

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA–LEON
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGIA**



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-LEON, 2012.

Presentado Por:

**Br. Félix Adonyz Urbina Hernández
Br. Claudio Francisco Valle García**

Tutora:

Lic. Petrona Ivania Baca Lezama

Asesora:

MSc. Carmen Marina Rizo Zeledón

**Trabajo presentado como requisito parcial para obtener el título de Ingeniero en
Agroecología Tropical**

León Julio, 2012

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
RESUMEN.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Virus.....	4
3.1.1. Virus Entomopatógenos.....	5
3.1.2. Producción de los Baculovirus.....	5
3.2. Control de Calidad en la Producción de VPNSs.....	6
3.2.1 Control de Calidad en la cría de <i>Spodoptera sunia</i>	9
3.2.2. Sanidad general y condiciones de cría.....	9
3.2.3. Higiene para eliminar y controlar la contaminación.....	10
3.2.4 Criterios para la reproducción de larvas de <i>Spodoptera sunia</i>	10
3.3. Laboratorio de producción de virus: Infraestructura y condiciones.....	11
3.3.1. Elaboración y esterilización de dietas para la crianza de <i>Spodoptera sunia</i>	12
3.3.2. Pasos básicos para los sistemas de producción de VPNSs.....	12
3.3.3. Determinación de la calidad del insecticida Viral.....	13
3.3.4. Formulación.....	13
3.4. Técnicas de Bioensayo con Virus Entomopatógenos.....	13
3.4.1. Aspectos para el diseño de Bioensayos.....	16
3.4.2. Análisis Probit.....	16
3.5. Generalidades de <i>Spodoptera sunia</i>	17
3.5.1. Distribución de <i>Spodoptera sunia</i>	17
3.5.2. Ciclo de vida de <i>Spodoptera sunia</i>	17
3.5.3. Apariencia general de <i>Spodoptera sunia</i>	19

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1. Ubicación del estudio.....	20
4.2 Material biológico usado.....	20
4.3 Descripción general del estudio.....	20
4.4 Etapas del estudio.....	20
4.4.1 Crianza de <i>Spodoptera sunia</i>	21
4.4.1.1 Colecta del insecto en campo.....	21
4.4.1.2 Manejo de <i>S. sunia</i> en cuarentena.....	21
4.4.1.3 Manejo del pie de cría.....	21
4.4.1.4 Preparación de la dieta artificial.....	23
4.4.2 Segunda etapa: Evaluación de la potencia biológica de VPNSs.....	23
4.4.2.1 Selección del Inóculo.....	23
4.4.2.2 Semipurificación del virus.....	23
4.4.2.3 Conteos de cuerpos de inclusión poliedral (CIP/ml).....	24
4.4.2.4 Preparación de dosis.....	24
4.4.2.5 Montaje del bioensayo.....	24
4.4.3 Evaluación de la producción óptima de VPNSs.....	25
4.4.3.1 Establecimiento del ensayo.....	26
4.5 Análisis de los datos.....	26
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
VI. CONCLUSIONES.....	35
VII. RECOMENDACIONES.....	36
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	37
IX. ANEXOS.....	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración estimada de la solución madre de cada lote de producción de VPNSs. Campus Agropecuario. 2011.....	27
Tabla 2. Mortalidad en larvas de <i>Spodoptera sunia</i> aplicadas con diferentes dosis de virus crudo del lote 100 LE. CIRCB, UNAN-León, 2011.....	28
Tabla 3. Mortalidad en larvas de <i>Spodoptera sunia</i> con las dosis de virus crudo del lote 128 LE. CIRCB, UNAN-León, 2011.....	29
Tabla 4. Mortalidad en larvas de <i>Spodoptera sunia</i> con las dosis de virus crudo de un lote de 250 LE. CIRCB, UNAN-León, 2011.....	29
Tabla 5. Dosis respuesta de larvas de primer instar de <i>Spodoptera sunia</i> infectadas con VPNSs crudo. CIRCB, UNAN-LEON. 2011.....	30
Tabla 6. Potencia relativa de la mediana de los valores de la DL_{50} de tres lotes de virus VPNSs. LCB. 2011.....	31

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Respuesta de mortalidad de larvas del segundo instar (L_2) de <i>Spodoptera Sunia</i> inoculadas con diferentes concentraciones de virus de un lote de 250 LE en condiciones del laboratorio. Laboratorio de producción de VPN. CIRCB. UNAN-León, 2011.....	32
Gráfico 2. Porcentaje de mortalidad de larvas del tercer instar (L_3) <i>Spodoptera sunia</i> aplicadas con diferentes concentraciones de inóculo del lote de 250 LE en condiciones del laboratorio de producción de VPN. CIRCB.UNAN-León, 2011.....	33

AGRADECIMIENTO

A:

Dios por brindarnos la vida, salud, fuerza y sabiduría para poder culminar con éxito esta etapa tan importante de nuestras vidas.

A nuestra magna Universidad UNAN-León, por habernos dado la oportunidad de coronar una carrera universitaria, por servirnos en todos los aspectos posibles y abrir sus puertas quitando nuestros obstáculos para mantenernos firmes siempre y concluir nuestra meta.

Nuestros padres; que con su esfuerzo, amor y dedicación, nos dieron su apoyo siempre para terminar nuestros estudios universitarios.

Nuestra tutora: **Lic. Petrona Ivania Baca Lezama** y nuestra asesora **MSc. Carmen Marina Rizo Zeledón**, por brindarnos sus conocimientos y apoyo en la realización de este estudio.

El personal de los laboratorios de cría de Insectos Noctuidos y producción de virus del CIRCB de la UNAN-León, que nos brindaron la información necesaria y apoyaron en la realización de este trabajo.

Todas las personas que indirectamente pusieron su grano de arena y nos ayudaron en la realización de este estudio.

DEDICATORIA

El presente trabajo monográfico lo dedico con mucho amor y cariño a:

Nuestro padre celestial **Dios** todo poderoso, mi poder superior por permitirme vivir, protegerme ante todas las adversidades y obstáculos que se me presentaron a lo largo de mis estudios universitarios, por llenarme siempre de fuerza, ganas y valor para seguir siempre adelante.

A mi padre **Félix Pedro Urbina Bonilla** que no está presente, por ser mi inspiración, todo el empeño que puse en este camino universitario te lo debo a ti, hoy en el cielo sé que estas orgulloso de tu hijo.

A mi madre **Martha Irene Hernández Benavides** por brindarme su amor, apoyo incondicional, consejos y sobre todo esa motivación para poder alcanzar la coronación de mi carrera universitaria, gracias mamá por que se cuánto deseaste verme triunfar y se cuánto te costó todo lo que has hecho por mí.

A mis tíos **Elías Antonio Urbina Bonilla, Adán de Jesús Urbina Bonilla, Ronald Urbina Bonilla y Raúl Bonilla Collado** por su apoyo incondicional durante toda mi carrera universitaria.

A mi tío **Arnulfo Bonilla Talavera**, que ha sido como mi padre, por su apoyo, consejos que me han guiado por el camino del bien desde que era un niño y por ser un buen ejemplo para mí.

A mi Abuelito **Salomón Urbina Betancourt** “mi papa” por sus palabras de aliento, consejos, motivación y ayuda para coronar mi carrera universitaria, dedico este trabajo especialmente para ti.

A mis hermanas **Elis Mercedes Bonilla Hernández y Melissa Madelen Bonilla Hernández** que las quiero y las estimo con todo mi corazón.

A la señora **Natalia Ramos Ríos** “Doña Natalia” que es para mí como una madre por todo ese amor, cariño y apoyo incondicional en el transcurso de mi vida como estudiante universitario.

A **Elida María Zepeda Urbina** por su apoyo incondicional, por sus frases de “seguir adelante” en momentos de tristeza y desilusión en el transcurso de mi carrera, eso te convierte en alguien muy especial.

“Siempre formarán parte de mí”

Félix Adonyz Urbina Hernández

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a:

Dios mi señor celestial que por su gracia y misericordia estoy concluyendo este trabajo y por quien hoy soy todo lo que soy.

Mi madre **Nidia del Carmen García Martínez** quien con desvelos y esfuerzos ha luchado por que yo sea un hombre preparado, de bien y que en este punto de mi vida se ha de sentir orgullosa del hijo que soy.

Eddy Valle Vargas quien como un amigo me ha aconsejado y guiado para que yo salga adelante, así como con todo su esfuerzo ha luchado para que yo me prepare y quien se debe de sentir orgulloso del hijo que tiene.

A mis dos hermanos quienes han sido más que testigos en la lucha de terminar esta carrera.

Mi esposa **Areli Erenia Jiménez López** quien ha sido mi compañera desde ya doce años y me ha motivado e incentivado para que yo termine mi carrera

Mis hijos **Kevin Josué y Bryan Joel** quienes son mi mayor motivación y son quienes llenan de luz mi vida

A mi primo **ALEJANDRO CIENFUEGOS RUIZ VALLE** quien ya no está presente físicamente con nosotros pero vivirá siempre en nuestros recuerdos y a quien le hubiese gustado ser un Ingeniero Agroecólogo.

A la familia **Jiménez López** quienes me han aceptado como un miembro más de su familia en especial a la señora **Esperanza López Medina** quien ha sido como una madre y quien me ha aconsejado como tal.

A toda mi familia que de una u otra manera pusieron un granito de arena para que esto se diera.

Claudio Francisco Valle García

RESUMEN

El Virus de la Poliedrosis Nuclear de *S. sunia* (VPNSs) es una alternativa para el manejo de esta plaga en los cultivos; sin embargo, es necesario mejorar la calidad de la producción en condiciones de laboratorio para asegurar la eficacia del mismo. Este estudio se realizó en los laboratorios de cría de insectos Noctuidos y producción de VPN del Campus Agropecuario de la UNAN-León, en los años 2010-2011, con el objetivo de evaluar la calidad de la producción del VPNSs en el laboratorio, mediante la determinación de la patogenicidad de tres lotes de producción del Virus VPNSs; y establecer la edad de la larva y concentración óptima del inóculo para la producción de VPNSs en el laboratorio. El estudio se realizó en dos etapas: primero se estableció la cría, para esto se colectó material biológico en el campo, se dejó en cuarentena y luego se estableció en el laboratorio el pie de cría de *S. sunia* siguiendo los procedimientos para la cría; la segunda etapa, fue para evaluar la actividad biológica del VPNSs a través de bioensayos con la técnica de la contaminación de la dieta. Esta etapa consistió en realizar tres bioensayos a tres lotes de producción de virus, para ello se purificó y centrifugó el virus crudo, se estimó la concentración viral de la solución madre y a partir de ella se prepararon cinco dosis y un testigo con agua, cada dosis fue aplicada a 30 larvas del primer instar de *S. sunia* y cada bioensayo fue repetido cuatro veces. Posteriormente, para determinar la edad y concentración de virus adecuada para la reproducción del virus en el laboratorio se realizó un ensayo donde se evaluaron tres concentraciones de inóculo viral (1.5, 3 y 5 cc de agua/LE) y dos instares larvales (L_2 y L_3), los resultados fueron analizados en un bifactorial establecido en un Diseño Completamente Aleatorio (DCA). Los resultados de mortalidad del bioensayo en cada lote mostraron un valor de la DL_{50} del lote de 100 LE (Larvas Equivalentes) de 5.334 CIP/ μ l; el de 128 LE de 4.665 CIP/ μ l y el de 250 LE de 4.669 CIP/ μ l, indicando una patogenicidad similar en los tres lotes, pero se observó presencia de contaminantes. La concentración óptima del inóculo en la producción no mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, pero se observó la tendencia del aumento de contaminantes durante el proceso de producción con larvas de menor edad. Sin embargo, se recomienda usar para la producción de virus 1.5 cc/LE y larvas L_3 , porque se produce un mayor porcentaje de mortalidad.

I. INTRODUCCIÓN

El uso excesivo y descontrolado de los plaguicidas ha generado efectos negativos en el suelo, agua y ambiente en general, también ha provocado un incremento de las plagas debido al desarrollo de resistencia y la destrucción de enemigos naturales; así mismo en muchas ocasiones los plaguicidas han propiciado el deterioro de la salud de las personas. En León y Chinandega una de las especies que ha causado muchos problemas a los cultivos es *Spodoptera sunia*, denominada comúnmente gusano cortador, gusano tigre o gusano cuerudo, era una plaga secundaria y debido al uso de los insecticidas se incrementaron sus poblaciones volviéndose una plaga de importancia en cultivos de ajonjolí, algodón, soya, frijol y sorgo, ya que pueden desfoliar totalmente cuando se encuentran en grandes densidades, a veces actúan como cortadores y consumen el fruto, siendo mayor su efecto en época de sequía (King y Saunders 1984).

Para reducir el efecto negativo de los plaguicidas, ha sido necesario la implementación de sistemas agrícolas sostenibles, basados en el conocimiento de las relaciones entre los cultivos, ambiente y organismos que viven en el campo, ya que analizando la naturaleza se puede aprovechar los recursos que esta nos provee en función de obtener buenas cosechas, sin contaminación ambiental y sin causar daños a la salud humana. La necesidad de prevenir las pérdidas causadas por las plagas, obligó al hombre a preocuparse por medidas de control más efectivas que condujeron al desarrollo de los plaguicidas modernos. Una alternativa viable para el manejo de estas poblaciones de *S. sunia* es el uso de VPN (Virus de la Poliedrosis Nuclear), que fue desarrollado en la UNAN-León, desde el año 1988. Actualmente, se cuenta con un laboratorio de cría de los huéspedes y uno de producción de VPN.

Para la producción óptima de un insecticida viral, en particular la producción de VPNSs (Virus de la poliedrosis Nuclear de *Spodoptera sunia*), se hace necesario realizar un buen control de calidad que garantice un producto final libre de agentes contaminantes.

Este trabajo pretende dar información básica acerca del control de calidad que debe formar parte de la producción de VPNSs y que sirva de base para la toma de decisiones durante el

proceso de producción, además permitirá conocer la calidad de la producción que se realiza a escala semi-industrial en el laboratorio y utilizar este insecticida biológico en los cultivos con la seguridad de la eficacia del producto, este trabajo se desarrolló con la perspectiva de describir los procedimientos necesarios para obtener un virus de calidad y determinar la concentración óptima a utilizar para su producción bajo condiciones de laboratorio.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

✓ Evaluar la calidad de la producción del Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera sunia* (VPNSs), del laboratorio de producción de Virus del CIRCB, de la UNAN-León, durante el año 2010 - 2011.

Objetivos Específicos

✓ Cuantificar la concentración de Cuerpos de Inclusión Poliedral (CIP) de diferentes lotes de producción del virus VPNSs.

✓ Determinar la DL_{50} (Dosis Letal Media) de tres lotes de producción del Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera sunia* mediante bioensayos con larvas de segundo instar de *Spodoptera sunia*.

✓ Estimar la mortalidad por virus y por contaminantes en las larvas de *S. sunia* aplicadas con diferentes dosis de VPNSs de tres lotes de producción.

✓ Establecer la concentración óptima del inóculo y la edad de la larva adecuada para maximizar la producción de VPNSs en el laboratorio.

III. MARCO TEÓRICO

3.1. Virus

Los virus son entidades submicroscópicas constituidos por paquetes de ácidos nucleicos con una cubierta de lipoproteína conteniendo un núcleo de ADN o ARN con una doble o simple cadena circular o lineal, segmentada o intacta. El ADN está constituido por una capa de proteína cuya función es protegerlo de las condiciones extracelulares desfavorables y facilitar su entrada al huésped para sintetizar macromoléculas víricas durante la primera fase de infección; además los virus tienen diferentes formas y tipos que indican la marcada virulencia entre un aislado viral y otro.

Los estudios sobre virus que atacan a los artrópodos son muy importantes porque 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 en programas de control, (Evans y Entwistle 1987, citado por Calderón 1992).

Los virus entomopatógenos utilizados para el control de plagas pertenecen a la familia Baculoviridae; esta familia es la más estudiada hasta el momento, por reunir excelentes características, seguridad para la salud humana y por su especificidad para invertebrados.

El concepto de manejo integrado de plagas (MIP), se introdujo en 1954 y nació del conocimiento de las ventajas que presentaban los insecticidas químicos, los componentes claves del MIP son la prevención, el monitoreo y el manejo de plagas, para reducir las poblaciones hasta un nivel económicamente aceptable (umbral económico).

Antes de esta fecha ya se conocía la posible actividad mutualista de control de insectos con microorganismos entomopatógenos y organismos predadores o parasitoides. El empleo de baculovirus dentro de programas MIP es más alto en países en desarrollo que en países desarrollados; se ha venido incrementando el empleo de baculovirus en programas de MIP

para el control de especies de *Spodoptera* en países como India, África, China y algunas regiones de Asia y América Latina.

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.

3.1.1. Virus Entomopatógenos

Los virus Entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos hasta, eventualmente, ocasionar su muerte, son parásitos intracelulares obligados, pues no pueden reproducirse fuera de la célula huésped, puesto que necesitan un organismo vivo para su multiplicación y diseminación.

En el ambiente pueden estar presentes naturalmente, enfermado a pocos insectos en forma enzoótica, utilizándolos como insecticidas virales pueden ocasionar la muerte de grandes poblaciones de plagas de importancia económica, (Carrillo 2003).

3.1.2. Producción de los baculovirus

El éxito en el control de una plaga depende en gran parte de su ciclo de vida y demuestra posibilidad de atacar dos o más etapas de dicho ciclo; igualmente importante es la supresión de reproducción por eliminación de hospederos alternos para evitar reinfestaciones. Tomando estos factores en cuenta y proveyendo los requisitos básicos del parasitoide, como: disponibilidad de polen, néctar, refugio, presas alternativas y pareja, pueden esperarse resultados positivos.

Para producir masivamente este virus se hace necesario criar también al huésped *Spodoptera sunia*, que para los variados trabajos y estudios de investigación llevados a cabo acerca de los baculovirus en el laboratorio y en el campo, se hace indispensable tomar en cuenta la existencia de una cepa patrón para la metodología de producción a seguir que favorezca tener un mejor control de calidad en el proceso de producción del VPNSs, (Soto *et al* 2009).

Aunque parece un proceso fácil, en realidad la producción masiva depende de una serie de pasos sucesivos, los cuales requieren ser optimizados para que la producción siga en marcha de manera fluida y coordinada; el vigor, la limpieza de la colonia principal de insectos son de importancia elemental y se asegura mediante la descontaminación frecuente de los recipientes de cría, superficies del laboratorio, cámaras bioclimáticas y el tratamiento rutinario de los huevos y las pupas del insecto con soluciones de lejía o formol para reducir la presencia de patógenos en la colonia; por otro lado, la dieta que se usa para mantener la colonia se prepara con inhibidores de crecimiento de microorganismos, antibióticos y pequeñas cantidades de formol, aunque el formol no se incluye generalmente si la dieta está destinada a la cría de larvas infectadas con virus.

Así mismo, es necesario contar con recipientes diseñados para infectar cantidades importantes de larvas y para poder cosechar los cadáveres infectados de manera rápida y eficiente; la optimización del sistema de inoculación y cosecha de las larvas infectadas requiere de estudios detallados orientados a determinar el estadio por infectar, que normalmente es el último o penúltimo estadio larvario, la densidad larvaria que maximiza la producción de OBs (número de observaciones) por recipiente sin provocar pérdidas importantes por canibalismo o infecciones oportunistas, la concentración y administración del Inóculo, la composición de la dieta, la temperatura de incubación, las condiciones ambientales y el momento de la cosecha de las larvas infectadas para minimizar la contaminación por microorganismos, (Calderón 1992). Los sistemas actuales de producción de OBs en insectos generan una carga importante de bacterias y hongos que naturalmente infestan la dieta, la superficie del insecto, a su intestino y las heces.

3.2. Control de calidad en la producción de VPNSs

La calidad de forma general se define como un conjunto de propiedades y características de un producto que le confiere estar apto para satisfacer las necesidades a las cuales va dirigida, (Burges 1981, citado por Rodríguez 2009).

El control de calidad permite la corrección de los problemas de actividad originados en el proceso de producción que son elevados, la homogenización del material puede ser deficiente,

por tanto, el muestreo y control de calidad de cada lote producido permiten comprobar y asegurar la eficiencia del bioinsecticida que llega al mercado y se requiere para asegurar la viabilidad y efectividad del producto final. El mantener la naturaleza del virus es otra de las preocupaciones del control de calidad, (Rodríguez 2009).

Dos de los criterios para determinar la calidad de un producto, son su seguridad, o sea su pureza (libre de agentes contaminantes) y la eficacia biológica del ingrediente activo; el control de calidad de la producción se realiza con el objetivo de efectuar correcciones de los problemas de pérdida de la actividad biológica del virus, originados por el proceso de formulación; este control involucra dos etapas, la primera en la producción de los hospedantes del virus y la segunda durante el proceso de multiplicación del virus en sus hospedantes, (Rizo y Narváez 2001). Los insectos en general requieren carbohidratos, aminoácidos, grasas, lípidos, vitaminas, minerales y agua, las cantidades requeridas varían de una especie a la otra al desarrollar dietas para insectos que tienen requerimientos dietarios muy complejos, es aconsejable incluir todos los nutrientes conocidos con suficiente sustancia accesoria para obtener las propiedades físicas adecuadas.

Los requerimientos de minerales en los insectos por lo general se satisfacen mediante inclusión en las dietas de mezcla de sales disponibles, como las sales de Wesson, la celulosa normalmente se adiciona para estimular la alimentación y solo proporciona minerales como sustancias grasas y el agar se adiciona en la mayoría de las dietas para proporcionar consistencia.

Para evitar contaminaciones microbiales en las dietas, se acostumbra adicionar sustancias antimicrobiales; los productos más usados son aureomicina, formaldehído, metil parabén y ácido sórbico.

Cuando se crían insectos en el laboratorio se requiere extrema sanidad para evitar la contaminación con microorganismos; es necesario esterilizar los recipientes de cría, todos los equipos e instrumentos que se van a emplear y en lo posible también los estados del insectos con los cuales se empieza la cría, por lo general el estado de huevo, para esterilizar los insectos

se puede usar hipoclorito de sodio al 0.5 % lo mismo que para los recipientes de cría que no soporten esterilización en el autoclave.

Para evitar el crecimiento microbial en las dietas es muy común adicionar inhibidores químicos y a veces controlar el pH del medio manteniéndolo cerca de la neutralidad, según sea el caso. Estos procedimientos son muy efectivos siempre y cuando los ingredientes no estén contaminados inicialmente, equipos, ambientes limpios, los huevos de los insectos se laven en una solución germicida; los ingredientes de la dieta muchas veces se calientan durante la preparación pero por lo general esto no es suficiente para matar los microorganismos.

Se debe tomar precauciones especiales con el uso de sustancias antimicrobiales puesto que estas pueden ser tóxicas a insectos; el grado de toxicidad depende de la especie, la clase de la concentración del agente y la dieta. Cuando se crían insectos con dieta artificial para reproducir virus, se aconseja no adicionar formaldehído por que se ha demostrado que tienen algún poder de inhibición contra ciertos virus; tratándose de Lepidopteros en cría, la concentración de las sustancias antimicrobiales no debe exceder el 0.03 % de peso de la dieta.

Sin embargo en actividades rutinarias de crianza de *Spodoptera sunia* la calidad debe ser evaluada en base a la sucesión generacional y a las características biológicas incluyendo la abundancia de postura, porcentaje de eclosión, peso de pupas y reducción de la incidencia de deformaciones de pupas y adultos.

Hay que tener en cuenta que cuando se introduce una población nativa en un laboratorio, se pierde la variabilidad genética debido a la selección y cruzamiento entre hermanos (endogamia), en las primeras generaciones se recupera esta variabilidad debido a mutaciones y recombinaciones, (Joslyn 1984, citado por Rizo C *et al* 1994).

El control de calidad (CC) se requiere para asegurar la viabilidad y efectividad del producto final, una medición básica de productos a base de virus es el número de OBs por volumen (líquido) o masa (peso seco); aunque esta es una medida importante, el conteo no garantiza la actividad insecticida la cual es mejor determinarla por bioensayos estándares; las técnicas para

realizar bioensayos efectivos pueden variar mucho entre los laboratorios y posiblemente debería ser estandarizada por la finalidad de hacer comparaciones reales, (Rizo y Narváez 2001).

3.2.1 Control de calidad en la cría de *Spodoptera sunia*

Existen diversas formas de evaluar la calidad de los insectos producidos en el laboratorio, los aspectos más importantes para evaluar la calidad son: adaptabilidad, movilidad, acoplamiento, reproducción y colonización. La importancia de estos es relativa y depende del objetivo de la cría; por ejemplo, cuando la cría se tiene para la producción de virus el componente más importante es la reproducción, (Parra 1986, citado por Rizo y Narváez 2001).

3.2.2. Sanidad general y condiciones de cría

En un laboratorio de cría de insectos es necesario mantener condiciones de sanidad estrictas para controlar la contaminación del alimento con microorganismos, como enfermedades en los insectos, lo cual puede impedir la producción.

La principal fuente de contaminación son los insectos mismos, los alimentos seleccionados o ingredientes de ellos (por ejemplo el germen de trigo viejo puede estar contaminado con bacterias), el edificio y el equipo empleado.

Rizo *et al* 1994, señalan que la contaminación de los alimentos puede causar problemas de calidad de los insectos; las infestaciones por hongos pueden formar una capa superficial impenetrable, mientras que la contaminación por bacterias puede inhibir la alimentación, posiblemente por la producción de sustancias repelentes; sin embargo, para la cría, los aspectos de calidad se deben evaluar en las generaciones sucesivas y los parámetros son: características biológicas como la capacidad de ovoposición, eclosión, peso de pupas y porcentaje de deformación de pupas y adultos. Es recomendable mantener altas poblaciones (más de 100 individuos) en el laboratorio y realizar cruces con material genético nuevo para evitar la endogamia.

3.2.3. Higiene para eliminar y controlar la contaminación

El control de la contaminación es una actividad que debe ser parte de la rutina diaria del personal que conduce el insectario, para la esterilización de insectos y superficies del laboratorio se utilizan a menudo formalina e hipoclorito de sodio, rutinariamente se deben lavar los pisos, paredes, recodos y techos con las sustancias señaladas anteriormente, o bien es recomendable utilizar una luz Ultravioleta (UV) bactericida (257 nm de radiación), la cual debe ser activada solamente en ausencia del personal.

Se debe tener mucho cuidado con los materiales que son utilizados, tales como pinzas, pinceles y agujas de disección, las cuales deben ser lavadas y esterilizadas, o bien desinfectadas con alcohol cada vez que se van a utilizar y deben mantenerse en una solución de cloro al 5 %.

Los vasos utilizados pueden ser reciclados, pero después del lavado con agua y jabón se recomienda dejarlos 24 h en una solución de hipoclorito de sodio al 5 %, después estos deben enjuagarse con agua para quitar el excedente de cloro y cada vez que se utilizan deben de desinfectarse con alcohol, (Rizo *et al* 1994). Se sabe que si se presentan problemas de contaminación es recomendable colocar los vasos en una cámara de luz ultravioleta por 20 minutos.

Para eliminar la contaminación general fuera del huevo y transovarial o en el interior del huevo en los insectos, se puede esterilizar con seguridad la superficie de algunos estadios, como se describe anteriormente para los huevos y pupas, para el caso de infecciones internas se hace uso de productos que se incluyen en la dieta.

3.2.4. Criterios para la producción de larvas de *Spodoptera sunia*

La desinfección de materiales que se utilizan en el laboratorio y que serán reutilizados en los siguientes ciclos de producción debe ser una constante a seguir en todo proceso, así como el lavado de los laboratorios al menos dos veces al año; introducir material genético nuevo 2 ó 3 veces al año para evitar la degeneración de la especie, (Romero 2011).

Romero 2011, sugiere que el uso de Agar en la elaboración de dietas debe ser un lineamiento a seguir porque a través de diferentes pruebas se llegó a la conclusión que *Spodoptera sunia* se desarrolla mejor con dieta de soya siendo el agar el que mejor solidifica la dieta.

Todos estos criterios han sido analizados y creados con el fin de aumentar rendimientos y disminuir contaminantes en la cosecha de larvas (Romero 2011).

3.3. Laboratorio de producción de virus: Infraestructura y Condiciones

Para la producción del VPN se requiere la siguiente infraestructura:

Sala de inoculación. En esta sala se preparan los recipientes utilizados con la dieta, para posteriormente aplicar la solución viral, también se colocan las larvas del instar adecuado para que ingieran el alimento al cual se agrega el virus.

Sala de incubación y cosecha. En esta área se colocan todos los recipientes que contienen larvas con alimento contaminado con VPN, también se realiza la cosecha del virus entre los 3 y 5 días después de la inoculación.

Sala de almacenamiento. Esta sala contiene principalmente los congeladores necesarios para mantener el virus a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sala de formulación. En ella se lleva a cabo la formulación del VPN.

Cubículos de mantenimiento de los pie de cría. Los pie de cría, que no son otra cosa que las colonias madres que generan los individuos destinados a la reproducción masiva, requieren ser mantenidas en cubículos separados para la especie *Spodoptera sunia* a una temperatura media de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, (Unan-León 2004).

Lavado y saneamiento de materiales y utensilios: se debe disponer de otro ambiente para la limpieza y lavado de aquellos materiales y utensilios no desechables, (Unan-León 2004).

3.3.1. Elaboración y esterilización de dietas para la crianza de *Spodoptera sunia*

El término dieta artificial ha sido definido como cualquier dieta que no es el alimento natural del insecto, para este trabajo es indispensable formular una dieta para planificar la producción, la calidad y la nutrición del virus de *Spodoptera sunia*; al faltar un ingrediente que limite la producción de dieta para la crianza, una alternativa es suministrar dieta natural que puede ser el follaje de especies de cultivos que atacan en el campo siempre y cuando este alimento este higiénicamente esterilizado o lavado con cloro, la preparación y esterilización de las dietas debe ser realizada en una sala acondicionada para ello, que puede estar a temperatura ambiente, (Unan-León 2010).

3.3.2. Pasos básicos para los sistemas de producción de VPNSs

En general los sistemas de producción requieren de 5 pasos básicos:

- 1) La producción del sistema inicia con la selección, establecimiento y mantenimiento de una colonia de insectos saludables, esta colonia va a proveer los estadios de vida adecuados para la exposición del virus que se desea producir, (Unan-León 2004).

- 2) Los sistemas de producción eficientes requieren que el insecto alcance un estadio de crecimiento específico, con el objetivo de incrementar el rendimiento potencial del virus por individuo, las larvas juveniles de insectos se dejan crecer por varios días y generalmente se alimentan de una dieta artificial, para que aumenten de tamaño antes de la inoculación.

- 3) La inoculación generalmente consiste en la exposición del insecto al virus seleccionado, los insectos son inoculados o expuestos al virus para iniciar el ciclo de la enfermedad, esto se realiza para permitir que las larvas se alimenten de comida contaminada con el virus.

- 4) Después de la inoculación se deja que el ciclo de la enfermedad progrese dentro de un periodo de incubación, el cual termina con la producción del poliedro viral.

- 5) Una vez que se completa el ciclo de la enfermedad, los poliedros se cosechan y procesan para obtener el producto final, en muchos sistemas de lepidopteros se colectan los huevos de la colonia de insectos para producir larvas juveniles, (Unan-León 2004).

3.3.3. 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).

3.3.4. 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.

3.4. 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

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 VPNSs 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 DL_{50} , 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 DL_{50} por dosis letal media (DL_{50}) por dosis efectiva media, CL_{50} por concentración letal media, CE_{50} 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 DL_{50} , 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 (DL_{50}) 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 (CL_{50}) que es la dosis aplicada (generalmente por unidad de superficie) que produce el 50 % de mortalidad de una población; y 3) tiempo letal medio (TL_{50} %) 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 DL_{50} 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 DL_{50} y al mismo tiempo su grado de toxicidad, la determinación de la DL_{50} requiere de la estadística cuantil 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).

3.4.1. Aspectos para el diseño de Bioensayos

Estudios realizados por Steinbrecher 2008, muestran que existen varios aspectos que se deben tener en cuenta para el diseño de bioensayos: 1) utilización de insectos provenientes de cría de laboratorios, con un desarrollo biológico homogéneo (tamaño y peso) y en perfecto estado sanitario; 2) selección de larvas 12 a 24 horas antes de montar el bioensayo; 3) definición de tratamientos por ensayo; 4) definición de repeticiones por tratamiento (tres o más); 5) definición de números de individuos por repetición (no menos de 30); 6) tomar en cuenta un testigo tratado de igual manera usando agua destilada en lugar de inóculo, la mortalidad en este no debe exceder de 10 %; 7) tomar en cuenta las condiciones de temperatura y humedad relativa controlada.

Cuando no se conoce nada sobre comportamiento de un determinado principio activo se recomienda la evaluación de una dosis alta, mediana y baja, llamado esto ventana biológica, para conocer por donde está el rango de dosis.

3.4.2. Análisis Probit

En teoría de las probabilidades y estadística, el análisis Probit (probabilidad), es una parte del amplio campo de la estadística biológica, es un sistema de técnicas estadísticas que está basado en la relación entre la frecuencia en que ocurre una respuesta específica y la cantidad numérica de una dosis u otro estímulo que tiende a inducir la respuesta, la función es inverso función de distribución acumulativa (CDF), o función del quantile asociado al estándar distribución normal; tiene usos exploratorios y especializados así como moldear la regresión de las variables binarias de la respuesta, (Steinbrecher 2008).

3.5. Generalidades de *Spodoptera sunia*

Spodoptera sunia: (Guen) = (*Xylomiges sunia*) gusano cortador, gusano tigre, rosquilla, gusano cuerudo.

Las mariposas y palomillas constituyen el orden Lepidoptera con 100 mil especies distinguibles, a pesar del gran número son muy uniformes tanto en morfología como 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 tienen una coloración marrón y similares entre sí, (Malais y Ravensberg 1992).

Es una de las plagas claves del maíz a nivel Mesoamericano, así como también es plaga de otros cultivos de importancia como frijol, maní, ajonjolí, papa, tabaco, cebolla, pepino, repollo y camote. Los estados larvales se alimentan del follaje haciendo agujeros grandes e irregulares en las hojas, en otros casos solo deja el esqueleto de las mismas, son peligrosos en grandes cantidades reduciendo la actividad fotosintética esto lleva a que la planta no pueda desarrollarse o formar frutos.

3.5.1. Distribución de *Spodoptera sunia*

El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, El Caribe y América del Sur, en el país se encuentran en las áreas de cultivos de frijol, tomate, algodón, hortalizas, yuca y otras solanáceas, cucurbitáceas, maíz, sorgo y arroz (King y Saunders 1984). En su modo de distribución lo hacen por el vuelo; también se distribuyen a mayores distancias con ayuda del viento y por medio de transporte de material infestado.

3.5.2. Ciclo de vida de *Spodoptera sunia*

Huevo: los ponen en grandes grupos sobre las hojas y están cubiertos con un filtro gris de pelos que salen del abdomen de la hembra en ovoposición.

Larva: 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 esconden en los rastrojos o en el follaje durante el día, se alimentan de noche de las hojas y brotes tiernos, todas las especies empupan en el suelo y son similares en casi todos sus hábitos en los primeros dos estadios.

Adulto: con 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, 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.

Estado pupal: Cuando las larvas han terminado su alimentación al final del sexto estadio se dejan caer al suelo donde forman una cámara pupal y pasan al estado de pupa, 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 la idea de que de esa forma escapa de la muerte, se conoce que algunos depredadores pueden detectar y depredar pupa debajo de la superficie.

Daño: 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.

En la literatura consultada, según King y Saunders 1984, documentan que, la duración del ciclo promedio de desarrollo del complejo de *Spodoptera sunia* criados bajo condiciones de laboratorio son: Huevo dura 4 a 8 días; larva, 14 a 18 días y pupa, de 9 a 12 días, para un rango promedio del ciclo de vida de 27-38.

3.5.3. Apariencia general de *Spodoptera sunia*

En *Spodoptera sunia*, el adulto con envergadura de 26-27 mm, es similar a *S. eridania* pero se distingue 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).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del Estudio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cría de Insectos Noctuidos y de Producción de VPN del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB), en el Campus Agropecuario UNAN-León, ubicado a 1.5 km al este carretera a La Ceiba en la ciudad de León.

4.2 Material biológico usado

Se utilizó el aislado viral nativo de *Spodoptera sunia* (VPNSs) del catálogo de virus de la UNAN-León, VPNSs – U-13 (UNAN-13) colectado en un cultivo de chiltoma en el Centro de Capacitación “Vivian Hernández” ubicado en la comarca El Convento del departamento de León, el día 4 de diciembre de 1987, (Calderón 1991).

Para el establecimiento de la cría, las larvas de *S. sunia* se colectaron en los cultivos de tomate y repollo del Campus Agropecuario.

4.3 Descripción general del estudio

Se estableció la cría de *S. sunia*, a partir de larvas colectadas en el campo. Se dejaron en cuarentena hasta la segunda generación y en la tercera generación se pasaron al laboratorio de cría de noctuidos. Para determinar la actividad insecticida de tres lotes de virus producidos en el laboratorio se establecieron bioensayos usando larvas del segundo instar y se determinó la DL_{50} como un criterio de patogenicidad y virulencia de la cepa viral nativa VPNSs. Finalmente, se realizó un ensayo para determinar la concentración óptima del inóculo que permita incrementar los rendimientos de CIP/LE cosechadas en el laboratorio de producción de virus.

4.4 Etapas del estudio

El estudio es de tipo descriptivo, el cual se realizó en dos etapas: La primera en el laboratorio de cría de insectos noctuidos y la segunda etapa en el laboratorio de producción de VPN del Campus Agropecuario de la UNAN-León.

4.4.1 Crianza de *Spodoptera sunia*

4.4.1.1 Colecta del insecto en campo

Para establecer el pie de cría de *Spodoptera sunia*, se colectaron larvas de diferentes edades en los cultivos de tomate y repollo, ubicados en las parcelas del Centro Nacional de Referencia en Agroplasticultura (CNRA), de la UNAN-León. Estas larvas se llevaron al laboratorio de cría de noctuidos, aisladas y mantenidas en cuarentena hasta la segunda generación, a una temperatura media de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa promedio de 46.6 %.

4.4.1.2 Manejo de *S. sunia* en cuarentena

Para adaptarlas a las condiciones de laboratorio las larvas fueron alimentadas con hojas de tomate, previamente sumergidas por 10 min en una solución de cloro al 5%, se enjuagaba con abundante agua y luego se secaron. Cada dos días se colocaban 2 ó 3 hojas de tomate por taza, la cual contenía una larva de *S. sunia*, hasta completar su ciclo larval. Cuando las larvas alcanzaron el estadio de pupa, se procedió a determinar el sexo de las mismas y se colocaron 4 parejas por jaulas de oviposición.

Después de 3 ó 4 días los adultos emergieron y comenzaron las hembras a ovipositar. Estas masas de huevos fueron colectadas a diario y se esterilizaron con una solución de cloro al 1 % y benlate al 2 % para evitar la proliferación de hongos, luego ya secos se colocaron en bolsas plásticas. Al eclosionar los huevos, las larvas neonatas se trasladaron con la ayuda de un pincel a las tazas que contenían dieta artificial a base de soya. Se colocaron entre 40 ó 50 larvas por taza, estas larvas fueron alimentadas con dieta artificial a base de soya hasta que completaron la etapa larval.

4.4.1.3 Manejo del pie de cría

Los insectos de la tercera generación fueron usados para mantener el pie de cría de *Spodoptera sunia* en el laboratorio.

Después de la emergencia de los adultos de *Spodoptera sunia* de la tercera generación de la colonia, se introdujeron en las jaulas donde se produjo el acoplamiento y la ovoposición; cada jaula de emergencia se forró en su interior con papel, en la base se colocó un círculo de papel

y en las paredes de la jaula se pegaron tres bandas de papel, en el interior de las jaulas sobre platos petri se colocó un algodón impregnado de miel al 10 % y otro de agua para estimular la ovoposición; luego se introdujeron 50 parejas de adultos y se tapó la boca del cilindro con una tela de nylon y se rociaron las jaulas con agua para mantener una humedad adecuada.

Las hembras depositaron sus huevos sobre las tiras de papel colocadas en el interior de las jaulas y se seleccionaron las masas de huevos que contenían entre 100 a 250 huevos por masa, a partir del segundo día de ovoposición de las hembras, pues son las más viables. Se desinfectaron como se describe anteriormente, para evitar posibles patógenos que puedan estar presentes. Estos huevos se colocaron en bolsas plásticas rotuladas con la fecha de ovoposición y especie, hasta la eclosión de las larvas.

Al eclosionar las larvas, con la ayuda de un pincel, se colocaron entre 40-50 larvas en tazas de 16 onzas que contenían dieta para su alimentación y desarrollo; cuando las larvas alcanzaron un segundo a tercer estadio se trasladaron individualmente a tazas de 4 onzas donde se alimentaron con dieta artificial a base de soya, para mantener un flujo regular de producción en la crianza, se programó el traslado de 100 larvas/día a vasos individuales donde permanecieron hasta alcanzar el estado de pupa. El pie de cría se revisó dos veces por semana para coleccionar las pupas, se eliminaron las larvas enfermas y se proveyó de alimento fresco a las larvas cuando fue necesario.

Cuando las larvas entraron en el estadio de prepupa dejaron de comer, se retraían, mostraron un aspecto húmedo, cambiaron de coloración y formaron una celda pupal compuesta de dieta y restos de heces donde se introducían, las pupas coleccionadas se esterilizaron con cloro al 1 % durante 5 minutos a lo inmediato se enjuagaron con agua, se dejaron secar, cuando estaban secas se separaron por sexo y se trasladaron a las cajas plásticas asegurando una proporción de sexos de 1:1, en estas cajas se mantuvieron hasta la emergencia de los adultos, estos se trasladaron a diario a jaulas de ovoposición para repetir el ciclo nuevamente.

Las condiciones de temperatura y humedad relativa del laboratorio de cría se mantuvieron en 26.17 °C y 46.6 % respectivamente.

4.4.1.4 Preparación de la dieta artificial

La dieta a base de soya fue preparada para alimentar a las larvas en la cría y para la producción de virus y realización de los bioensayos. Para la elaboración de la dieta se pesaron en una balanza mecánica 200 g de germen de trigo, 275 g de harina de frijol, 120 g de harina de soya, 125 g de levadura y 180 g de maicena. Una vez pesados los ingredientes se mezclaron con 900 ml de agua hasta formar una mezcla homogénea, se cubrió el recipiente que contenía la mezcla con papel de aluminio para introducirla en el autoclave a 90 atmosferas de presión (20 PSI (atmósferas de presión) ó 1.5 kg/cm²), por 1.5 horas a una temperatura de 259 °F (126.11 °C); luego, se mezclaron en un recipiente 15 g de ácido ascórbico, 8 g de ácido sórbico, 7 g de vitaminas, 500 mg de tetraciclina, 10 g de metil-paraben, y 2 g de benlate, mezclándose con 100 ml de agua esterilizada, se agregó a la dieta una vez pasado el tiempo de esterilización y cuando la temperatura bajó a 60 °C, se homogenizó la dieta y se vertió en una bandeja, se tapó con papel aluminio, cuando estaba fría y sólida se utilizó para la alimentación de las larvas.

4.4.2 Segunda etapa: Evaluación de la actividad biológica de VPNSs

4.4.2.1 Selección del Inóculo

Se tomaron tres lotes de virus de VPNSs producidas en diferentes momentos en el laboratorio de producción de la UNAN-León. El primero corresponde a 128 LE (Larvas Equivalentes) infectadas el 22 de junio del 2009 y se cosecharon el 30 de junio del 2009; el segundo a 100 LE que se infectaron el 20 de agosto del 2009 y se cosecharon el 25 de agosto del 2009 y el tercer grupo de 250 LE infectadas el 23 de febrero del 2010 y cosechadas el 01 de marzo del 2010, este último presento en el momento de su almacenaje afectación de cambios de temperatura por problemas de cortes de energía en el laboratorio.

4.4.2.2 Semipurificación del virus

Cada lote de virus seleccionado se maceró en 10 ml de agua destilada. La solución resultante se centrifugó en dos etapas, primero se centrifugó a 3000 rpm (revoluciones por minuto) durante un minuto de esta primera centrifugación el resultado es un sobrenadante y un sedimento, el sedimento se eliminó y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos, el resultado de esta centrifugación fue el sobrenadante que se eliminó y el

sedimento que es donde se encuentran los cuerpos de inclusión poliedral, al cual se le agregó 5 ml de agua destilada y a esta solución resultante se le denomina solución madre.

4.4.2.3 Conteos de cuerpos de inclusión poliedral (CIP/ml)

De la solución madre se prepararon tres diluciones sucesivas, 1:10, 1:100 y 1:1000, esto se hizo para realizar el conteo de CIP/ml (Cuerpos de Inclusión Poliedral por mililitro). De la solución 1:1000 se tomaron 20 µl (microlitros) con una micropipeta y se colocaron en la cámara de conteo Neubauer (hemocitómetro) previamente esterilizado, el cual se ubicó en un microscopio de contraste de fase con un objetivo de 25X y un ocular de 16X. Para ello se contaron los poliedros en 5 cuadros grandes, uno en cada extremo de la cuadrícula y uno en el centro, omitiendo los poliedros que quedaron en el margen superior y derecho de cada cuadro, esto se repitió tres veces, se sumaron y promediaron.

Para el cálculo de la concentración de la solución madre se utilizó la siguiente fórmula: $5X \times 10^4 \times 1000$; Donde 5= número de cuadros contados, X= número de poliedros contados en los 5 cuadros, 10^4 = la dilución usada y 1000= la profundidad de la cámara.

4.4.2.4 Preparación de dosis

Para el montaje del bioensayo se prepararon cinco dosis de virus y un testigo a base de agua. El bioensayo se repitió cuatro veces. Para cada dosis se usaron 30 larvas con un total de 120 larvas por réplica y 720 larvas en total. A partir de la concentración de la solución madre se prepararon cinco dosis las cuales fueron: 150, 500, 1000, 3000 y 6000 CIP/ml.

4.4.2.5 Montaje del bioensayo

El bioensayo se realizó en el Laboratorio de Entomología con una temperatura promedio de 28.03 °C y 44.80 % de humedad relativa.

Para realizar el bioensayo se utilizó el método de contaminación de la dieta para esto se utilizaron micro platos y una jeringa con la que se colocó un ml de dieta artificial en cada orificio del micro plato. Con una micro pipeta se depositó sobre la dieta un microlitro de cada dosis del virus, luego se colocó una larva del segundo instar en cada orificio, se procedió a

cubrir con papel absorbente, se asperjó con agua y se tapó con un cubre objeto, luego se selló con un cinta adhesiva. Rotulando la dosis y número de réplica. El bioensayo se inició con el control y se continuó con la dosis más baja hasta concluir con la dosis más alta, para no tener problemas de contaminación.

De las larvas L₁ usadas en los bioensayos, previamente se tomó una muestra de 100 larvas a las cuales se les midió la longitud y se pesaron en una balanza analítica, con el fin de asegurar que todas las larvas fueran del mismo tamaño y de un mismo peso. Puesto que las larvas poseen mucha movilidad se procedió a refrigerarlas de dos a tres minutos para pesar y medirlas. El peso promedio de las larvas utilizadas para el montaje del bioensayo fue de 0.001955 g y una longitud promedio de 0.42125 cm.

El traslado de los bioensayos se realizó 24 horas después del montaje, este lapso de tiempo permitió que la larva consumiera la dieta infectada con la dosis de virus. Se revisó en la parte inferior de los platos para ver si las larvas habían consumido la dieta, cuando se observó que la mayoría de larvas comieron entonces se realizó el traslado de cada larvita a vasitos individuales, las que no comieron se marcaron por debajo para no trasladarlas, estas se dejaron un día más y luego se trasladaron, el traslado inició por el testigo (agua destilada), continuando con la dosis más baja a la más alta.

Se usaron vasitos conteniendo dieta nueva, los cuales se rotularon. La revisión se realizó diariamente tomando apuntes en la hoja de registro de bioensayos hasta la muerte de la larva o hasta alcanzar el estado de pupa.

4.4.3 Evaluación de la producción óptima de VPNSs

Se estableció un ensayo en el laboratorio de producción de VPN bajo condiciones promedio de temperatura de 27.44 °C y humedad relativa de 46.45 %. El diseño estadístico usado fue un bifactorial montado en un DCA. El factor principal fue la edad de la larva y el factor secundario la dosis de infección, para un total de tres tratamientos. Las dosis de infección fueron: 1) 1.5 ml de agua destilada /LE, el cual se consideró como el testigo, 2) 3 ml de agua destilada /LE y 3) 5 ml de agua destilada /LE. Las edades de la larva evaluada fueron L₂ y L₃.

Cada larva fue considerada como la unidad experimental. El total de observaciones (repeticiones) por tratamiento fue de 100.

4.4.3.1 Establecimiento del ensayo

Se prepararon las tres dosis y se colocó cada una en un atomizador. Se usaron tazas de 5 ml de capacidad, donde se colocó dieta la cual se maceró para dejar una superficie homogénea. Posteriormente, se asperjó cada taza con la dosis correspondiente, depositando 50 µl/taza, luego se dejó secar y se colocó una larva L₂ o L₃ según el tratamiento, se utilizó un total de 300 larvas L₂ y 300 larvas L₃. Cada taza fue tapada y rotulada con el tratamiento y replica respectiva. Las variables evaluadas fueron mortalidad por tratamiento y causas de mortalidad.

Se consideró una larva muerta por virus aquella que al tocarlas se rompía el integumento, muerte por bacterias cuando las larvas se tornaban oscuras y no se rompía el integumento y por hongo aquellas larvas que mostraban rigidez o crecimiento de micelio.

4.5 Análisis de los datos

Los datos obtenidos fueron introducidos en una hoja de cálculo de EXCEL para realizar las gráficas. El análisis probit del programa SPSS, versión 15 se utilizó para calcular la patogenicidad y virulencia (DL₅₀) del insecticida viral. Los datos del ensayo del inóculo para la producción de virus fueron analizados como un bifactorial establecido en un DCA.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Concentración de la solución madre del virus crudo

La Tabla 1 muestra las concentraciones de cada solución madre del virus VPNSs usadas para la preparación de las dosis de los bioensayos. Se muestra un incremento de la concentración de virus en la medida que aumenta el número de larvas equivalentes. Sin embargo, esto no ocurrió en el lote dos de 128 LE. (Alves 1986), señala, que la concentración de virus en una LE, varía de una especie de virus a otra, pero no es el caso de *Spodoptera sunia*, una LE de *Heliothis* contiene 6×10^9 y una de *Anticarsia gemmatalis* contiene 1.3×10^9 , el otro factor que afecta la concentración viral es el tamaño de la larva cosechada, pues a mayor tamaño debe haber una mayor concentración de unidades virales. Esto nos indica que las larvas cosechadas en el lote que contenía 128 LE fueron más pequeñas y por tanto, la concentración de unidades virales es menor que el lote de 100 LE.

Tabla 1. Concentración estimada de la solución madre de cada lote de producción de VPNSs. Campus Agropecuario. 2011.

Aislado viral	Concentración de solución madre CIP/ml
Virus crudo de 100 LE	3.7×10^8
virus crudo de 128 LE	5.583×10^6
virus crudo de 250 LE	1.19×10^{10}

5.2 Comportamiento de la mortalidad de las larvas expuestas a las dosis en los bioensayos

En la Tabla 2, 3 y 4, se muestra la mortalidad por virus y otros agentes contaminantes en los bioensayos en larvas de *Spodoptera sunia* infectadas con cada lote de virus evaluado. Fue notorio que algunas larvas mostraron síntomas diferentes a los causados por el VPN, estas presentaron una apariencia similar a la mortalidad producida por hongos cubiertas por una capa blanca algodonosa y otras con apariencia similar a la muerte ocasionada por bacterias, donde el integumento no se rompió y secretaban un líquido transparente y aceitoso.

Tabla 2. Mortalidad en larvas de *Spodoptera sunia* aplicadas con diferentes dosis de virus crudo del lote de 100 LE. CIRCB, UNAN-León. 2011.

DOSIS	N° de larvas probadas	N° de individuos muertos		Mortalidad (%)	
		VPN	Otro	VPN	Otro
Testigo	120	0	1	0	0.83
150	120	107	13	89.16	10.84
500	120	118	2	98.33	1.67
1000	120	117	3	97.5	2.5
3000	120	114	6	95	5
6000	120	117	3	97.5	2.5

En la Tabla 2 se puede observar el comportamiento de la mortalidad de larvas de *Spodoptera sunia*, en cada una de las dosis. Es evidente que en el testigo la mortalidad por otras causas es mínima, de 0.83 % y se atribuye a muerte por manipulación, mientras que, la mortalidad por otras causas es mayor en las larvas aplicadas con las diferentes dosis de virus, lo que es un indicativo de que existen contaminantes como hongos y bacterias en la producción de virus.

Al analizar el comportamiento de la mortalidad por virus, se observa una mortalidad constante de manera directa al incrementar la dosis, lo cual es de esperarse ya que a mayor cantidad de viriones en el intestino medio de las larvas, más rápido ocurre la multiplicación de los mismos en las células epiteliales y en el resto de las células del cuerpo de los insectos, (Alves 1986).

En la Tabla 3 se muestra el comportamiento de la mortalidad en las larvas aplicadas con el lote 128 LE y se observa que la mortalidad por otras causas, en el testigo se mantiene igual que el lote anterior con 0.83 % esta muerte se presentó por manipulación de la larva, pero la mortalidad producida por otras causas (contaminantes) es aproximadamente siete veces mayor en este lote de producción de virus.

Tabla 3. Mortalidad en larvas de *Spodoptera sunia* con las dosis de virus crudo de 128 LE. CIRCB, UNAN-León. 2011.

DOSIS	N° de larvas probadas	N° de individuos muertos		% DE MORTALIDAD	
		VPN	OTRO	VPN	OTRO
TESTIGO	120	0	1	0	0.83
150	120	25	95	20.83	79.17
500	120	99	21	82.5	17.5
1000	120	115	5	95.83	4.17
3000	120	115	5	95.83	4.17
6000	120	95	25	79.17	20.83

En cuanto a la mortalidad por virus el incremento de la mortalidad está en correspondencia con la concentración viral usada. Caso contrario ocurre con los contaminantes que incrementan la mortalidad de manera inversa a la dosis de virus.

Tabla 4. Mortalidad en larvas de *Spodoptera sunia* aplicadas con diferentes dosis de virus crudo de un lote de 250 LE. CIRCB, UNAN-León. 2011.

DOSIS	N° de larvas probadas	N° de individuos muertos		% DE MORTALIDAD	
		VPN	OTRO	VPN	OTRO
TESTIGO	120	0	2	0	1.66
150	120	35	85	29.17	70.83
500	120	53	67	44.16	83.34
1000	120	69	51	57.5	42.5
3000	120	111	9	92.5	7.5
6000	120	118	2	98.33	1.67

En la Tabla 4 se observa un comportamiento de mortalidad diferente a los dos lotes de 100 y 128 LE, es decir, la mortalidad por virus en las larvas se incrementa a medida que la dosis aumenta, la mortalidad en el testigo por otras causas se incrementa ligeramente, pero es todavía baja de 1.66 %, manteniéndose dentro de los límites permitidos. Sin embargo, la mortalidad por contaminantes como bacterias y hongos se incrementó de igual manera que en el lote dos de 128 LE y también se observa una relación inversa con la dosis de virus, lo que podría explicarse debido a que al haber una mayor concentración de virus, las larvas se enferman más rápido y posiblemente la velocidad de incubación de los hongos y bacterias es menor cuando las poblaciones de virus en el cuerpo del insecto son altas.

Por otro lado, cabe señalar que los contaminantes aparentemente provienen de la solución del virus producido en el laboratorio, puesto que la mortalidad por otras causas se presentó en el tratamiento testigo con poca frecuencia sin presentarse mortalidad por agentes contaminantes en el testigo, por lo tanto todos estos casos son atribuidos a la muerte por manipulación del material genético usado en los testigos de los lotes evaluados y el efecto de los contaminantes estuvo presente en todas las dosis aplicadas a las larvas de *S. sunia*, lo que es un indicativo de que el virus que se está cosechando en el laboratorio contiene contaminantes como bacterias y hongos. Algo relevante que se debe mencionar es que el lote de 250 LE al momento de su almacenaje presentó afectación por condiciones adversas a las requeridas para su debido tratamiento, por tanto pudo afectar su viabilidad, patogenicidad y toxicidad reduciendo los porcentajes de mortalidad por virus en comparación con los lotes de 100 y 128 LE.

5.3 Determinación de la patogenicidad y virulencia del virus

Al realizar los bioensayos para determinar la patogenicidad y virulencia de la cepa de VPNSs producida en el laboratorio, se observa que el lote de 100 lavas equivalentes (LE), producido en agosto del 2009, muestra una DL_{50} de 5.334 CIP/ μ l; para el de 128 LE producido en junio del 2009 la DL_{50} fue de 4.665 CIP/ μ l, manteniendo una patogenicidad y virulencia similar, la DL_{50} del lote de 250 LE fue de 4.669 CIP/ μ l.

Tabla 5. Dosis respuesta de larvas de primer instar de *Spodoptera sunia* infectadas con VPNSs crudo. CIRCB, UNAN-LEON. 2011.

Nº de LE	Solución madre	DL_{50}	Límite inferior	Límite superior	Pendiente	X^2
100	3.7×10^8	5.334	4.647	6.021	-1.130	155.06
128	5.583×10^6	4.665	4.082	5.248	-1.878	135.60
250	1.19×10^{10}	4.669	3.71	5.628	-2.147	42.59

La Tabla 5, muestra los valores de la DL_{50} , mostrando el grado de patogenicidad del virus; estos valores son un punto de referencia para la comparación entre los lotes de 100, 128 y 250 LE, y son los que determinan si un lote es más o menos patogénico que el otro. Se observa que el límite inferior en todos los casos se desvía muy poco del valor de la DL_{50} , de igual manera ocurre con el límite superior que se incrementa con respecto al valor de la DL_{50} , lo que

indica que no hay variación del estimado de la DL_{50} . Sin embargo, cabe destacar que la prueba de X^2 para los datos de mortalidad de los diferentes lotes de virus fue alta, lo que indica una heterogeneidad de los datos observados entre los datos. Siendo el lote 250 LE el que presentó el menor valor (42.59), lo que indica un mejor ajuste de los datos observados a los esperados representados en la línea de regresión.

Tabla 6. Potencia relativa de la mediana de los valores de la DL_{50} de tres lotes de virus VPNSs. LCB. 2011.

Lote de Virus	Potencia relativa	Límites de confianza (95%)	
		Inferior	Superior
128 LE vs 100LE	1.295	-.626	5.494
250 LE vs 128 LE	.342	-1.585	2.898
250 LE vs 100 LE	1.637	-.435	6.617

Como se observa en la Tabla 6 al comparar los resultados de la DL_{50} de los tres lotes para determinar la potencia relativa, o sea cual lote presenta mayor patogenicidad y virulencia entre ellos, nos indica que el lote de 128 LE es 1.295 veces más potente que el lote de 100 LE y el lote 250 LE es 1.637 veces más potente que el de 100 LE. Estos resultados indican que a mayor cantidad de Larvas Equivalentes el virus es más potente, o sea más patogénico.

5.4 Evaluación de la concentración del inóculo de virus

En la Gráfica 1 se observa el comportamiento que mostraron las larvas del instar L_2 a los tres días después de inoculadas. Se observa que la mortalidad por VPN fue similar en los tratamientos 1.5 cc/LE, 3 cc/LE y 5 cc/LE con un 64, 63 y 60 % de mortalidad, respectivamente. Estos porcentajes de mortalidad son estadísticamente iguales ($F=0.959$, $gl=2$, $sig=0.400$).

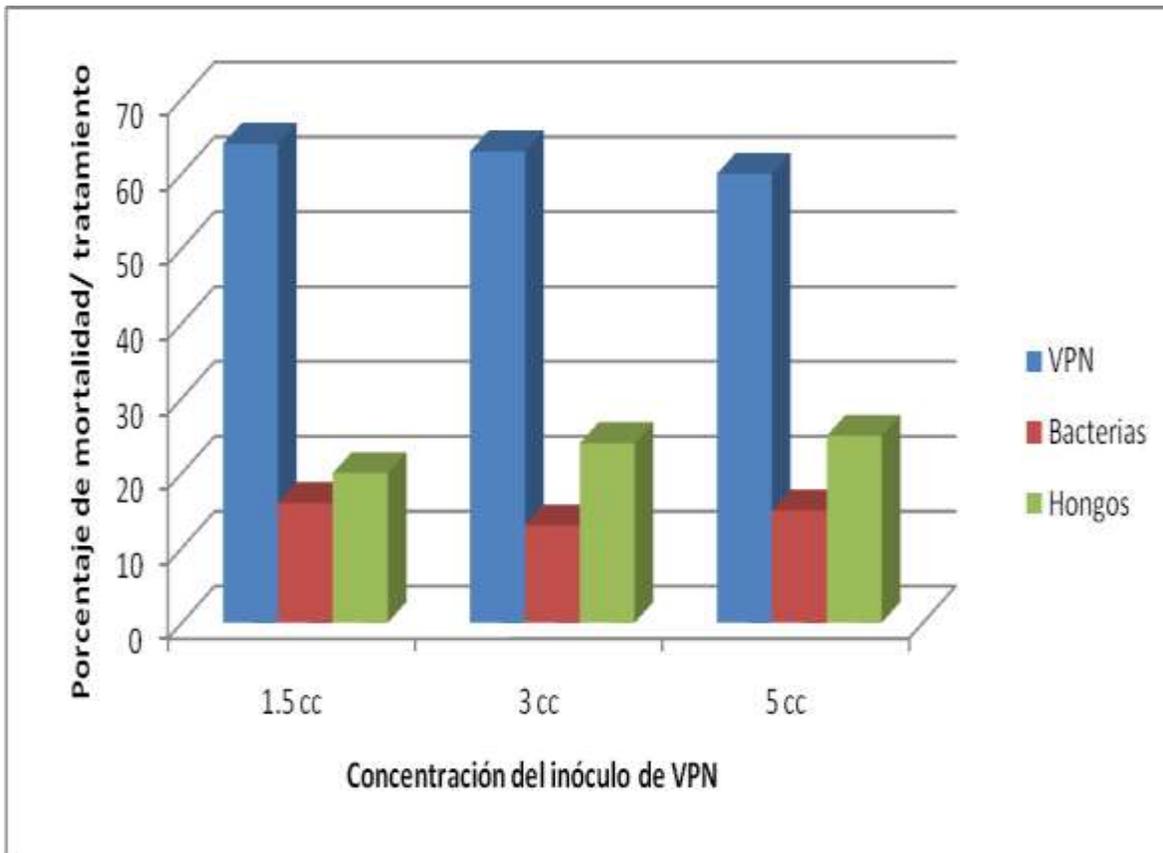


Gráfico 1. Respuesta de mortalidad de larvas del segundo instar de *Spodoptera sunia* inoculadas con diferentes concentraciones de virus de un lote de 250 LE en condiciones del laboratorio. Laboratorio de producción de VPN. CIRCB. UNAN-León, 2011.

El Gráfico 2, nos muestra el comportamiento de la mortalidad que presentó en el instar L_3 de *Spodoptera sunia* después de inoculadas las larvas, en relación a las dosis suministradas en el ensayo. Se muestra la mortalidad de larvas L_3 de *Spodoptera sunia*, después de la infección con los tratamientos virus crudo a una concentración de 1.5 ml agua/LE, 3ml agua/LE y 5 ml agua/LE la mortalidad fue de 90 %, 87 % y 86 %, respectivamente.

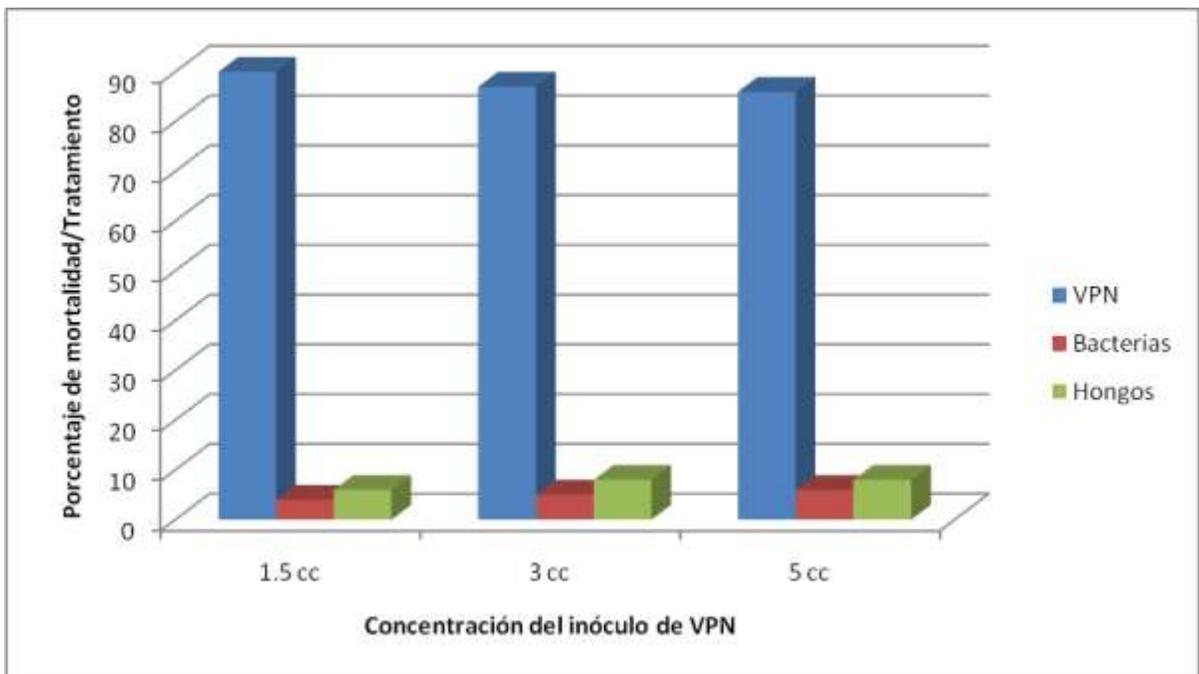


Gráfico 2. Porcentaje de mortalidad de larvas L₃ de *Spodoptera sunia* aplicadas con diferentes concentraciones de inóculo del lote de producción de 250 LE en condiciones del laboratorio de producción de VPN. CIRCB. UNAN-León, 2011.

Fue notorio que las larvas L₃ murieron a los cuatro días después de aplicado los tratamientos, mientras que las larvas L₂ murieron al tercer día, esto es lo esperado ya que el virus actúa más rápido en las larvas pequeñas (Alves, 1986). Por otro lado, de igual manera que en las larvas L₂, estas diferencias en la mortalidad son similares y no indican diferencias estadísticas significativas, tal como se mencionó anteriormente. Sin embargo, al comparar el efecto de la edad en la mortalidad de las larvas, si existen diferencias significativas ($F= 56.38$, $gl= 1$, $sig= 0.00$).

Con respecto a la contaminación entre los tratamientos en las edades L₂ y L₃ se observó que la mortalidad por contaminantes como hongos y bacterias en las larvas L₃ fue de 10 %, 13 % y 14 %, respectivamente. En las larvas L₂ el porcentaje de mortalidad producida por bacterias y hongos fue de 36 %, 37 % y 40 %, respectivamente. De igual manera que la muerte por virus, los contaminantes no muestran diferencias significativas entre los tratamientos, pero sí hay diferencias entre las edades, de una manera inversa a la mortalidad por virus, es decir, hay más

contaminantes en las larvas L_2 , que en las L_3 . Esto se puede explicar debido al tiempo que pasan las larvas del segundo instar que no mueren por virus es mayor y se contaminan más. Por ello se recomienda usar larvas L_3 para realizar el proceso de producción y disminuir de esta manera el incremento de contaminantes en la solución viral.

VI. CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos y dadas las condiciones en que se realizó este trabajo podemos concluir que:

1. La concentración de CIP/ml aumenta en relación directa al número de larvas equivalentes, encontrándose una concentración de 1.19×10^{10} CIP/ml en el lote de 250 LE y 3.7×10^8 en el lote de 100 LE.
2. La DL_{50} en larvas del segundo instar del lote 100 LE fue de 5.334 CIP/ μ l, del lote 128 LE fue de 4.665 CIP/ μ l, y la DL_{50} del lote de 250 LE fue de 4.669 CIP/ μ l., mostrando los tres lotes patogenicidad significativa.
3. La mortalidad por virus osciló entre 20 % en la dosis de 100 CIP/larva hasta un 98.33 % en las dosis de 6000 CIP/larva.
4. La mortalidad por otros factores como hongos y bacterias fue mayor en las dosis de virus más bajas (100 y 500 CIP/larva), oscilando la mortalidad entre 10.84 a 83 % en los tres lotes de virus.
5. Existe diferencias entre los tratamientos en la concentración del inóculo como en la mortalidad tanto en las larvas L_2 como las L_3 , se produjo una mortalidad similar en cuanto a que la dosis más altas presentaron mayor mortalidad que las más bajas. En las larvas L_3 la mortalidad fue de 90 %, 87 % y 86 % en los tratamientos 1.5, 3 y 5 cc/LE, respectivamente. Mientras que, en las larvas L_2 la mortalidad en los diferentes tratamientos fue de 64 %, 63 % y 60 %. Este comportamiento de mortalidad se debe a que los agentes contaminantes en larvas del instar L_2 se desarrollaron más rápido que el virus aprovechando las condiciones adversas de humedad y temperatura del laboratorio.

VII. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos recomendamos lo siguiente:

1. Cosechar las larvas muertas por virus el cuarto y quinto día después del proceso de infestación, esto permitirá tener una mejor producción del virus, evitar mortalidad por otros agentes contaminantes y obtener VPNSs más efectivo para el control de esta plaga.
2. Usar larvas L₃ para la reproducción de virus y una concentración viral de 1.5 ml de agua /LE, ya que produce el mayor porcentaje de mortalidad y por lo tanto más virus por larva.
3. Realizar estudios específicos de los contaminantes presentes en la solución viral usada para la producción de virus en el laboratorio.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alves, SB. 1986. Controle microbiano de insectos. Sao Paulo, Brasil. Editora Monole. 407 p.
- Calderón, RBN. 1992. Prueba comparativa de dos aislados nativos de VPN en *Spodoptera sunia* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis, Lic. en Biología. UNAN-León, Nic. 52 p.
- Carrillo, P. et al, 2003. Evaluación de la persistencia del virus de la poliedrosis nuclear (VPN), expuesto a la luz solar en diferentes periodos de tiempo. Tesis. Ing. en Agroecología Tropical. UNAN-León, Nic. 48 p.
- 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.
- Leucona, R. 1995. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. 338 p.
- Malais, MH y Ravensberg, WJ. 1992. Conocer y reconocer las plagas de cultivos protegidos y sus enemigos naturales. 173 págs.
- Rizo, Z. C. y Narváez, S. C. 2001. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No Sintéticos; Manejo Integrado de Plagas (en línea). Costa Rica. CATIE/GTZ. Nicaragua. Consultado 17 febrero de 2011. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A2134E/A2134E.PDF>
- Rizo, Z et al. 1994. Procedimiento para la crianza masiva de insectos noctuidos. UNAN-OEA. 24 p.

- Rodríguez, L.FM. 2009. Producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear en el laboratorio de control biológico: Elementos para el control de calidad. CIRCB, UNAN-LEON. Tesis, Ing. En Agroecología Tropical, UNAN-León, Nic. 38 p.
- Romero, G. MI et al. 2011. Calidad de la cría de *Spodoptera sunia*: Algunos parámetros biológicos para su reproducción. Tesis. Ing. en Agroecología Tropical. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León; Nic. 24 p.
- Soto, A y González, J. 2009. Protocolo de cría de *Musca doméstica* en Laboratorio Gianna Martiradonna Ochipinti. Boletín de Malariología y salud ambiental Vol. XLIX, N° 2. (En línea). Consultado 10 de marzo 2010. Disponible en <http://www.scielo.org.ve/pdf/bmsa/v49n2/a>
- Steinbrecher, S. 2008. Forecasting US Recessions with Probit Stepwise Regression Models, diario europeo de las matemáticas aplicadas (en línea). January 2008 edición. Business Economics. Consultado 18 febrero de 2011. Disponible en <http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Probit>
- UNAN-LEON. 2004. Manual de procedimientos para la producción de virus VPN Entomopatógenos. 22 p.
- UNAN-LEON. 2010. Manual de procedimientos para la cría de insectos Noctuidae de *Spodoptera exigua*, *Spodoptera sunia* y *Spodoptera frugiperda*. 26 p.
- Vargas, TSA.2004-2006. Actividad insecticida contra larvas de *Spodoptera exigua* de dos formulaciones de virus de la Poliedrosis nuclear (VPN), usando óxido de zinc y glicerina, Tesis, Ing. en Agroecología Tropical, UNAN-León, Nic. 50 p.

X. ANEXOS

Anexo 1. Preparación de soluciones

Solución de Hipoclorito de sodio al 5 %

Hipoclorito de Sodio grado industrial está preparado a una concentración del 12.5 %, para preparar una solución al 5% consistiría en tomar 400 ml del producto comercial al 12.5 % y 600 ml de agua destilada, esta operación se realiza mediante la siguiente fórmula:

$C_1V_1 = C_2V_2$, Donde C_1 = Concentración del reactivo y V_1 = Volumen que se necesitaría, C_2 = Concentración a la que necesitamos preparar el reactivo y V_2 = Volumen final que se requiere preparar.

Por lo tanto:

$$(12.5 \%) (X) = (5 \%) (1000\text{ml}).$$

$$\text{De donde } X = \frac{5000 \text{ ml}}{12.5} = 400 \text{ ml}$$

El resultado indica que deberemos usar 400 ml de Hipoclorito de Sodio Comercial y añadirle 600 ml de agua destilada para tener una solución al 5% de este reactivo.

Solución de formalina al 3 %

Comúnmente la formalina comercial se expende al 34.6 % como grado industrial, para prepararse al 3% tendremos:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(34.6)(X) = (3 \%) (1000\text{ml})$$

$$\text{De donde: } X = \frac{300\text{ml}}{34.6} = 86.70 \text{ ml}$$

Por lo que deberá de usarse 86.70 ml de formalina comercial y ajustarse o completar el volumen a 1000 ml con agua destilada para tener una solución de formalina al 3%.

Etanol al 70 % para desinfectar superficies

El alcohol etílico, etanol, alcohol, alcohol de caña o alcohol desnaturalizado utilizado como desinfectante de superficies, se comercializa al 96 %, para prepararse como desinfectante al 70% tendremos:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$(96 \%) (X) = (70 \%) (1000)$$

$$\text{De donde: } X = \frac{7000 \text{ ml}}{96} = 72.9 \text{ ml}$$

Por lo que deberemos usar 72.9 ml de alcohol etílico al 96 % para disolver en agua destilada hasta completar 1000 ml; UNAN-LEON, (2004).

Anexo 2: Tabla de ingredientes Dieta Artificial de Soya para la cría de *Spodoptera sunia*

INGREDIENTES	CANTIDAD
Agar	45 g
Germen de trigo	200 g
Harina de frijol	275 g
Harina de soya	120 g
Levadura	125 g
Acido ascórbico (Vitamina C)	15 g (8 cápsulas)
Ácido sórbico	8 g
Vitaminas	7 g
Tetraciclina	1 cápsula
Benlate	2 g
Agua	1000 ml
Metil Parabén	10 g
Maizena	180 g

Anexo 3. Tablas para conteo CIP/ml y preparación de diluciones en μl de 1:1000 de, 100 LE, 128 LE y 250 LE.

Tabla para conteo CIP/ml de 1:1000 de 100 LE

Número de repeticiones	Primer conteo	Segundo conteo	Tercer conteo
1	12	14	19
2	18	14	18
3	17	9	17
4	14	16	11
5	18	13	12
Total	79	66	77

$$79 + 66 + 77 = 222 \div 3 = 74 \text{ CIP/ml}$$

$74 \times 5 \times 10^4 \times 1000 = 3.7 \times 10^8 \text{ CIP/ml}$; este resultado debe pasarse a microlitros (μl) para esto se le restan 3 unidades al exponente:

$$3.7 \times 10^{8-3} = 3.7 \times 10^5 \text{ CIP}/\mu\text{l}, \text{ esta ecuación es la solución madre de 100 LE.}$$

Preparación de Diluciones de 100 LE

Volumen final en 1000 µl.

$$\text{Formula: Volumen inicial} = \frac{\text{Volumen final} \times \text{Concentracion final}}{\text{Concentracion inicial}}$$

Es decir, $V_i = \frac{v_f \times c_f}{c_i}$

Tabla de volumen final en 1000 µl de 100 LE

Volumen de agua	Concentración (µl)	Volumen de VPN (µl)	Volumen de agua (µl)
1000	$\frac{1000 \times 100000}{3.7 \times 10^6}$	2.70	997.3
1000	$\frac{1000 \times 33500}{100000}$	335	665
1000	$\frac{1000 \times 11000}{33500}$	328	672
1000	Dosis I: 6000	545	455
1000	Dosis II: 3000	500	500
1000	Dosis III: 1000	333.33	666.67
1000	Dosis IV: 500	500	500
1000	Dosis V: 150	300	700

Tabla para conteo CIP/ml de 1:1000 de 128 LE

Número de repeticiones	Primer conteo	Segundo conteo	Tercer conteo
1	20	23	24
2	27	19	25
3	23	21	25
4	18	26	24
5	26	19	17
Total	114	108	125

$$114 + 108 + 125 = 335 \div 3 = 111.66 \text{ CIP/ml}$$

$111.66 \times 5 \times 10^4 \times 1000 = 5.583 \times 10^6 \text{ CIP/ml}$; este resultado debe pasarse a microlitros (µl) para esto se le restan 3 unidades al exponente:

$$5.583 \times 10^{6-3} = 5.583 \times 10^3 \text{ CIP/µl}, \text{ esta ecuación es la solución madre de 128 LE.}$$

Preparación de Diluciones de 128 LE

Volumen final en 1000 µl.

Formula:
$$\text{Volumen inicial} = \frac{\text{Volumen final} \times \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}}$$

Es decir,
$$V_i = \frac{V_f \times C_f}{C_i}$$

Tabla de volumen final en 1000 µl de 128 LE

Volumen de agua	Concentración (µl)	Volumen de VPN (µl)	Volumen de agua (µl)
1000	$\frac{1000 \times 100000}{3.7 \times 10^6}$	1.73	998.27
1000	$\frac{1000 \times 35000}{100000}$	350	650
1000	$\frac{1000 \times 12000}{35000}$	343	657
1000	Dosis I: 6000	500	500
1000	Dosis II: 3000	500	500
1000	Dosis III: 1000	333.33	666.67
1000	Dosis IV: 500	500	500
1000	Dosis V: 150	300	700

Tabla para conteo CIP/ml de 1:1000 de 250 LE

Número de repeticiones	Primer conteo	Segundo conteo	Tercer conteo
1	13	104	48
2	48	111	25
3	34	39	34
4	51	13	20
5	77	52	45
Total	223	319	172

$$223 + 319 + 172 = 714 \div 3 = 238 \text{ CIP/ml}$$

$238 \times 5 \times 10^4 \times 1000 = 1.19 \times 10^{10}$ CIP/ml; este resultado debe pasarse a microlitros (μl) para esto se le restan 3 unidades al exponente:

$1.19 \times 10^{10-3} = 1.19 \times 10^7$ CIP/ μl , esta ecuación es la **solución madre de 250 LE**.

Preparación de Diluciones de 250 LE

Volumen final en 1000 μl .

Formula: $\text{Volumen inicial} = \frac{\text{Volumen final} \times \text{Concentracion final}}{\text{Concentracion inicial}}$

Es decir, $V_i = \frac{v_f \times c_f}{c_i}$

Tabla de volumen final en 1000 μl de 250 LE

Volumen de agua	Concentración (μl)	Volumen de VPN (μl)	Volumen de agua (μl)
1000	$\frac{1000 \times 100000}{3.7 \times 10^6}$	8.40	991.60
1000	$\frac{1000 \times 33500}{100000}$	350	650
1000	$\frac{1000 \times 11000}{33500}$	343	657
1000	Dosis I: 6000	500	500
1000	Dosis II: 3000	500	500
1000	Dosis III: 1000	333.33	666.67
1000	Dosis IV: 500	500	500
1000	Dosis V: 150	300	700

Tratamiento (ml de agua)	Nº de larvas infectadas	Fecha de infectación	Fecha de cosecha	No de larvas cosechadas	Agentes contaminantes			
					mosquitas	bacterias	Hongos	Otras causas
1.5 ml/LE	100	2/5/2011	5/5/2011	64		16	20	
3 ml/LE	100	2/5/2011	5/5/2011	63		13	24	
5 ml/LE	100	2/5/2011	5/5/2011	60		15	25	

Anexo 4. Mortalidad en larvas L₂ de *Spodoptera sunia* alimentadas con una formulación viral cruda de 250 LE.

Anexo 5. Mortalidad en larvas L₃ de *Spodoptera sunia* alimentadas con una formulación viral cruda de 250 LE.

Tratamiento (ml de agua)	Nº de larvas infectadas	Fecha de infectación	Fecha de cosecha	No de larvas cosechadas	Agentes contaminantes			
					mosquitas	bacterias	Hongos	Otras causas
1.5 ml/LE	100	3/5/2011	7/5/2011	90		4	6	
3 ml/LE	100	3/5/2011	7/5/2011	87		5	8	
5 ml/LE	100	3/5/2011	7/5/2011	86		6	8	

Nota: estos datos fueron obtenidos a temperaturas promedio de 27.80 °C y humedad promedio de 45.29 % en el laboratorio de producción de VPN-UNAN-León.

Anexo II

Su licencia temporal de SPSS for Windows caducará dentro de 18583 días.

GET

FILE='C:\Users\carmen\Documents\MONOGRAFIA 2011\Urbina\DATOS urbinaultim'+
'os.sav'.

DATASET NAME Conjunto_de_datos1 WINDOW=FRONT.

DATASET ACTIVATE Conjunto_de_datos0.

UNIANOVA

mortalidad BY Edad Tratamiento

/METHOD = SSTYPE(3)

/INTERCEPT = INCLUDE

/POSTHOC = Edad Tratamiento (DUNCAN)

/PLOT = PROFILE(Edad*Tratamiento)

/EMMEANS = TABLES(Edad) COMPARE ADJ(LSD)

/EMMEANS = TABLES(Tratamiento) COMPARE ADJ(LSD)

/EMMEANS = TABLES(Edad*Tratamiento)

/PRINT = DESCRIPTIVE HOMOGENEITY

/CRITERIA = ALPHA(.05)

/DESIGN = Edad Tratamiento .

Análisis de varianza univariante

[Conjunto_de_datos0]

Advertencia

No se realizarán las pruebas post hoc para Edad porque hay menos de tres grupos.

Factores inter-sujetos

		Etiqueta del valor	N
Edad	1.00	segundo instar	11
	2.00	tercer instar	13
Tratamiento	1.00	1.5 cc	8
	2.00	3 cc	8
	3.00	5 cc	8

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mortalidad

Edad	Tratamiento	Media	Desv. típ.	N
segundo instar	1.5 cc	16.0000	2.16025	4
	3 cc	16.0000	1.00000	3
	5 cc	15.0000	.00000	4
	Total	15.6364	1.36182	11
tercer instar	1.5 cc	22.5000	1.29099	4
	3 cc	20.4000	3.28634	5
	5 cc	21.5000	.57735	4
	Total	21.3846	2.21880	13
Total	1.5 cc	19.2500	3.84522	8
	3 cc	18.7500	3.41216	8
	5 cc	18.2500	3.49489	8
	Total	18.7500	3.45468	24

Contraste de Levene sobre la igualdad de las varianzas error

Variable dependiente: mortalidad

F	gl1	gl2	Significación
.707	5	18	.626

Contrasta la hipótesis nula de que la varianza error de la variable dependiente es igual a lo largo de todos los grupos.

a. Diseño: Intersección+Edad+Tratamiento

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mortalidad

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	203.670 ^a	3	67.890	19.170	.000
Intersección	8162.410	1	8162.410	2304.796	.000
Edad	199.670	1	199.670	56.380	.000
Tratamiento	6.793	2	3.396	.959	.400
Error	70.830	20	3.541		
Total	8712.000	24			
Total corregida	274.500	23			

a. R cuadrado = .742 (R cuadrado corregida = .703)

Medias marginales estimadas

1. Edad

Estimaciones

Variable dependiente: mortalidad

Edad	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
segundo instar	15.592	.570	14.404	16.780
tercer instar	21.422	.524	20.330	22.514

Comparaciones por pares

Variable dependiente: mortalidad

(I) Edad	(J) Edad	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95% para la diferencia ^a	
					Límite inferior	Límite superior
segundo instar	tercer instar	-5.830*	.776	.000	-7.449	-4.210
tercer instar	segundo instar	5.830*	.776	.000	4.210	7.449

Basadas en las medias marginales estimadas.

*. La diferencia de las medias es significativa al nivel .05.

a. Ajuste para comparaciones múltiples: Diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste).

Contrastes univariados

Variable dependiente: mortalidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Contraste	199.670	1	199.670	56.380	.000
Error	70.830	20	3.541		

Cada prueba F contrasta el efecto simple de Edad en cada combinación de niveles del resto de los efectos mostrados. Estos contrastes se basan en las comparaciones por pares, linealmente independientes, entre las medias marginales estimadas.

2. Tratamiento

Estimaciones

Variable dependiente: mortalidad

Tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1.5 cc	19.250	.665	17.862	20.638
3 cc	18.021	.672	16.619	19.424
5 cc	18.250	.665	16.862	19.638

Comparaciones por pares

Variable dependiente: mortalidad

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia entre medias (I-J)	Error típ.	Significación ^a	Intervalo de confianza al 95% para la diferencia ^a	
					Límite inferior	Límite superior
1.5 cc	3 cc	1.229	.946	.209	-.744	3.202
	5 cc	1.000	.941	.301	-.963	2.963
3 cc	1.5 cc	-1.229	.946	.209	-3.202	.744
	5 cc	-.229	.946	.811	-2.202	1.744
5 cc	1.5 cc	-1.000	.941	.301	-2.963	.963
	3 cc	.229	.946	.811	-1.744	2.202

Basadas en las medias marginales estimadas.

- a. Ajuste para comparaciones múltiples: Diferencia menos significativa (equivalente a la ausencia de ajuste).

Contrastes univariados

Variable dependiente: mortalidad

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Significación
Contraste	6.793	2	3.396	.959	.400
Error	70.830	20	3.541		

Cada prueba F contrasta el efecto simple de Tratamiento en cada combinación de niveles del resto de los efectos mostrados. Estos contrastes se basan en las comparaciones por pares, linealmente independientes, entre las medias marginales estimadas.

3. Edad * Tratamiento

Variable dependiente: mortalidad

Edad	Tratamiento	Media	Error ttp.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
segundo instar	1.5 cc	16.335	.770	14.728	17.942
	3 cc	15.106	.824	13.389	16.824
	5 cc	15.335	.770	13.728	16.942
tercer instar	1.5 cc	22.165	.770	20.558	23.772
	3 cc	20.936	.726	19.421	22.451
	5 cc	21.165	.770	19.558	22.772

Pruebas post hoc / Tratamiento / Subconjuntos homogéneos

mortalidad

Duncan^{a,b}

Tratamiento	N	Subconjunto
		1
5 cc	8	18.2500
3 cc	8	18.7500
1.5 cc	8	19.2500
Significación		.327

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

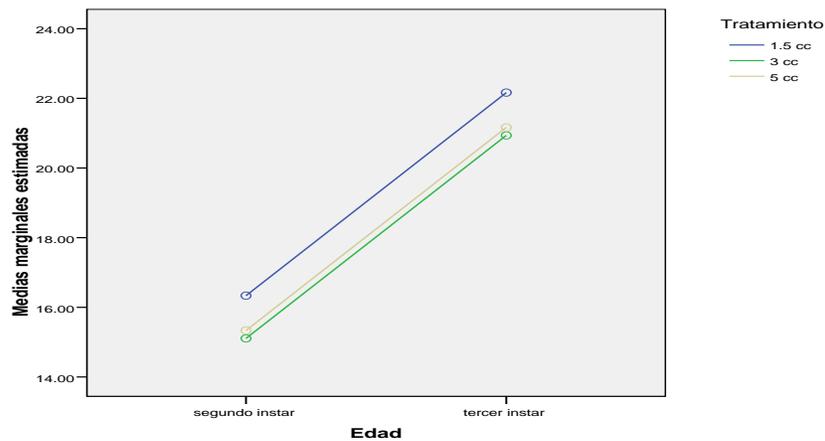
Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 3.541.

- a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 8.000
- b. Alfa = .05.

Gráficos de perfil

Medias marginales estimadas de mortalidad



Análisis probit versión

```
PROBIT
Mortalidad OF observado WITH Dosis
  /LOG 10
/MODEL PROBIT
  /PRINT FREQ CI
/NATRES
/CRITERIA P(.15) ITERATE(20) STEPLIMIT(.1) .
```

Análisis probit

LOTE 2501E

Advertencia

Las estimaciones de la potencia relativa de la mediana no se muestran porque no existe variable de agrupación en el modelo.

Información sobre los datos

		Nº de casos
Válidos		6
Rechazados	Perdidos	0
	La transformación log no se puede realizar	0
	Número de respuestas > Número de sujetos	0
Grupo control		0

Información sobre la convergencia

	Número de iteraciones	Solución óptima encontrada
PROBIT	16	Sí

Estimaciones de los parámetros

Parámetro	Estimación	Error típico	Z	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^a Dosis	4.669	.489	9.540	.000	3.710	5.628
Intersección	-2.147	.363	-5.919	.000	-2.510	-1.784

a. Modelo PROBIT: $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$ (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

Covarianzas y correlaciones de estimaciones de los parámetros

		Dosis	Respuesta natural
PROBIT	Dosis	.240	.765
	Respuesta natural	.034	.008

Covarianzas (abajo) y correlaciones (arriba).

Estimación de tasa de respuesta natural^a

	Estimación	Error típico
PROBIT	.000	.092

a. No se ha proporcionado el grupo control.

Contrastes de chi-cuadrado

		Chi-cuadrado	gl ^a	Sig.
PROBIT	Contraste de la bondad de ajuste de Pearson	42.506	3	.000 ^b

a. Los estadísticos basados en casos individuales difieren de los estadísticos basados en casos agregados.

b. Como el nivel de significación es menor que .150, se utiliza un factor de heterogeneidad en el cálculo de los límites de confianza.

Residuos y frecuencias de casillas

	Número	Dosis	Número de sujetos	Respuestas observadas	Respuestas esperadas	Residuos	Probabilidad
PROBIT	1	.000	120	0	1.908	-1.908	.016
	2	.301	120	43	27.505	15.495	.229
	3	.477	120	56	63.860	-7.860	.532
	4	.602	120	69	89.600	-20.600	.747
	5	.699	120	111	104.148	6.852	.868
	6	.778	120	118	111.767	6.233	.931

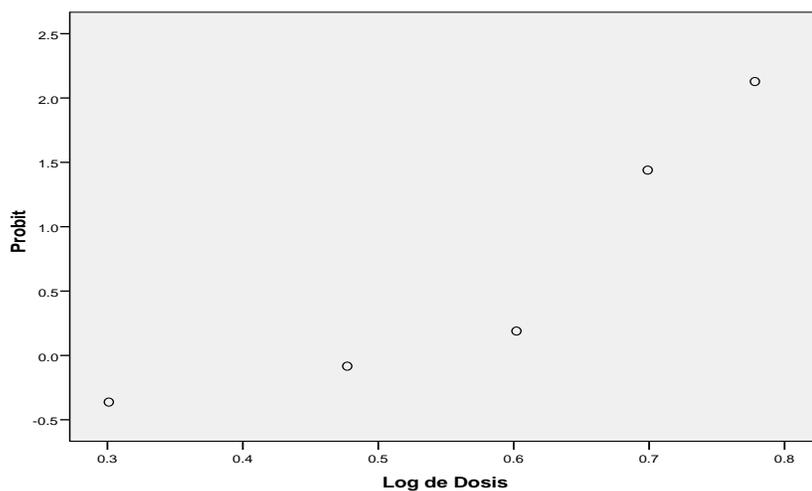
Límites de confianza

	Probabilidad	Límites de confianza al 95% para Dosis			Límites de confianza al 95% para log(Dosis) ^a		
		Estimación	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT ^b	.010	.915	.	.	-.038	.	.
	.020	1.047	.	.	.020	.	.
	.030	1.140	.	.	.057	.	.
	.040	1.216	.	.	.085	.	.
	.050	1.281	.	.	.108	.	.
	.060	1.339	.	.	.127	.	.
	.070	1.392	.	.	.144	.	.
	.080	1.442	.	.	.159	.	.
	.090	1.488	.	.	.173	.	.
	.100	1.532	.	.	.185	.	.
	.150	1.729	.	.	.238	.	.
	.200	1.904	.	.	.280	.	.
	.250	2.067	.	.	.315	.	.
	.300	2.226	.	.	.348	.	.
	.350	2.384	.	.	.377	.	.
	.400	2.544	.	.	.406	.	.
	.450	2.710	.	.	.433	.	.
	.500	2.883	.	.	.460	.	.
	.550	3.067	.	.	.487	.	.
	.600	3.267	.	.	.514	.	.
	.650	3.486	.	.	.542	.	.
	.700	3.734	.	.	.572	.	.
	.750	4.021	.	.	.604	.	.
	.800	4.366	.	.	.640	.	.
	.850	4.806	.	.	.682	.	.
	.900	5.424	.	.	.734	.	.
	.910	5.585	.	.	.747	.	.
	.920	5.765	.	.	.761	.	.
	.930	5.969	.	.	.776	.	.
	.940	6.206	.	.	.793	.	.
	.950	6.488	.	.	.812	.	.
	.960	6.836	.	.	.835	.	.
	.970	7.289	.	.	.863	.	.
	.980	7.938	.	.	.900	.	.
	.990	9.080	.	.	.958	.	.

a. Base del logaritmo = 10.

b. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

Respuestas transformadas por Probit



Anexo III

Fotos del ciclo Biológico de *Spodoptera sunia*



Foto 1. Huevo de *Spodoptera sunia*



Foto 2. Larva de *Spodoptera sunia*



Foto 3. Pupa de *Spodoptera sunia*



Foto 4. Adulto de *Spodoptera sunia*

Fotos del montaje, traslado y toma de datos del bioensayo



Foto 5. Traslado del bioensayo



Foto 6. Traslado del bioensayo



Foto 7. Cambio de dieta a los bioensayos.
Mortalidad de larvas.



Foto 8. Cambio de dieta y recuento de



Foto 9: traslado del bioensayo



Foto 10: recuento de mortalidad de larvas

Anexo IV

Anexo 1. Formato de registro de los parámetros para los bioensayos.

Registro de contaminantes de larvas L ₃ de <i>Spodoptera sunia</i> , con la dosis 1.5 ml/LE				
N° de larva	Fecha de revisión			
	04/05/2011	05/05/2011	06/05/2011	07/05/2011
1				
2				
3				
4				
5				
6				
100				
Total				

Anexo 2. Formato de registro de los parámetros para los bioensayos.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA – LEON
LABORATORIO DE PRODUCCION DE VPNSs**

REGISTRO DE BIOENSAYOS

Concentración (CIP/ml): _____

Fecha del Bioensayo: _____

Nº de Larvas purificadas: _____

Dosis: _____

Fecha del Traslado: _____

Nº de Larvas Trasladas: _____

Replica Nº : _____

Fecha de revisión	Larvas muertas por VPN	Tamaño de Larvas			Nº de Agentes Contaminantes				Estadíos Vivos			Condiciones Ambientales	
		G	M	P	Mosquitas	Bacterias	Hongos	Otras Causas	Larvas Vivas	Prep	Pup	Tª (°C)	Humedad (%)