

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS
INGENIERIA AGROECOLÓGICA TROPICAL



Monografía para optar al título de Ingeniero en Agroecología
Tropical

*Evaluación de la persistencia del Virus de la Poliédrosis
Nuclear (VPN), expuesto a la luz solar en diferentes
períodos de tiempo. Campus Agropecuario, León 2002-2003.*

Presentado por: Anielka Mercedes Carrillo Pérez.
Carla Marcela Jirón Pérez.
Anielka Cecilia Lacayo Tórres.

Tutor: MSc. Carmen Marina Rizo.
MSc. Ana Cristina Rostrán

León, 12 de Junio del 2003.

AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA

Tenemos la plena satisfacción de dedicar este trabajo a *DIOS* y a la *VIRGEN SANTÍSIMA*, como muestra de agradecimiento, por ser una fuente de luz y sabiduría, para recorrer este largo camino que ha llegado a su fin.

A nuestros amados *PADRES* y *ABUELOS*, que con mucho esfuerzo y sacrificio han sido el pilar de nuestra educación integral y quienes con espíritu emprendedor, son modelos a seguir para ser mejores cada día.

A nuestra tutora *MSC. CARMEN MARINA RIZO*, quién con sus conocimientos, paciencia, esfuerzo y dedicación nos guío al logro de una más de nuestras metas, no teniendo las mejores palabras para agradecerle, sencillamente podemos decir **GRACIAS**.

A nuestros *PROFESORES* y a todas aquellas personas que con su esfuerzo y generosa entrega contribuyeron en la labor autentica de una formación científica y moral.

A nuestra Alma Mater *UNAN-LEON*, por haber puesto todo su esmero, prestando las condiciones y el medio para forjar poco a poco lo que hoy es nuestra carrera finalizada, haciendo de nosotras personas de provecho.

A nuestros queridos *AMIGOS*, que con su afecto incondicional nos acompañaron siempre en la edificación de nuevos y mejores senderos, para el cumplimiento de nuestras propias metas.

EVALUACIÓN DE LA PERSISTENCIA DEL VIRUS DE LA POLIÉDROSIS NUCLEAR (VPN), EXPUESTO A LA LUZ SOLAR EN DIFERENTES PERÍODOS DE TIEMPO

El trabajo fue realizado en el Campus Agropecuario de la UNAN-León, ubicado a 2 Km. sobre la carretera a la comarca la Ceiba, departamento de León entre los meses de Octubre del año 2002 y Enero del año 2003. El objetivo fue evaluar la persistencia del Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN) solo y con protectantes expuesto a la luz solar, bajo diferentes condiciones de campo por un período de cuarenta y ocho horas. El diseño metodológico fue el modelo factorial, utilizando un área total de 26.4 m², la que se dividió en 4 parcelas de 10 surcos de largo por 4 surcos de ancho con una distancia entre surco de 0.66 m, para el cultivo de soya (*Glycine max*) variedad Chemaya. El área útil de cada parcela fue de dos surcos centrales, eliminando 1 m en los extremos para un área de 10.56 m². Los tratamientos aplicados fueron: 1) *VPNSe* semi-purificado, 2) *VPNSe* en formulación líquida (virus más agua), 3) *VPNSe* más carbón como protectante más agua y 4) *VPNSe* más leche en polvo como protectante más agua, a los que a su vez se les adicionó un penetrante-humectante llamado SERACSA WK 86% L. S, los que se aplicaron con una microaspersora de 400 ml de capacidad. Para evaluar la persistencia del *VPNSe* se realizó una colecta de hojas en los estratos superior y medio de la planta, estos fueron tomados a diferentes períodos de tiempo: Media hora antes de la aplicación (testigo), a las 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas después de la aplicación. Se utilizaron 25 larvas en L2 de *Spodoptera exigua* provenientes de la cría para cada tratamiento. Se realizó un segundo ensayo para confirmar los resultados obtenidos en el primero, con la diferencia que la exposición del *VPNSe* fue en viales de plástico y el número de larvas utilizado fue 30. Los datos obtenidos en el primer ensayo demuestran que el *VPNSe* más carbón alcanzó un 66.8% a las cuarenta y ocho horas de exposición solar en el estrato superior y el *VPNSe* más leche resultó ligeramente inferior con un 62.5% en este mismo estrato en comparación con el tratamiento *VPNSe* semi-purificado el que obtuvo un 46.8%. Comportamiento similar ocurrió en el estrato medio, presentando el *VPNSe* más leche un 75.1% y el *VPNSe* más carbón un 68.8% en relación a los otros tratamientos, lo que indica que los tratamientos con protectantes tuvieron una mejor persistencia en el campo, presentado una tendencia mejor el estrato medio; Sin embargo, en el análisis estadístico realizado con el ANOVA del diseño factorial, se muestra que existe diferencia significativa entre los tratamiento y los tiempos de exposición, pero no en los estratos superior y medio de la planta. Los resultados obtenidos en el segundo ensayo muestran un comportamiento similar, lo que reafirma que los tratamientos con protectantes *VPNSe* más leche y *VPNSe* más carbón mejoran la persistencia del virus, presentaron una mortalidad de 88% y 83.9% respectivamente.

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Específicos	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. MARCO TEÓRICO	5
4.1 Control biológico	5
4.2 Control microbiano	6
4.3 Virus Entomopatógenos	7
4.3.1 Baculoviridae	8
4.3.2 Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN)	8
4.3.3 Modo de acción	10
4.3.4 Sintomatología	11
4.3.5 Aspectos ecológicos	12
4.3.5.1 Dispersión y persistencia	12
4.4 Utilización de Baculovirus para el control de plagas	12
4.5 Factores que influyen sobre la eficiencia del virus entomopatógeno aplicado en campo	13
4.5.1 Inóculo del patógeno	13
4.5.2 Dosis del patógeno	13
4.5.3 Temperatura	13
4.5.4 Humedad	14
4.5.5 Sustrato	14
4.5.6 Radiación solar	15
4.6 Formulación	16
4.6.1 Componentes de un formulado	17
4.6.2 Criterios de formulación	17
4.6.3 Protectantes en las formulaciones de virus	18

4.7 Aspectos técnicos y equipos de aplicación _____	19
4.7.1 Cobertura de aplicación _____	20
4.7.2 Colección y redistribución de las gotas _____	21
4.7.3 Tamaño de gota asperjada _____	21
4.8 Aspectos generales de <i>Spodoptera exigua</i> _____	22
4.8.1 Taxonomía _____	22
4.8.2 Descripción, biología y daños _____	22
4.8.3 Biología y ecología _____	23
4.8.3.1 Duración de cada estadio _____	23
4.8.3.2 Ecología _____	24
4.8.4 Métodos de control de <i>Spodoptera exigua</i> _____	24
V. METODOLOGÍA _____	26
5.1 Descripción del área de estudio _____	26
5.2 Ensayo I. Evaluación de la persistencia del virus <i>VPNSe</i> aplicado en el cultivo de soya (<i>Glycine max</i>) _____	26
5.2.1 Procedimiento _____	26
5.2.2 Preparación del virus _____	27
5.2.3 Aplicación del Virus de la Poliédrosis Nuclear (<i>VPNSe</i>) _____	27
5.2.4 Evaluación de la persistencia en laboratorio _____	28
5.3 Ensayo II. Evaluación de la persistencia del virus <i>VPNSe</i> expuesto a la luz solar en viales de plástico _____	29
5.3.1 Procedimiento _____	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	30
VII. CONCLUSIONES _____	39
VIII. RECOMENDACIONES _____	40
IX. BIBLIOGRAFÍA _____	41
ANEXOS _____	46

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato superior, contaminadas con virus no expuesto a la luz solar (hora cero). Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 30
- Tabla 2. Análisis de varianza de la Mortalidad Original Remanente (MOR) de *Spodoptera exigua* en cada tratamiento, realizado en el cultivo de soya (*Glycine max*). Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 32
- Tabla 3. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato medio, contaminadas con virus no expuesto a la luz solar (hora cero). Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 32
- Tabla 4. Prueba de Tukey realizada para el factor tratamientos aplicados al cultivo de soya (*Glycine max*) en el Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 34
- Tabla 5. Prueba de Tukey aplicada al factor tiempo de exposición de los tratamientos realizada en el cultivo de soya (*Glycine max*) en el Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 35
- Tabla 6. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua*, contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPNSe) no expuesto a la luz solar (hora cero). Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 36
- Tabla 7. Prueba de Tukey aplicada al factor tiempo de exposición de los tratamientos realizados en viales de plástico en el Campus Agropecuario. UNAN-León, 2003. _____ 38

INDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de Mortalidad Original Remanente (MOR) en larvas de *Spodoptera exigua*, alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato superior, contaminadas con virus expuesto a la luz solar. Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 31

Gráfica 2. Porcentaje de Mortalidad Original Remanente (MOR) en larvas de *Spodoptera exigua*, alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato medio, contaminadas con virus expuesto a la luz solar. Campus Agropecuario. UNAN-León, 2002-2003. _____ 33

Gráfica 3. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua*, contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPNSe) expuesto en viales de plásticos a la luz solar. Campus Agropecuario. UNAN-León, 2003. _____ 36

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura ha sido y continúa siendo la principal fuente de abastecimiento de productos alimenticios; sin embargo el hombre con el manejo que le ha venido dando a los Recursos Naturales ha provocado un gran desequilibrio en los ecosistemas, haciendo que éstos se degraden y sean más vulnerables a los fenómenos naturales.

Un factor importante que contribuyó al avance indiscriminado de la frontera agrícola fue la llamada “**Revolución Verde**”, la que vino a satisfacer la necesidad del hombre de incrementar su capital, sin pensar en el daño que ocasionaba al ambiente y al hombre mismo, provocando de esta manera un sin número de afecciones que se han venido manifestando en la actualidad, siendo algunas difíciles y a veces imposibles de curar, destacándose las enfermedades respiratorias, alergias, deformaciones congénitas, contaminación de la leche en mujeres lactantes, esterilidad y otras.

No obstante, no podemos aludir el gran impacto causado al ambiente por la utilización de diversas prácticas inadecuadas, como es el uso excesivo de insumos tóxicos para el manejo de organismos, que causan daño económico en los cultivos, contaminando en gran medida con el paso del tiempo los principales elementos que el hombre necesita para su subsistencia como son: el agua y el suelo.

Ante la creciente demanda de insumos químicos en la agricultura, los nuevos plaguicidas sintéticos siguen representando una amenaza para el hombre más que los propios insectos, ya que éstos adquieren cada vez más inmunidad fisiológica; razón por la cual es necesario aumentar las dosis de estos productos, efecto que a dado origen a la rápida búsqueda de alternativas que den soluciones ecológicas como una respuesta simple, racional y económica a este problema; tal es el caso de la producción masiva de controladores biológicos.

El control biológico se presenta como una alternativa eficaz, esperanzadora y libre de riesgo frente a los numerosos y crecientes problemas, derivados del uso de los productos químicos biocidas (Lecuona, 1996). Uno de los principales grupos de organismos controladores de plagas es el Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN), el cual es un insecticida microbial específico que actúa por ingestión, y controla larvas del género *Lepidóptera* como el complejo *Spodoptera sp.* provocando la muerte al tercer o cuarto día de infección.

Este al igual que un sin número de organismos son la respuesta eficaz para el establecimiento de prácticas de Manejo Integrado de Plagas (MIP). Demanda que se ha incrementado como opción integral a las tecnologías modernas de protección a la naturaleza, a la ecología; a la exigencia de producir alimentos más sanos y a la necesidad de ajustarse a las normas de calidad requeridas por la globalización comercial, para ingresar a los mercados mundiales.

El uso de Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN), representa una nueva alternativa ecológica para el manejo integrado de *Spodoptera exigua* en diferentes cultivos, como cebolla (*Allium sativum L*), soya (*Glycine max*), entre otros, en Nicaragua. Su uso contribuirá a la sostenibilidad y a la restauración de los agroecosistemas. Sin embargo, los insecticidas microbiales y en particular el VPN pueden ser afectados por diversos factores ambientales como: la radiación solar, el viento, la humedad relativa, la temperatura, entre otros, los cuales inciden en la actividad biológica de éstos. Es por esta razón que se hace necesario conocer la capacidad de persistencia del virus y el efecto de agregar sustancias o materiales protectantes que le confieran mayor persistencia a éste en condiciones de campo, lo que permitirá la utilización del mismo como un insecticida microbial con un efecto de control de la población a corto plazo, tal como lo hacen los insecticidas sintéticos, asegurando de esta manera un mejor manejo de *Spodoptera* en los cultivos (Lecuona, 1996).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar la persistencia del Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN) solo y con protectantes expuesto a la luz solar, bajo diferentes condiciones de campo por un período de cuarenta y ocho horas.

2.2 Objetivo específicos

- 2.2.1 Determinar el efecto de la adición de protectantes solares, leche en polvo y carbón, sobre la persistencia del virus *VPNSe*, aplicado en el cultivo de soya (*Glycine max*).
- 2.2.2 Determinar el efecto de la adición de protectantes solares, leche en polvo y carbón, sobre la persistencia del virus *VPNSe*, expuesto a la luz solar en viales de plásticos.
- 2.2.3 Determinar la persistencia del virus *VPNSe* semi-purificado y crudo (impuro), aplicado en el cultivo de soya (*Glycine max*) y expuesto a la luz solar en viales de plástico.
- 2.2.4 Medir el efecto del estrato superior y medio de la planta de soya (*Glycine max*) en la persistencia del virus en diferentes formulaciones.

III. HIPÓTESIS

- El Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN) tiene mayor persistencia al agregarle un protectante en comparación con el Virus de la Poliédrosis Nuclear crudo y semi-purificado.

- El Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN) tiene mayor persistencia en el estrato medio del cultivo de soya (*Glycine max*) en comparación al estrato superior.

IV. MARCO TEÓRICO

La Agricultura es una de las actividades más antiguas que el hombre ha desarrollado y que constituye una de las fuentes fundamentales de subsistencia; dicha actividad es una de las principales proveedoras de materia prima, siendo utilizada en la elaboración de diversos productos y subproductos, (Lecuona, 1996). Sin embargo, las prácticas inadecuadas que se han implementado a través del tiempo a ocasionado grandes pérdidas que afectan los rendimientos y la calidad de la producción. Esto se debe a la presencia de diversos organismos, tales como insectos, malezas y fitopatógenos, los cuales se han venido contrarrestando con el empleo de agroquímicos, jugando un rol importante en la disminución de daños económicos en los vegetales. No obstante, la toxicidad elevada de algunos de ellos, su residualidad y mal manejo han llevado a un replanteo de tácticas de control de plagas, dentro de las que encontramos las implementadas por el MIP, (Lecuona, 1996).

El Manejo Integrado de Plagas (MIP), es un sistema que utiliza todos los métodos de control compatibles con la conservación del ambiente, manteniendo las poblaciones en cantidades que no causen pérdidas a los agricultores; una de las estrategias fundamentales del MIP, es la manipulación de los enemigos naturales, depredadores, parasitoides y entomopatógenos, aprovechando sus cualidades inherentes como reguladores de las poblaciones de organismos dañinos (DeBach, 1968).

4.1 Control biológico

El control biológico, desde el punto de vista ecológico, es la regulación, por medio de enemigos naturales, parasitoides, depredadores y patógenos, de las densidades poblacionales de otros organismos a un promedio menor que el que existiría en su ausencia (DeBach, 1968). Esta definición no incluye el punto de vista económico, ni la manipulación por el hombre, o sea es una definición de control biológico natural, el que se da como producto de la coevolución de los organismos. Por lo tanto el control biológico aplicado es la utilización intensional de estos enemigos naturales, y la meta es la regulación de la abundancia de las plagas.

Estas técnicas son compatibles con la conservación del ambiente, que actuando de un modo normal controlan el nivel poblacional de las especies plagas, sin ocasionar problemas de contaminación, ni de residuos (Lecuona, 1996; Coulson, 1989).

Este tipo de control tiene grandes ventajas, contemplando principalmente el respeto al ambiente, mayor seguridad a la salud humana, no produce efectos nocivos colaterales o son mínimos a los insectos benéficos y otros organismos, no produce resistencia de las plagas o es muy rara, y evita la presencia de plagas secundarias, el control es relativamente a largo término, con frecuencia permanente, y la relación costo-beneficio es favorable, disminuyendo las pérdidas productivas. Sin embargo, presenta desventajas, como el resultado que es a largo plazo, requerimiento de personal especializado, ignorancia sobre los principios del método, pues tiene que haber una buena sincronización entre la plaga y su enemigo natural, además de la susceptibilidad a muchos productos químicos y principalmente por no estar disponible (DeBach, 1968).

En la naturaleza existen muchos organismos patógenos de insectos plagas, a los que se denominan entomopatógenos, señalando a las bacterias, hongos, protozoarios, nemátodos y virus, como los que presentan mayores posibilidades para emplearse en el control microbiano, rama del control biológico (Coulson, 1989).

4.2 Control microbiano

Es la utilización de microorganismos entomopatógenos, que sirven para disminuir las densidades poblacionales de insectos plagas, que afectan económicamente al hombre, o es un proceso dinámico en el cual el hospedero y el patógeno están íntimamente relacionados con el medio (Alves, 1986; Moscardi, 1983).

En general, no hay duda, que los virus tienen ventajas sobre los insecticidas químicos, debido a que no afectan a los insectos benéficos, lo cual contribuye a que los parasitoides y depredadores continúen ejerciendo su acción de control de las plagas (Hunter, Crook y Entwistle, 1984). Además, poseen un grado de especificidad variable, una alta capacidad de multiplicación y dispersión que le permiten persistir dentro del agroecosistema, no ocasionando la muerte directa y resistencia de los insectos; del mismo modo, éstos tienen la capacidad de mezclarse con productos químicos y biológicos sin perder su patogenicidad o virulencia (Coulson, 1989).

No obstante, estos entomopatógenos pueden presentar desventajas que perjudican su acción microbial, ocasionada principalmente por las condiciones climáticas (temperatura, humedad relativa, radiación solar, etc.), la falta de ciertas medidas de almacenamiento y el período de aplicación (Coulson, 1989). Otras limitaciones del uso de virus es que no impide el daño estético en el cultivo, debido a que el control no es tan rápido como el de los insecticidas sintéticos, se señala también que la especificidad es una desventaja, puesto que en un cultivo existen generalmente varias especies, lo que implica la necesidad de utilizar otros agentes de control lo que resulta un incremento de costos.

A pesar de ello el control de plagas por medio de los Baculoviridae ha recibido mucho énfasis en los últimos años, siendo el más promisorio dentro de este grupo el Virus de la Poliédrosis Nuclear, por su gran potencial como agente de control microbial (Evans y Entwistle, 1987).

4.3 Virus Entomopatógenos

Existen virus que afectan a los insectos, pertenecientes a 7 familias y un número de grupos, la mayoría de ellos causan una infección letal. Se ha demostrado que miembros de la familia Reoviridae, Parvoviridae, Picornaviridae y Baculoviridae, han mostrado ejercer un cierto control en los insectos, cuando éstos se han aplicado en cultivos con equipos convencionales. Solamente la familia Baculoviridae, sin embargo, es exclusiva para invertebrados, ocurriendo principalmente en insectos, pero también en algunos artrópodos. Todas las otras familias contienen miembros que

causan enfermedades en los humanos y en otros vertebrados. Por esta razón y por su potencial de desarrollo como insecticidas microbiales, ha sido concentrado el esfuerzo en los baculovirus.

Actualmente cerca de 40 baculoviridae han sido desarrollados para controlar una amplia variedad de plagas en cultivos, pastos, bosques y productos almacenados. Varios de estos virus han sido registrados como plaguicidas y están disponibles comercialmente.

4.3.1 Baculoviridae

La familia Baculoviridae, constan de un genoma, ADN de doble fila que infecta invertebrados, multiplicándose en los tejidos de los insectos hasta ocasionar su muerte. Son parásitos intracelulares obligados, debido a que solo se reproducen en la célula del huésped y necesitan de un organismo vivo para su multiplicación y disseminación (Alves, 1986; Evans y Entwistle, 1987).

La mayoría de los 300 baculovirus aislados de diversos ordenes de insectos y otros artrópodos son conocidos genéricamente como VPN, existen tres subgrupos, ellos son: el subgrupo A, el virus de la poliédrosis nuclear, VPN, el subgrupo B, el virus de la granulosis, VG, y el subgrupo C, el virus de Oryctes. Los primeros dos subgrupos se caracterizan por la presencia de cuerpos de inclusión proteinacea, en la cual una o varias partículas virales están envueltas (Lobo de Souza, *et al* 2000), y existen dos tipos morfológicos clasificados como subgéneros: VPN simple (VPNS), el que presenta un nucleocápside por virión y VPN múltiple (VPNM), el cual varía su número de nucleocápside por virión (Lecuona, 1996). Esta matriz que envuelve el cuerpo de inclusión es conocida como poliedrín para los VPN y como granulín para lo VG (Hunter, Crook y Entwistle, 1984).

4.3.2 Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN)

Estos baculovirus tienen un tamaño aproximado que varía de 0.5 a 15 μm (micrómetros de diámetro). La matriz de este cuerpo de inclusión esta compuesto esencialmente de un polipéptido, llamado poliédrina, con un peso molecular aproximado a 30,000 dalton, (ver figura 1). Internamente

esta compuesto por una capa de proteína llamada cápside, que rodea o protege el ácido nucleico,

representando la porción biológica del virus, pudiendo presentar ADN o ARN con un peso molecular de aproximadamente 100×10^6 dalton, medidas variables según la cepa considerada (Payne y Kelly 1981). A este conjunto se le denomina nucleocápsides, los cuales pueden estar solos o agrupados de una envoltura lipoproteica para formar el virión, el que tiene forma de bala o bastón, de 40 a 70nm x 250 a 400 nm (nanómetros), construida a partir del material celular del insecto parasitado (Evans y Entwistle, 1987; Payne y Kelly, 1981). Esta característica, sumada a la de poder contener más de cien viriones por poliedro y la de multiplicarse solamente en el núcleo celular, es lo que los diferencia del resto de los virus de esta familia (Padhi, 1985).

Al lado de los viriones, los dos componentes principales del cuerpo de inclusión son la matriz interna y la envoltura. La primera está formada principalmente por poliédrica, presentando una conformación multinumerica y una estructura paracristalina. La envoltura del poliedro esta constituida mayoritariamente de carbohidratos, no habiendo cantidades significativas de proteínas (Minion *et al*, 1979). Sin embargo, fue demostrada la presencia de una proteína fosforilada (pp34), juntamente con una subpoblación de poliédrica en la envoltura del poliedro (Whitt y Manning, 1988).

Los poliedros confieren protección al VPN, siendo estos rodeados en el núcleo de la célula, oclusos y liberados tras la muerte celular, son bastante estables y pueden persistir ante las condiciones adversas del ambiente. Estos poliedros son disueltos en pH básico (>7.5), como el presente en el intestino medio de los Lepidópteros, produciéndose la liberación de los viriones infectados (Rohrman, 1992).

La mayoría de las técnicas utilizadas en la caracterización de los baculovirus requieren inicialmente de la purificación de partículas virales de los cuerpos de los insectos, procesos basados en centrifugación diferencial, los cuales consisten en períodos alternados de velocidades de sedimentación, altas y bajas, permitiendo separar el virus de otros materiales (Lobo de Souza, *et al* 2000).

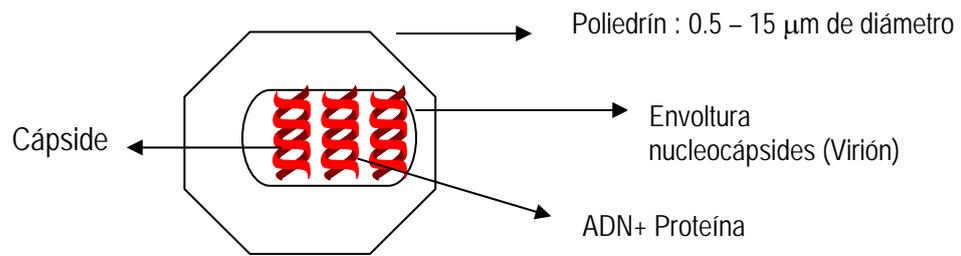


Fig. 1. Cuerpo de Inclusión Poliedral. Adaptado de Payne y Kelly, 1981, tomado de Rizo y Narváez 2001.

4.3.3 Modo de acción

Los virus contaminan a los insectos por vía oral, siendo ingeridos muchas veces con los alimentos presentes en los tallos y hojas. El contagio se puede dar vía interna y externa por contaminación del corium, a través de los huevos del insecto (Alves, 1986). La infección también puede ocurrir por la inyección del virus directamente en el hemócelo de la larva por parasitoides durante la oviposición de los mismos (Hunter, Crook y Entwistle, 1984).

La ruta primaria de ingreso del virus al hospedante es la vía del tracto alimenticio, especialmente para larvas y adultos. Después de la ingestión el alimento se mueve directamente al intestino medio, produciéndose las siguientes etapas (Lecuona, 1996; Evans y Entwistle, 1987):

1. En larvas de Lepidópteras los fluidos del intestino tienen un pH básico (>7.5), factor que interviene principalmente en la gradual o rápida disolución de la proteína del virus, también por la acción enzimática que ocurre en el mismo, en menor grado. Esta etapa puede ocurrir en un período de 15 minutos hasta 2 horas después de ingerido el virus.
2. Luego se libera la partícula viral o virión.
3. La partícula viral se fusiona con la membrana de la célula del intestino por dos posibles procesos, viropexis o por pinocitosis, entrando los nucleocápsides al citoplasma de la célula y de éstas se transportan al núcleo.

1. En esta etapa se forma un estroma virogénico y es en esta estructura que los cuerpos de inclusión poliedral del virus se producen. Donde el ADN de la célula, es la plantilla para replicar al ADN (genoma viral).
2. El virus toma el control de los mecanismos para la producción de macromoléculas celulares (polipéptidos y ácidos nucleicos) y los utiliza para producir nuevas partículas virales.
3. Se inicia la infección secundaria, la cual consiste en la liberación de los cuerpos de inclusión poliedral en el hemócelo, pasando de una célula a otra a través de la membrana basal, por el proceso de viropexis o fusión.
4. El insecto se transforma en un virus latente.
5. El insecto se muere y por consiguiente se produce la rotura del integumento, liberándose y dispersándose el virus en el ambiente.

4.3.4 Sintomatología

Estos aparecen después del tercer o cuarto día de infección de las larvas. Observándose manchas sobre el integumento, amarillamiento y aspecto oleoso de la piel, movilidad reducida y disminución de consumo de alimentos, los principales tejidos atacados son: adiposo, epidérmico, matriz traqueal, glándulas salivares, tubos de Malpighy, células sanguíneas, células musculares, ganglios nerviosos y células pericardiales, siendo el último tejido infectado la hipodermis. Los insectos enfermos se colocan en la parte superior de la planta con las patas posteriores, tornándose oscuras debido a la desintegración de los tejidos internos hasta la rotura del integumento, los cuales serán fuentes de inóculos para otras larvas susceptibles presentes (Alves 1986; Lecuona, 1996; Evans y Entwistle, 1987).

En el caso de los adultos provenientes de larvas que sobrevivieron a una infección de baculovirus se observan alteraciones, principalmente en la reproducción, reducción en la fecundidad y/o viabilidad en la oviposición o en ambos parámetros, cuando la infección larval tiene lugar en los últimos estadios (Lecuona, 1996).

4.3.5 Aspectos ecológicos

4.3.5.1 Dispersión y persistencia

Los cadáveres de las larvas muertas representan una fuente de inóculo para otras larvas presentes en el cultivo, ocurriendo la dispersión a través de factores bióticos como parásitos, depredadores, adulto del hospedante, detritívoros, aves, entre otros y de factores abióticos como la lluvia, viento, riego y laboreo, (Alves, 1986), los cuales representan el inóculo inicial para generaciones futuras y el posible establecimiento de epizootias (enfermedad que afecta a muchas larvas en un momento dado en un cultivo) en el campo.

Estas epizootias dependen en gran escala de la dispersión del virus y de la persistencia del mismo dentro y fuera de su huésped. Los restos de virus sobre las plantas son importantes en la dinámica de las epizootias, pero las reservas de virus en el suelo son más importantes a largo plazo (Hunter, Crook y Entwistle, 1984).

4.4 Utilización de Baculovirus para el control de plagas

Según Hunter, Crook y Entwistle, (1984), existen tres métodos para usar baculovirus en el control de plagas:

- 1- Manejo del Baculovirus: minimiza los disturbios del ambiente para mantener las poblaciones naturales del patógeno.
- 2- Control biológico clásico: este introduce el patógeno en el cultivo haciendo aplicaciones en cantidades pequeñas y escalonadas que resultan en una adecuada dispersión y disminución de la plaga a un número económicamente aceptable.
- 3- Uso de virus como insecticidas químicos: se realizan aplicaciones con una dosis alta, para tener un efecto deseado de control de la plaga.

4.5 Factores que influyen sobre la eficiencia del virus entomopatígeno aplicado en campo

4.5.1 Inóculo del patógeno

La variabilidad genética en poblaciones de virus en campo puede estar traducida en grandes variaciones de la virulencia a su hospedante, considerando el aislamiento más virulento como el más adecuado para su producción masiva, multiplicándose inicialmente en cantidades suficientes para que sirva de inóculo de referencia en producciones futuras; procedimiento que reduce las posibilidades en las alteraciones genéticas del agente.

4.5.2 Dosis del patógeno

La definición de dosis eficiente de virus para la aplicación en el campo debe basarse en una diversidad de situaciones, procurando seleccionar la dosis que proporcione resultados adecuados de control, por lo que se recomienda la realización de ensayos en condiciones controladas de campo, en distintos lugares, con diferentes densidades de las plagas y condiciones de cultivo, eligiendo la dosis que presenta un desempeño deseable para casi todas las situaciones analizadas.

Las dosis recomendadas para controlar el complejo *Spodoptera* varía de acuerdo al aislamiento viral; para *Spodoptera frugiperda*, en Nicaragua se utiliza una dosis de 708 LE/ha (Rizo y Narváez 2000); para *Spodoptera sunia* y *Spodoptera exigua* la dosis aplicada en campo es de 212 LE/ha. Alves (1986), sugiere que cuando las infestaciones de larvas son muy altas o hay larvas de diferentes instares, es recomendable aplicar una dosis alta al inicio y después aplicar dosis más bajas según la densidad poblacional de la plaga, con el objetivo de mantener el inóculo en el campo.

4.5.3 Temperatura

La temperatura aparentemente no ejerce un efecto directo significativo sobre los virus asociados a cuerpos de inclusión, particularmente los baculovirus son aplicados normalmente en el campo, ya

que mantienen su virulencia cuando son sometidos a temperaturas elevadas (40 - 45 °C) o bajo cero (Ignoffo, 1985; Benz, 1987). En cambio, cuando se considera su asociación con el hospedante, puede ocurrir inhibición del proceso infectivo tanto en temperaturas bajas como elevadas (Jaques, 1977; Benz, 1987; Moscardi, 1991).

4.5.4 Humedad

Este factor tiene poco efecto sobre la eficiencia y estabilidad de los virus de insectos, sin embargo la alta humedad puede facilitar la diseminación del virus presente en las larvas muertas, resultantes de la aplicación, debido a que en estas condiciones el cuerpo del insecto se rompe fácilmente, permitiendo que el inóculo sea transportado por otros artrópodos o gotas de lluvias, como fue verificado para el VPN de *A. gemmatilis* (Moscardi, 1991). No obstante, en períodos de sequías prolongados después de la aplicación, la epizootia de virus a partir de larvas muertas, es perjudicada pues los cadáveres de las larvas tienden a desecarse y no se rompen con facilidad, lo que torna menos rápido la liberación del virus sobre las plantas.

4.5.5 Sustrato

La eficiencia de aplicaciones de virus en el campo y la persistencia del mismo, están estrechamente relacionados al sustrato donde estos agentes son depositados y pueden ser desactivados de manera diferente, en función de la morfología, lugar y especie de la planta donde el virus fue depositado.

Existen plantas que por la disposición de sus hojas, inserción del pecíolo y distribución espacial de sus ramas evitan una penetración mayor de los rayos solares en su interior, lo que propicia mayor persistencia de la actividad viral. De la misma manera, el depósito del virus en las hojas de la periferia de la planta es menos protegida que las partículas virales depositadas internamente (Jaques, 1967; Jaques y Morris, 1981).

Otro aspecto importante a considerar es el valor del pH en el follaje de algunos cultivos como algodón (*Gossypium hirsutum*), soya (*Glycine max*), tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*), factor que contribuye en la inactivación del virus, ejemplo de ello son los estudios realizados por Gudauskas and Canerday 1968; Ignoffo *et al.* 1972; Andrews and Sikorowski 1973; Young and Yearian 1974; McLeod *et al* 1977; Young *et al* 1977, los que concluyen que el alto valor del pH en la hoja del algodón reduce la persistencia del VPN de *Heliothis*.

4.5.6 Radiación solar

El espectro de radiación solar, está constituido por luz natural, luz infrarroja y luz ultravioleta. El rango de radiación de la longitud de onda ultravioleta (200-400 nm), es el principal factor que influye en la desactivación de los virus entomopatógenos aplicados en campo, el cual ha sido señalado como el aspecto más importante en la sobrevivencia del mismo (Enwistle y Evans, 1985; Tanada, 1973; Yendol y Hamlen, 1973; Jaques, 1977). Los virus asociados a cuerpos de inclusión proteicos, como los VPN, VG, VPC y Entomopoxvirus, poseen generalmente mayor capacidad de persistencia en el ambiente que los virus de partículas libres, debido a la protección conferida por estos cuerpos a las partículas infectivas incluidas en su interior (Jaques, 1977).

Varios estudios han demostrado que la longitud de onda de la radiación ultravioleta, presente en la luz solar (280-300 nm), inactiva los baculovirus en intensidades semejantes a la luz ultravioleta germicida, que se sitúa alrededor de 237 nm (Bullock, 1967; Gudauskas y Canerday 1968; Jaques, 1968; David, 1969; Bullock *et al* 1970; Smirnov, 1972).

De esta manera los virus aplicados en campo sobre la superficie de las plantas puede ser desactivado rápidamente, variando para la mayoría de las virosis de dos a cinco días (Jaques, 1977). Por otro lado, la mayor o menor persistencia de la actividad viral va a depender del cultivo en consideración, de la morfología de la planta, del lugar donde el patógeno fue depositado y de la dosis utilizada.

La adición de adyuvantes, que promueven cierta protección al virus, ha sido ensayada y utilizada en formulaciones de bioinsecticidas virales, con la finalidad de prolongar la actividad de estos agentes en campo, los que posteriormente se controlan de forma adecuada (Ignoffo y Batzer, 1971; Jaques, 1971, 1972, 1977; Ignoffo y Couch, 1981; Smith *et al* 1982; Lutrel *et al* 1983; Shapiro *et al* 1983; Jaques, 1985; Alves *et al* 1992).

Debido al efecto de la radiación ultravioleta sobre los virus entomopatógenos, ha sido recomendada su aplicación al atardecer, garantizando de este modo un mayor período en la actividad microbial, luego de su aplicación y en consecuencia, el incremento de la probabilidad de que los insectos presentes en el cultivo ingieran la dosis letal del patógeno (Smirnoff, 1972; Moscardi, 1983, 1986; Ignoffo, 1985).

Aunque puede ocurrir una rápida desactivación del virus, la gran mortalidad provocada al pulverizarlo sobre el cultivo proporciona altos niveles de reposición del patógeno en el ambiente. Esto representa una disminución de las plagas por debajo de los niveles de daño económico, especialmente para insectos masticadores en cultivos con tolerancia o alta capacidad de daño (Moscardi, 1983).

4.6 Formulación

Consiste en preparar una combinación de ingredientes de forma tal que el principio activo se mantenga estable a largo plazo en un rango de pH.

Normalmente una formulación contiene disolventes, humectantes, adherentes, emulsificantes y la sustancia activa. Estos aditivos permiten que se utilice fácilmente el equipo, mezclándose en el vehículo transportador que puede ser agua o aceite, lo cual facilitará la dispersión y adhesión al follaje con un rango mínimo aceptable de residualidad, para el caso de los insecticidas químicos o persistencia, mejorando la actividad biológica del mismo. Asimismo es importante que sea compatible con otros insecticidas (Fernández- Larrea, 2001).

Las formulaciones y métodos de aplicación de insecticidas virales son probablemente más exigentes que para los productos químicos, ya que éstos deben permanecer viables y ser ingeridos para ser eficaz en el control de plagas (Angus y Luthy, 1971; Ignoffo y Couch 1981).

4.6.1 Componentes de un formulado

En toda formulación se distinguen tres componentes principales, el principio activo, los microorganismos o sus toxinas, el diluyente o vehículo que puede ser sólido o líquido y es un material inerte y el adyuvante, con función protectora (Fernández- Larrea, 2001).

Las formulaciones básicas pueden ser: 1. Líquidas, ya sea suspensiones acuosas o emulsificantes; 2. Polvos para espolvoreo; 3. Polvos humedecibles; 4. Cebos y 5. Granulados.

4.6.2 Criterios de formulación

Un insecticida microbiano además de eficaz, debe ser económico y satisfacer algunos requerimientos comerciales y de aplicación en condiciones de campo. Entre los aspectos que se debe mejorar en una formulación están la estabilidad física y biológica durante el almacenamiento, evitar la evaporación, incrementar la cobertura y adherencia en el follaje, mejorar la dispersión y suspensibilidad e incrementar la resistencia a las condiciones ambientales (lluvia, temperatura, radiación, etc.).

Una de las desventajas de los productos microbiológicos usados para el control de plagas es el efecto negativo de las condiciones ambientales, lo cual afecta la estabilidad y eficacia. Este problema puede ser resuelto mediante la preparación de formulaciones, mezclando el ingrediente activo con los diferentes componentes.

Cómo se mencionó la luz ultravioleta inactiva al virus, perdiendo en casos extremos su actividad viral en un día, por consiguiente este efecto se ha contrarrestado con la aplicación de protectantes. Estas, son algunas sustancias o materiales que se agregan al virus para proteger el ADN viral de la radiación solar, con el objetivo de conservar la potencia de éste por un lapso de tiempo mayor (Jaques 1971, 1972; Ignoffo y Batzer, 1971; Young y Yearian 1974).

4.6.3 Protectantes en las formulaciones de virus

La adición de protectantes en la aplicación de virus, es una de las técnicas que requiere de la realización de estudios que confirmen su efectividad. Sin embargo, existen ciertas clases principales de protectantes que se clasifican por su modo de acción:

1- Reflectantes: Son sustancias o materiales opacas que se han utilizado como protectantes de luz ultravioleta, dentro de los que se conocen: el aluminio metálico (en polvo), el óxido de aluminio y el titanio; siendo prohibido el uso de éste último, pues es considerado un contaminante ambiental en la actualidad.

2- Absorbentes generales: Es un material oscuro que absorbe la luz infrarroja. Uno de los ejemplos más estudiados en esta clasificación es el carbón, el cual ha sido empleado industrialmente en la protección del virus de la poliédrosis nuclear (Bull *et al*, 1976).

3- Absorbentes selectivos: Son sustancias que absorben fuertemente los rayos ultravioletas, los cuales se han seleccionado y probado como protectantes. Estos materiales a menudo son transparentes a la luz visible.

Según Killick, (1990), la protección del virus depende de las concentraciones utilizadas; en bioensayos experimentales la adición de protectantes presentó buenos porcentajes de actividad viral original, llegando a la conclusión que la sobrevivencia del virus, mejora normalmente con protectantes, pero no siempre es mayor con concentraciones más altas de éste.

Jaques, (1972); Killick, (1990); afirman que el agregar protectantes como leche en polvo desnatada, carbón de leña, albúmina de huevo o extracto de levadura, a la aplicación del virus es beneficiosa, debido a que extiende el período de vida de éste y produce tres veces más la actividad microbial en la dosis letal cincuenta (LD_{50}), ocasionando un 50% de mortalidad original larval en un lapso de 4 a 20 días, prolongando significativamente el período de protección de la planta.

4.7 Aspectos técnicos y equipos de aplicación

Una buena aplicación se define en el momento oportuno, con la máxima cobertura posible, la cantidad de preparado (ingrediente activo) requerido sobre un blanco bien definido, con la correcta calibración del caudal y el ajuste adecuado del tamaño de la partícula. Además, cabe señalar que el VPN, debe ser preparado bajo sombra y al momento de aplicarse, para evitar su inactivación por la acción de los rayos ultravioleta (Enwistle y Evans, 1985).

La aplicación terrestre de virus es considerada generalmente más eficiente que la aplicación aérea, principalmente en relación al depósito del agente activo sobre el cultivo (Yearian, 1978). En el caso de insecticidas virales aplicados por vía aérea, están sujetos a la pérdida por deriva o evaporación en una proporción 4:5 veces mayores que en aplicación terrestre, especialmente cuando el vehículo utilizado es agua aplicada en bajos volúmenes. Por otra parte el uso de sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión y que retardan la evaporación, como la melaza y aceites vegetales o minerales, puede proporcionar un adecuado depósito de estos microorganismos, posibilitando un eficiente control de la plaga (Yearian, 1978; Smith y Bouse, 1981).

Según estos últimos autores, la mortalidad por virus es generalmente mayor con un tamaño de gotas entre 100 y 150 micrones, en contraste con gotas mayores y con velocidad horizontal del viento entre 0.6 – 2.0 metros por segundo. Asimismo, el uso de maquinaria y tecnología inapropiada es un factor importante en el fracaso de las aplicaciones, no solo en el caso de virus sino también, con otros entomopatógenos.

Dentro de los métodos más utilizados para la aplicación de VPN en los diferentes cultivos se encuentran la microulva y Micron Sprayers Ltd.UK., los cuales generan una gota de aproximadamente 58μ de diámetro promedio de volumen. Poveda y Saravia, (1994) citado por Rizo y Narváez (2000), en evaluaciones de la eficacia de otros tipos de equipo probaron bombas de motor y de presión, y no encontraron diferencias estadísticas significativas, lo cual demuestra que para la aspersión de este virus se puede utilizar cualquier equipo convencional, utilizado para productos sintéticos o biológicos. Lo más importante es que se garantice una buena cobertura, porque el virus manifiesta su actividad biológica en especies que ingieren las hojas contaminadas. Es por ello que se consideran aspectos importantes para la aplicación: la cobertura de aplicación, Colección y redistribución de las gotas y tamaño de gota asperjada.

4.7.1 Cobertura de aplicación

Una cobertura adecuada de las plantas es un factor fundamental para una aplicación eficiente del virus, ya que este debe ser ingerido para actuar sobre el hospedante susceptible. La cobertura es muy afectada por el tamaño de la gota y el volumen del vehículo utilizado (agua, aceite etc.), los cuales a su vez son influenciados por el tipo de maquinaria empleada.

Otros factores como la formulación utilizada, viscosidad del líquido, altura de aplicación, presión, velocidad horizontal del viento, humedad relativa, temperatura, precipitación y tipo de planta, influye en gran medida sobre la calidad de la cobertura obtenida y consecuentemente sobre la aplicación del virus (Smith y Bouse, 1981). En función de las numerosas variables que pueden afectar la aplicación, la comparación de resultados obtenidos con dosis en diferentes lugares se torna muy difícil, aún cuando se estudia la misma combinación insecto-planta-virus-maquinaria (Smith y Bouse, 1981; Bals, 1973; Morgan y Col 1972; Mathews, 1979).

Junco, (1978) señala que la cobertura y penetración que se obtiene con aplicaciones de gotas grandes son muy deficientes y que este tipo de tratamiento sólo puede ser posible con productos sistémicos. Asimismo Killick, (1990) en el estudio realizado para el control de la polilla del pino (*Panolis flammea*) confirma que los niveles de infección eran significativamente afectados

por el tamaño de las gotas y la exposición antes de la ingestión, ya que las gotas pequeñas alcanzaron niveles de infección más altos en árboles pequeños, que las gotas grandes en árboles altos.

4.7.2 Colección y redistribución de las gotas

El recobrado es la parte del ingrediente activo del producto, que se recupera como depósito en la superficie del cultivo. Torgeson (1967), señala que el depósito sobre el objetivo se debe a varios factores, refiriéndose a que en las hojas más grandes y de superficie lisa, la eficiencia del impacto de las gotas es menor; siendo estas colectadas sobre insectos o superficies de plantas por la sedimentación e impacto, del mismo modo el humedecimiento es otro factor que afecta el ángulo de contacto de las gotas sobre las hojas y la superficie cerosa.

El diámetro de gotas menor a 150 micrones y formulaciones dotadas de agentes tensoactivos, favorecen notablemente el cubrimiento de las hojas (Mathews, 1979). La estructura y rugosidad de las hojas influye sobre el humedecimiento y pueden ser diferentes por el haz y el envés (Holloway, 1970).

4.7.3 Tamaño de gota asperjada

Según estudios realizado por Muller, (1969), la uniformidad de las gotas de aspersión optimiza el combate contra las plagas; sin embargo, al realizar la aspersión, la mayoría de los equipos y formulaciones, forman un amplio rango de tamaño de gotas simultáneamente, las cuales son afectadas por el viento, la turbulencia y la evaporación, principalmente las de tamaño menor a los 150 micrones, causa que conlleva a una mala cobertura durante la aplicación (Akesson, 1972; Junco, 1978).

Spillman (1982), destaca que la elección del tamaño de las gotas debe estar enfocadas en la efectividad biológica sobre el objetivo y el tipo de producto, teniendo presente que las gotas más

pequeñas ofrecen un mayor efecto biológico, mayor penetración y distribución en el follaje de la planta, sin embargo son más propensas a ser desviadas por el viento en la aplicación, favoreciendo más la evaporación; por otro lado las gotas más grandes pueden provocar mayores pérdidas, hasta de un 50% y más del ingrediente activo por escurrimiento. Mathews (1979), refiere como tamaño de gota óptimo de 30-50 micrones para el control de insectos en el follaje y de 40-100 micrones en aplicaciones dirigidas al follaje de la planta.

4.8 Aspectos generales de *Spodoptera exigua*

4.8.1 Taxonomía

Esta especie es un insecto plaga que pertenece al orden Lepidóptera y a la familia Noctuidae. Fue descrita primero como *Noctua exigua* por Hubner en 1808. Fue renombrada como *Laphygma exigua* Hubner, por Hampson en 1909 y actualmente ubicada en el género *Spodoptera exigua* por Zimmerman en 1958 (Smits, 1987). Por su estatus de plaga en todo el mundo, es conocida por muchos nombres en cada localidad, el más común el gusano soldado, el cual es ampliamente utilizado en diferentes partes del mundo.

4.8.2 Descripción, biología y daños

Spodoptera exigua está ampliamente distribuida en los países tropicales y subtropicales del mundo. El daño de estos insectos es ocasional, pero severo en algunas partes del país. Normalmente, afecta las hojas, sin embargo, las condiciones ambientales y la presión de los plaguicidas, incrementa las poblaciones de la misma, afectando también las vainas o estructuras reproductivas, produciendo roeduras superficiales que deprecian el producto.

Según King y Saunders (1984), han reportado al gusano soldado (*Spodoptera exigua*), como plaga secundaria en cultivos importantes como algodón (*Gossypium hirsutum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), ajonjolí (*Sesamiun indicum*), frijol (*Phasseolus vulgaris*), soya (*Glycine max*),

cebolla (*Allium cepa* L), espárrago (*Asparagus officinalis* L), garbanzo (*Cicer arietinum* L.) y vid (*Vitis vinifera* L.)

Esta especie deposita los huevos sobre las hojas en masas de 50-150, cubiertos con escamas de color gris del abdomen de la hembra en oviposición. Las larvas pasan por 5 ó 6 estadios con un largo de 25-35mm, cuando éstas están maduras, dorsalmente presentan un color gris-verdoso con una línea quebrada de color amarillo en medio del dorso y una banda pálida por debajo de éste; en la fase gregaria presentan un color verde oscuro a negro total. En el primer estadio la larva se alimenta por debajo de una telaraña de seda en el envés de la hoja, quedando esqueletonizadas. Los estadios posteriores se pueden encontrar alimentándose solos, en grupos o en agregados extensos, bajo estas condiciones pueden ocurrir defoliaciones serias y las larvas pueden migrar en grandes números hacia nuevos campos de alimentación. *Spodoptera exigua*, empupa en el suelo después de un período de prepupa de 1 – 2 días, este es un capullo suelto de color café. El adulto de esta especie tiene una envergadura de 5mm, presentando en las alas delanteras un color gris con una mancha central pálida y anaranjada de forma circular y alas posteriores blancas con venas café (King y Saunders, 1984).

La biología de *Spodoptera exigua* es muy similar a la de *Spodoptera frugiperda*, siendo la incidencia de estos insectos muy irregular; observándose en algunos años altas poblaciones y daños severos y en otras poblaciones bajas con daños de poca importancia.

4.8.3 Biología y ecología

4.8.3.1 Duración de cada estadio

Huevo: 3-5 días

Larva: 10-16 días

Pupa: 6-7 días

Adulto: 10 días

Tiempo de generación: 30-35 días

Número de generaciones: 3-6 (zonas frías 3 y zonas costeras 6), según King y Saunders, (1984).

4.8.3.2 Ecología

La tasa de desarrollo y la duración relativa de cada estadio esta relacionada con la temperatura. También la calidad y el tipo de planta influyen en la tasa de desarrollo (Smits, 1987). *Spodoptera exigua* es una especie polífaga, el número de especies vegetales cultivadas que pueden ser atacadas por esta plaga es bastante elevado, 60 especies pertenecientes a 23 familias distintas. Igualmente el número de especies de malas hierbas y plantas espontáneas sobre las que puede alimentarse es alto y corresponde a un total de 31 familias botánicas. Dentro de éstas se destacan los cultivos herbáceos extensivos y hortícolas.

Existen muchos organismos parásitos y predadores, que mantienen regulado las poblaciones de esta plaga, especialmente en cultivos con bajo uso de insumos químicos. Se han reportado mosca Tachinidae, varios Ichneumonidae, Braconidae, Enlophidae, Chrysopidae, entre otros (King y Saunders, 1984; Smits, 1987).

4.8.4 Método de control de *Spodoptera exigua*

Tradicionalmente se han utilizado insecticidas sintéticos para el control de esta especie en diferentes cultivos. Sin embargo, *Spodoptera exigua* ha adquirido resistencia a muchos plaguicidas, razón que genera en las últimas décadas el desarrollo de una creciente actividad investigadora, dirigida a la búsqueda de medidas de luchas eficaces y al mismo tiempo, seguras para establecer sistemas de protección de cultivos sostenibles y respetuosos con el ambiente (Anon, 1974).

El principal método usado se basa en insecticidas químicos. El uso excesivo de estos ha conducido al desarrollo de resistencia, habiéndose reportado esto en productos como el DDT, Toxafeno, Methomyl (Lannate), entre otros en Norte América y México (Smits, 1987).

Entre los métodos alternativos más atendidos se encuentra el desarrollo de insecticidas biológicos basados en nemátodos, parásitos, microorganismos y virus entomopatógenos, siendo estos últimos, uno de los grupos más estudiados, y efectivos para el control de plagas, tanto en cultivos agrícolas como en ecosistemas forestales. Ejemplo de ello es la aplicación del Virus de la Poliédrosis Nuclear en cultivo de cebolla en la región de Sébaco, por algunos productores, para contrarrestar el incremento de las poblaciones de esta plaga, obteniendo buenos resultados, debido a su especificidad y alta capacidad virulenta.

V. METODOLOGÍA

El trabajo se realizó en el Campus Agropecuario propiedad de la UNAN- León, ubicada al sureste del centro de la ciudad, 2 Km. sobre la carretera de la comarca La Ceiba, municipio de León.

5.1 Descripción del área de estudio

El Campus Agropecuario cuenta con una extensión de 60 manzanas, en la cual predominan suelos franco-arenosos, con pendientes de 1-2 %, topografía relativamente plana, temperatura promedio de 27.85 °C, humedad relativa de 77.12 %, precipitación media mensual de 128.11 mm. y evapotranspiración media mensual de 4.87 mm.

5.2 Ensayo I. Evaluación de la persistencia del virus *VPNSe* aplicado en el cultivo de soya (*Glycine max*).

5.2.1 Procedimiento

El ensayo se ejecutó en el mes de Octubre del año 2002. Se estableció el cultivo de soya (*Glycine max*), variedad Chemaya, utilizando cuatro parcelas de 10 surcos de largo por cuatro 4 surcos de ancho, con una distancia entre surco de 0.66 m, para un área total de 26.4 m² por parcela. El área útil de cada parcela fue de dos surcos centrales, eliminando 1 m en los extremos para un área de 10.56 m².

En cada parcela se aplicó Virus de la Poliédrosis Nuclear aislado en *Spodoptera exigua* (*VPNSe*) a una dosis de 150 LE/mz (1.08×10^{11} CIP/mz), correspondiendo a 1 LE para el área de cada parcela.

Los tratamientos a evaluar son:

- 1) Virus de la Poliédrosis Nuclear (*VPNSe*) semi-purificado (disuelto en agua).
- 2) Virus de la Poliédrosis Nuclear (*VPNSe*) crudo (virus más agua).
- 3) Virus de la Poliédrosis Nuclear (*VPNSe*) más carbón como protectante más agua.
- 4) Virus de la Poliédrosis Nuclear (*VPNSe*) más leche en polvo como protectante más agua.

5.2.2 Preparación del Virus

Para el tratamiento uno se preparó el virus semi-purificado, se tomó 1 larva muerta en el último instar de *Spodoptera exigua*, se maceró y se filtro con una tela de organdí, luego se agregó Sodio Dodecil Sulfato (SDS) al 1%, el caldo obtenido se sometió a un proceso de centrifugación diferencial. La primera centrifugación fue por 1 minuto a 3000 rpm, produciéndose un sobrenadante y un precipitado, eliminando este último y centrifugando nuevamente el sobrenadante a 6000 rpm por un período de 10 minutos, el precipitado es el pelet que contiene los cuerpos de inclusión poliedral (CIP), al cual se le agregó agua destilada y se aplicó en la parcela.

Para la preparación del tratamiento 2, en la formulación líquida del virus crudo se mezcló, tomando una LE de *Spodoptera exigua*, más agua destilada y se filtro con tela de organdí obteniendo el caldo para la aplicación en la parcela.

Para la preparación del tratamiento 3, se procedió igual que el anterior y el caldo obtenido del virus más agua, se mezcló con carbón en una proporción del 1%. Procedimiento que se realizó igual para el tratamiento 4 donde se mezcló el caldo de virus más agua con leche en polvo en una proporción de 1%. A todos los tratamientos se les adicionó al momento de la aplicación un penetrante-humectante llamado SERACSA WK 86% L. S, para mejorar o asegurar la acción de los tratamientos.

5.2.3 Aplicación del Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPNSe)

La aplicación se hizo con una microaspersora de 400 ml. de capacidad, utilizando para ello una boquilla de abanico. Previamente se calibró el equipo para determinar el volumen de agua que se utilizó por tratamiento, el que fue de 350 ml., posteriormente se realizó la limpieza y desinfección del equipo. Dicha aplicación se efectuó a las 6:00 AM.

5.2.4 Evaluación de la persistencia en laboratorio

Para evaluar la actividad del virus, se cortó de cada parcela útil diez hojas de ambos estratos superior y medio de plantas seleccionadas al azar. La toma de muestra se realizó antes de iniciar la aplicación, inmediatamente después de esta (hora cero), a las 4, 8, 12, 24 y 48 horas después de la aplicación. Cada muestra de hojas se colocó en bolsas plásticas estériles selladas y rotuladas con cada tratamiento, estrato y hora de toma de muestra, las cuales fueron llevadas al laboratorio.

Las muestras recolectadas en campo se colocaron en platos petri, debidamente esterilizados con alcohol al 97%, en cada uno de estos se colocó un foliolo de la hoja trifoliada de la soya, colocando un algodón impregnado de agua destilada para evitar la desecación de la misma.

Para evaluar la persistencia del virus sobre el follaje, se usaron 25 larvas del segundo instar (± 6 días de edad) de *Spodoptera exigua* en cada tratamiento, provenientes de la cría del laboratorio de la UNAN-LEÓN, alimentadas con dieta a base de soya.

En cada plato petri se colocaron dos larvas, las que consumieron el material vegetal contaminado, por un período de veinticuatro horas, posteriormente se trasladaron a vasos individuales para evaluar la muerte por virus o la pupación de la misma. Se consideró una larva muerta por virus, aquella que moría colgada de sus patas traseras en cualquier parte del vasito o cuando el integumento se rompía, saliendo un líquido oscuro.

Se calculó el porcentaje de mortalidad en cada tratamiento y cada uno fue corregido usando la fórmula de Abbott, utilizando la mortalidad del tratamiento pre-aplicación (testigo).

$$r_c = \frac{(r - c)}{(1 - c)} \times 100$$

r_c = Mortalidad Original Corregida
 r = Proporción de muertes del tratamiento
 c = Proporción de muertes del testigo

La persistencia del virus se expresó como un porcentaje de la Mortalidad Original Remanente (MOR), la cual consiste en dividir el porcentaje de mortalidad larval en cada período de exposición entre el porcentaje de la mortalidad larval del virus no expuesto a la luz (hora cero), y multiplicado por 100.

$$\% \text{ MOR} = \frac{\% \text{ M (Hi)}}{\% \text{ M (Ho)}} \times 100$$

5.3 Ensayo II. Evaluación de la persistencia del virus *VPNSe* expuesto a la luz solar en viales de plástico

5.3.1 Procedimiento

En este ensayo se utilizaron los mismos tratamientos y un control con agua (testigo). Cada tratamiento fue preparado con el procedimiento descrito anteriormente y no se utilizó como sustrato el cultivo de soya (*Glycine max*), por falta de recursos para establecerlo.

Para cada tratamiento se preparó una dosis de 50 ml, las que se expusieron al sol por un período de 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas. De cada solución se tomó 250 µl, el cual se asperjó sobre la dieta artificial contenida en cada vaso, seguidamente se colocó una larva de *Spodoptera exigua* de segundo estadio proveniente de la cría. Este procedimiento se repitió con 30 larvas por cada tratamiento y por cada tiempo de exposición. Diariamente se revisó cada vasito y se anotó en la hoja diseñada para ello (Anexo 6), la muerte o sobrevivencia, considerando en los mismos criterios descritos en el ensayo I.

Se realizó un análisis de varianza para determinar si hay diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos; utilizando para ello el programa Excel y el programa estadístico SPSS. El diseño estadístico usado fue el modelo factorial, el cual mide el efecto de dos o más factores juntos, comparándolos en el mismo experimento para todas las combinaciones posibles de los niveles de ambos factores. Se consideraron como factores: el tratamiento, tiempo de exposición (en ambos ensayos) y niveles de exposición, los estratos superior y medio, en el primer ensayo. Para el factor tratamiento los niveles fueron tratamiento 1, 2, 3 y 4, para el factor tiempo de exposición los niveles fueron 0, 4, 8, 12, 24 y 48 horas.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1. Evaluación de la persistencia del virus *VPNSe* aplicado en el cultivo de soya (*Glycine max*).

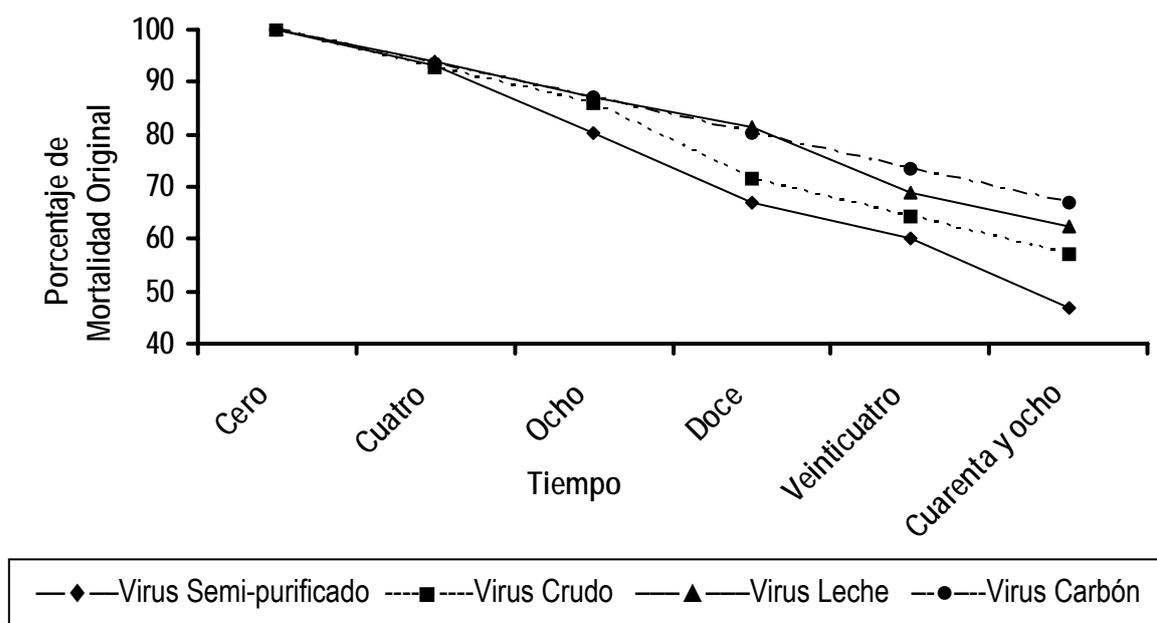
Los resultados obtenidos del primer ensayo en el estrato superior de las hojas del cultivo de soya, demuestran que la máxima actividad biológica del virus (hora cero), causó una mortalidad entre 82.3% y 94% en los diferentes tratamientos y se dió un 32 % de mortalidad en el tratamiento pre-aplicación, factor que fue corregido con la fórmula de Abbott (Tabla 1). Se observó una disminución progresiva de la actividad viral a medida que éste era expuesto a la luz solar (Gráfica 1), existiendo diferencias significativas entre los tratamientos a un nivel de significancia de 0.05 (Tabla 2) este comportamiento descendente de la mortalidad original en los tratamientos del estrato superior, se debe a que recibe de forma directa la radiación solar, factor que inactiva la capacidad microbial de los baculovirus a medida que se incrementa el tiempo de exposición en el campo. Según Entwistle y Evans (1985), la hoja es el sitio a partir del cual el virus es ingerido por las larvas, sin embargo, es la que provee el ambiente más adverso para el mismo.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato superior, contaminadas con virus no expuesto a la luz solar (hora cero). Campus Agropecuario UNAN-León, 2002-2003.

Tratamientos	Porcentaje de mortalidad larval
Testigo Pre-aplicación	32.0
Virus Semi-puro	88.0
Virus Crudo	82.3
Virus + Leche	94.0
Virus + Carbón	88.0

El tratamiento donde se aplicó virus semi-purificado en el estrato superior, mostró la menor persistencia después de las cuarenta y ocho horas de exposición, logrando un 46.8% de Mortalidad Original Remanente (Anexo 1), esto es debido a que el virus semi-purificado esta desprovisto de proteínas y otros materiales (grasa, lípidos, células y tejidos del insecto huésped, etc.), que recubren el cuerpo de inclusión poliedral Entwistle y Evans (1985). En cambio el tratamiento virus más

agua (crudo) a las cuarenta y ocho horas incrementó la mortalidad en 10.3% con respecto al virus semi-purificado, lo que se atribuye a la presencia de restos de proteínas y otros materiales presentes en la solución viral provenientes de la larva muerta, lo que coincide con lo señalado por Jaques, (1972). Sin embargo, en la persistencia del virus, aunque puede dar al cultivo cierta protección ésta no es suficiente para mantener las poblaciones bajas de *Spodoptera exigua*.



Gráfica 1. Porcentaje de Mortalidad Original Remanente (MOR) en larvas de *Spodoptera exigua*, alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato superior, contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear expuesto a la luz solar. Campus Agropecuario UNAN-León, 2002-2003.

Se observó que al agregar carbón al virus la mortalidad original remanente alcanzó un 66.8% a las cuarenta y ocho horas de exposición en el estrato superior, presentando una mejor persistencia de la actividad microbial en el campo, esto puede atribuirse al color oscuro del carbón, el cual representa una fuente de protección a los cuerpos de inclusión poliedral (Jaques, 1971 – 1972; Killick, 1990). El tratamiento virus más Leche resultó ligeramente inferior con un 62.5% en este mismo estrato, lo que indica que ambos tratamientos con protectantes tuvieron mejor persistencia; observándose un incremento porcentual de estos mismos en el estrato superior en un rango de 15.7% - 20% y en el estrato medio de 37.5% - 43.8%, en comparación con el tratamiento Virus Semi-puro, debido a que éstos contrarrestan el efecto de la radiación solar en los cuerpos de inclusión poliedral (Anexo1).

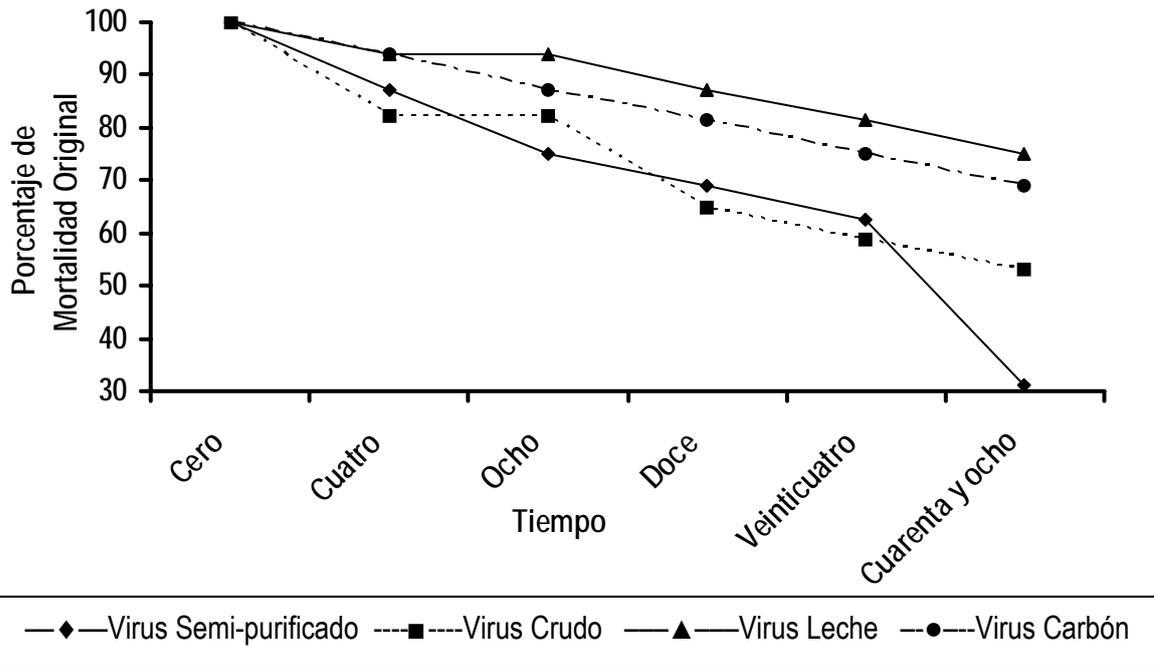
Tabla 2. Análisis de varianza de la Mortalidad Original Remanente (MOR) de *Spodoptera exigua* en cada tratamiento, realizado en el cultivo de soya (*Glycine max*). Campus Agropecuario UNAN-León 2002- 2003.

Fuente de Variación	Suma Cuadrado	Cuadrado Medio	F	P
Entre tratamiento	8516.556	2838.852	4.095	0.008
Tiempo de exposición	50328.499	10065.700	14.519	0.000
Estratos	16.921	16.921	0.024	0.876

En el estrato medio, se observó que la máxima actividad del virus fue de 94% a un 100% a la hora cero (Tabla 3), siendo similar al estrato superior; sin embargo, en éste estrato, los tratamientos virus semi-puro y virus crudo mostraron una actividad original remanente inferior de 31.3% y 52.9% respectivamente, después de cuarenta y ocho horas de exposición solar (Anexo 2), lo que coincide con lo encontrado por Rizo, 1993. Esto podría ser a causa de una cobertura inadecuada, que a menudo dan como consecuencia una baja mortalidad (Tanada, 1968). Caso contrario ocurrió en los tratamientos virus más leche con un 75.1% y 68.8% en el virus más carbón (Gráfica 2), esto puede atribuirse a la presencia de protectantes (leche en polvo y carbón) y a la consistencia de la gota, por ser más pesada, lo que disminuye el efecto del viento en la aplicación. Del mismo modo, (Jaques, 1972), señala que el método de aplicación es muy importante para el control de insectos, ya que el virus localizado en estas partes de la planta de soya no es expuesto directamente a la luz del sol.

Tabla 3. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato medio, contaminadas con virus no expuesto a la luz solar (hora cero). Campus Agropecuario UNAN-León, 2002-2003.

Tratamientos	Porcentaje de mortalidad larval
Testigo Pre-aplicación	32.0
Virus Semi-puro	94.0
Virus Crudo	100
Virus + Leche	94.0
Virus + Carbón	94.0



Gráfica 2. Porcentaje de Mortalidad Original Remanente (MOR) en larvas de *Spodoptera exigua*, alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato medio, contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear expuesto a la luz solar. Campus Agropecuario UNAN-León, 2002-2003.

La diferencia porcentual de los tratamientos en este estrato mostraron una mayor Mortalidad Original Remanente (MOR) de 8.3% (Anexo 1 y 2), indicando una mayor actividad del virus en el estrato medio en horas posteriores a la aplicación, debido a que la incidencia de los rayos solares es menor en éste por la estructura morfológica que presenta el cultivo. Del mismo modo se observó una mayor persistencia en el tratamiento virus más Leche con una diferencia de 12.6% y de 2% en el tratamiento virus más carbón respectivamente, lo que indica que en el estrato medio, el virus más Leche actúa por más tiempo, manteniendo un mayor porcentaje de mortalidad. Sin embargo, en el análisis estadístico realizado con el ANOVA del diseño factorial, se muestra que existe diferencia significativa entre los tratamiento y los tiempos de exposición, pero no en los estratos superior y medio de la planta, (Tabla 2).

Caso contrario ocurrió en el estudio realizado por Rizo en 1993, en el que se observó que el porcentaje de mortalidad original fue mayor en el estrato superior. Esto puede deberse, que al agregar protectante se afecte la cobertura y cantidad del material depositado sobre las hojas, de manera que no queda una buena cobertura con el equipo de aplicación usado. Cabe señalar que durante el período de evaluación de la persistencia del virus en el cultivo de soya, no ocurrió

ninguna precipitación (Anexo 3), observándose el día claro, factor que contribuyó a la aceleración de la desactivación del virus, tal como lo señala Jaques (1972).

Asimismo al realizar el análisis estadístico de los resultados, se observó que no existe interacción de segundo ni de tercer orden entre los factores tratamientos aplicados, estratos de la planta de soya y tiempo de exposición en horas, esto quiere decir que la combinación de estos factores no produce ningún efecto diferente en la sobrevivencia del virus, lo que significa que actúan de manera independiente (Anexo 5).

Tabla 4. Prueba de Tukey realizada para el factor tratamientos aplicados al cultivo de soya (*Glycine max*) en el Campus Agropecuario UNAN-León 2002-2003.

Tratamientos aplicados	Porcentaje Promedio de Mortalidad Original Remanente (MOR) *
Virus Semi-Puro	72.263 ^a
Virus Crudo	77.533 ^{a,b}
Virus + Leche	86.111 ^b
Virus + Carbón	86.315 ^b

*Valores seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales; A un nivel de significancia de 0.05

Al realizar la prueba de Tukey para detectar diferencia entre los tratamientos se observó, que el virus semi-puro y virus crudo son estadísticamente iguales, compartiendo igual grado de significancia el tratamiento virus crudo y virus más leche, siendo este último estadísticamente igual al tratamiento virus más carbón.

Tabla 5. Prueba de Tukey aplicada al factor tiempo de exposición de los tratamientos realizada en el cultivo de soya (*Glycine max*) en el Campus Agropecuario UNAN-León 2002-2003.

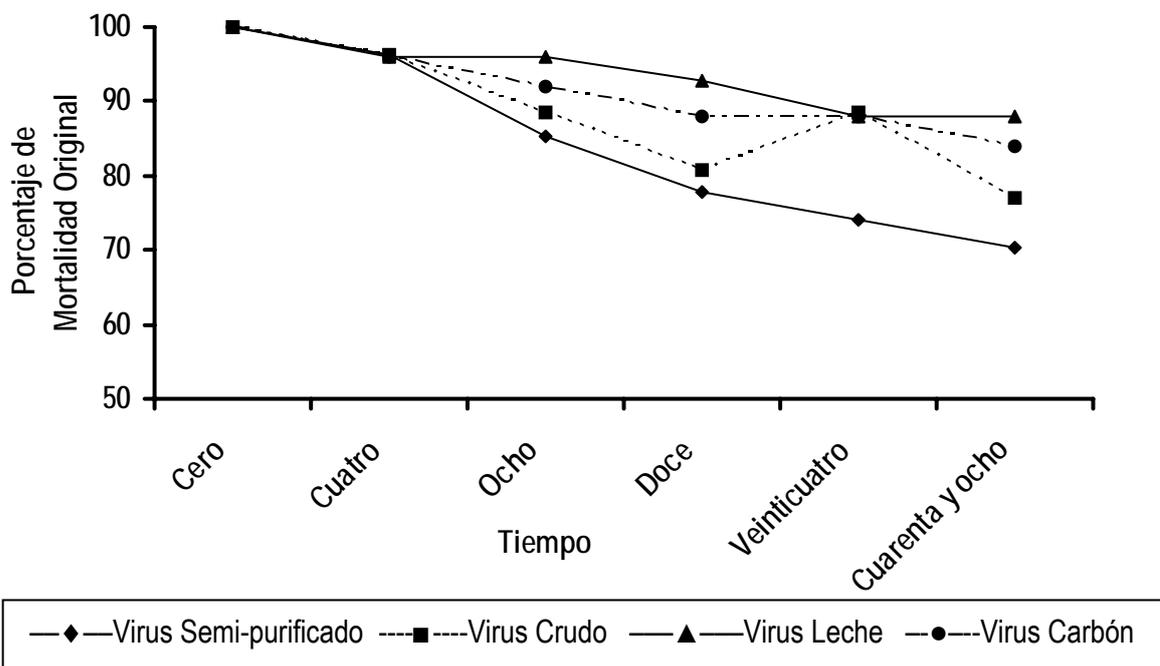
Tiempo de exposición de los tratamientos	Porcentaje Promedio de Mortalidad Original Remanente (MOR) *
Hora Cero	100 ^a
Cuatro Horas	94.365 ^a
Ocho Horas	85.294 ^{a,b}
Doce Horas	76.900 ^b
Veinticuatro Horas	69.056 ^{b,c}
Cuarenta y Ocho Horas	57.721 ^c

*Valores seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales; A un nivel de significancia de 0.05

Los promedios de los porcentajes de mortalidad en los diferentes tiempos de exposición difieren estadísticamente, observándose que desde el tiempo cero a las ocho horas, todos los tratamientos son estadísticamente iguales, mientras que de las ocho a las veinticuatro horas, donde la actividad del virus comienza a disminuir drásticamente, resultan iguales entre sí, asimismo a las veinticuatro y cuarenta y ocho horas todos los tratamientos presentan un comportamiento similar.

Ensayo 2. Evaluación de la persistencia del virus *SeVPN* expuesto a la luz solar en viales de plástico.

Los resultados obtenidos en el segundo ensayo se muestran en la gráfica 3 . Datos que respaldan los resultados del primer estudio; en este segundo experimento el comportamiento descendente de los tratamientos evaluados fue similar al primer ensayo, lo que confirma la pérdida de la actividad viral a medida que transcurre el tiempo de exposición solar del virus.



Gráfica 3. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua*, contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear expuestos en viales de plástico a la luz solar. Campus Agropecuario UNAN-León, 2003.

En este ensayo la mortalidad por virus en el tratamiento pre-aplicación (testigo) fue de 6.6% (tabla 6), esto fue ocasionado por la manipulación, valor que no pasa los límites permisibles, el cual es de 10%, según Alves, (1986).

Tabla 6. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua*, contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear (*VPN_{Se}*) no expuesto a la luz solar (hora cero). Campus Agropecuario UNAN-León, 2002-2003.

Tratamientos	Porcentaje de mortalidad larval
Testigo Pre-aplicación	6.6
Virus Semi-puro	90.0
Virus Crudo	80.3
Virus + Leche	70.6
Virus + Carbón	70.6

La máxima expresión de mortalidad de los tratamientos, fue alcanzada en las primeras horas (cuatro horas), observándose valores entre 96% - 96.3% (Anexo 4), esto significa que el virus durante los primeros períodos de exposición presentó una mayor actividad microbial (Jaques 1972); no obstante el comportamiento de los tratamientos en las horas posteriores fue decreciendo paulatinamente, llegando a alcanzar 70.4% y 76.9% en los tratamientos virus semi-puro y virus crudo respectivamente, a las cuarenta y ocho horas de exposición. Sin embargo, los tratamientos con protectante mostraron valores superiores, de 83.9% en el tratamiento virus más carbón y 88% en el tratamiento virus más leche, lo que indica una mayor persistencia de éste (*SeVPN*) durante la exposición solar a las cuarenta y ocho horas, resultados similares a los encontrados por Jaques, (1971-1972).

Este incremento con respecto al primer ensayo sugiere que la hoja de soya afecta la sobrevivencia del virus, tal como lo señala Alí y Sikorowski (1986), quienes aseguran que el pH de la soya disminuye la poliédrina que protege al virión. Por otro lado, la cobertura en la aplicación podría ser otro factor importante sobre los depósitos del virus en la hoja.

Según el ANOVA del diseño factorial (Anexo 5), muestra que existe diferencia significativa entre los tratamientos y no en los tiempos de exposición; sin embargo se observa una tendencia a mejorar la persistencia en el tratamiento virus más Leche con un 88% y 83.9% en el tratamiento virus más carbón (Anexo 4), esto es debido a que los protectantes que se les adicionaron al Virus de la Poliédrosis Nuclear, le confieren una mayor protección a los cuerpos de inclusión poliedral y por ende una mayor actividad microbial (Jaques, 1972). el mismo modo el análisis demostró que no existe interacción entre los factores tratamientos aplicados y exposición solar, lo que significa que ambos factores son diferentes e independientes (Anexo 5).

Tabla 7. Prueba de Tukey aplicada al factor tiempo de exposición de los tratamientos realizados en viales de plástico en el Campus Agropecuario UNAN-León, 2003.

Tiempo de exposición de los tratamientos	Porcentaje Promedio de Mortalidad Original Remanente (MOR)*
Hora Cero	100 ^a
Cuatro Horas	97.313 ^a
Ocho Horas	91.179 ^{a, b}
Doce Horas	86.016 ^{a, b}
Veinticuatro Horas	85.326 ^{a, b}
Cuarenta y Ocho Horas	81.162 ^b

*Valores seguidos de la misma letra son estadísticamente iguales; A un nivel de significancia de 0.05

En los diferentes tiempos de exposición los porcentajes promedios no difieren estadísticamente, observándose que desde la cero a las veinticuatro horas, todos los tratamientos son estadísticamente iguales, mostrando diferencia significativa los tratamientos expuestos a las cuarenta y ocho horas en relación a los tratamientos expuestos durante los dos primeros periodos.

VII. CONCLUSIONES

1. El *VPNSe* presenta una mejor persistencia a las cuarenta y ocho horas de exposición solar cuando se le adiciona protectantes, carbón y leche en polvo en comparación con el virus semi-purificado y crudo en ambos ensayos.
2. En el ensayo aplicado al cultivo de soya (*Glycine max*), la mejor persistencia en el estrato superior fue alcanzada en el tratamiento virus más carbón, con un 66.8% y en el estrato medio por el tratamiento virus más Leche con un 75.1%.
3. Los tratamientos con protectantes, expuestos en viales de plásticos a diferentes períodos de luz solar presentaron una mayor actividad microbial, con 88% y 83.9% en los tratamientos virus más leche y virus más carbón respectivamente, en comparación con los tratamientos virus semi-purificado y crudo.
4. En ambos ensayos el comportamiento de los tratamientos es similar, observándose un incremento de mortalidad en los tratamientos con protectantes, no existiendo diferencias estadísticas significativas entre ellos.
5. Los tratamientos virus semi-purificado y virus crudo aplicados al cultivo de soya (*Glycine max*) en el estrato superior disminuyeron su actividad microbial en un 46.8% y 57.1%, respectivamente y en el estrato medio en un 31.3% y 52.9% a las cuarenta y ocho horas de exposición solar.
6. Los tratamientos expuestos en viales de plásticos virus semi-purificado y virus crudo disminuyeron su actividad microbial en un 13.1% y 26.8%, respectivamente a las cuarenta y ocho horas de exposición solar.

VIII. RECOMENDACIONES

- 1- Realizar estudios que evalúen factores como: temperatura, insolación y pH de la hoja de soya (*Glycine max*), con el objetivo de conocer el efecto que tienen en la persistencia del Virus de la Poliédrosis Nuclear.

- 2- Evaluar el efecto de otros protectantes y la combinación de ellos, para mejorar la persistencia del *VPNSe* en campo, aumentando el período de exposición solar para determinar la actividad microbial de éste.

- 3- El Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPN), es una alternativa viable que contribuye al restablecimiento del equilibrio poblacional de los insectos.

- 4- Tomar las medidas pertinentes al momento de manipular estos microorganismos para evitar cualquier tipo de contaminación, pérdida de materiales y por ende costos económicos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

AKESSON, N.B., 1972. El uso del avión en la agricultura. Boletín de servicios a la agricultura de la FAO. 16. 131 p.

ALVES, SB. 1986. Controle microbiano de insetos. Sao Paulo, Brasil, Editora Monole. 407 p.

ANDREWS, G. L., AND P. P. SIKOROWSKI. 1973. Effects of cotton leaf surfaces on the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens*. *Ibid.* 22:90.

ANGUS, T. A., AND P. LUTHY. 1971. Formulation of microbial insecticides, pp. 623-638. In H. D. Burges and N. W. Hussey eds. ,*Microbial control of insects and mites*. Academic Press, New York.

ANON. 1974. Primer catalogo de insectos fitófagos de México. *Fitófilo* 69: 176 pp.

BALS, S.J. 1973. Some observations on the basic principles involved in ultra-low volume spray applications. *Pans* 19 (2) 193-200 p.

BENZ, G. 1987. Environment. *In* FUXA, J.R. and TANADA, Y; eds. *Epizootiology of insect diseases*. New York, JOHN WILEY. Pp. 177-217.

BULLOCK, H. R. 1967. Persistence of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus on cotton foliage. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol. 9. 434-436.

BULLOCK, H. R., HOLLINGSWORTH, J. P. AND HARTSTACK, A. W., JR. 1970. Virulence of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus exposed to monochromatic ultraviolet irradiation. *Journal of Invertebrate Pathology*. Vol. 16. 419-422.

COULSON, J.R. 1989. State of global biological control 100 years alter the release of the vedalia beetle. In *II Mesa Redonda de Control Biológico*, FAO-CIRPON. S.M. de Tucumán. Pp 17-28.

DE BACH, P. 1968. Control Biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Ed. Revolucionaria, Cuba.

DAVID, W. A. L. 1969. The effect of ultraviolet radiation of known wavelengths on a granulosis virus of *Pieris brassicae*. *J.invert. path.* 14:336-342.

ENTWISTLE, PF; EVANS, HF. 1985. Viral Control. *In* *Comprehensive Insect Fisiology. Biochemistry and farmacology*. Eds. G. A. Ves keed and L. I. Gilbert. Perganon Press. V, 12, pp 347-412.

EVANS, HF; ENWISTLE, P. 1987. Viral diseases. *In* *Epizootiology of insect diseases*. Fuxa and Tanada. Eds. USA. p 257-322.

FERNÁNDEZ, L. O. 2001. Formulación de bioplaguicidas microbiológicos. Capacitación Proyecto Producto Sanitario no sintéticos. NOQ-CATIE 16TZ.

GUDAUSKAS, R. T. AND CANERDAY, D. 1968. The effect of heat buffer salt and H-ion concentration, and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear polyhedrosis viroses. *Journal of invertebrate pathology* 12:401-411.

HOLLOWAY, P.J. 1970. Surface factors affecting the wetting of leaves. *Pesticide Science*, 1; 156-163.

HUNTER, F. R., CROOK, N. E. And ENWISTLE. P.F. 1984. Insect control by viruses. Society for applied. Bacteriology. P 323-346.

IGNOFFO, C. M. AND BATZER, O. F. 1971. Microencapsulations and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of and insect virus. Journal of Economic Entomologic 64:850-853.

IGNOFFO, C. M. AND COUGH, T.L. 1981. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticida. In BURGES H.D.ed. Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980. London, Academia Press. pp. 329-362.

IGNOFFO, C. M. AND GARCÍA, C. 1992. Influence of conidial colour on inactivation of several entomogenous fungi (Hyphomycetes) by simulated sunlight. Environmental Entomology 21, 913-917.

IGNOFFO, C. M.1985. Manipulating enzootic- epizootic diseases of arthropods. In HOY, M.A. and HERZOG, D.C. eds. Biological control in agricultural IPM systems. Orlando, Academia Press. pp 243-261.

IGNOFFO, CM; COUCH, TL. 1981. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis species* as a microbial insecticide. In: Microbial control of pests and plant aiseases-1970-1980. (Ed. Burges, H. D.), pp 330-362.

JAQUES, R. P. 1967. The persistence of a nuclear-polyhedrosis virus in the habitat of host insect, *Trichoplusia ni*. L polyhedra deposited on foliage. Canadian Entomology 99:785-794.

_____ 1968. The inactivation of the nuclear-polyhedrosis virus of *Trichoplusia ni* by gamma, and ultraviolet radiation. Canadian J. Microbiol. 14: 1161-1163.

_____ 1971. Tests on protectants for foliar deposits of a polyhedrosis virus. Journal of Invertebrate Pathology. Vol. 17. 9-16.

_____ 1972. Inactivation of foliar deposits of viruses of *Trichoplusia ni* and *Pieris rapae* and tests on protectant activities. Canadian Entomologist, 104, 1985-1994.

_____ 1977. Stability of entomopathogenic virus. Entomological Society of America, Miscellaneous Publications 100-99-116.

_____ 1985. Stability of insect viruses in the enviroment. In MARAMOROSCH, K. And SHERMAN, K.E. eds. Viral Insecticides for Biological Control. New York, Academic Press. pp. 289-360.

JAQUES, R. P. and MORRIS, O. N. 1981. Compatibility of pathogens whit other methods of pest control and whit different crops. BURGES, H. D. ed. Microbial control of pests and plant diseases: 1970-1980. London, Plenum Press. pp. 695-715.

JUNCO, E.R. 1978. Técnicas especiales antiderivas. 10 Conferencia Internacional de Mecanización Agrícola. Feria Internacional Agrícola. España 15. 177-182.

KILLICK, H.J. 1990. Influencia of droplet size, solar ultraviolet light and protectants, and others factors on the efficacy of baculovirus sprasy against *Panolis flammea* (Shiff.) (Lepidoptera: Noctuidae).

KING A. B. S. AND SAUNDERS, J. L. 1984. Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en américa Central. Pág 46.

LECUONA, R. E. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. 338 p.

LOBO DE SOUZA, M; BATISTA DE CASTRO, M; SILHER, W; ARAÚJO RIBEIRO, Z; MOSCARDI, F. 2000. Caracterização de Baculovirus Utilizados no Controle de Pragas. www.Brasil.htm.

LUTTREL R.G.; YEARIAN, W. C. and YOUNG, S.Y. 1983. Effect of spray adjuvants on *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus efficacy. Journal of Economic Entomology 76 (1): 160-167.

MC LEOD, P. J., YEARIAN, AND S. Y. YOUNG, III. 1977. Inactivation of Baculovirus *Heliothis* by ultraviolet irradiation, dew, and temperature. Ibid. 30: 327-341.

MATTHEWS, G.A. 1979. Pesticides and application methods. First Edition London 323 p.

MINION, F. C; COONS, L. B. AND BROOM, J. R. 1979. Characterization of the polyhedral envelope of the nuclear polyhedrosis virus of *Heliothis virescens* . Journal of Invertebrate Pathology 34: 303-307.

MORGAN, N.G. Y COL. 1972. Spray application in plantation crops. Pans 10 (3): 316-326.

MOSCARDI, F. 1983. Utilización de Baculovirus de *Anticarsia* para el control de larvas de Soya, *Anticarsia gemmatilis*. Londrin EMBRAPA-Centro Nacional de Investigación de la Soya. Comunicado Técnico. N° 23. 21p.

_____ **1986.** Utilizacao de virus para o controle da lagarta da soja. *In* ALVES, S. B. ed. Controle microbiano de insetos. Sao Paulo, Manole, p. 188-201.

_____ **1990.** Uso de entomopatógenos no manejo integrado de pragas de soja no Brasil. In FERNANDEZ, O.A.; CORREIA, A.C.B. E BORTOLI, S.A. eds. Manejo integrado de pragas e nematoides. Jaboticabal, UNESP-FUNEP. pp. 207-220.

_____ **1991.** Virus entomopatogenicos. Informe Agropecuario 15 (167): 5-20.

MULLER, J.R. 1969. An Agronomist 's view of agricultural aviation. Pans. 15 (3): 330- 333.

PADHI, S.B. 1985. Viral proteins for the identification of insect viruses. *In* MARAMOROSCH, K. And SHERMAN, K.E. eds, *Viral insecticides for biological Control*. Orlando, academic press. Pp. 55-78.

PAYNE, C C; KELLY, D C. 1981. Identification of insect and mite viruses. *In* Burges, H D. *Microbial control of pests and plant diseases*. London, Academic Press.p. 61 - 91.

RIZO, C. 1993. Evaluación de la persistencia del virus Spodoptera sunia VPN y Spodoptera frugiperda VPN, en los cultivos de maíz y soya. L.C.B. 1992.

RIZO, C. Y NARVÁEZ, C. 2001. Uso y producción del Virus de la Poliédrosis Nuclear. Manejo Integrado de Plagas. CATIE, Costa Rica. No 61. p 90-96.

ROHRMAN, G. F. 1992. Baculovirus structural proteins. *Journal of General Virology* 73: 749-761. species as a microbial insecticides. *In* Burges, HD. Ed. *Microbial control of pests and plant diseases*. London, Academic Press.p.329-362.

SAID ALÍ AND SIKOROWSKI. 1986. Effects of sunlight, cotton foliage surface, and temperature on the infectivity of cytoplasmic polyhedrosis virus to *Heliothis virescens* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. Vol. 79, no. 2.

SHAPIRO, M., AGIN, P. O. AND BELL, R. A. 1983. Ultraviolet protectants of the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nucleopolyhedrosis virus. *Environmental Entomology* 12, 982-985.

SMIRNOFF, W.A. 1972. The effect of sunlight on the nuclear-polyhedrosis virus of *Neodipron swainei* whit measurement of the solar energy received. *Journal of invertebrate pathology* 19: 179-88.

SMITH, D.B. and BOUSE, L.F. 1981. Machinery and factors that effect the applications of pathogens. In BURGES, H. D. ed. *Microbial control of pest and plant diseases 1970-1980*. New York, Academic Press. pp. 635-653.

SMITH, D.B. and HOSTETTER, D. L.; PINNELL, R. E. and C.M. 1982. Laboratory studies of viral adjuvants: Formulation development. *Journal of Economic Entomology* 75 (1): 16-20.

SMITS, P. H. 1987. Nuclear polyhedrosis virus as biological control agent of *Spodoptera exigua*. PhD Thesis, agricultural . Landbou wuniversitei fe Wageningen.

SPILLMAN, J.J. 1982. Some factors affecting choice of drop side and methods of atomization. *Application of pesticides*. Vol. 1. 12 p. International Centre for the Application of Pesticides. Cranfield Institute of Technology. Bidfore. U.K.

TANADA, Y. 1973. Environmental factors external to the host. *Annals of the New York Academy of sciences* 217.p. 120-130.

TORGENSON, D.C. 1967. Fungicides: an advanced treatise. Academic Press New York. Vol. 1: 239-286.

WHITT, M. A. AND MANNING, P.S. 1988. A phosphorylated 32-KDa protein and a subpopulation of polyhedrin are thiol linked to the carbohydrate layer surrounding a baculovirus occlusion body. *Virology* 163: 33-42.

YEARIAN, W. C, 1978. Application technology to increase effectiveness of entomopathogens. In ALLEN, G. E. ; IGNOFFO, C.M. and JAQUES, R. P. eds. *Microbial control of insect pests: future strategies in pest management systems*. Gainesville, NSF-USDA-University of Florida. Pp. 100-110.

YENDOL, W.G. and HAMLEN, R. A. 1973. Ecology of entomopathogenous viruses and fungi. *Annals of the New York Academic of Sciences* 217. Pp. 18-30

YOUNG, S. Y. AND YEARIAN, W. C. 1974. Persistence of *Heliothis* NPV on foliage of cotton, soybean and tomato. *Environmental Entomology* 3,253-255.

YOUNG, S. Y., W. C. Yearian , and K. S. Kim. 1977. Effects of dew from cotton and soybean foliage on activity of *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus.

ANEXOS

Ensayo 1. Evaluación de la persistencia del virus *VPNSe* aplicado en el cultivo de soya (*Glycine max*).

Anexo1. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato superior, contaminadas con virus expuesto a la luz solar. Campus Agropecuario UNAN-León, 2002-2003.

MORTALIDAD ORIGINAL REMANENTE DEL ESTRATO SUPERIOR

Tratamientos	Períodos de Exposición / Horas					
	0	4	8	12	24	48
Virus Semi-Puro	100%	93.2%	80.2%	66.8%	60.1%	46.8%
Virus Crudo	100%	92.9%	85.8%	71.4%	64.3%	57.1%
Virus + Leche	100%	93.8%	87.0%	81.4%	68.8%	62.5%
Virus + Carbón	100%	93.5%	86.9%	80.2%	73.5%	66.8%

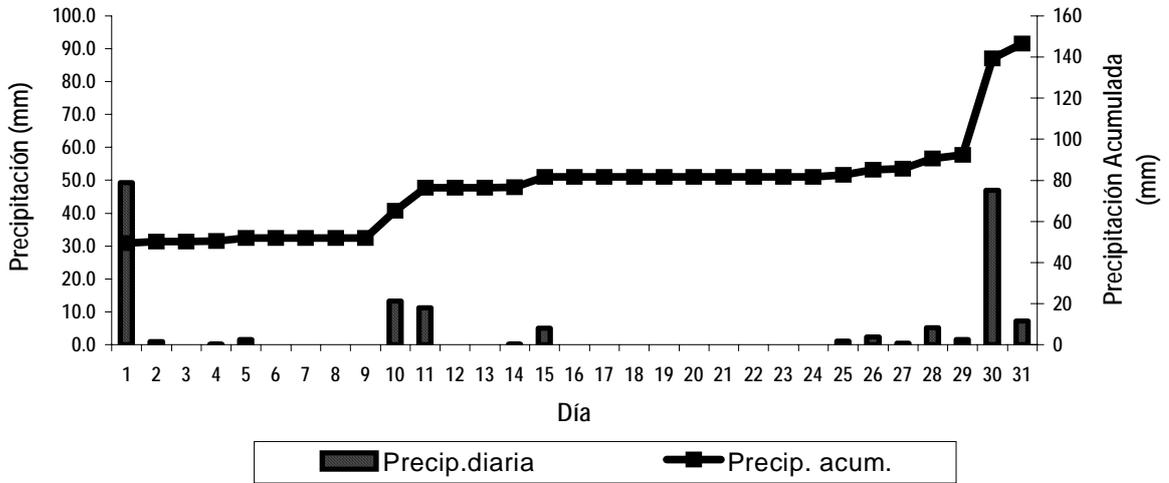
Anexo 2. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con hojas de soya (*Glycine max*) del estrato medio, contaminadas con virus expuesto a la luz solar. Campus Agropecuario UNAN-León, 2002-2003.

MORTALIDAD ORIGINAL REMANENTE DEL ESTRATO MEDIO

Tratamientos	Períodos de Exposición / Horas					
	0	4	8	12	24	48
Virus Semi-Puro	100%	87.2%	75.1%	68.8%	62.5%	31.3%
Virus Crudo	100%	82.3%	82.3%	64.7%	58.8%	52.9%
Virus + Leche	100%	93.8%	93.8%	87.0%	81.4%	75.1%
Virus + Carbón	100%	93.8%	87.0%	81.4%	75.1%	68.8%

* La diferencia porcentual de los tratamientos que presentaron mayor persistencia a las cuarenta y ocho horas de exposición en ambos estratos, equivale a 8.3 %.

Anexo 3



Gráfica 1. Precipitación diaria y acumulada del mes de Octubre 2002. Fuente: Estación Agro meteorológica del Campus Agropecuario de la UNAN León.

Ensayo 2. Evaluación de la persistencia del virus *SeVPN* expuesto a la luz solar en viales de plástico.

Anexo 4. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua*, contaminadas con virus expuestos en viales de plástico a la luz solar. Campus Agropecuario UNAN-León, 2003.

MORTALIDAD ORIGINAL REMANENTE						
Tratamientos	Períodos de Exposición / Horas					
	0	4	8	12	24	48
Virus Semi-Puro	100%	96.3%	85.1%	77.8%	74.1%	70.4%
Virus Crudo	100%	96.1%	88.4%	80.7%	88.4%	76.9%
Virus + Leche	100%	96.0%	96.0%	92.0%	88.0%	88.0%
Virus + Carbón	100%	96.0%	92.0%	88.0%	88.0%	83.9%

Anexo 5. Análisis de varianza de la Mortalidad Original Remanente (MOR) de *Spodoptera exigua* en cada tratamiento expuesto en viales de plástico. Campus Agropecuario UNAN-León 2002-2003.

Fuente de Variación	Suma Cuadrado	Cuadrado Medio	F	P
Entre tratamiento	1596.271	532.090	1.95	0.01
Tiempo de exposición	5410.344	1082.069	3.91	0.60

Anexo 6

Formato utilizado en el levantamiento de datos de la mortalidad natural en larvas de *Spodoptera exigua*, contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear (VPNSE).

HOJA DE BIOENSAYO

Especie: _____ Instar/edad: _____

Tratamiento: _____ Hora de toma de muestra: _____

Fecha de traslado de la larva: _____

No. Larva	Causa de mortalidad			Observación
	Virus	Otro	Pupa	
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				
21				
22				
23				
24				
25				
26				
27				
28				
29				
30				



Aplicación de Virus de la Poliédrosis Nuclear *VPNSe*, con y sin protectantes en el cultivo de soja (*Glycine max*), Campus Agropecuario. UNAN-LEÓN. 2002-2003.



Recolecta de hojas de soja (*Glycine max*), en el estrato superior, después de aplicar Virus de la Poliédrosis Nuclear *VPNSe* solo y con protectantes. Campus Agropecuario. UNAN-LEÓN. 2002-2003.



Recolecta de hojas de soya (*Glycine max*), en el estrato medio, después de aplicar Virus de la Poliédrosis Nuclear *VPNSe* solo y con protectantes. Campus Agropecuario. UNAN-LEÓN. 2002-2003.



Hoja de soya (*Glycine max*) asperjada con Virus de la Poliédrosis Nuclear *VPNSe*, utilizada como sustrato en la contaminación de larvas de *Spodoptera exigua* en L2. Campus Agropecuario. UNAN-LEÓN. 2002-2003.



Rotulación de platos petri, conteniendo folíolos de soya (*Glycine max*) y larvas de *Spodoptera exigua* en L2 contaminadas con Virus de la Poliédrosis Nuclear. UNAN-LEÓN. 2002-2003.



Traslado de larvas de *Spodoptera exigua* contaminadas con VPNSe a vasitos con dieta artificial. Campus Agropecuario. UNAN-LEÓN. 2002-2003.



Larva de *Spodoptera exigua* muerta por Virus de la Poliédrosis Nuclear *VPNSe*. Campus Agropecuario. UNAN-LEÓN. 2002-2003.