia*, esta especie en nuestro país se encuentra distribuida en las áreas de cultivos de frijol, tomate, algodón, yuca y otras Solanáceas, Cucurbitáceas, maíz, sorgo y arroz.

Por esta razón, los especialistas en protección vegetal están desarrollando sistemas de manejo integrado de plagas, partiendo de las bases ecológicas que rigen los sistemas de producción y la utilización de métodos agrícolas, químicos, culturales y biológicos, con los objetivos de reducir la tasa de incremento de plagas y daños infligidos a los cultivos y una mayor estabilidad ecológica (Maxwell, et al 1991).

La situación de alto riesgo ambiental, social y económico implica un replanteamiento en las estrategias de manejo de plagas. Generalmente se utilizan agentes entomopatógenos, causantes de enfermedades en los insectos, como las bacterias, hongos y los virus, en segundo lugar, las rickettsias y los protozoarios.

Como una alternativa ecológicamente sostenible surge el control biológico mediante el uso de virus entomopatógenos (baculovirus), microorganismos con un potencial interesante para ser incluidos en programas de manejo integrado de plagas (MIP) (Szewczyk et al., 2006)

Como se verá afectada la efectividad del Virus de la Poliedrosis Nuclear Sa(VPN) con las diferentes concentraciones virales a través del tiempo transcurrido posterior a la infección en larvas de *Spodoptera albula* en sus cinco instars de I, II, III, IV y V?

II. OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar la efectividad del Virus de la Poliedrosis Nuclear *Sa(VPN)* sobre larvas de *Spodoptera albula* en sus cinco instar larvales en el Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos UNAN-León. (CIRCB).

ESPECÍFICOS

- 1- Estimar la Virulencia del Virus de la Poliedrosis Nuclear *Sa(VPN)* en condiciones de laboratorio, a través de dosis letal cincuenta (DL_{50}) y dosis letal noventa (DL_{90}).
- 2- Determinar el tiempo letal medio (TL_{50}) de cinco concentraciones de Virus de la Poliedrosis Nuclear en sus cinco instar larvales de *Sa(VPN)* *Spodoptera albula*.
- 3- Determinar la eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear en 5 instares de larvas de I, II, III, IV y V de *Sa(VPN)* *Spodoptera albula*, en condiciones de laboratorio.

III. HIPÓTESIS

HO: Al evaluar las diferentes concentraciones virales en los diferentes instares larvales, no hay diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos.

HA: Al evaluar las diferentes concentraciones virales en los diferentes instares larvales, hay diferencias estadísticamente significativas en al menos unos de los tratamientos.

IV. MARCO TEÓRICO

Los métodos de agentes en control biológico, como los virus de insectos, son opciones importantes para complementar o incluso reemplazar los plaguicidas en un programa integrado de control de plagas]. Entre los virus de insectos naturales, los miembros de la familia Baculoviridae se han utilizado como biopesticidas eficaces. Por ejemplo, un aislado 2D de múltiples nucleopoliedrovirus *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV-2D) se ha aplicado al control biológico de la plaga de soja *Anticarsia gemmatalis* H. (Lep.: Noctuidae) desde principios de la década de 1980. La biología molecular, patología, ecología y uso de los baculovirus como agentes de control de insecto plagas y como vectores para la expresión de genes foráneos ha sido revisado recientemente (Rodríguez et al., 2020).

Según (Gómez et al.,2021) los virus son probablemente las entidades biológicas más abundantes y diversas de la tierra Según Urbina y Valle 2012, los virus son entidades infecciosas compuestos de material genético constituido por ADN o ARN con una cadena doble circular o lineal segmentada o intacta. El ADN está hecho por una matriz proteica con la finalidad es resguardarlo ante situaciones desfavorables y permitirle fácilmente la entrada al huésped.

4.1. Aspectos generales de Virus Entomopatógenos

Leucona (1995), manifiesta que los virus entomopatógenos son parásitos obligados que necesitan de huésped para su subsistencia y reproducción, permitiendo de esta manera diseminarse. Según (Carballo et al., 2003), el genoma está constituido por ácido nucleico ya sea de ADN o ARN, que además de ser agentes promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos en un programa de control de plagas insectiles. El Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) es uno de los más utilizados para el control de plagas; perteneciente a la familia *Baculoviridae*.

Carrillo (2003), citados por Urbina y Valle (2012), mencionan que las entidades víricas pueden encontrarse de manera natural dentro de los ecosistemas, enfermado a pocos insectos de manera enzootia, estos al ser utilizados como insecticidas virales pueden ocasionar la mortalidad de grandes poblaciones de plagas de importancia económica en los cultivos.

4.2. Clasificación y morfología del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)

Según Carballo et al., (2003) y Payne y Kelly (1981). Tradicionalmente los virus que infestan a invertebrados se dividen en dos grandes grupos, los que presentan un cuerpo de inclusión de naturaleza proteica visibles a través de un microscopio óptico, entre ellos destacan los Baculovirus, (el Virus de la Poliedrosis Nuclear VPN y el Virus de la Granulosis VG, los Virus de la Poliedrosis Citoplasmática VPC y los entomopoxvirus. Esta clasificación ha sido usada con criterios morfológicos obtenidos por microscopios electrónicos y de luz. (Payne y Kelly, 1981) y citados por Rodríguez, (2009).

Payne y Kelly, (1981); Rodríguez (2006), mencionan que la clasificación y nomenclatura de los principales grupos de virus que afectan a los insectos, fue determinada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus. El Virus de la Poliedrosis Nuclear pertenece a la Familia Baculoviridae, Género Báculovirus y al Grupo A: Poliedrosis Nuclear (VPN).

4.3. Estructura de los baculovirus

Estos microorganismos internamente presentan una capa proteína llamada cápsido, que rodea y protege el ácido nucleico, que representa la porción biológica del virus, pudiendo presentar ADN o ARN, a este conjunto se le denomina nucleocápsido. Estos nucleocápsidos pueden estar solos o en grupos con una envoltura lipoproteica, construida a partir del material del insecto parasitado. Al conjunto de nucleocápsidos más la envoltura se le denomina virión o partícula viral. Esta constituye la unidad infectiva del virus. Los viriones están envueltos por una matriz proteica formando el cuerpo poliédrico de inclusión (CIP), (Rizo y Narváez 2001).

ICTV, (2012) citados por Barrera et al., (2016) mencionan que, dentro de los virus entomopatógenos, la familia Baculoviridae, está dividida en cuatro géneros: Alphabaculovirus donde se clasifican Nucleopoliedrovirus (NPV), Betabaculovirus donde se clasifican granulovirus (GV), ambos patógenos de insectos del orden Lepidoptera, Gammabaculovirus y Deltabaculovirus que agrupan GV y NPV patógenos de insectos del orden Hymenoptera y Diptera, respectivamente. La mayoría de baculovirus han sido aislados de insectos lepidópteros y algunos pocos de dípteros e himenópteros (Martínez et al., 2012), a pesar de que existen aproximadamente 7600 especies de hospederos descritas para estos virus (Martignoni & Iwai, 1981).

Leucona 1995, también documenta que dentro de la gran diversidad de virus existentes, una de las familias más importantes es la *Baculoviridae*, además de ser la más estudiada en la actualidad, debido a poseer excelente potencial de manejo de plagas lepidópteras y presentar seguridad a la salud humana por ser específicos de invertebrados, contiene solo un género dentro del cual se encuentra el Virus de la Poliedrosis Nuclear y los granulovirus, los que tienen gran potencial como agentes de control biológico (Belda et al., 2000).

Según Murphy et al. (1995) , el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) revisó la clasificación de la familia Baculoviridae y la dividió en dos géneros: (1) *Nucleopolyhedrovirus* (NPV) (anteriormente Virus de la Polihedrosis Nuclear) y (2) *Granulovirus* (GV) (anteriormente granulosis virus). Sin embargo, Jehle et al. (2006) y Afolami y Oladunmoye (2017) informaron que la familia Baculoviridae contiene 4 géneros: *Alphabaculovirus* (neocleopolyhedrovirus (NPV) específicos de lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovirus (GV) específicos de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPV específico de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (VPN específico de dípteros). Herniou y Jehle (2007) afirmaron que Baculoviridae contiene más virus de insectos identificados que cualquier otra familia viral.

4.4. Importancia del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)

Los estudios sobre virus que atacan a los artrópodos son de gran importancia y hasta la fecha existen más de 700 virus que tienen la capacidad para infectar especies

de insectos de varios ordenes (Leucona, 1995). Muchas de estas enfermedades ocurren naturalmente en insectos de importancia agrícola; por tanto, los virus son agentes promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos. (Evans y Entwistle 1987, citado por Calderón1992).

Los Baculovirus, subgrupos A (Virus de la Poliedrosis Nuclear, VPN) y B (virus de la granulosis, VG) de la Familia Baculoviridae, son patógenos exclusivos de artrópodos que infectan a numerosas especies de insectos, principalmente lepidópteros. Ambos grupos destacan por cualidades de interés práctico (especificidad, seguridad de empleo, facilidad de aplicación y estabilidad), que hacen posible su utilización como materias activas de insecticidas microbianos (Cory & Myers, 2003).

Los baculovirus son microorganismos que poseen ADN, el cual se puede adueñar del ADN de células de insectos y causar enfermedades incluso la muerte, gracias a esto se consideran como buenos candidatos para el control de insectos plagas de importancia económica en la agricultura. Según Behle et al., 2003, los Baculovirus se producen de forma natural en los insectos y son capaces de causar epizootias espectaculares que reducen en gran medida las poblaciones de insectos susceptibles. Como en el caso de los lepidópteros que tienen aplicaciones como base de insecticidas biológicos y vectores de expresión en procesos biotecnológicos. Beperet et al., 2021

Las observaciones del control natural por baculovirus han llevado a intentos comerciales de producirlos en masa como alternativas biológicas a los pesticidas químicos. Sin embargo, la mención de empresas o productos por su nombre no implica su respaldo por parte del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos sobre otros no citados.

El Virus de la Poliedrosis Nuclear, es uno de los microorganismos con mayor potencial para ser usados como bioinsecticidas para el control de plagas de importancia en diferentes cultivos. Los VPN y los Virus de la Granulosis, de la familia de los Baculoviridae, han sido los más estudiados con la finalidad de obtener insecticidas biológicos (Moscardi, 1991).

El VPN es un microorganismo que produce enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos hasta ocasionar su muerte. Son parásitos intracelulares necesitan de un organismo vivo para su multiplicación y su desimanación (Rizo, 2005).

Rodríguez 2006, expresa que, en Nicaragua, la UNAN-LEÓN es la única institución que produce VPN. El Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos, CIRCB, a través del laboratorio de Virus, ha desarrollado y adaptado metodologías para la producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN). Actualmente se producen virus de las especies *Spodoptera exigua*, *Spodoptera sunia* y *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) y se usan como bioinsecticidas para la regulación de estas plagas.

Por ello esta familia es considerada como la más importante en el control de insectos ya que, ataca a muchas de las plagas de importancia económica en varios cultivos. Las principales características de esta familia son: el genoma de estos virus está compuesto de una partícula de ADN, el ácido nucleico se encuentra envuelto por una capa proteica llamada cápside, la capsida y el ácido nucleico forman la unidad infectiva llamada virión y los viriones envueltos en una matriz proteica forman el conjunto conocido como cuerpos poliédricos de inclusión. (Carballo y Guharay, 2004) citado por Cruz 2002.

El núcleo cápside es de 30-55 nm de diámetro y de 205 a 300 nm de largo contienen una cadena súper embobina de forma circular con una doble cadena de AND de 90-160 Kb. Los cuerpos de inclusión son formados en el núcleo de la célula infectada y pueden ser fácilmente detectados en el microscopio en el fase contrastante o campo oscuro, como partículas de alta refracción que pueden ser vistos a 400x (ODEC, 2002) citado por Cruz 2002,

4.5. Modo de acción

Alves 1986, citados por Rizo y Narváez., 2001, explican que los virus penetran al hospedante por medio de ingestión de alimentos con los poliedros siendo el estado larval su etapa de mayor susceptibilidad, otras vías de infección son a través de transmisión transovárica, por medio de los huevos de los insectos, es posible por vía interna y externa

por contaminación del corium, la cual es más frecuente: La contaminación de larvas recién nacidas es facilitada por el hábito de comer el corium de los huevos, y por heridas provocadas por el parásito. Santos (1998), Lezama, (2011).

Según Cave (1995) y Lezama, (2011), el modo de acción del VPN Los Báculovirus contaminan a los insectos por vía oral, los viriones son ingeridos con el alimento después de la ingestión, los poliedros del VPN que contienen los viriones se disuelven en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 7.5$) del intestino medio y se liberan los cápsidos a las células epiteliales del intestino donde el virus normalmente realiza su primera vuelta de replicación (Cáceres 2002). El número de nucleocápsidos y el número de partículas de virus por poliedros puede afectar la transmisión de la infección. Posteriormente el virus afecta otros tejidos susceptibles del hospedero, donde continúa reproduciéndose y multiplicándose. Entre los tejidos que ataca se menciona el cuerpo graso, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda.

4.6. Síntomas de infección por VPN

Las larvas inoculadas con el Virus de la Poliedrosis Nuclear, (VPN), básicamente presentan los síntomas después del tercer o cuarto día, primero se observa poca movilidad de las larvas, manchas en el integumento y la piel, con un tono amarillento y apariencia oleosa, dejan de alimentarse y se suben a la parte alta de la planta, luego se cuelgan de las hojas con las patas traseras y posteriormente se vuelven oscuras debido a la desintegración de los tejidos internos hasta la ruptura del integumento (Rizo y Narváez, 2001) citados por (Centeno y Carrasco, 2004)

Vaughan y León (1979) reportan que en Nicaragua *Spodoptera sunia* se ha vuelto altamente resistente a los plaguicidas y son plagas claves debido a sus altas poblaciones y altos niveles de daño económico.

4.7. Dispersión del VPN

Los cuerpos de las larvas muertas son una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles en el cultivo y cuando la membrada del cuerpo larvario se rompe liberan una gran cantidad de poliedros (cuerpos de inclusión) en el medio ambiente (Lobo de

Souza; Lecuona (1995).), Cruz (2002) Para el ciclo de escritura a medida que avanza, tanto el agua de lluvia como las larvas que caen al suelo transportan partículas virales al suelo, donde permanecen y sirven como inóculo inicial para infecciones posteriores (Rizo y Narváez 2001). Según Alves (1986), el inóculo es esparcido por factores abióticos como viento, lluvia, riego y labranza, así como por factores bióticos como parásitos, depredadores adultos del hospedero, detritívoros y aves.

4.8. Producción del Virus laboratorio.

Igual que con otros virus, su producción es necesariamente en células de insectos ya sea en larvas (in vivo) o por medio de cultivo de células de insectos (in vitro), técnica que es más costosa. Ambas técnicas requieren de diferentes niveles tecnológicos representativos en cada caso. La producción *in vivo* requiere de muy poca tecnología moderna (Behle, R.W. y Tamez-Gerra, P, 2003)

La metodología de producción que se utiliza actualmente en el laboratorio de la UNAN, es in vivo y está basada en los resultados de evaluaciones sobre concentración de virus y sobre el instar larval más adecuado para obtener una larva equivalente. Se considera una Larva equivalente, una larva grande muerta por virus y con una producción de 6 unidades virales, que corresponde a 10^9 cuerpos de inclusión poliedral, CIP/LE (Alves, 1986).

Para la producción del virus primero se coloca dieta semiartificial en estado semi líquida sobre el recipiente utilizado, donde permanece hasta la solidificación; cuando está completamente fría se procede a inocular con una solución viral, luego se colocan las larvas del 2^{do} y 3^{er} estadio. Después se procede a examinar las larvas que mueren por efecto de virus. La cosecha de los virus se realiza después de 3 o 5 días del período de incubación. Para ello se sacan las larvas muertas por virus de cada vaso, cuidando de no depositar restos de dieta o heces de las larvas, para evitar problemas de contaminación. Luego se almacenan en recipientes plásticos, los cuales se le coloca la información necesaria como nombre del virus, número de larvas, fecha de inoculación y de cosecha (Rizo y Narváez, 2001).

4.9. Uso del Virus de la Poliedrosis Nuclear para el Control de Plagas

Centeno y Carrasco (2001) a diferencia de los insecticidas químicos, que solo tienen un efecto directo y local sobre los insectos los baculoviridae tienen una gran capacidad innata de para su reproducción y propagación utilizándose de diversas maneras como bioinsecticidas o inoculación para crear un inoculo o epizootias naturales al inicio de la temporada agrícola desempeñando un papel muy significativo en el control de plagas tanto en condiciones ambientales como a través de un programa de manejo integrado de plagas.

4.10. Determinación de la calidad del insecticida Viral

Este proceso incluye varias etapas; la primera es contar con un patrón de referencia almacenada en condiciones óptimas, la segunda es determinar el número de cuerpos de inclusión poliedral (CIP) de la formulación, a través de bioensayos y como último paso se compara este con el patrón de referencia y si es necesario se hacen las correcciones requeridas. Este proceso debe realizarse para cada lote de producción, el cual está determinado por la capacidad de producción de la empresa, (Sosa-Gómez y Moscardi 1996, citado por Rizo y Narváez 2001).

4.11. Formulación

Actualmente, el VPN es utilizado de forma cruda y en una formulación en polvo. Para obtener una solución viral las larvas equivalentes (LE) son maceradas en agua y filtradas con una tela de muselina, para evitar que las cápsulas cefálicas obstaculicen las boquillas de las bombas de aplicación, la solución filtrada debe estar lista para mezclarse en un volumen de agua suficiente para asperjar en el cultivo.

4.12. Técnicas de Bioensayo con virus Entomopatógenos

Bioensayo se puede definir como cualquier método que mida alguna propiedad de un material, en términos de respuesta biológica, es decir, que en los bioensayos se toman los organismos vivos como aparatos de medición y establece el parámetro biológico que utilizará (crecimiento, fertilidad, longevidad y mortalidad) para relacionar el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo, en el terreno toxicológico el fenómeno

causal es siempre un agente deletéreo y el efecto normalmente es la mortalidad o algún otro daño biológico, este es el caso de los bioensayos donde se prueban los efectos de diversas dosis de VPN *Spodoptera sunia*, sobre determinadas especies de insectos hospederos del virus, este efecto se mide en términos de mortalidad como si fuera un insecticida químico, (Soto 2009).

Los estudios sobre características biológicas de virus a través de bioensayos son importantes desde el punto de vista básico y aplicado, la determinación de ciertos parámetros a través de ensayos sobre material vivo permite evaluar la potencialidad de un virus en el control de 14 plagas, así como, también, la identificación de los aislamientos y formulaciones más eficientes para dicho control.

En términos generales un bioensayo puede ser definido entonces como cualquier prueba que involucra organismos vivos, a su vez se puede señalar como cualquier método por medio del cual alguna propiedad de una sustancia o material es medida en términos de la respuesta biológica que produce. Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la metodología estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo sino que se debe utilizar lo que se llama estadística cuantil, la cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo donde el principal objetivo de este tipo de análisis es evaluar el nivel de estímulo que es necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población (Steinbrecher 2008).

El bioensayo de *Spodoptera sunia* se basa en la hipótesis farmacológica la cual establece que un individuo manifestará el efecto médico al administrarle una dosis determinada del fármaco en prueba, que dicha dosificación variará de un individuo a otro y que el efecto sobre una población de individuos mostrará límites mínimos y máximos de dosificación, en otras palabras, el efecto de una dosis solo podrá ser válido si se mide sobre una población homogénea; la dosificación mostrará un umbral en el que la dosis mínima de ese umbral causará el efecto deseado a un mínimo de la población probada, mientras que la dosis máxima de ese umbral causará el efecto esperado a un máximo de la población, esto implica que si se desea establecer una relación entre las dosis probadas y la mortalidad causada por las preparaciones de *Spodoptera sunia*, cada dosis deberá probarse con una población representativa de individuos tal, que refleje los

efectos reales de la δ -endotoxina, de esta forma los datos podrán ser analizados estadísticamente y se podrá estimar un parámetro estadístico que represente, con un nivel de probabilidad dado, la toxicidad de la preparación en prueba.

El efecto de VPNSa sobre los insectos susceptibles solo podrá ser medido cuantitativamente mediante bioensayos, el objetivo final de un bioensayo con *Spodoptera sunia*, es la estimación de la DL₅₀, como parámetro estadístico que refleja dentro de ciertos niveles de probabilidad el nivel de toxicidad de la preparación probada; en el presente trabajo se enumeran los diferentes pasos a seguir para la elaboración de un bioensayo estadísticamente válido y cuáles son sus fundamentos, (Steinbrecher 2008).

El nivel de estímulo que causa una respuesta en el 50% de los individuos de una población bajo estudio es un importante parámetro de caracterización denotado como DL₅₀ por dosis letal media (DL₅₀) por dosis efectiva media, CL₅₀ por concentración letal media, CE₅₀ por concentración efectiva media y LTM (límite de tolerancia media), el periodo de tiempo durante el cual se expone el estímulo debe ser especificado, por ejemplo, 24 horas DL₅₀, esto con el fin comparar y estimar la potencia relativa del estímulo.

La potencia de un organismo se puede medir por varios parámetros: 1) dosis letal media (DL₅₀) que es la cantidad de virus CIP (cuerpos de inclusión poliedral) capaz de provocar el 50 % de mortalidad de una población; 2) concentración letal media (CL₅₀) que es la dosis aplicada (generalmente por unidad de superficie) que produce el 50 % de mortalidad de una población; y 3) tiempo letal medio (TL₅₀ %) que es el tiempo que tarda en matar el 50 % de una población, por lo que el insecto está continuamente expuesto al virus.

La determinación de la DL₅₀ se utiliza para encontrar umbrales de toxicidad para determinadas sustancias; en el desarrollo de pesticidas se utiliza para determinar los límites de resistencia de insectos, ante ciertos biocidas. En la investigación fotoquímica valiéndose del principio de que farmacología es simplemente toxicología a bajas concentraciones o toxicología es farmacología a concentraciones altas se puede correlacionar la bioactividad con el valor de la DL₅₀ y al mismo tiempo su grado de toxicidad, la determinación de la DL₅₀ requiere de la estadística cuantitativa para lo cual es

necesario transformar los valores de respuesta obtenidos en unidades Anglit, Logit o Probit y las dosis suministradas en unidades logarítmicas conocidas como dosis metamétricas; existen algunos programas especializados que realizan este tipo de cálculos automáticamente, pero su confiabilidad depende de la persona o institución que los haya desarrollado. Se hace necesaria la comparación de los procedimientos empleados así como desarrollar medios para su simplificación y de esta manera aportar al desarrollo de un análisis de bioactividad a través del método de Probit, (Vargas 2006).

4.13. Características biológicas de *Spodoptera albula*

Las plagas del género *Spodoptera* Spp (Lep.: Noctuidae) en Nicaragua tienen importancia económica, ya que pueden influir significativamente en la disminución de los rendimientos de importantes cultivos: algodón, soya, maíz, girasol. *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) ocurre en maíz, sorgo y arroz. *Spodoptera exigua* (Hubn) en los cultivos de algodón soya y melón. *Spodoptera sunia* (Guen) en cultivos de algodón soya, ajonjolí, cártamo y tomate.

Romero y Cruz 2011 manifiestan, las mariposas y palomillas constituyen el Orden Lepidóptera con 100 mil especies distinguibles, y a pesar del gran número son muy uniformes tanto en morfología como en comportamiento; las orugas más perjudiciales que se reportan en los invernaderos son Noctuidos que es la familia de mayor número de especies de los lepidópteros, la mayoría de los adultos son nocturnos y tienen una coloración marrón similares entre sí (Malais y Ravensberg, 1992). *Spodoptera sunia* (Guen) = (*Xylomige sunia*) es llamado gusano cortador, gusano tigre, rosquilla de gusano cuerudo.

4.14. Distribución

Spodoptera albula se encuentra distribuida en el Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, El Caribe y América del sur. En nuestro país se encuentran en las áreas de cultivo de frijol, tomate, hortalizas, yuca, solanáceas, cucurbitáceas, maíz, sorgo, arroz (King y Saunders, 1984). En su modo de dispersión lo hacen por el vuelo, también se dispersan a mayores distancias con ayuda del viento. (King y Saunders, 1984).

4.15. Ciclo de vida de *Spodoptera albula*

4.15.1. Huevo:

Los ponen en grandes grupos sobre las hojas y están cubiertos por un gran filtro gris de pelos que salen del abdomen de la hembra en ovoposición.

4.15.2. Larva:

Son de color gris-negro a gris-café, con una línea dorsal de triángulos negros u oscuros en pares, cada uno tiene un punto blanco en su centro, la línea subespiracular está ausente o es borrosa; las líneas dorsales y subdorsales a menudo de color amarillo rojo o naranja brillante, pero puede ser borrosa, la cabeza es café con marcas negras, las larvas cuando emergen son muy pequeñas y lo primero que hacen es devorar el resto de lo que ha quedado de los huevos, seguidamente ellas comienzan a alimentarse de las hojas, causando una esqueletización de las mismas; son gregarias durante sus dos primeros estadios, se dispersan en el terreno y se dispersan en los rastrojos, o en el follaje en el día, se alimentan de noche de las hojas y brotes tiernos, todas las especies empupan en el suelo.

4.15.3. Estado pupal:

Cuando las larvas han terminado su alimentación al final del sexto estadillo se dejan caer al suelo donde forman una cámara pupal y pasan al estado de pupas, este hecho de empupar en el suelo parece una estrategia del insecto de escapar de otros animales; a pesar del hecho de que las pupas se protegen en el suelo y de esa forma escapa de la muerte.

4.15.4. Adulto:

El adulto tiene una envergadura de 26-27 mm puede distinguirse por la presencia de una banda negra delgada inmediatamente detrás de la cabeza; los sexos son similares, la hembra copula solo una vez en la noche, y lo más común es que las hembras vírgenes copulen en las primeras horas de la noche, la mayor actividad se alcanza antes de la media noche, después de la fecundación se da la ovoposición.

4.16. Ciclo de vida

Según King y Saunders, 1984, documentan que, la duración del ciclo de desarrollo del complejo de *Spodoptera sunia* criados para condiciones de laboratorios son: huevo dura de 4 a 8 días; larva de 14 a 18 días, pupa de 9 a 8 días para un rango promedio del ciclo de vida de 27 a 38 días.

4.17. Modo de distribución

Romero y cruz 2011, expresan que la distribución de la especie *Spodoptera sunia* es a través del vuelo. También se distribuyen a mayores distancias con ayuda del viento y por medio de transporte de material infestado.

4.18. Apariencia general

El adulto de *Spodoptera sunia* posee una envergadura de 26 - 27 mm, es similar a *Spodoptera eridania* pero se diferencia por la presencia de una banda negra delgada inmediatamente detrás de la cabeza. La larva es gris negro a gris café, con una línea dorsal de triángulos negros u oscuros en pares, cada uno tiene un punto blanco en el centro, la cabeza es café con marcas negras. (King y Saunders 1984).

4.19. Daño

Según King y Saunders (1984) y Urbina y Valle (2012) las larvas se alimentan del follaje y de la fruta, pueden defoliar cuando están en grandes densidades, a veces actúan como cortadores más aún en las regiones secas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación del estudio

El trabajo se realizó en el laboratorio de producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear del Centro de Investigación y Reproducción Controladores Biológicos (CIRCB), en la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinarias de la UNAN-León iniciando en septiembre del año 2022.

El virus utilizado fue de aislados originalmente obtenidos de larvas de *Spodoptera albula* colectadas del laboratorio de cría de insectos noctuidos perteneciente al Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB) de la UNAN-León. El aislado fue codificado como virus U-3. El virus SaVPN producido en el Laboratorio de Virus Entomopatógenos de la Escuela de Ciencias Agrarias y Veterinaria de la UNAN-León.

5.2. Fases de la investigación

5.2.1. Preparación de la solución viral:

Se realizó la prueba de virulencia de la cepa del Virus de la Poliedrosis nuclear Sa (VPN) de 150 larvas equivalentes que fueron inoculadas el 16-2-21 y cosechadas el 25-2-21 y almacenadas en freezer a 0°C procedentes del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos de la UNAN-León, las que se prepararon de la siguiente manera:

5.2.2. Proceso semipurificación del Virus de la Poliedrosis Nuclear Sa(VPN)

Las larvas equivalentes seleccionadas se descongelaron por 30 minutos, luego se les agregó 150 ml de agua destilada y se licuaron por un minuto, la solución obtenida se filtró en una tela organdi fina, obteniendo de esta manera la solución viral para el proceso de centrifugación y así obteniendo la solución madre.

La solución viral, se sometió por un proceso de centrifugación diferencial, para separar el virus de las partículas del cuerpo de larva. De la solución obtenida se

colocaron en tubos de ensayo los cuales fueron lavados y esterilizados previamente, en donde después se centrifugaron en dos tiempos.

Primero se realizó la centrifugación por un minuto a 3000 rpm, de esta primera centrifugación se obtuvo 2 soluciones: un sobrenadante y un precipitado, de esta se descartó el precipitado y el sobrenadante se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 6000 rpm, de esta centrifugación se obtuvo un sobrenadante y un precipitado, el sobrenadante se descartó y el precipitado es el que contiene los cuerpos de inclusión poliedral (CIP), a este se le agregó 20 ml de agua destilada con ayuda de una pipeta Pauster se succiono y se vertió en un vial el cual se rotulo con el número de larvas equivalentes y fecha de semipurificación, la solución que se obtuvo fue la solución madre y a partir de esta se conocieron las concentraciones realizando el conteo de cuerpos de inclusión poliedral para elaborar las diferentes dosis de virus.

5.3. Preparación de las disoluciones

A partir de la solución madre se prepararon las disoluciones sucesivas 1:10, 1:100, 1:1000. Primero se midieron 50 microlitros de la solución madre con una micropipeta, se vertieron en un vial y se le agregaron 450 microlitros de agua destilada para obtener la dilución 1:10, la dilución 1:10 se agito en un vortex durante un minuto y se agregaron 50 micro litros de la solución con una micropipeta se depositaron en vial y se le agregaron 450 microlitros de agua destilada y se obtuvo la disolución 1:100, se agitó la solución se tomaran 50 microlitros de solución y se depositó en un vial y se le agregaron 450 microlitros de agua destilada y se obtuvo la disolución 1:1000 de la solución 1:1000 se realizó el conteo de cuerpos de inclusión.

5.4. Conteo de cuerpos de inclusión poliedral

De la solución 1:1000 se realizó el conteo a través de la cámara de Neubauer en el microscopio de contraste de fase, el conteo se realizó en cinco cuadros grandes de la retícula de la cámara, este procedimiento se elaboró 3 veces, para determinar la concentración de los CIP donde se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Concentración} = X \times 5 \times 10^4 \times 1000$$

Donde:

5: cuadros de la solución empleada.

10⁴: profundidad de la cámara.

X: Numero promedio de Poliedros.

5.5. Preparación de las dosis

Para el montaje del ensayo, conociendo la concentración se prepararon cinco dosis (ventana biológica) más un testigo las cuales serán 100 LE, 125 LE, 150 LE, 175 LE y 200 LE de solución viral por litro de agua. Para cada dosis se evaluaron 25 individuos para un total de 100 individuos por dosis y un testigo absoluto en el cual solo se les aplicó agua destilada a las larvas para 900 individuos en total.

5.6. Diseño experimental

Se realizó un Bifactorial conformado por dos factores, donde los factores que interactúan en el estudio fueron cinco concentraciones virales y un testigo absoluto, con los cinco instars de las larvas con tres repeticiones.

5.7. Análisis estadístico

Para el análisis de los datos primero se procedió a la creación de la base de datos con el programa Microsoft Excel 2016 posteriormente se utilizó el programa estadístico R Statistical para Windows. Primeramente, se importó la base de datos en el programa R mediante la función “import” del paquete “rio” (Chan *et al.*, 2018). para el procesamiento de datos y se usó un modelo lineal generalizado para calcular la mortalidad y eficacia según los instar larval, concentración y el tiempo letal con un nivel de confiabilidad de 95%. para la variable eficacia usando la función “glm” del paquete “stats” (R Core Team, 2020) y se estimó el valor del criterio de información de Akaike(AIC) y Peso de Akaike mediante la función “glmulti” del paquete con mismo nombre (Calcagno, 2020) para determinar los factores con mayor importancia en el modelo. Posteriormente se efectuó la evaluación de la CL₅₀ mediante la función “dose.p” del paquete “MASS” (Venables & Ripley, 2002) y TL₅₀ mediante la función “LT_logit” del paquete “ecotox” (Hlina *et al.*, 2019).

5.8. Inoculación del virus

Para el uso del virus se implementó el método de contaminación de la dieta vía oral (de ingesta tópica) siendo usadas las larvas de *Spodoptera albula* en sus 5 estadios larvales L1, L2, L3, L4 y L5 con cinco concentraciones previamente preparadas para ser infestadas. Antes de inocular con las soluciones virales fue necesario la preparación de la dieta la cual se realizó un día previo a su uso, la dieta se cortó en cubos de 3x2 cm² y se distribuyó en tazas pequeñas de 4 onzas de forma homogénea las cuales previamente fueron desinfectadas con alcohol al 70 %.

Una vez obtenida la dieta elaborada con agar procedente del laboratorio de cría de insectos noctuidos, se procedió a distribuir homogéneamente en tazas de 4 onzas ya desinfectadas; esto se hizo con la finalidad de tener una mejor distribución de la dieta, luego se inocularon con cada una de las concentraciones preparadas. Se utilizó una micropipeta de 20 microlitros para diseminar las concentraciones virales preparadas sobre la dieta lo más homogéneamente posible. Realizado este proceso se colocaron una larva por taza de manera individual, se taparon y rotularon con el día de infestación y la hora.

Para el establecimiento del ensayo fueron utilizadas larvas de *Spodoptera albula*, de las cuales se manejaron las 5 concentraciones virales, más el testigo absoluto en todos sus 5 instares larvales con una muestra de 15 larvas con 3 repeticiones para un total 45 larvas por tratamiento, para una población total de 1350 larvas.

Una vez que las larvas de *Spodoptera albula* ya inoculadas en el laboratorio de entomología se procedió a inocular todos los tratamientos con cada una de sus repeticiones, para posteriormente observar la mortalidad de las larvas después de 8 horas de haber sido infestadas con las diferentes concentraciones virales, monitoreándose cada 12 horas durante 15 días seguidos obteniendo mortalidades del 70% de la población, siguiéndose con la observación hasta obtener la mortalidad de la población total de las larvas y el testigo absoluto llegara hasta la fase de pupas.

Cuadro 1. Establecimiento del ensayo

Dosis	Instar				
	I	II	III	IV	V
C1	C1I	C1II	C1III	C1IV	C1V
C2	C2I	C2II	C2III	C2IV	C2V
C3	C3I	C3II	C3III	C3IV	C3V
C4	C4I	C4II	C4III	C4IV	C4V
C5	C5I	C5II	C5III	C5IV	C5V
TESTIGO	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA	AGUA
<i>C1=100LE, C2=125LE, C3=150LE, C4=175LE, C5=200LE.</i>					

Cuadro 2 . Descripción de los tratamientos.

Simbología		Descripción
C1=100LE C2=125LE C3=150 C4=175 C5=200	T1	Consiste en la utilización de Virus de la Poliedrosis nuclear de la especie <i>Spodoptera albula</i> a una concentración de 100LE, para inocular los 5 instar de las larvas.
	T2	Consiste en la utilización de Virus de la Poliedrosis nuclear de la especie <i>Spodoptera albula</i> a una concentración de 125LE, para inocular los 5 instar de las larvas.
	T3	Consiste en la utilización de Virus de la Poliedrosis nuclear de la especie <i>Spodoptera albula</i> a una concentración de 150LE, para inocular los 5 instar de las larvas.
	T4	Consiste en la utilización de Virus de la Poliedrosis nuclear de la especie <i>Spodoptera albula</i> a una concentración de 175LE, para inocular los 5 instar de las larvas.
	T5	Consiste en la utilización de Virus de la Poliedrosis nuclear de la especie <i>Spodoptera albula</i> a una concentración de 200LE, para inocular los 5 instar de las larvas.

Se calculo el porcentaje de mortalidad en todos los tratamientos, posteriormente serán corregidos, utilizando la fórmula de Abbott y así determinar la eficacia.

Formula de Abbott corregida

$$Mortalidad = \frac{\% Mort. Tratadas - \% Mort. Control}{100} \times 100$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Concentración letal media (CL₅₀) del Virus de la Poliedrosis Nuclear en *Spodoptera albula*

Los valores de CL₅₀ y CL₉₀ obtenidos en los distintos instares de *S. albula* establecen que en general, a mayor instar larval se requiere una mayor dosis de VPN para conseguir la mortalidad del 50% y 90% de la población. El instar L5 presentó los valores más altos de CL₅₀ (78.952 LE/ 6.15E+08 CIP) y CL₉₀ (165.58 LE/8.69E+11 CIP), sin embargo, obtuvo la menor variabilidad en los mismos. El instar L1 por su parte, mostró los menores valores para ambas dosis (37.12 LE/4.81E+05 CIP) (80.16 LE/8.04E+08 CIP), pero estos resultados tienen la mayor variabilidad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Concentración letal 50 y concentración letal 90 de Virus de la Poliedrosis Nuclear en *Spodoptera albula* Reflejado en Cuerpos de inclusión poliedral (CIP) y Larvas equivalentes (LE). Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos, UNAN-León, 2022.

Ínstar	Concentración CIP		Error estándar	LE	Error estándar
L1	CL ₅₀	4.81E+05	7.34E+00	37.12	0.71
	CL ₉₀	8.04E+08	2.85E+00	80.16	0.28
L3	CL ₅₀	6.41E+07	2.48E+00	51.33	0.38
	CL ₉₀	2.11E+11	7.62E-01	146.32	0.10
L4	CL ₅₀	6.04E+05	5.97E+00	33.64	0.74
	CL ₉₀	8.95E+10	1.13E+00	130.72	0.13
L5	CL ₅₀	6.15E+08	1.47E+00	78.95	0.15
	CL ₉₀	8.69E+11	7.87E-01	165.58	0.08

6.2. Tiempo letal medio (TL₅₀) del Virus de la Poliedrosis Nuclear en *Spodoptera albula*

La variable TL₅₀ muestra que el tiempo requerido para ocasionar la mortalidad del 50% de la población de *S. albula* depende en gran medida de la concentración utilizada de VPN, así como del instar larval del insecto. El mayor valor se presentó en el Instar 5 a la concentración de 100 LE (211 horas), mientras que el valor más bajo se evidenció en el instar I a la concentración de 100 LE (0.187 horas). A pesar de la gran variabilidad observada entre las distintas concentraciones y distintos instar larvales, se visualiza una marcada tendencia a la reducción del tiempo letal 50 a medida que incrementa la concentración de VPN (74.99, 62.88, 51.10, 33.39 y 39.80 horas para las concentraciones 100, 125, 150, 175 y 200 LE respectivamente); de igual manera se evidencia que según incrementó el estado de desarrollo de las larvas, también incremento el tiempo necesario para la muerte del 50% de la población con valores de 16.99, 30.82, 63.48, 53.32 y 97.56 horas para los instar I, II, III, IV y V respectivamente (cuadro 4)

Cuadro 4. Tiempo letal 50 de Virus de la Poliedrosis Nuclear en *Spodoptera albula* Reflejado en Cuerpos de inclusión poliedral (CIP) y Larvas equivalentes (LE). Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos.

Concentración (LE)	Instar larval	TL 50	Límite inferior	Límite superior	Promedio horas
100	I	0.17	1.568374	9.31	74.99
	II	48.3	32.2	62.9	
	III	46.2	26.5	64	
	IV	69.3	53.6	83.7	
	V	211	178	260	
125	I	20.5	13.6	25.8	62.88
	II	27.1	22.5	31.4	
	III	137	98.3	178	
	IV	56.9	40.2	72.1	
	V	72.9	61.1	84	
150	I	43.5	38.7	47	51.10
	II	51.7	41.2	61.3	

	III	59	48.3	69	
	IV	48.2	26.2	67.5	
	V	53.1	47.9	58	
	I	4.07	0.254	11.3	
	II	12.3	1.39	27	
175	III	25	10.7	38.4	33.39
	IV	35.7	11	58.2	
	V	89.9	76	103	
	I	16.7	10.3	22.5	
	II	14.7	6.4	23.2	
200	III	50.2	40.2	59.4	39.80
	IV	56.5	47.5	64.9	
	V	60.9	50.8	70.5	

Los mayores valores de CL_{50} en instares larvales se debe a que los mecanismos de defensas de los insectos al proceso infeccioso del virus aumentan a medida que el huésped se desarrolla. Entre los mecanismos que las larvas utilizan se destacan la activación de la ruta PIRK-Akt fosfatidinositol-3-quinasa que afecta los efectores del virus y por ende al proceso infeccioso (Xu *et al.*, 2015). Hu *et al.* (2023) mencionan que existen muchos mecanismos en insectos afectados por Virus de la Poliedrosis Nuclear como *Bombyx mori* L. (Lep.: Bombycidae). Se han identificado proteínas antivirales en el intestino (proteínas de fluorescencia roja, lipasas H-A, proteasas de serina, NADPH oxidorreductasa); eliminación del virus por melanización catalizada por profenoloxidasas (PPO) y fenoloxidas (PO); producción de ARN de interferencia que inhabilitan el virus y muerte celular programada que detiene la infección.

Lezama (2011) reporta valores de CL_{50} en larvas L2 de 2040 CIP utilizando la misma cepa de virus que se implementó en este estudio. A su vez menciona que dicha concentración aumentó en comparación a los resultados obtenidos en evaluaciones realizadas en la década de 1990 (50 – 300 CIP). El incremento de la CL_{50} a través de los años indica que la cepa en estudio, la cual ha permanecido sin modificación, ha perdido viabilidad debido a que las poblaciones de *E. albul*a han generado resistencias al virus por la constante exposición al mismo (Fuxa, 1987; Lovett & Leger, 2017) ya sea de manera deliberada o naturalmente. Esto implica que se debe renovar la cepa existente

(Butt *et al.*, 2016) mediante la recolección e incorporación de especímenes que hayan contagiado el virus de forma natural para generar variabilidad en los genes de la cepa.

Cruz (2002) reporta resultados de CL_{50} en *S. exigua* de 5×10^7 CIP en larvas de tercer estadio, los cuales son muy similares a los obtenidos en esta investigación. Sin embargo, sus resultados de CL_{90} fueron muchos mayores (7×10^{14} CIP) lo que implica una menor carga viral para producir la mortalidad del 90% de la población de larvas. Por otro lado, Zhou *et al.* (2023) obtuvieron CL_{50} en rangos desde 0.717 hasta 138.9 ($\times 10^6$ CIP). El-Sheikh (2015) menciona que para larvas del primer instar obtuvo CL_{50} y CL_{90} respectivas de 1.9×10^5 y 1.8×10^6 ambos resultados semejantes a los de este ensayo, lo que muestra que a pesar de la disminución de viabilidad de la cepa en estudio, los resultados obtenidos se mantienen en el rango de concentración letal media reportada por otros investigadores.

Respecto a los valores de tiempo letal medio, Cruz (2002), El-Sheikh (2015) y Zamora *et al.* (2017) reportan resultados respectivos de 120 horas para larvas de segundo instar, 117 y 74 horas para larvas de instar 1 y 2, y 90.5-103.3 horas en larvas de segundo instar, mientras que en larvas de cuarto instar se alcanzaron de 109.1- 119.2 horas. Todos estos resultados fueron superiores a los de este estudio, siendo la gran mayoría de ellos superiores a los obtenidos en larvas L5. Valores bajos de tiempo letal medio implican que las larvas de *E. exigua* permanecerían menos tiempo en los agroecosistemas y por ende la probabilidad de ocasionar daños en cultivos y la potencial disminución en la productividad de los mismos sería menor.

6.3. Eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear en *Spodoptera albula*

Para estimar la eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear en *S. albula* se generó un modelo lineal generalizado con los factores instar larval, concentración del virus y horas después de la inoculación del virus para estimar, mediante los valores de criterio de información de Akaike y peso de Akaike, cual o cuales factores fueron los más determinantes en la eficacia. Se obtuvo que la combinación de los tres factores evaluados explica los valores de eficacia obtenidos, siendo la acción conjunta de estos

la responsable de dichos valores, ya que el modelo que combina los tres factores obtuvo el menor valor de AICc y mayor peso de Akaike respectivamente (9469.42 y 1) (Cuadro 5.). El hecho de que los modelos producidos por Instar + Hora después de inoculación, Concentración del virus + Horas después de inoculación, y Hora después de inoculación fuesen los siguientes modelos de mayor relevancia en la eficacia, demuestra que en este estudio el tiempo transcurrido luego de la inoculación tiene mayor peso que el instar en el que se encuentra la larva de *S. albula* al ser expuesta al virus y más aún que la concentración del virus que resultó ser el factor de menor peso.

Cuadro 5. *Criterio de información da Akaike y peso de Akaike de la eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear sobre Spodoptera albula según instar larval, concentración del virus y horas después de inoculación en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022.*

Modelo	AICc	Peso
Eficacia ~ 1 + Concentración + Instar + Hora	9469.42	1
Eficacia ~ 1 + Instar + Hora	9506.28	0
Eficacia ~ 1 + Concentración + Hora	9628.04	0
Eficacia ~ 1 + Hora	9659.29	0
Eficacia ~ 1 + Concentración + Instar	9846.84	0
Eficacia ~ 1 + Instar	9872.06	0
Eficacia ~ 1 + Concentración	9957.65	0
Eficacia ~ 1	9980.00	0

En los resultados del porcentaje de mortalidad general, se obtuvo que el primer instar presentó el mayor porcentaje de mortalidad con un 93.6%, seguido por el segundo instar con 87.0% de mortalidad, luego el instar cuarto presentó una mortalidad con un 78.4%, el instar 3 presentó una mortalidad de 76.2% obteniendo un valor más baja que el instar tres, por último, el instar cinco reportó una mortalidad de 68% lo que demuestra una efectividad del virus sobre las larvas de *Spodoptera albula*. (Figura 1ª). La mortalidad total referente a la última fecha donde se muestra la muerte de todos los instares larvales

por las concentraciones virales utilizadas, se obtuvo en el instar 1 una efectividad de 98.2%, para el segundo instar 96.0%, en el cuarto 91.1%, el tercer instar presentó un 88.9% y por último el 5 instar presentó una mortalidad de 83.6% (Figura 1b).

En lo que respecta a la eficacia del virus Sa(VPN) según el instar larval, se puede observar que el instar uno presentó la mayor eficacia con 92.8%, seguido por el segundo instar 86.7%, en el cuarto instar mostró 77.7%, en el tercer instar se obtuvo 74.8% y el quinto instar presentó 67.0% de mortalidad (Figura 1c). Mientras que la eficacia acumulada del virus Sa(VPN) con las diferentes concentraciones evidencia que los volares incrementaron ya que el instar uno obtuvo un 97.6%, el segundo instar tuvo 95.3%, en el cuarto instar 89.5 %, mientras que el tercer instar presento 86.5% y en el quinto su eficacia fue de 82.0% (Figura 1d).

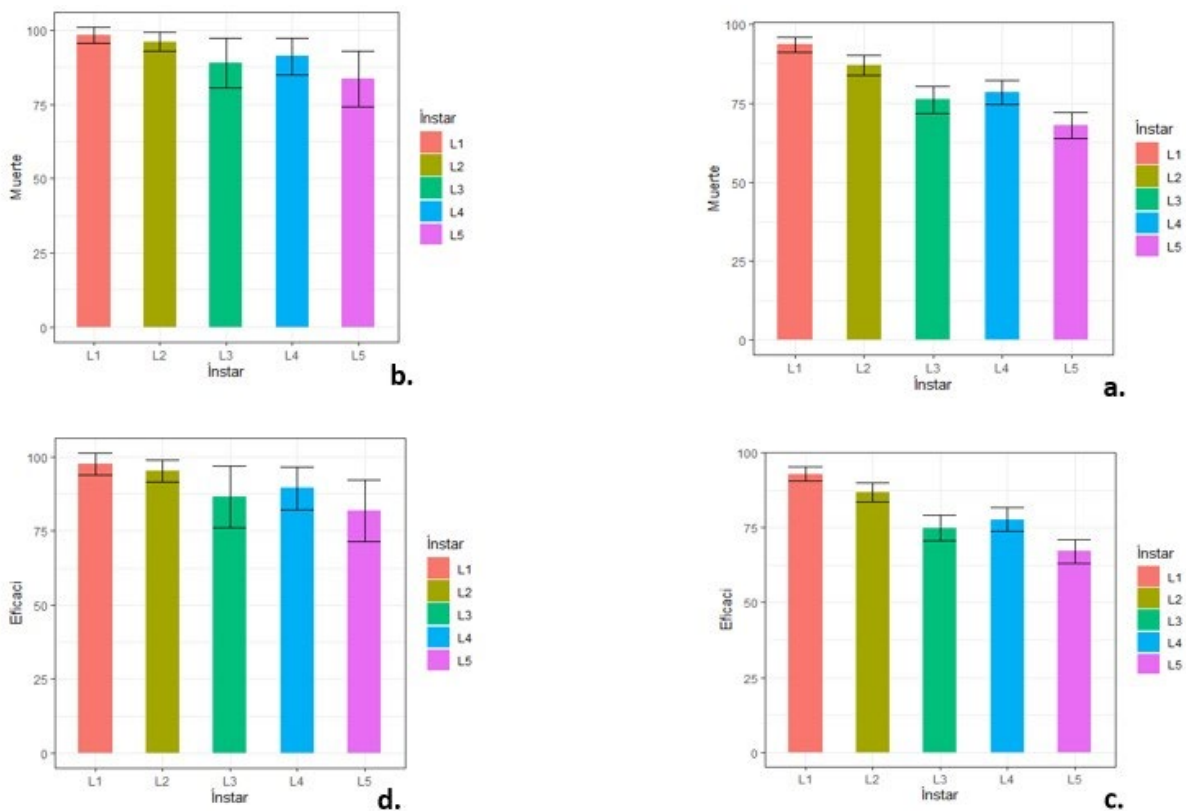


Figura 7. a) Mortalidad y b) Eficacia de los instares larvales de *Spodoptera albula* inoculados con diferentes concentraciones de Virus de la Poliedrosis Nuclear en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022.

Los valores de eficacia general según la concentración del Sa(VPN) establecen que la concentración de 150 LE presentó los mayores valores promedio con 84.6%, seguidos de las concentraciones 175 y 200 LE con 83.1 % y finalmente las concentraciones de 125 y 100 LE con 77.2% y 71.1% respectivamente (Figura 2^a). Esta tendencia en los resultados cambió en la eficacia acumulada según la concentración debido a que la concentración de 200 LE presentó los mayores promedios 96.9%, seguido de 150 LE con 96.3%, el tratamiento de 175 LE obtuvo 89.2%, mientras que los menores promedio los presentaron nuevamente las concentraciones de 125 y 100 LE con 87.9% y 80.5% (Figura 2b)

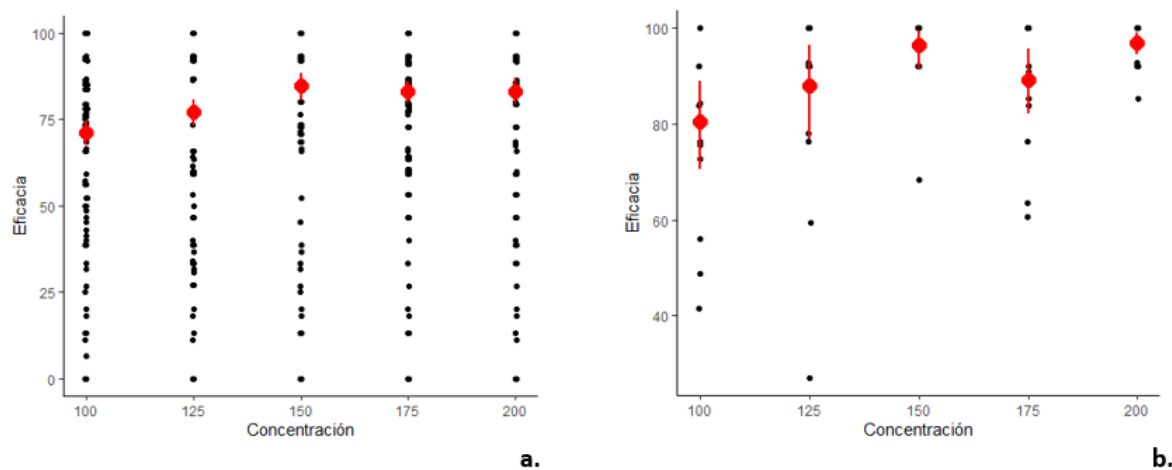


Figura 8. Eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear según concentración. a) eficacia general; b) eficacia acumulada

Al evaluar la eficacia de SaVPN dada las distintas combinaciones de instar larval y concentración del virus se puede observar una importante variabilidad entre los resultados. Únicamente en el instar L4 se obtuvo un incremento lineal de la eficacia al aumentar la concentración del virus (68.74%, 74.00%, 80.74%, 80.75% y 82.86% para las concentraciones respectivas de 100, 125, 150, 175 y 200 LE). Sin embargo, estos resultados variaron en la eficacia acumulada a las 336 horas después de la inoculación del virus, ya que en la concentración de 175 LE se obtuvo una reducción de 89.48% a 86.85%.

Los instar L1 y L2 obtuvieron poca variabilidad entre resultados a pesar de que no se presentara un incremento lineal en la eficacia al aumentar la concentración, siendo

todos los valores mayores al 72% con promedio de 87.41% en los datos generales y de 93.49 a las 336 horas. En el instar L3 se observa una importante disminución en la eficacia a la concentración de 125 LE, presentando los segundos valores promedios más bajos del ensayo, solamente por debajo de los obtenidos en el L5 con 100 LE, esta tendencia se mantuvo tanto en los datos generales como en la eficacia acumulada a las 336 horas (49.94% y 69.2% respectivamente). Finalmente, el instar L5 presentó los valores con mayor variabilidad en el estudio, mostrando altos valores de eficacia en la concentración de 150 LE (86.51% y 100%) y bajos valores en 175 LE (94.6 % y 100%). Cabe resaltar que los valores promedio de eficacia a las 336 horas después de la inoculación presentaron mayor variación con respecto a los datos generales (Figura 3).

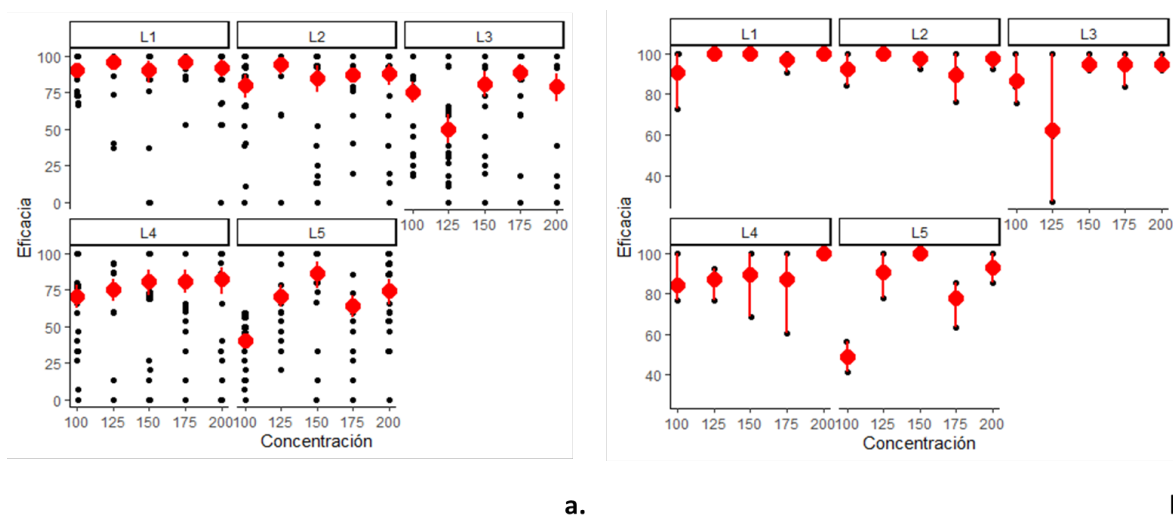


Figura 9. Eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear según instar larval y concentración. a) eficacia general; b) eficacia acumulada

Estos resultados obtenidos son los esperados para los primeros instars larvales, así como se presentó en el estudio realizado por Paiba, (2021) en donde presentó una mortalidad alta, sobre todo en el primer instar con respecto al segundo y el tercero, aunque no habiendo diferencia significativa en la última fecha. Por otro lado, Soza (2018) también afirma que una regla fundamental para propiciar una buena infección viral es realizarlo en sus primeros estadios larvales ya que son más propensas a enfermarse, debido a que en esa etapa necesitan una cantidad baja de inoculación para morir

debido al menor tiempo y esfuerzo que toma por parte del virus para colonizar el cuerpo del insecto.

El modelo realizado a la variable eficacia en función al tiempo, indica un mayor deceso de las larvas de *Spodoptera albula* en todo sus instares larvales al haber sido inoculadas con todas las concentraciones virales empleadas en el ensayo. Se evidencia que al transcurrir tan solo las primeras 25 horas se obtuvieron valores cercanos al 70% en los cinco instares evaluados y a medida que transcurrieron las horas aumentó la eficacia. La variabilidad entre los diferentes instares fue mínima hasta llegar a las 336 horas en donde se reportó la muerte total de las larvas lo que demuestra una excelente mortalidad del virus sobre todos los instares larvales de *E. albula* (Figura 4).

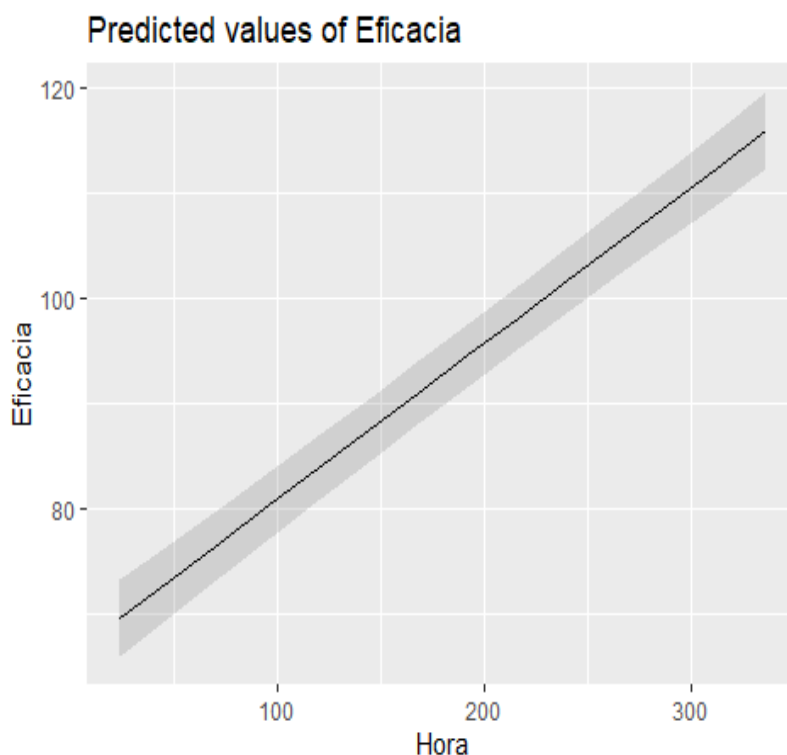


Figura 10. Valores predichos de eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear sobre *Spodoptera albula* según las horas de inoculación en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022.

El modelo realizado a la variable eficacia según instar larval, concentración del virus y horas después de inoculación evidenció que el instar L1 obtuvo 6.15% mayor

eficacia que el L2 con intervalos de confianza entre 1.96% a 10.34%; con respecto a L3 la diferencia fue de 17.99% con intervalos de confianza entre 13.80% a 22.18%; el instar L4 obtuvo una eficacia 15.10% menor a la de L1 con intervalos entre 10.91% y 19.29%; mientras que L5 presentó la menor eficacia con 25.81% menos que L1 a intervalos de confianza de 21.63% a 30% menos, presentándose diferencia estadística significativa entre los instar larvales ($p=0.00$) (Figura 5). Las diferentes concentraciones, mostraron un aumento de la eficacia a medida que se incrementaron las mismas para todos los instares larvales (Figura 6), es decir por cada unidad de LE, que se va incrementó se obtuvo un aumento de 0.12% en la eficacia con intervalos de confianza de 0.08% a 0.16%, habiendo diferencia significativa ($P=0.00$) en todas las concentraciones. Finalmente, se encontró que por cada hora transcurrida después de la inoculación del virus, la eficacia del mismo sobre *E. albula* en todos sus instar y concentraciones incrementó en 0.10% con intervalos de confianza entre 0.14% y 0.16% evidenciando diferencia estadística significativa ($p=0.00$) (Cuadro 6). Este modelo se efectuó a una confiabilidad del 95%.

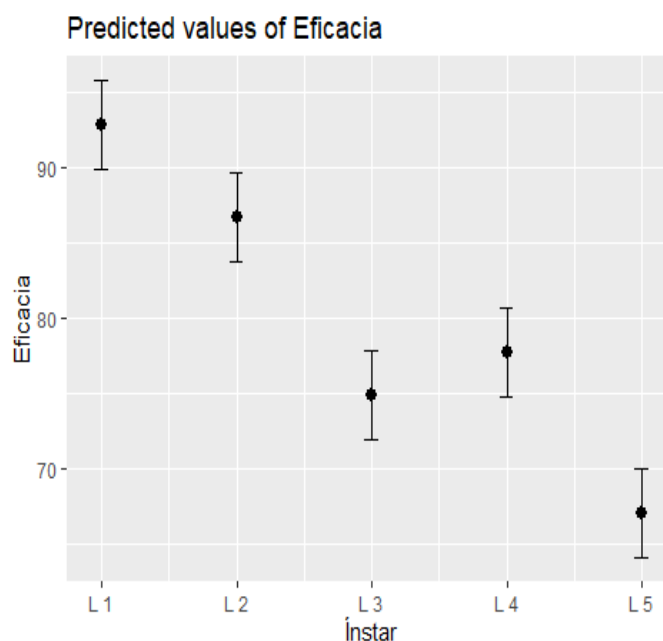


Figura 11. Comportamiento de la eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear Sa(VPN) por instar larval en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022.

Cuadro 6. *Modelo lineal generalizado efectuado a la variable eficacia del Virus de la Poliedrosis Nuclear sobre Spodoptera albula, según instar larval, concentración del virus y horas después de inoculación.*

	Estimado	Error estándar	Estatidístico	Valor de p	ICI	ICS
(Intercept)	48.07	3.47	13.83	0	41.26	54.88
Concentración	0.12	0.02	6.27	0	0.08	0.16
ÍnstarL2	-6.15	2.14	-2.88	0	-10.34	-1.96
ÍnstarL3	-17.99	2.14	-8.42	0	-22.18	-13.80
ÍnstarL4	-15.10	2.14	-7.07	0	-19.29	-10.91
ÍnstarL5	-25.81	2.14	-12.08	0	-30.00	-21.63
Hora	0.15	0.01	21.31	0	0.14	0.16

En los resultados de eficacia del virus Sa(VPN) referente a la última fecha en los instares larvales con cada una de las diferentes concentraciones se puede observar que la los mayores valores se obtuvieron en los primeros instares larvales, tal efecto se da debido a que la multiplicación del virus es más rápida cuando la larva se encuentra más joven, ya que posee menos células por unidad de superficie ocasionando que presente síntomas y afectaciones en menor tiempo (Leucona, 1985). Afolamy y Oladun comprobaron que las larvas jóvenes o huésped del VPN mueren en dos días mientras que las larvas más viejas mueren de 4 a 9 días. De igual manera Roman, (1998) manifiesta que la mortalidad por virus en las larvas en los primeros y tercer estadio es superior a la mortalidad en sus estadios finales ya que se reporta que la mortalidad en el cuarto y quinto instar es de 61.5% reduciendo la mortalidad del virus entomopatógeno; estos resultados fueron muy inferiores a los obtenidos en este estudio en el instar L5 (89.8 %).

Tal y como los resultados presentados por Lezama, (2011) en donde los datos de la mortalidad producida en cada uno de sus bioensayos mostraron una relación directamente proporcional con la dosis aplicada, en donde aumentó la mortalidad en la medida que la dosis aplicada se incrementó; también cabe destacar que el control

presentó una mortalidad en cada uno de sus bioensayos menor que el 10 % lo que se considera permisible y estando relacionado con las concentraciones virales utilizadas en el estudio. Vargas (2006) establece en sus resultados que con larvas de *Spodoptera exigua* infestada con un formulado viral obtuvo una mortalidad ascendente a medida que la dosis se incrementó, en la dosis 372 CIP/ml se produjo una muerte de 68.2 % y en la dosis más alta de 223000 CIP/ml presentó una mortalidad de 97.8%. Al contrastar estos resultados con los de esta investigación con la concentración más cercana (100 LE con 481000 CIP), se obtiene datos muy similares en los instar L1 y L2 con los cuales se superó el 90% de eficacia.

Se reportan variados resultados de eficacia de SaVPN en diferentes estudios en donde los valores mostrados fueron mayormente menores a los obtenidos en esta investigación. El-Sheikh (2015) menciona que implementando concentraciones de 5×10^3 - 5×10^8 CIP para larvas L1 y L2 alcanzó mortalidades de 53% y 45% respectivamente. Montecalvo y Navasero (2019) obtuvieron 80-100% en larvas L1, 10-93% en L2, 17-93% en L3, 17-47% en L4 y 57-63% en L5 con distintas cepas de Virus de la Poliedrosis Nuclear en concentraciones desde 10^3 a 10^8 CIP. Según Sarwar *et al.* (2021), para larvas de segundo instar alcanzaron eficacias entre 30.48% y 54.92%, mientras que para larvas del cuarto instar los valores se redujeron a 15.89-38.68% utilizando concentraciones entre 10^4 a 10^5 CIP. Por otra parte, Zamora *et al.* (2017) lograron mortalidades elevadas en larvas L2 y L4 con valores respectivos de 100% y 80%, al igual que Luna-Espino *et al.* (2018), quienes reportan una mortalidad del 100% luego de 166 horas post inoculación de virus 1×10^6 CIP. A pesar que los valores de CL_{50} obtenidos en esta investigación fueron mayores a los de otros estudios, los valores de eficacia alcanzados fueron elevados mostrando que la cepa evaluada es un promisorio agente para el combate de *E. albula*.

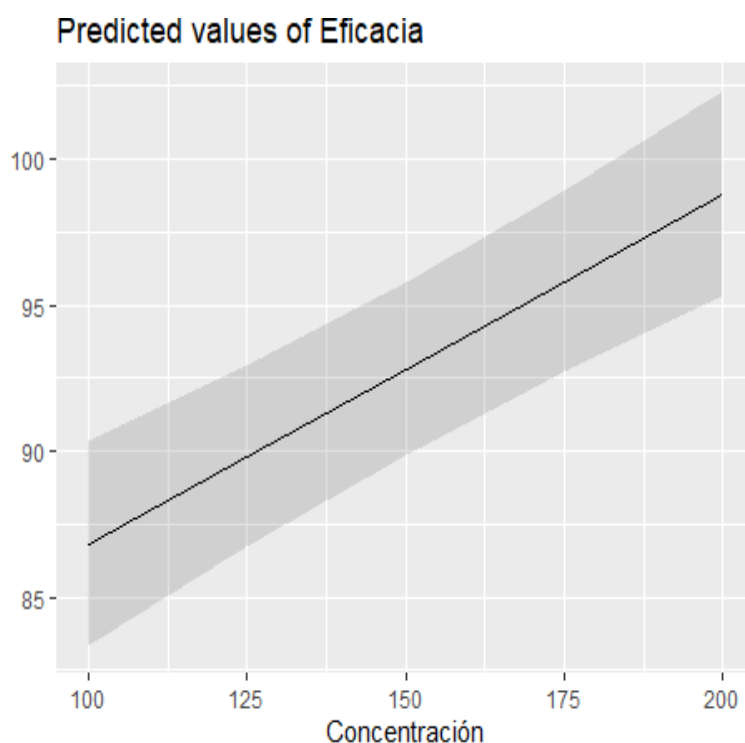


Figura 12. Modelo de valor predicho de la eficacia en las diferentes concentraciones del Virus de la Poliedrosis Nuclear Sa(VPN), *Spodoptera albula* en condiciones de laboratorio en el CIRCB, 2022.

A pesar de que la mortalidad y eficacia de SaVPN presentó una tendencia de incrementar con la concentración del virus y de disminuir con el instar larval, mientras que la concentración letal media y tiempo letal medio mostraron la tendencia opuesta, muchos datos se salieron por completo de dichas tendencias en este estudio. Este tipo de resultados pueden evidenciarse en múltiples estudios con distintos insectos y opciones de control. Koppeerhöfer *et al.* (2019) mencionan que en evaluaciones sobre *Listronotus maculcollis* (Col.: Cucurliionidae) obtuvieron mayor mortalidad en el tercer instar que en el segundo evaluando los insecticidas indoxocarb, spinosad y trichlorfon, mientras que con estos dos últimas también se presentó mayor mortalidad en L4 que en L2. Por otro lado, utilizando insecticidas botánicos a base de *Azadirachta indica* (Meliaceae), Banken y Stark (1997) presentaron una concentración letal media mayor en larvas de segundo instar que en las de cuarto instar de *Coccinella septempunctata* (Col.: Coccinellidae).

Dentro del género *Spodoptera* se han registrado casos de variabilidad en los resultados de los productos evaluados. Según Yu (1983), la dosis letal media de los insecticidas methomyl y diazinon se redujo del instar L5 con respecto a L4, mientras que con permetrina la reducción se registró de L2 en comparación a L1. Investigaciones con controladores biológicos también han experimentado este fenómeno; Acharya *et al.* (2020) mencionan que el nematodo *Steinernema longicaudum* causó mayor mortalidad en larvas L4 de *S. frugiperda* que en L3, mientras que *Heterorhabditis bacteriophora*, *S. arenarum*, *S. carpocapsae*, y *S. longicaudum* presentaron mayor tiempo letal medio en el primer instar larval que en L2, L3, L4 y L5.

Idrees *et al.* (2022) obtuvieron que concentraciones más altas en suspensiones de conidias de *Beauveria bassiana* ($\times 10^7$) presentaron menor mortalidad que en la concentración de $\times 10^6$ con una cepa, mismo resultado al que alcanzaron con las concentraciones $\times 10^8$ y $\times 10^7$ con otra cepa distinta sobre *S. litura*. También trabajando con *B. bassiana*, Kaur *et al.* (2011) describieron que larvas L4 de *S. litura* lograron un porcentaje de empupado más alto que L2 y L3 en concentraciones de 2.03×10^8 , 4.03×10^6 y 1.47×10^3 .

Finalmente, en evaluaciones con VPN, Barreto *et al.* (2005) evidencia que de 22 cepas evaluadas sobre *S. frugiperda*, tres redujeron la mortalidad de la concentración $\times 10^3$ a $\times 10^4$ CIP, y otras tres cepas lo hicieron al incrementar de $\times 10^4$ a $\times 10^5$ CIP. Nathan y Kalaivani (2006) reportan mayor mortalidad de larvas de *S. litura* L4 que en L2 y L3 al usar una concentración de 10^2 CIP. Ríos-Velasco *et al.* (2012) obtuvieron mortalidades de 0% en las mayores concentraciones de seis evaluadas con *S. frugiperda*. Yasin (2020) alcanzó mayor porcentaje de empupado en larvas L3 que en L2 con tres cepas distintas de VPN evaluadas en *S. litura*; mientras que Sawar *et al.* (2021), reportó más empupado de *E. albula* en concentraciones de 3×10^5 que en 1×10^4 y 6×10^4 CIP.

Aún se desconocen los motivos por los que algunos datos parecieran salir de la tendencia de obtener ciertos resultados según incrementa la concentración de un producto o se desarrolla un organismo. Una solución planteada es que organismos más desarrollados consumen mayor cantidad de alimento, lo que conllevaría a una carga viral más alta y por ende a presentar mayor mortalidad. Sin embargo, todavía queda mucha

tela por cortar en post de dilucidar este tema (Montecalvo & Navasero, 2019; Takatsuka & Kunimi, 2001). Un aspecto que pudo afectar esta investigación fue la cantidad similar de CIP presentes en las concentraciones 150 y 175 LE. Lo que podría indicar la necesidad de evaluar la viabilidad de la metodología de larvas equivalentes.

También en un estudio realizado por Urbina y Valle (2007) demostraron que al analizar el comportamiento de la mortalidad larval, se observa una mortalidad constante. Esta se realiza aumentando directamente la dosis, lo cual es de esperar debido a la gran cantidad. Cuantos más viriones haya en el intestino medio de las larvas, más rápido se multiplicarán en células epiteliales de insectos ya que en la dosis utilizada de 128 LE fueron más bajos que los valores presentados en la dosis de 100 LE, estos mismos autores mencionan que uno de los factores que afectaron a esa tendencia fue el tamaño de las larvas cosechadas en el caso del lote de 128 LE fue de menor tamaño que las usadas para la dosis de 100 LE.

VII. CONCLUSIÓN

Los ensayos efectuados con *Spdoptera albula* establecen que, en general, a mayor instar larval se requiere una mayor dosis de VPN para conseguir la mortalidad del 50% y 90% la población.

Para el tiempo letal 50 a medida que incrementó la concentración de VPN se redujo el tiempo letal medio, mientras que dicho tiempo incrementó según avanzó el instar larval.

A pesar de la alta variabilidad registrada en los valores de eficacia, se obtuvo que la combinación adecuada de los factores concentración del virus, instar larval y tiempo transcurrido luego de la inoculación del virus permite alcanzar mayor eficacia en el manejo de *S. albula*; siendo la concentración del virus el factor de menor relevancia.

VIII. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos se recomienda lo siguiente:

Cambiar la metodología de larvas equivalentes a peso de larvas infectadas o conteo de Cuerpos Inclusión Poliedral, para tener mejor control en la elaboración de las concentraciones virales.

Realizar otros bioensayos en base a la nueva metodología para comparar con datos obtenidos en el presente estudio.

Realizar otros estudios con una mayor población de larvas y otras especies para validar la efectividad del VPN.

Validar la efectividad del Sa(VPN) en estudios de campo en distintas zonas del país para evaluar la eficacia del virus en distintas condiciones meteorológicas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, MST Interacciones entre baculovirus e insectos entomófagos. Egypt J Biol Pest Control 30 , 107 (2020). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00306-0>
- Acharya, R., Hwang, H.-S., Mostafiz, M. M., Yu, Y.-S., & Lee, K.-Y. (2020). Susceptibility of Various Developmental Stages of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to Entomopathogenic Nematodes. Insects, 11(12), 868. <https://doi.org/10.3390/insects11120868>
- Afolami, O., & Oladunmoye, M. (2017). Baculoviruses: Emerging frontiers for viral biocontrol of insect pests of agricultural importance. Journal of Advances in Microbiology, 5(4), 1-7. https://www.researchgate.net/profile/Olufemi-Afolami/publication/320147594_Baculoviruses_Emerging_Frontiers_for_Viral_Biocontrol_of_Insect_Pests_of_Agricultural_Importance/links/5af57201aca2720af9c62ed6/Baculoviruses-Emerging-Frontiers-for-Viral-Biocontrol-of-Insect-Pests-of-Agricultural-Importance.pdf
- Arana Ríos, A. E., & Cárdenas Corrales, H. F. (2003). Estudio del comportamiento de la especie *spodoptera sunia lepidoptera*: noctuidae utilizando dos dietas artificiales diferentes para su producción masiva. Campus Agropecuario 2003 (Doctoral dissertation).
- Ardisson-Araújo, DM, Da Silva, AMR, Melo, FL, Dos Santos, ER, Sosa-Gómez, DR, & Ribeiro, BM (2018). Un nuevo betabaculovirus aislado de la plaga monocotiledónea *Mocis latipes* (Lepidoptera: Noctuidae) y la evolución de genes de copias múltiples. Virus , 10 (3), 134.
- Banken, J. A. O., & Stark, J. D. (1997). Stage and Age Influence on the Susceptibility of *Coccinella Septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) after Direct Exposure to Neemix, a Neem Insecticide. Journal of Economic Entomology, 90(5), 1102-1105. <https://doi.org/10.1093/jee/90.5.1102>

- Barrera, G., Murcia, J., Cerón, J., Cuartas, P., Guzmán, C., & Villamizar, L. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 24-31.
- Barreto, M. R., Guimaraes, C. T., Teixeira, F. F., Paiva, E., & Valicente, F. H. (2005). Effect of Baculovirus spodoptera isolates in Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. *Neotropical Entomology*, 34(1), 67-75. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100010>
- Behle, R. W., Tamez-Guerra, P., & McGuire, M. R. (2003). BIOLOGICAL AND MICROBIAL CONTROL-Field Activity and Storage Stability of *Anagrapha falcifera* Nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in Spray-Dried Lignin-Based Formulations. *Journal of Economic Entomology*, 96(4), 1066-1075.
- BELDA, J. E., E. MIRASOL, A. ESCRIBANO, S. RAPALLO y P. CABALLERO. 2000. Eficacia de un nucleopoliedrovirus (SeNPV) en el control de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) en pimiento de invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas* 26: 619-628.
- Beperet, I., Simón, O., López-Ferber, M., van Lent, J., Williams, T., & Caballero, P. (2020). Mezclas de virus patógenos de insectos en un solo virión: hacia el desarrollo de insecticidas diseñados a medida. *Microbiología Ambiental y Aplicada*, 87 (3), e02180-20.
- Burges, 1981. Progress in the Microbial Control of Pests, 1970-80. In *Microbial Control of pest and plant diseases. 1970-1980*. Academic Press. 1981. 1-6p.
- Calcagno, V. 2020. glmulti: Model Selection and Multimodel Inference Made Easy. R package version 1.0.8. <https://CRAN.R-project.org/package=glmulti>
- Carrasco Díaz, J. F., & Centeno Ramos, M. D. S. (2004). Actividad biológica y estabilidad en el almacenamiento en dos condiciones de temperatura del virus de la Poliedrosis Nuclear *Spodoptera exigua*.. (Doctoral dissertation).

- Carreras Solís, B., Rodríguez Batista, D., & Piedra Díaz, F. (2009). Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* Berliner para el control de *Heliothis virescens* Fabricius en el cultivo del tabaco en Cuba. *Fitosanidad*, 13(4), 277-280.
- Carrillo Pérez, A. M., Jirón Pérez, C. M., & Lacayo Torres, A. C. (2003). Evaluación de la persistencia del virus de la poliedrosis nuclear (VPN), expuesto a la luz solar en diferentes períodos de tiempo.. (Doctoral dissertation).
- Chan,C; Chan, G; Leeper, T; Becker J. 2018. rio: A Swiss-army knife for data file I/O. R package version 0.5.16.
- Cory, J. S., & Myers, J. H. (2003). The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 239-272.
- Cruz, E. A. (2002). Estimación de la DL50 y DL90 del Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Autographa californica* en *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*.
- Delgado Munguía, J. G., & Hernández, H. V. (2008). Evaluación del comportamiento de la especie *Spodoptera sunia* (Lepidóptera: Noctuidae, utilizando fécula de maíz como gelificante en la dieta semi artificial, para la producción masiva del virus de la poliedrosis nuclear (VPN). Laboratorio de cría de insectos noctuidos.. (Doctoral dissertation).
- Gómez, SA, Moscardi, F. y Sosa-Gómez, DR (1999). Susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a aislamientos geográficos de un virus de poliedrosis nuclear. *Investigación Agrícola Brasileña* , 34 , 1539-1544.
- Hauxwell, CI (1999). Evaluación de posibles insecticidas de baculovirus: estudios del proceso de infección y susceptibilidad del huésped . Universidad de londres
- Hlina, BL; Birceanu, O; Robinson, CS; Dhiyebi, H; Wilkie, MP. 2019 In Review. Seasonal Variation in the Sensitivity of Invasive Sea Lampreys to the Lampricide
- Hu, Z., Zhu, F., & Chen, K. (2023). The mechanisms of silkworm resistance to the Baculovirus and antiviral breeding. *Annual Review of Entomology*, 68, 381-399. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120220-112317>

- Idrees, A., Afzal, A., Qadir, Z. A., & Li, J. (2022). Bioassays of *Beauveria bassiana* Isolates against the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Fungi*, 8(7), 717. <https://doi.org/10.3390/jof8070717>
- Kaur, S., Kaur, H., Kaur, K., & Kaur, A. (2011). Effect of different concentrations of *Beauveria bassiana* on development and reproductive potential of *Spodoptera litura* (Fabricius). <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:2578872>
- King, ABS y Saunders, JL. 1984. Las Plagas Invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en América Central. London: Asignado al CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) por el ODA (Overseas Development Administration). 182 p.
- Koppenhöfer, A. M., McGraw, B. A., Kostromytska, O. S., & Wu, S. (2019). Variable effect of larval stage on the efficacy of insecticides against *Listronotus maculicollis* (Coleoptera: Curculionidae) populations with different levels of pyrethroid resistance. *Crop Protection*, 125, 104888. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104888>
- Leandro, J. A. V., Román, L. D., Rodríguez, V. C., Zamora, A. V., & Velásquez, V. V. (2011). Colecta, identificación y multiplicación de virus entomopatógenos en el género *Spodoptera* presente en el cultivo del maíz. *Tecnología en Marcha*, 24(1), 17-24.
- Lezama Gaitán, L. D. J. (2011). Actividad biológica de una formulación en polvo del virus de la poliedrosis nuclear (VPN) almacenado a diferentes temperaturas y eficacia para el control de *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla, en Sebaco-Matagalpa (Doctoral dissertation).
- López, JA, Cano, E., Carballo, CV y Guharay, F. (2004). Control biológico de plagas agrícolas (No. 53). Babero. Orton IICA / CATIE.
- Martínez-Zubiaur, Y., Abreu, MP, PÉREZ HERNÁNDEZ, MDC, Sihler, W., Falcão, R., Ribeiro, BM, & de Souza, ML (2016). Primer registro de un aislado de Nucleopolyhedrovirus (BmNPV) de *Bombyx mori* en Cuba. *Embrapa Recursos Genéticos y Biotecnología-Artículo en periódico indexado (ALICE)* .

- Miller, LK y Dawes, KP (1978). Análisis de endonucleasas de restricción para distinguir dos virus de polihedrosis nuclear estrechamente relacionados: *Autographa californica* MNPV y *Trichoplusia ni* MNPV. Microbiología aplicada y ambiental , 35 (6), 1206-1210.
- Montecalvo, M., & Navasero, M. (2019). SUSCEPTIBILITY OF ONION ARMYWORM, *Spodoptera exigua* (HÜBNER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), LARVAE TO *Spodoptera exigua* MULTIPLE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS (SeMNPV). Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences, 25, 23-30.
- Murillo, R., Muñoz, D., Williams, T., Mugeta, N. y Caballero, P. (2006). Aplicación del método PCR-RFLP para la diferenciación rápida de genotipos de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua*. Revista de métodos virológicos , 135 (1), 1-8.
- Nathan, S. S., & Kalaivani, K. (2006). Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. Biological Control, 39(1), 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.06.013>
- Payne and Kelly, 1981. Identification of Insect and Mite Viruses. In Microbial Control of pest and plant diseases. 1970-1980. Burges Ed. Academic Press. 93-106p
- R Core Team 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rios-Velasco, C., Gallegos-Morales, G., Berlanga-Reyes, D., Cambero-Campos, J., & Romo-Chacón, A. (2012). Mortality and Production of Occlusion Bodies in *Spodoptera frugiperda* Larvae (Lepidoptera: Noctuidae) Treated with Nucleopolyhedrovirus. Florida Entomologist, 95(3), 752-757. <https://doi.org/10.1653/024.095.0326>
- Rodrigues, DT, Peterson, L., de Oliveira, LB, Sosa-Gómez, DR, Ribeiro, BM, & Ardisson-Araújo, DM (2020). Caracterización de un nuevo alfabaculovirus aislado del gusano soldado del sur, *Spodoptera eridania* (Cramer, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) y la evolución de odv-e66, un gen de condroitinasa baculoviral adquirido en bacterias. Genómica , 112 (6), 3903-3914.

- Rodríguez Aburto, H. O. (1989). Susceptibilidad relativa de tres especies del género *Spodoptera* (Lepidoptera: noctuidae) a una cepa del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA).
- Rodríguez Laínez, F. D. M. (2009). Producción de virus de la polidrosis nuclear en el laboratorio de Control Biológico: elementos para el control de calidad, CIRB, UNAN-León (Doctoral dissertation).
- Román, D. X. (1998). Bioensayos de campo y analisis economicos de la produccion del virus de la poliedrosis nuclear *Spodoptera frugiperda*.
- Romero Gutiérrez, M. I., & Cruz Reyes, C. M. (2011). Calidad de la cría de *Spodoptera*: algunos parámetros biológicos para su reproducción. Campus Agropecuario de la UNAN-León. Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB) 2011 (Doctoral dissertation).
- Ruiz, P. A.T., Restrepo, L. N. Z., Sánchez, R. A. H., Rodriguez, F. C.Y., Tafur, J.C., & Sanchez, F. O. (2008). Determinación de la DL50 y Lt50 de extractos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. Revista Facultad Nacional de agronomía- medellin, 61(2), 4564-4575.
- Santos, A. M., Uribe, L. A., Ruiz, J. C., Tabima, L., Gómez, J. A., & Villamizar, L. F. (2014). Nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* Sf NPV003: compatibilidad con agroquímicos y estabilidad en condiciones de almacenamiento. Ciencia y Tecnología Agropecuaria, 15(2), 219-228.
- Sarwar, G., Maan, N. A., Ayub, M. A., Shahid, M. R., Malik, M. A., & Farooq, M. (2021). Evaluation of indigenous the nucleopolyhedrovirus (NPV) of *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in combination with chlorantraniliprole against *Spodoptera* species. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00403-8>
- Smits, P. H. (1987). Nuclear polyhedrosis virus as biological control agent of *Spodoptera exigua*. Wageningen University and Research.

- Smits, PH y Vlak, JM (1988). Actividad biológica del virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera exigua* frente a larvas de *S. exigua*. Revista de Patología de Invertebrados , 51 (2), 107-114.
- Smits, PH, Van de Vrie, M. y Vlak, JM (1987). Virus de la poliedrosis nuclear para el control de larvas de *Spodoptera exigua* en cultivos de invernadero. Entomologia Experimentalis et Applicata , 43 (1), 73-80.
- Sosa-Gómez, DR, Morgado, FS, Corrêa, RFT, Silva, LA, Ardisson-Araújo, DMP, Rodrigues, BMP, ... & Ribeiro, BM (2020). Virus entomopatógenos en el neotrópico: estado actual y especies recientemente descubiertas. Entomología neotropical , 49 , 315-331.
- Takatsuka, J., & Kunimi, Y. (2002). Lethal effects of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolated in Shiga Prefecture, Japan, on larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*(Lepidoptera: Noctuidae). Applied Entomology and Zoology, 37(1), 93-101. <https://doi.org/10.1303/aez.2002.93>
- Tsai, C. L., Chu, I. H., Chou, M. H., Chareonviriyaphap, T., Chiang, M. Y., Lin, P. A., Lu, K. H., & Yeh, W. B. (2020). Rapid identification of the invasive fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) using species-specific primers in multiplex PCR. Scientific reports, 10(1), 16508. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73786-7>
- Urbina Hernández, F. A., & Valle García, C. F. (2012). Evaluación de la calidad de la producción del virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera sunia* (SsVPN) del Laboratorio del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB), en el Campus Agropecuario. UNAN-León, 2012 (Doctoral dissertation).
- Valderrama, J. A. G., Agudelo, E. J. G., Cubillos, G. P. B., Prado, A. M. C., & Rivero, L. F. V. (2010). Aislamiento, Identificación y Caracterización de Nucleopoliedrovirus Nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín, 63(2), 5511-5520.
- Vargas-Leandro, J. A., Durán-Román, L., Carranza-Rodríguez, V., Viquez-Zamora, A., & Villalba-Velásquez, V. (2011). Colecta, identificación y multiplicación de virus

entomopatógenos en el género *Spodoptera* presente en el cultivo del maíz. Revista Tecnología en Marcha, 24(1), ág-17.

Venables, WN; Ripley, BD. 2002 Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0. 138 p.

Wennmann, JT, Fan, J. y Jehle, JA (2020). Bacsnp: uso de especificidades y frecuencias de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) para identificar la composición del genotipo en baculovirus. Virus , 12 (6), 625.

Yasem de Romero, Marta G., Romero, Eduardo R., Sosa Gómez, Daniel, & Willink, Eduardo. (2009). Evaluación de aislamientos de baculovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (LEP.: NOCTUIDAE), plaga clave del maíz en el noroeste argentino. Revista industrial y agrícola de Tucumán, 86(2), 7-15. Recuperado en 28 de octubre de 2022, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30182009000200002&lng=es&tlng=es.

Yasin, M., Qazi, M. S., Wakil, W., & Qayyum, M. A. (2020). Evaluation of Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) and Emamectin Benzoate against *Spodoptera litura* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae). Egyptian Journal of Biological Pest Control, 30(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00271-8>

Yu, S. J. (1983). Age Variation in Insecticide Susceptibility and Detoxification Capacity of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larva1. Journal of Economic Entomology, 76(2), 219-222. <https://doi.org/10.1093/jee/76.2.219>

Zhou, S., Zhang, J., Lin, Y., Li, X., Liu, M., Hafeez, M., Huang, J., Zhang, Z., Chen, L., Ren, X., Dong, W., & Lu, Y. (2023). *Spodoptera exigua* Multiple Nucleopolyhedrovirus Increases the Susceptibility to Insecticides: A Promising Efficient Way for Pest Resistance Management. Biology, 12(2), 260. <https://doi.org/10.3390/biology12020260>

X. ANEXOS



Figura 7. Preparación de suspensión viral Sa(VPN), para la elaboración de las 5 concentraciones virales y inoculación de larvas de *Spodoptera albula* Laboratorio de Control Biológico UNAN León 2022. a) centrifugado del virus; b) dilución seriada; c) concentraciones finales.



Figura 8. Establecimiento del ensayo. a) inoculación de virus; b) colocación de dieta en tazas; c) dieta preparada



Figura 9 Ensayo de larvas de *Spodoptera albula* inoculadas con las 5 concentraciones virales y un Testigo absoluto Sa(VPN).

Virus de la Poliedrosis Nuclear

FECHA: _____ CONCENTRACION: _____

Tratamientos	Replica 1					T	Replica 2					T	Replica 3				
	LV	LM	H	B	Otros		LV	LM	H	B	Otros		LV	LM	H	B	Otros
1						16						31					
2						17						32					
3						18						33					
4						19						34					
5						20						35					
6						21						36					
7						22						37					
8						23						38					
9						24						39					
10						25						40					
11						26						41					
12						27						42					
13						28						43					
14						29						44					
15						30						45					

Figura 10. Formato de recolección de datos