

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA**  
**UNAN – LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**INGENIERÍA EN AGROECOLOGIA TROPICAL**



**Actividad biológica y estabilidad en el almacenamiento en dos condiciones de temperatura del Virus de la Poliedrosis Nuclear *Spodoptera exigua* (VPN Se), formulado en polvo para el control de *Spodoptera exigua*. Campus Agropecuario, León, 2004.**

**Presentado por:**

**Br. Maricela del Socorro Centeno Ramos.**

**Br. Juana Francisca Carrasco Días**

***Monografía presentada para optar al título de Ingeniero en Agroecología Tropical***

Tutor: MSc. Carmen Marina Rizo.

Asesora: Adalila Molina.

Noviembre, 2004.

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL .....	ii
AGRADECIMIENTO .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
RESUMEN .....	v
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. OBJETIVOS .....	3
III. HIPÓTESIS .....	4
IV. MARCO TEÓRICO .....	5
4.1 ASPECTOS GENERALES DE LOS VIRUS .....	5
4.2 ¿QUÉ SON LOS VIRUS? .....	5
4.3 PRODUCCIÓN DE VIRUS EN EL LABORATORIO .....	6
4.4 ECOLOGÍA DE VIRUS .....	8
4.5 FORMULACIÓN .....	9
4.6 ARCILLAS .....	13
4.7 USO DE VIRUS DE LA POLIEDROSIS PARA EL CONTROL DE PLAGAS .....	17
4.8 CICLO DE VIDA DE <i>Spodoptera exigua</i> .....	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
VII. CONCLUSIONES .....	32
VIII. RECOMENDACIONES .....	33
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	35
X. ANEXOS .....	37

## **DEDICATORIA**

Dedicamos este trabajo a nuestro señor Jesús por habernos brindado fuerza, sabiduría y voluntad para la realización de este trabajo y culminar con éxito nuestra carrera; por que sin su ayuda no hubiese sido posible.

### ***Maricela del Socorro Centeno Ramos***

A DIOS por darme la fuerza, la voluntad y la sabiduría que me motivo para seguir adelante siempre.

A mis padres Silvio Centeno y Socorro Ramos por darme su apoyo, confianza, posibilidades económicas y comprensión, me dieron aliento para seguir adelante y no decaer en el camino hacia el triunfo de nuestro trabajo.

A mis hermanos Antonio, Silvia, Laura que me motivaron día a día para sobresalir y culminar con éxito este trabajo.

A mi novio Jesús Manuel Palacios por motivarme a salir adelante para no decaer en el largo camino de la vida y culminar con éxito mi carrera.

### ***Juana Francisca Carrasco Díaz***

A DIOS por darme la sabiduría necesaria para sacar adelante mi trabajo y así culminar mi carrera.

A mis padres Reina Isabel Díaz y Manuel Carrasco por su leal e incansable y desinteresado apoyo en mi formación científica y moral que con la ayuda de ellos hoy estoy finalizando mi carrera.

A mis hermanos Luz Marina, Kenia, Brenda que de una manera u otra me ayudaron a terminar mi trabajo.

A mi novio Gabriel Delgado por su comprensión y apoyo moral que me alentó a salir adelante.

## AGRADECIMIENTO

Agradecemos a nuestro señor Jesucristo creador de nuestras vidas por habernos ayudado a realizar este trabajo con mucho esfuerzo, amor y voluntad para concluir con éxito nuestra meta.

A nuestra tutora **MSc. Carmen Marina Rizo**, por brindarnos su apoyo, conocimientos y dedicación para sobresalir en este trabajo monográfico.

Al licenciado **Juan Diego Solís**, por brindarnos sus conocimientos y ayuda para sacar adelante nuestro trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua UNAN-LEON, por brindarnos las condiciones necesarias y prestarnos los equipos para realizar este trabajo.

A los profesores por brindarnos los conocimientos básicos y su ayuda constante para que nuestro trabajo fuese real y efectivo para poder desempeñarnos exitosamente como agroecólogos.

A aquellas personas que con sus experiencias y aportaciones nos motivaron a concluir con éxito nuestro trabajo.

## RESUMEN

Uno de los principales problemas que ha enfrentado la agricultura en Nicaragua es el uso irracional de insecticidas químicos. Sin embargo, en los últimos años ha habido avances positivos con el uso del control biológico, específicamente el Virus de la Poliedrosis Nuclear para el manejo de *Spodoptera exigua* de la familia Noctuidae. A pesar del excelente control de plagas, este virus no es utilizado masivamente por los productores en Nicaragua; por un lado la producción es en pequeña escala (virus crudo) y por otro, se necesita disponer de equipos de refrigeración para su almacenamiento. Tradicionalmente el Virus de la Poliedrosis Nuclear se usa en formulación líquida (virus crudo) para el control de *Spodoptera exigua*. El propósito de este trabajo es 1) Elaborar un formulado en polvo, 2) Determinar la actividad biológica del Virus de la Poliedrosis Nuclear en polvo después de 7.5, 8.5 y 11.5 meses de formulado y almacenado en dos condiciones de temperatura, ambiente y refrigerada, 3) Comparar la actividad biológica de ambas formulaciones y 4) Determinar el porcentaje de control en larvas de *Spodoptera exigua* en ambas formulaciones. El bioensayo se realizó en el Campus Agropecuario de la UNAN –León, en el año 2003 en condiciones de laboratorio, los tratamientos evaluados fueron virus semipurificado, virus recién formulado y virus formulado y mantenido a temperatura ambiente (28°C) y refrigerado (18°C) por un período de 2 meses, y en el año 2004 aplicado en el cultivo de ajonjolí y evaluado en laboratorio en larvas de segundo instar larval de *Spodoptera exigua*. Para ello se estableció un diseño completamente al azar con 9 tratamientos y 4 repeticiones; los que consistieron en Virus formulado en polvo a 7.5 meses a 18°C, Virus formulado en polvo 7.5 meses a 28°C, Virus formulado en polvo a 8.5 meses a 18°C, Virus formulado en polvo 8.5 meses a 28°C, Virus formulado en polvo a 11.5 meses a 18°C, Virus formulado en polvo a 11.5 meses a 28°C, virus crudo a 7.5 meses, Virus crudo a 8.5 meses Virus crudo a 11.5 meses. La dosis que se utilizó para todos los tratamientos fue de 150 LE/Mz. Las aplicaciones de los diferentes tratamientos en el campo se realizaron a las 7 de la mañana, 4 horas después se cortaron las hojas y se trasladaron al laboratorio, se colocaron en platos petri y se agregaron cuatro larvas de segundo instar de *S. exigua* proveniente de la cría de Noctuidos, 24 horas después se trasladaron en tasas individuales con dietas. Tres días después de la aplicación se obtuvo un porcentaje diferente de mortalidad en todos los tratamientos; el tratamiento virus formulado en polvo a 7.5 meses a 18°C se obtuvo un 89% de mortalidad, el virus formulado polvo 7.5 meses a 28°C 74.6%, el Virus formulado polvo 8.5 meses a 18°C 75.6%, Virus formulado polvo 8.5 meses a 28°C 74.5%, Virus formulado polvo 11.5 meses a 18°C 75.7 %, Virus formulado polvo 11.5 meses a 28°C 64.7 %, virus crudo 7.5 meses 100%. Virus crudo 8.5 meses 100%, virus crudo 11.5 meses 97.2 %. Los resultados indican que existe diferencia significativa entre los tratamientos. La temperatura de refrigeración (18°C) mantiene más estable la actividad biológica del virus formulado en un rango de 89 % - 75.6 % de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua*. Por lo que el virus formulado y mantenido en refrigeración debe almacenarse por un período no mayor de 11 meses. Por lo tanto se puede concluir que el virus formulado en polvo es viable para el manejo del gusano verde de *Spodoptera exigua*.

## I. INTRODUCCIÓN

Nicaragua es un país donde el 75% de su economía está basada en los sistemas de producción agrícola; sin embargo, uno de los principales problemas que ha enfrentado la agricultura en Nicaragua es el uso irracional de los agroquímicos en los cultivos. En los años 90 se recomendaron aproximadamente 87 productos químicos sintéticos diferentes para la aplicación en el campo en diversos cultivos. En particular, en el año 2002, en el valle de Sébaco, se realizaron un promedio de 20 aplicaciones por ciclo de cultivo en cebolla, para el manejo del complejo *Spodoptera*.

El mal manejo que se ha dado a los sistemas agrícolas en Nicaragua ha provocado un desequilibrio en los agroecosistemas, originando diversas consecuencias como la muerte de insectos benéficos que juegan un papel muy importante en la regulación de plagas (DeBach, 1968), también se ha reportado desarrollo de resistencia de las plagas a los insecticidas, además de problemas de contaminación ambiental y afectación a la salud humana.

Sin embargo, en los últimos años han habido avances positivos con el uso del control biológico como una estrategia de manejo de plagas en los cultivos. La UNAN- LEON produce Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN), desde inicios de los años 90 con fines de investigación, y desde el año 1996 ha estado produciendo en pequeña escala con fines de comercialización para que lo utilicen los productores. Esta nueva alternativa de control biológico es una tecnología viable para el manejo de las plagas de la familia Noctuidae.

Las investigaciones realizadas por la UNAN- LEON, indican que el virus de la Poliedrosis Nuclear es un efectivo agente de regulación de las larvas desfoliadoras en los diferentes cultivos, por ejemplo: en el cultivo de cebolla la regulación es de un 85 % de la población de larvas de *Spodoptera exigua* (Narváez, 1993). No obstante, a pesar del excelente control de esta plaga, esta tecnología no ha sido apropiada por la mayoría de los productores en Nicaragua, por un lado por que la producción de virus es en pequeña escala, y por otro lado,

porque para su uso es necesario disponer de un equipo de refrigeración para mantener el virus crudo a una temperatura de 4<sup>0</sup>C para conservar la viabilidad del mismo (Alves 1986). Esto se debe a la forma artesanal de la formulación, lo que dificulta aún más que los pequeños y medianos productores puedan implementar medidas de control biológico en los cultivos, ya que no es accesible pues éstos no disponen de freezer en sus fincas para almacenar el virus.

Es necesario por lo tanto, desarrollar un formulado que pueda ser almacenado por los productores sin necesidad de refrigeración, sin que pierda la actividad biológica y por tanto la efectividad del mismo, puesto que las altas temperaturas y la radiación ultravioleta desactivan el virus y pierde o disminuye su efectividad biológica cuando es mantenido en condiciones no adecuadas de almacenamiento (Alves, 1980).

La formulación del virus, con un material inerte como caolín, que permita mantener activo el virus en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente resolvería este problema. Es por esta razón que se está investigando este ingrediente como un medio inerte para formular el virus sin que disminuya su actividad biológica bajo condiciones ambientales durante un periodo de tiempo de almacenamiento.

Con la formulación del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN), se pretende que los productores tengan acceso a esta tecnología y pueda ser utilizada masivamente como un insecticida microbial para el manejo de *Spodoptera* en los diferentes cultivos.

## II. OBJETIVOS

### General

- ◆ Evaluar la actividad biológica del Virus de la Poliedrosis Nuclear formulado en polvo en larvas de *Spodóptera exigua*, en condiciones de laboratorio.

### Específicos

- ◆ Elaborar una formulación de virus en polvo usando caolín como material inerte y una formulación líquida con agua o virus crudo.
- ◆ Determinar la concentración de Cuerpos de Inclusión Poliedral del virus en las formulaciones en polvo y líquido, recién elaborados.
- ◆ Determinar la estabilidad de la actividad biológica del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPNSe), de ambas formulaciones después de 7.5, 8.5 y 11.5 meses de almacenamiento bajo dos condiciones de temperatura.
- ◆ Comparar la actividad biológica del virus formulado en polvo con el virus en suspensión acuosa (formulación líquida).



### III. HIPÓTESIS

- El virus de la Poliedrosis Nuclear formulado en polvo usando caolín mantiene una actividad biológica similar al virus formulado en agua (virus crudo) después de 11 meses de formulado.
- La temperatura en la cual es mantenido el formulado viral afecta la actividad biológica del mismo.
- La mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* producida por el virus formulado y mantenido en condiciones de temperatura ambiental y temperatura de 18°C son iguales a lo largo del tiempo.

## IV. MARCO TEÓRICO.

### 4.1 Aspectos generales de los Virus

Existen 13 familias de virus que son capaces de infectar insectos, pero los más estudiados como agentes de control biológico pertenecen a la familia Baculoviridae. Por esto, la mayoría de los reportes científicos se refieren principalmente a los baculovirus, los cuales presentan actividad contra insectos de los Ordenes Coleópetas, Dípteras, Neurópteras, Lepidópteras, entre otros (Evans. H. F y Enwistle, P. F., 1987). Estos son muy específicos y son referidos empleando el nombre del insecto del cual fueron aislados. Dentro de los baculovirus a los que se les ha prestado mas atención en los últimos años son los relativos a especies de importancia económica en la agricultura, como *Heliothis*, *Helicoverpa*, *Spodoptera*, entre otras (McGuire, et al., 2003 ).

Los Baculovirus están presentes naturalmente en los insectos y son capaces de causar epizootias que reducen en gran parte la población de las especies susceptibles. Estos hechos observados han conducido a realizar intentos para la reproducción y comercialización de los virus como alternativas biológicas para la regulación de las plagas. (Behle, Tamez- Guerra y McGuire, 2003).

Una de las ventajas de utilizar el virus como bioinsecticida es que tienen hospederos específicos, eliminando el posible daño a poblaciones de insectos benéficos, son persistentes en el suelo y se diseminan de un insecto a otro (diseminación vertical y horizontal). Por otro lado, el tipo de aplicación en el campo es muy versátil, estos se pueden aplicar como polvos secos, polvos humectable, formulaciones líquidas etc, (McGuire, et al., 2003).

### 4.2 ¿Qué son los virus?

Los virus entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos, hasta ocasionar su muerte. Son parásitos

intracelulares obligados, pues no pueden reproducirse fuera de la célula huésped, ya que necesitan un organismo vivo para su multiplicación y diseminación (Alves, 1986). Estos virus pueden estar presentes en el ambiente causando enfermedades a pocos insectos (en forma enzoótica).

Poseen un ADN o ARN, el cual puede adueñarse del ADN de las células de los insectos huéspedes y causar la enfermedad hasta ocasionar la muerte. El ADN está envuelto en una membrana de proteína, la cual se denomina nucleocápside, esta es la unidad infecciosa, denominada virión. Este a su vez está envuelto en otra capa de proteína o lipoproteína que tiene forma de poliedrin.

#### **4.2.1 Modo de acción del virus**

El virus penetra al hospedero por vía oral, normalmente ingerido con alimento contaminado por virus (virión), para que causen enfermedades y muerte al hospedero susceptible. Este proceso de infección depende de varios factores como la susceptibilidad del insecto, edad o tamaño del insecto, disponibilidad del alimento y competencia por el espacio y temperatura (Bustillo, 1989).

#### **4.2.2 Sintomatología**

Las larvas infectadas con Virus de la Poliedrosis Nuclear, VPN, normalmente presentan síntomas a partir del tercero y cuarto día. Los primeros síntomas se observan cuando las larvas tienen muy poco movimiento, cesan de alimentarse, tomando un color amarillento y apariencia oleosa, es característico que se suban a la parte alta de la planta. Antes de morir se pueden hinchar ligeramente poniéndose el tegumento frágil, debido a la desintegración de los tejidos internos, después se observan colgadas en las hojas de las plantas sostenidas de las patas traseras luego ocurre la muerte de la larva, el integumento se oscurece, se rompe y hay pérdida de líquido rico en poliedros, los cuales serán fuente de inóculo para otras larvas susceptibles presentes en los cultivos (Rizo y Narváez, 2001).

### **4.3 Producción de virus en laboratorio**

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

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

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

#### **4.3.1 Almacenamiento**

En forma general, los VPN se almacenan congelados, para evitar la degradación del producto. Una vez congelado, la actividad insecticida permanece por años. Inclusive en refrigeración se conserva la mayor parte de la actividad del virus. La sabiduría convencional podría sugerir que el secado de productos virales podría mejorar la conservación de los mismos a temperatura ambiente. Sin embargo, en experiencia práctica se ha visto que los virus que se almacenan secos, generalmente continúan perdiendo

actividad. Es necesario realizar más trabajos de investigación en esta área para mejorar la estabilidad de los productos a base de VPN durante su almacenamiento, para determinar la técnica que se empleará o la forma de formulación (Behle, R.W. y Tamez-Gerra, P, 2003).

#### **4.3.2 Control de calidad**

El control de la calidad de la producción se requiere para asegurar la viabilidad y efectividad del producto final. En el virus formulado se realiza con el objetivo de efectuar correcciones de los problemas de la pérdida de la actividad biológica del virus originado tanto en el proceso de producción como durante el proceso de formulación (Lecuona, R. E. 1995).

#### **4.4. Ecología de los virus**

##### **4.4.1 Dispersión**

Los cadáveres de las larvas representan una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles en un cultivo. Igualmente a lo largo de la estación del cultivo, tanto el agua de lluvia, como las larvas caídas al suelo, transportan las partículas virales dentro del suelo donde permanecen por muchos años y representa el inóculo inicial para futuras infecciones. La dispersión ocurre por factores abióticos, tales como lluvia, riego, laboreo y por factores bióticos como parásitos, depredadores, adultos del huésped, detritívoros y aves (Alves, 1986)

##### **4.4.2 Persistencia**

La protección contra la radiación solar es muy importante para preservar la actividad biológica de los virus, puesto que la luz ultravioleta mata las partículas virales (ADN). En algunos casos la temperatura del suelo es importante para la sobrevivencia del virus. El virus persiste sobre el follaje por un período de 24 a 48 horas, en el suelo se han reportado sobrevivencia del virus hasta por más de 15 años. Otra forma de persistir es a través del mismo huésped de generación en generación (Enwistle y Evans, 1985)

## **4.5 Formulación**

Para obtener una solución acuosa de virus para la aplicación en el campo, un número de larvas equivalentes, LE, dependiendo de la dosis recomendada, son maceradas en agua y filtradas con una tela de muselina, para evitar que la cápsula cefálica obstaculice las boquillas de la bomba de aplicación. Esta es la formulación que actualmente elabora la UNAN-LEÓN y es usada por los productores en Nicaragua (Rizo y Narváez, 2001).

### **4.5.1 ¿Qué es un formulado?**

Es definida como la composición resultante cuando el candidato a plaguicida es mezclado con cualquier cosa, incluyendo el agua. Otra definición es mezclar una combinación de ingredientes de forma tal que el principio activo se mantenga estable, efectivo y fácil de aplicar (Couch and Ignoffo, 1980).

### **4.5.2 Componentes en toda formulación**

Se distinguen tres tipos principales, *el principio activo*, una molécula química o un microorganismo o sus toxinas en el caso de bioinsecticidas; *diluyentes o vehículos*, que puede ser sólido o líquido, es un material inerte; y *adyuvantes* que son materiales inertes pero tiene función protectora, dispersante y adherente, etc.

## **Formulaciones más comunes de productos fitosanitarios sintéticos**

### **a) Concentraciones líquidas**

Son formulaciones líquidas cuyo contenido de principio activo esta directamente relacionado con la dosis a utilizar, son aplicaciones con o sin diluyentes. Generalmente se le agrega agua, utilizando equipos especiales para aplicarlos. Las gotas producidas en una aplicación Ultra Bajo Volumen (UBV), no se evaporan con facilidad como ocurre con las emulsiones acuosas. El calibrado de los equipos y la aplicación misma debe ser realizado muy cuidadosamente, sobre todo cuando se utiliza formulaciones de alta concentración de principio activo. Normalmente, se emplean en tratamientos con equipos aéreos.

**b) Polvos para espolvorear**

El ingrediente activo se encuentra disperso en un inerte sólido, la concentración de ingrediente activo generalmente es entre 1- 20% se recomienda para usar en lugares secos, con poca agua disponible o en ambiente con baja humedad. Generalmente son partículas de menos de 30 mm de diámetro los materiales mas usados son: arcilla, minerales, sílice, distomitas, etc.

**c) Polvos humedecibles**

Es un polvo capaz de humedecerse y mantenerse en suspensión acuosa durante un período de tiempo (horas), el principio activo que generalmente resulta poco soluble, se dispersa en un inerte y a la formulación se le adiciona un humectante, agente que aumenta la suspensibilidad, adherentes y estabilizantes. Generalmente del 50 al 80 % de la formulación lo constituye el ingrediente activo, el 15-45 el diluyente y entre el 1 al 10% el dispersante, el agente humectante entre el 3 y el 5 %.

Se presenta como partícula muy pequeña en las cuales se adhieren las estructuras de los microorganismos. La mayoría de las partículas son mayores de 5 micras y todas deben ser menores de 44 micras, se emplean generalmente como inerte caolín, arcilla silica gel y tierra de diatomeas.

**d) Granulados**

Son formulaciones sólidas que se aplican directamente al suelo; tienen forma de gránulos con tamaño de 0.2 a 0.5 mm presentan en 5 y 20 % de principio activo, de 80 a 95 % de soporte y 1.5 del adherente, se emplean preferiblemente contra insectos de suelos, y acuáticos con una formulación especial, La formulación mas utilizada es la mezcla con aceite de soya y emulsificante.

**e) Concentraciones emulsionables**

Muchos principios activos no son solubles en agua pero pueden disolverse en diferentes solventes orgánicos, aromáticos o alifáticos, normalmente se los ha denominado hasta

ahora como líquido emulsionables. Estos productos llevan como soporte un solvente y la sustancia acompañante mejora su característica, tales como agentes emulsificantes (derivados de nonil fenol y otros coadyuvantes).

Los solventes no son solubles en agua y se mezclan con ella con dificultad, pero la presencia de los emulsificantes permite que pueda mezclarse en forma muy homogénea formando emulsiones de aspecto lechoso. Una vez hecha la emulsión es necesario mantener cierta agitación para conservar la homogeneidad de la misma dentro del tanque del equipo de aplicación.

Un concentrado emulsionable es una formulación muy versátil pues se presta para distintas aplicaciones. Puede penetrar en materiales porosos (papel, madera, suelo, etc) pueden manipularse con facilidad, pero por ser líquido presentan algunos riesgos para operarios.

#### **f) Concentrados solubles**

Esta denominación corresponde a la formulaciones líquidas en la que el ingrediente activos puede ser disuelto en agua. Una vez preparado no requiere mezclado ni agitación adicional para conservar sus características. Los operarios corren los mismos riesgos indicados para los concentrados emulsionables, pero son menos peligrosas pues las soluciones acuosas tienen pocas posibilidades de penetrar por la piel sana. Suelen ser muy pocas fitotóxicas pues no contienen solventes orgánicos.

### **4.5.3 Criterios para la formulación de bioplaguicidas**

Una de las principales desventajas de los productos microbiológicos para el control de plagas es el efecto negativo de las condiciones ambientales, como la radiación, temperatura y humedad relativa, lo cual afecta su estabilidad y eficacia. Esta desventaja debe ser resuelta en gran medida mediante la preparación de formulaciones para lo cual el ingrediente activo, una vez obtenida, se mezcla con los diferentes componentes. (Fernández, O., 2002)



#### **4.5.4. Estabilidad de las formulaciones bioplaguicidas**

Debido a que los organismos están expuestos al deterioro y a la pérdida de calidad durante su almacenamiento y transporte, la formulación debe ser apropiada para proteger al virus de los factores abióticos que afectan la supervivencia y actividad biológica. Por ello el proceso de formulación debe preservar la actividad biológica y conferir al producto características de estabilidad durante su almacenamiento y capacidad de permanecer en suspensión. Además de favorecer una cobertura apropiada teniendo en cuenta que los virus actúan por vía oral.

Al igual que otros insecticidas biológicos la formulación de virus Entomopatógenos puede requerir la incorporación de protectores ultravioleta (material inerte), para que mejoren la estabilidad en el almacenamiento. Existe una amplia variedad de posibilidades para los formulados como: polvos, polvos mojables y suspensiones concentradas. El desarrollo de una formulación a partir de microorganismos resulta similar a la de un insecticida químico (Fernández, O., 2002)

Un insecticida microbiano además de ser eficaz debe ser económico y satisfacer algunos requerimientos comerciales y de aplicación en condiciones de campo. Uno de los aspectos que deben mejorar la formulación es la estabilidad física y biológica durante su almacenamiento; disminuir la evaporación; incrementar la cobertura y adherencia en el follaje; mejorar la suspensión y suspensibilidad; aumentar la persistencia a las condiciones ambientales (lluvia, temperatura, radiación, etc.); y facilitar la aplicación.

Fernández, O. 2002, señala como un ejemplo de una proporción usada para una formulación viral, lo siguiente: Suspensión viral 20 ml, aceite de soya refinado 50 ml, emulsificante 5 ml y Glicerina 10 ml.

Debido a que el ingrediente activo son estructuras poco estables de organismos vivos, la selección de los aditivos y el tipo de formulación resulta una cuestión crítica, el objetivo de formular es incrementar la estabilidad de las unidades y facilitar la infección.

Un insecticida microbiológico debe resultar estable al menos durante 18 meses bajo la presencia de otros factores como el pH y la temperatura. Se considera, como se mencionó anteriormente, que la radiación Ultravioleta (UV) es el factor inactivante más importante de estos agentes biológicos, en especial del VPN (Alves, 1986).

Unos de los aspectos que se toman en cuenta para la formulación es como se va a aplicar. Las formulaciones más comunes son polvos y fluidos oleosos. Para el primero se emplea generalmente caolín (Fernández, O., 2002.).

#### **4.5. 5. Características de los ingredientes para la formulación**

**Soporte sólido:** se usa para diluir el principio activo en formulaciones sólidas soluble en aguas como cloruro de carbonatos, de fosfatos y se usan tierras inertes como: talcos, arcillas, caolín, bentonita, silicato, zeolita, etc.

**Soporte líquido:** solubles o emulsionables derivados del petróleo.

#### **4.5.6 Ingredientes inertes usados para la formulación de virus**

Estudios realizados por Tamez-Guerra, 2003, en la formulación del virus AfVPN han utilizado con éxito sustancias como lignina, glicerina, harina de maíz nixtamalizado, entre otros.

La arcilla, caolín, ha sido utilizada como un ingrediente inerte en la formulación del virus de la poliedrosis nuclear en diferentes países, entre los cuales se encuentra el formulado de AgVPN realizado por EMBRAPA-soya en Brasil. (Sosa y Moscardi, 1996) y el formulado de VPN producido en Guatemala por Agrícola El Sol.

## **4.6 Arcilla**

El término arcilla se usa habitualmente con diferentes significados. Desde el punto de vista mineralógico, engloba a un grupo de minerales (minerales de la arcilla), filosilicatos en su mayor parte, cuyas propiedades físico-químicas dependen de su estructura y de su tamaño de grano, muy fino (inferior a 2  $\mu\text{m}$ ). Desde el punto de vista petrológico la arcilla es una roca sedimentaria, en la mayor parte de los casos de origen detrítico, con características bien definidas. Para un sedimentólogo, arcilla es un término granulométrico, que abarca los sedimentos con un tamaño de grano inferior a 2  $\mu\text{m}$ . Para un ceramista una arcilla es un material natural que cuando se mezcla con agua en la cantidad adecuada se convierte en una pasta plástica. Desde el punto de vista económico las arcillas son un grupo de minerales industriales con diferentes características mineralógicas y genéticas y con distintas propiedades tecnológicas y aplicaciones (García y Suárez, 2004).

### **4.6.1 Propiedades físico-químicas**

Las importantes aplicaciones industriales de este grupo de minerales radican en sus propiedades físico-químicas. Dichas propiedades derivan, principalmente, de:

- Su extremadamente pequeño tamaño de partícula (inferior a 2  $\mu\text{m}$ )
- Su morfología laminar (filosilicatos)
- Las sustituciones isomórficas, que dan lugar a la aparición de carga en las láminas y a la presencia de cationes débilmente ligados en el espacio interlaminar.

Como consecuencia de estos factores, presentan, por una parte, un valor elevado del área superficial y, a la vez, la presencia de una gran cantidad de superficie activa, con enlaces no saturados. Por ello pueden interaccionar con muy diversas sustancias, en especial compuestos polares, por lo que tienen comportamiento plástico en mezclas arcilla-agua con elevada proporción sólido/líquido y son capaces en algunos casos de hinchar, con el desarrollo de propiedades reológicas en suspensiones acuosas. (García R., E. y Suárez B. M., 2004).

Por otra parte, la existencia de carga en las láminas se compensa, con la entrada en el espacio interlaminar de cationes débilmente ligados y con estado variable de hidratación,

que pueden ser intercambiados fácilmente mediante la puesta en contacto de la arcilla con una solución saturada en otros cationes, a esta propiedad se le conoce como capacidad de intercambio catiónico y es también la base de multitud de aplicaciones industriales.

#### **4.6.2 Arcillas industriales**

Hoy en día las arcillas comerciales, aquellas que sirven como materia prima industrial figuran entre los recursos minerales más importantes, tanto por el volumen explotado como por el valor de la producción. Un 90 % de la producción se dedica, preferentemente a la fabricación de materiales de construcción y agregados. Sólo un 10 % se dedica a otras industrias (fabricación de papel, caucho, pinturas, absorbentes, decolorantes, arenas de moldeo, productos químicos y farmacéuticos, agricultura, etc.)

A estas últimas se las denomina **arcillas especiales**, las cuales están constituidas fundamentalmente por un sólo tipo de mineral de la arcilla, y sus propiedades dependen esencialmente de las características de ese mineral. Estas, a pesar de ser mucho menos importantes en volumen, suponen más del 70 % del valor de las arcillas comerciales, y son objeto de comercio internacional. Las arcillas especiales se pueden dividir en caolines y arcillas caoliníferas, y bentonitas, sepiolita y paligorskita:

##### **4.6.2.1 Caolines y arcillas caoliníferas**

Un caolín es una roca que contiene una cierta proporción de minerales del grupo de caolín, que puede ser económicamente extraída y concentrada. Se trata, generalmente, de una arcosa o arena caolínifera, granito o gneis caolinitizado, que es necesario procesar para enriquecer en minerales del grupo del caolín.

La arcilla caolinífera es también un caolín en sentido amplio. Igualmente, se trata de una arcilla compuesta fundamentalmente de minerales del grupo del caolín. Esta no se procesa, se usa tal cual, e inicialmente los porcentajes en minerales del grupo del caolín son más altos que en el caolín (>50%). Cuando el caolín se usa para cerámica blanca recibe la denominación de China Clay.

El caolín, tal como se obtiene en una explotación mineral (caolín bruto/todo uno) posee un contenido variable de caolinita y/o halloysita que, a veces no llega al 20 %, además suele tener cuarzo, feldespatos, micas, y, dependiendo de la roca madre otro tipo de minerales accesorios.

Se utilizan caolines, en menores proporciones, en industrias: como carga más económica sustituyendo a las resinas en pinturas, aislantes, caucho. También como carga de abonos, pesticidas y alimentos de animales.

La industria química consume cantidades importantes de caolín en la fabricación de sulfato, fosfato y cloruro de aluminio, así como para la fabricación de ceolitas sintéticas. A partir del caolín calcinado se obtienen catalizadores y fibras de vidrio. La industria farmacéutica utiliza caolín como elemento inerte en cosméticos y como elemento activo en absorbentes estomacales.

#### **4.6.2.2 Bentonitas**

Una bentonita es una roca compuesta esencialmente por minerales del grupo de las esmectitas, independientemente de cualquier connotación genética. Los criterios de clasificación utilizados por la industria se basan en su comportamiento y propiedades fisico-químicas; así la clasificación industrial más aceptada establece tipos de bentonitas en función de su capacidad de hinchamiento en agua:

- Bentonitas altamente hinchables o sódicas
- Bentonitas poco hinchables o cálcicas
- Bentonitas moderadamente hinchables o intermedias

El término fuller'earth, también conocidas en español como tierras de batán, los ingleses lo usan para denominar a arcillas constituidas fundamentalmente por montmorillonita con calcio como catión de cambio, mientras que los americanos se lo dan a arcillas paligorskíticas. A las bentonitas cálcicas que los ingleses denominan fuller'earth los americanos las llaman bentonitas no hinchables.

La elevada superficie específica de la bentonita, le confiere una gran capacidad tanto de absorción como de adsorción. Debido a esto se emplea en decoloración y clarificación de aceites, vinos, sidras, cervezas, etc. Tienen gran importancia en los procesos industriales de purificación de aguas que contengan diferentes tipos de aceites industriales y contaminantes orgánicos.

Se utiliza además como soporte de productos químicos, como por ejemplo herbicidas, pesticidas e insecticidas, posibilitando una distribución homogénea del producto tóxico.

En los últimos años están compitiendo con otras arcillas absorbentes (sepiolita y paligorskita) como materia prima para la fabricación de lechos de animales. La demanda de bentonitas para este uso varía sustancialmente de unos países a otros, así en Estados Unidos comenzaron a utilizarse a finales de los años 80, sin embargo en Europa el mercado es más complejo y su demanda mucho menor.

#### **4.7 Uso de virus de la poliedrosis nuclear para el control de plagas**

Según Entwistle y Evan, 1985, en contraste a los insecticidas químicos, los cuales son usados para tener solo efecto inmediato y local en los insectos, los baculoviridae con su capacidad innata de multiplicación y dispersión pueden ser empleados de diversas formas, estos pueden ser utilizado como un insecticida (aplicación periódica inundativas) o bien aplicaciones inoculativas, para establecer el inóculo al inicio de la estación agrícola. Estos juegan un papel muy importante en la regulación de las plagas, tanto en condiciones naturales como cuando se usa un programa de Control Integrado de Plagas.

Actualmente existen varias formulaciones comerciales de virus que han pasado todas las regulaciones sobre seguridad humana y seguridad ambiental. A pesar que las formulaciones comerciales son relativamente recientes, los virus se han utilizado desde hace mucho tiempo en el control de diversas plagas agrícolas. Los agricultores de Brasil, EE.UU. (California), Centroamérica y otros han confirmado la efectividad de estos patógenos y se han encargado de colectarlos en el campo, almacenarlo y formularlo para aplicarlos en los próximos cultivos (FAO- OMS, 1974). En el Brasil actualmente existen

varios formulados de baculovirus en polvo para el control de *Anticarsia gemmatalis* y *Spodoptera exigua*. En el Paraguay se ha trabajado con el baculovirus *Anticarsia* para el control de larvas de *Anticarsia gemmatalis*, los estudios se iniciaron desde 1981 y hasta la fecha la tecnología ya está difundida a nivel de técnicos y productores. En 1983 probaron en Nicaragua una formulación de virus de la Poliedrosis nuclear aislado de *Heliothis*, contra la larva de *H. zea* en el algodón (Martínez y Swezey, 1983).

#### **4.7.1 Efectividad del virus de la Poliedrosis Nuclear para el control de *Spodoptera exigua*.**

En el ciclo de 1994 – 1995 se evaluó la efectividad del virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN Se), en formulación líquida, para el control del gusano verde *Spodoptera exigua*, obteniéndose resultados satisfactorios que muestran que VPN es un insecticida efectivo para el control de esta plaga, con costos muy bajos comparados con los químicos. (Narváez y Castillo, 1995)

#### **4.8 Ciclo de vida de *Spodoptera exigua* (gusano verde).**

El gusano verde es un Lepidóptera que pertenece a la familia Noctuidae y género *Spodoptera* conocido comúnmente como el gusano verde, este es un insecto polífago y se manifiesta por la oviposición de huevos y la alimentación sobre la planta. Esta plaga está ampliamente distribuida en todo el mundo (Saunders, 1998), y representa uno de los insectos plagas más importantes específicamente en el cultivo de cebolla.

**4.8.1 Huevos:** Los ovipositan en masa de 50 a 150 huevos sobre las hojas, cubiertos con una escama de color gris producida en el abdomen de la hembra en oviposición.

**4.8.2 Larva:** Pasa por 5 o 6 estadios larvales miden de 25 a 35 mm de largo cuando está madura, gris verdosa dorsalmente, con una línea amarilla media dorsal quebrada y una banda subdorsal, pálida por debajo; verde oscuro o negro total en la fase gregaria.

En el primer estadio se alimenta gregariamente bajo una telaraña de seda en el envés de las hojas que quedan esqueletizadas. Los estadios posteriores se pueden encontrar

alimentándose solitarios o en grupos o agregados extensos. Bajo esta condición ocurre una defoliación seria y las larvas pueden migrar hacia nuevos campos de alimentación (Saunders1989).

**4.8.3 Pupa.** La pupa de exigua es de color pardo y se encuentra en un capullo suelto.

**4.8.4 Adulto.** La Envergadura es de 5 mm, las alas delanteras son de color gris con una mancha central pálida o anaranjada de forma circular. Las alas traseras son de color blanco con venas de color pardo.

**4.8.5 Daño.** Las larvas se alimentan del follaje de la planta, Estas pueden defoliar áreas importantes del cultivo durante la fase gregaria.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico (LCB), de la UNAN-LEON en el Campus Agropecuario, ubicado de la arrocera 1 1/2 Km carretera a La Ceiba, León, en los meses de mayo a septiembre del 2002 y mayo del 2003 a julio del 2004.

El virus utilizado fue aislado originalmente de larvas de *Spodoptera exigua* colectadas en la región del Occidente de Nicaragua desde el año 1989. El aislado fue codificado como virus U-3. El virus SeVPN es reproducido en el Laboratorio de Virus Entomopatógenos (LCB), del Campus Agropecuario de la UNAN-LEÓN.

El estudio se realizó en dos etapas, la primera consistió en la elaboración del formulado y la segunda fue la evaluación de la actividad insecticida aplicando el virus formulado y almacenado en diferentes períodos de tiempo, sobre un cultivo y evaluado en larvas de *Spodoptera exigua* en condiciones de laboratorio.

De los lotes de virus producidos, usando la técnica de producción en vivo (huéspedes) en el LCB, se tomaron para elaborar los formulados experimentales. Los lotes de dosis de virus usados contenían un promedio de  $2.5 \times 10^9$  CIP/ml. Estos fueron usados para preparar el formulado en polvo a base de caolín y la formulación líquida, basado en una solución acuosa.

### 5.1 Elaboración del formulado

#### 5.1.1 Formulado en líquido (virus crudo)

Se tomaron 3 lotes de 150 larvas muertas en su último estadio larval (LE). De cada lote se maceraron las larvas y se les agregó agua del grifo en una cantidad de 50 ml, luego se procedió a filtrarlo con una tela de organdí y el caldo obtenido se colocó en una bolsa plástica, la cual se rotuló con la fecha de elaboración y especie correspondiente. Este procedimiento se repitió para obtener 3 dosis. Cada dosis fue almacenada en el freezer por

diferentes períodos de tiempo, 7.5, 8.5 y 11.5 meses de formulado. Este procedimiento fue realizado en mayo de 2003 y en mayo de 2004.

### **5.1.2 Formulado en polvo**

Se usó caolín, una bentonita blanca, producido por la compañía ROTOWA de Nicaragua. El contenido o composición química es: SiO<sub>2</sub>: 87.29%, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 3.06, CaO: 0.74, MgO: 0.67, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 1.28, Na<sub>2</sub>O: 0.27, K<sub>2</sub>O:0.10, MnO:0.03, TiO:0.08, H<sub>2</sub>O:4.26. El tamaño de las partículas es de 325 mesh.

Se mezcló el virus con el caolín en una proporción de 1:1 (peso: peso). Se tomo otro lote de 150 larvas muertas en último estadio larval (LE), luego se procedió a pesarlas. Ya pesadas fueron maceradas y se le agregó 50 ml de agua, luego el líquido se filtró en una tela fina, evitando el paso de restos de larvas. Este procedimiento se realizó 2 veces. Posteriormente, se mezcló el caldo de virus filtrado, que se obtuvo de las larvas muertas, con el caolín hasta obtener una pasta homogénea. Luego esta masa se extendió en una bandeja que contenía plástico negro en la base. Esta se colocó en una mesa y para acelerar el proceso de secado se colocó sobre el virus mezclado con caolín una lámpara de luz amarilla, teniendo cuidado que la temperatura no fuese mayor que los 40°C. Una vez seca la masa, se procedió a moler el virus formulado, con un molino de mesa para masa de maíz, procurando que no se recalentara el virus con el caolín para evitar la baja calidad del producto. Inmediatamente se separó el virus formulado en dos bolsas, una se colocó a temperatura ambiente a 28°C y la otra se mantuvo refrigerada a 18°C. Se rotuló con la fecha de elaboración correspondiente. Este procedimiento se repitió con diferentes lotes de virus para elaborar los formulados que se mantendrían a 7.5, 8.5 y 11.5 meses de almacenamiento.

### **5.1.4 Determinación de la concentración de Cuerpos de Inclusión Poliedral del Virus formulado.**

De cada uno de los tratamientos (virus formulados y almacenado en dos temperaturas y tres períodos de tiempo), se tomaron 0.5 gramos para realizar el conteo de los CIP /ml. Se le

agregó a cada muestra de formulado 1 ml de agua, se movió con un agitador Vortex y se procedió a realizar diluciones sucesivas, 1:10, 1:100 y 1:1000, de esta última dilución se tomaron 20  $\mu$  para realizar el conteo de CIP en una cámara Neubauer. Para su conteo la cámara fue colocada sobre un microscopio de contraste de fase. El conteo se realizó en 5 cuadros grandes repitiéndolo dos veces el conteo para obtener un valor promedio de CIP. Para el cálculo de la concentración se usó la siguiente fórmula:

$$\text{CIP/gr} = \text{Promedio de conteo} \times 5 \times 10^4 \times \text{dilución usada}$$

El valor obtenido se multiplicó por 2 para obtener la concentración de CIP/gr.

Este procedimiento fue repetido para determinar la concentración del producto antes de la aplicación en las plantas de ajonjolí, para verificar la concentración de cada tratamiento y realizar los cálculos de la dosis a usar por área de aplicación.

### **5.1.3 Proceso de semi-purificación de la solución viral**

El caldo de virus obtenido a partir de 150 LE se vierte en los tubos de ensayo y se depositan dentro de la centrifuga. Se centrifuga por un minuto a 3000 rpm, obteniendo un sobrenadante y un precipitado, el cual contiene restos de cuerpos grasos y otras moléculas del insecto, éste se elimina y el sobrenadante que contiene las partículas virales se somete nuevamente a centrifugación por 10 min a 6000 rpm, de nuevo se formará un precipitado y un sobrenadante en este caso el precipitado contiene los CIP y el sobrenadante se eliminará. A este precipitado se le agregaran 2 ml de agua destilada.

## **5.2 Evaluación de la actividad insecticida**

### **5.2.1 Evaluación preliminar realizada en el año 2003**

Para evaluar la actividad biológica del virus se realizaron dos bioensayos utilizando larvas de segundo estadio de *Spodoptera exigua*. Se evaluaron los tratamientos: virus semipurificado, virus formulado, un testigo donde se aplicó agua. Cada tratamiento fue repetido 3 veces. Cada repetición con 33 larvas; la primera evaluación se hizo inmediatamente después de formulado; la segunda evaluación se realizó dos meses después

de formulado, los tratamientos evaluado fueron virus semipurificado, virus formulado y mantenido a 18°C, y a 28°C y un testigo con agua.

## **5.2.1 Aplicación en campo en ajonjolí para determinar la actividad insecticida**

### **5.2.1.1 Establecimiento del cultivo en el campo**

El 27 de marzo del 2004 se sembraron 36 surcos de 1 metro de largo de ajonjolí (*Sesamun indicum*), variedad istar 198. La siembra se hizo a una distancia de 20 pulgadas entre surco y 7 pulgadas entre planta obteniéndose un total de 7 plantas por surco. El área de cada surco fue de 0.53 m<sup>2</sup> y el área del tratamiento corresponde a 2.12 m<sup>2</sup>. Cada surco estaba separado por 1 m. Se realizaron todas las labores agronómicas convencionales (limpia, aporque y raleo). Las parcelas se dispusieron en un diseño completamente al azar (ver anexo 1). Los tratamientos a evaluar fueron: 1) virus formulado en líquido (crudo) y mantenido en refrigeración por 7.5 meses, 8.5 meses y 11.5 meses, los cuales fueron considerados como testigo 2) virus formulado en polvo mantenido en refrigeración por 7.5, 8.5 y 11.5 meses, 3) virus formulado en polvo mantenido a temperatura ambiente por 7.5, 8.5 y 11.5 meses. Cada tratamiento fue repetido 4 veces.

### **5.2.1.2. Aplicación del virus en el cultivo**

La aplicación se realizó con una bomba microaspersora (micro ulva), la cual deposita un tamaño de gota de 50 micrones. Previamente se calibró para determinar el volumen de agua necesaria para obtener una buena cobertura sobre las plantas. La aplicación se realizó a las 7 de la mañana para evitar que los rayos ultravioleta desactiven el virus. Se utilizaron 250 ml de agua y se asperjaron en un surco de tal manera que quedara totalmente cubierta la planta, el total del volumen de agua que se utilizó por tratamiento fue de 1000 ml. Para evitar la deriva del virus en las parcelas adyacentes, se colocó una barrera de plástico de 36 pulgadas por un metro de largo entre cada parcela en el momento de la aplicación.

Para el cálculo de la dosis se hizo una relación del área de la parcela con la dosis recomendada para una manzana (150 LE, o 30 gr). La concentración de virus fue de  $2.5 \times 10^{10}$  para el virus crudo y de  $2.45 \times 10^9$  CIP/ml para el virus formulado con caolín.

### **5.2.1.3 Evaluación de la actividad biológica del virus**

Después de cuatro horas de aplicado cada tratamiento en el cultivo de ajonjolí y que el virus asperjado se hubiera secado, se procedió a cortar 5 hojas seleccionadas al azar de cada surco, colectando un total de 20 hojas por cada tratamiento. Las hojas cortadas se colocaron en bolsas plásticas estériles rotuladas con el tratamiento y la repetición correspondiente. Inmediatamente se trasladaron al laboratorio para la evaluación de la actividad biológica.

En el laboratorio, cada hoja se colocó en un plato petri, colocando algodón impregnado de agua sobre el pecíolo para evitar que la hoja se deshidratara. Luego se colocaron 4 larvas de *Spodoptera exigua* del segundo estadio larval (L2), provenientes de la cría de insectos del laboratorio de Control Biológico de la UNAN-LEÓN. Las larvas se dejaron por un período de 24 horas para que comieran la hoja de ajonjolí contaminada con el virus. Todas las larvas que comieron fueron trasladadas en tasas individuales con dieta. Estas se revisaron a diario hasta la muerte o pupación.

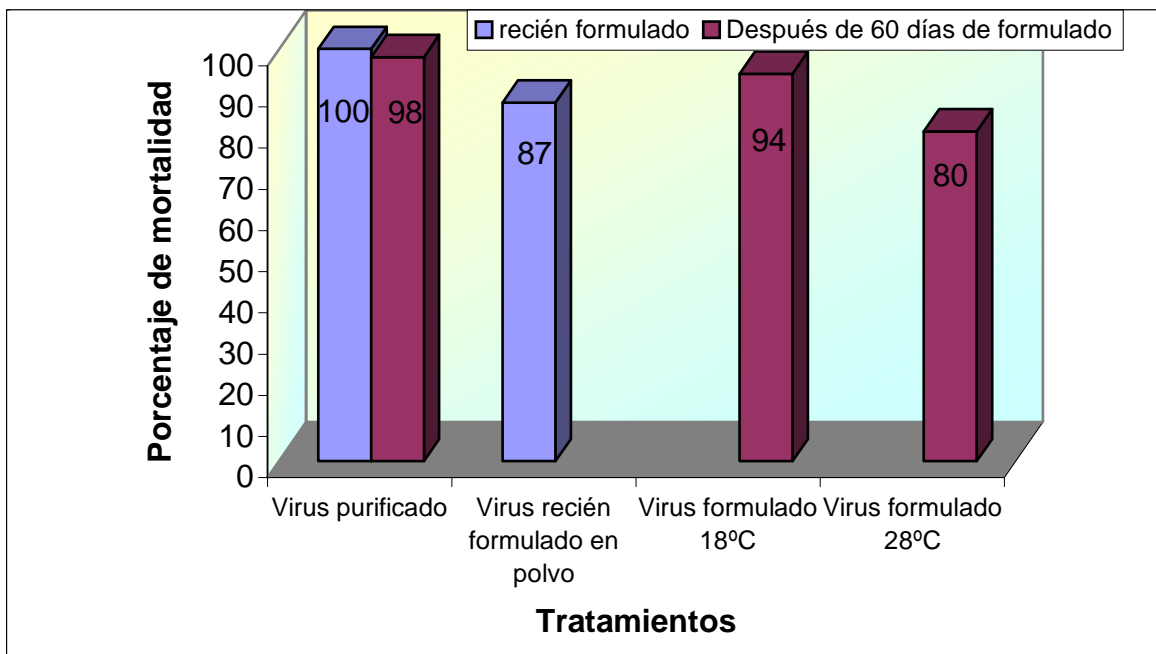
Se consideró una larva muerta por virus, aquella que al tocarla se rompía el integumento y se liberaba el líquido que contiene los cuerpos de inclusión poliedral.

Los datos obtenidos fueron metidos en una hoja de Excel y luego se realizó un Andeva en el programa SPSS, posteriormente para detectar diferencia entre las medias de los tratamientos se realizó la prueba de Tukey. Se elaboraron gráficos de porcentajes de mortalidad producida por virus en cada tratamiento.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Evaluación de la actividad biológica del virus en condiciones de laboratorio, en el año 2003.

La actividad inicial del virus de *Spodoptera exigua* formulado con caolín no causó una pérdida significativa de la actividad insecticida cuando se compara con el virus crudo o el virus semipurificado (Gráfica 1), después de haber sido aplicado sobre dieta artificial para alimentar a larvas de *Spodoptera*.



**Gráfica 1.** Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* sometida a diferentes formulaciones de Virus de la Poliedrosis Nuclear. Laboratorio de Control Biológico. 2003.

La disminución de un 13% de mortalidad producida por el virus recién formulado, con respecto a la mortalidad producida por el virus purificado, puede ser debido al proceso de secado y molido que se realizó para formular el virus en polvo. De igual manera reportan una pérdida de actividad Tamez-Guerra, 2003, para virus formulados en polvo.

Se evidencia además que la mortalidad producida por el virus después de dos meses de formulado disminuye ligeramente (7%) cuando es mantenido a temperatura ambiente  $\pm$  28°C disminuyendo un 18% la mortalidad comparado con el virus puro. Sin embargo, el virus mantenido a 18°C muestra una mortalidad superior a la obtenida por el virus recién formulado, lo que podría deberse a que el virus durante el proceso de mezclado, secado y molido no quedo uniformemente distribuido al mezclarse con el caolín.

El virus purificado fue mantenido congelado durante los dos meses, por lo que la actividad insecticida en larvas de *Spodoptera exigua*, apenas disminuye un 2%. La literatura menciona que de esta manera el virus puede sobrevivir por largos períodos de tiempo (Tamez – Guerra 2003).

## **6.2 Evaluación de la actividad biológica del virus formulado aplicado en el cultivo de ajonjolí en el año 2004.**

La actividad biológica del virus formulado en polvo (VPN) evaluado en larvas de *Spodóptera exigua*, en el año 2004, en cada uno de los tratamientos nos indica que la mortalidad ocasionada por cada formulado disminuye en la medida que el tiempo de almacenamiento es mayor. Estos resultados coinciden con los que encontraron Kaupp y Ebling, citado por Behtle et al, 2003 quiénes demostraron la pérdida de la actividad durante el almacenamiento en cuartos a temperatura ambiente.

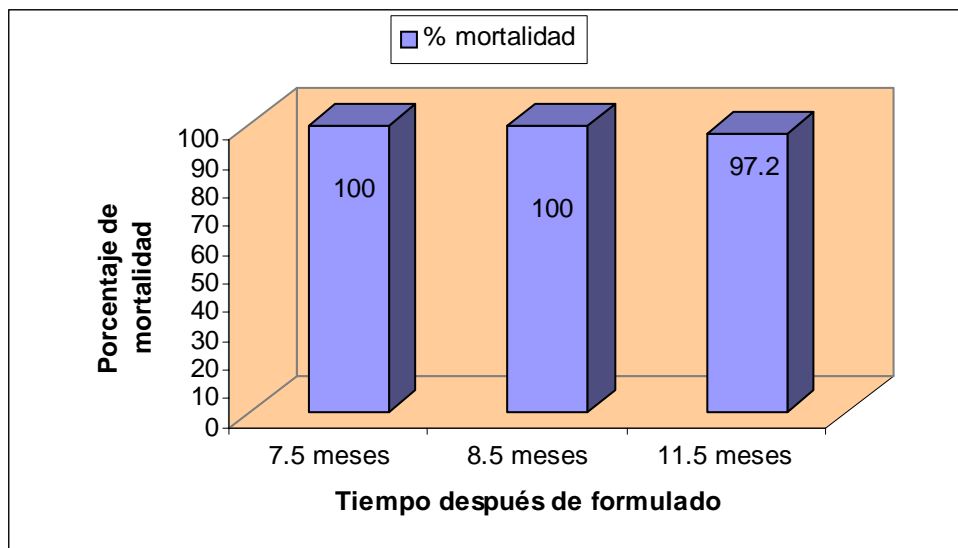
Al realizar las comparaciones de los porcentajes de mortalidad media de los tratamientos formulados en polvo mantenido en refrigeración y el mantenido a temperatura ambiente, con la actividad del virus formulado en líquido o virus crudo y basados en los resultados del bioensayo sobre muestras de hojas de ajonjolí asperjadas en condiciones de campo en el año 2004, el análisis de una vía ANOVA (Tabla 1), muestra que los valores medios de los porcentajes de mortalidad fueron estadísticamente diferentes (alfa 0.05%).

**Tabla 1.** ANOVA realizado para los porcentajes de mortalidad ocasionada en larvas de *Spodoptera exigua* por cada uno de los tratamientos. Campus Agropecuario, 2004.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado medios	F	Sig.
Entre tratamientos	202.222	8	25.278	23.534*	.000
error	29.000	27	1.074		
total	231.222	35			

\*Diferencias estadísticas significativas al 0.05%.

Se observó además, que el virus formulado en líquido (crudo) sin ningún aditivo solamente agua, mantiene una mortalidad de un 100% en larvas de *Spodoptera exigua*, disminuyendo 2.8% a los 11.5 meses de haber sido hecha la formulación, lo que no es una pérdida significativa de la actividad biológica. (Gráfica 2). Esto coincide con lo encontrado por Stainhaus, 1954, citado por Bethle, 2003, quién señala que los virus mantenidos en temperaturas de congelación mantienen una actividad remanente después de 15 años de almacenamiento.

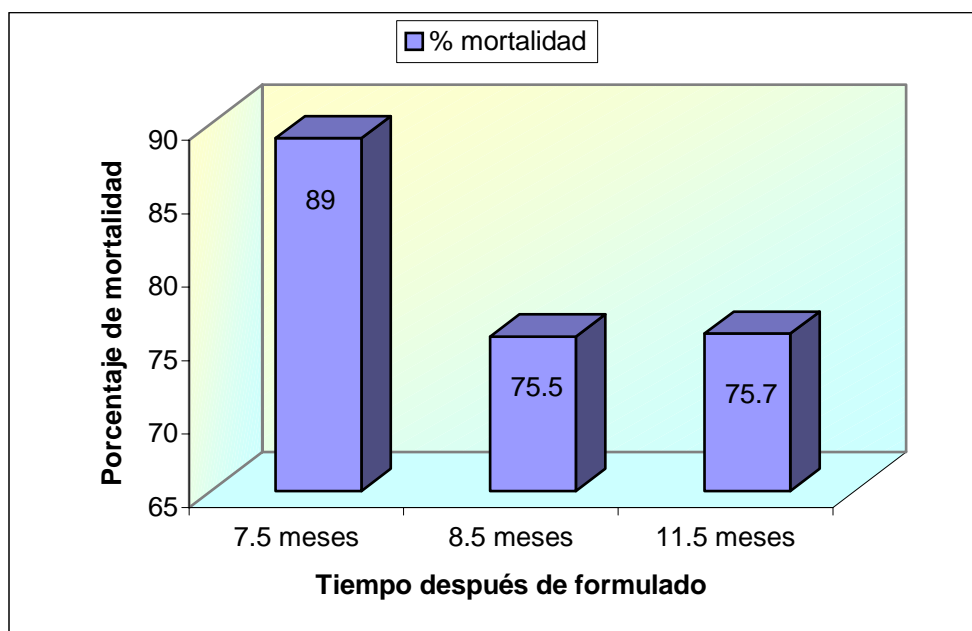


**Gráfica 2.** Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* producido por el virus en formulación líquida (crudo) mantenido en refrigeración (4°C). Campus Agropecuario, UNAN- León, 2004.

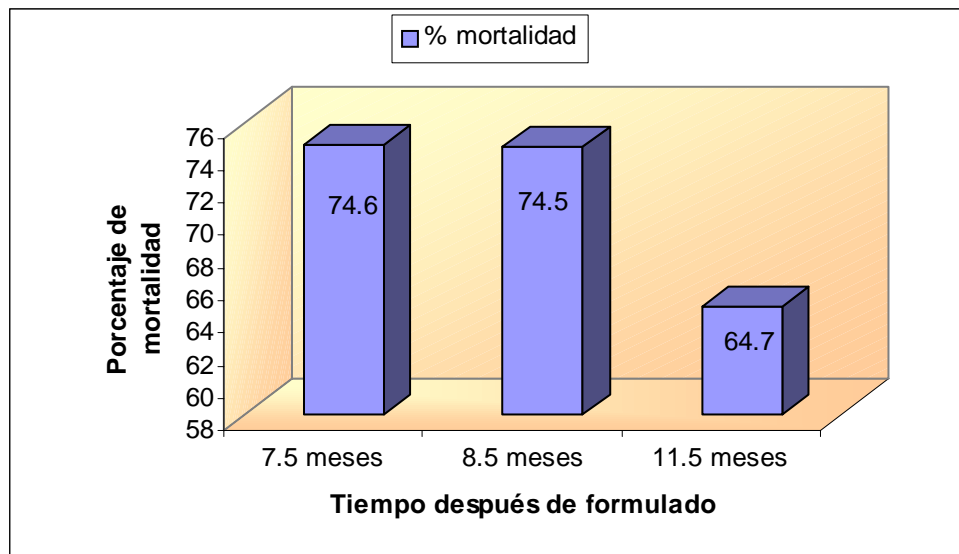


Al comparar los resultados del virus purificado (Gráfica 1) con la actividad biológica del virus crudo se observa que es más estable, esto es debido a que en esta forma las proteínas y restos del insecto le confieren mayor protección aún en condiciones de refrigeración.

Sin embargo, el virus formulado en polvo y mantenido en refrigeración a 18°C disminuye la mortalidad ocasionada en larvas de *Spodoptera exigua* en un 11% después de un período de 7.5 meses, al compararlo con el virus crudo. Esta disminución de la mortalidad producida en las larvas de *Spodoptera exigua* se incrementó a un 21.5% a los 11.5 meses cuando lo comparamos con la mortalidad producida por el virus crudo a los 11.5 meses (Gráfica 3).



**Gráfica 3.** Porcentaje de mortalidad producida en larvas de *Spodoptera exigua* por el virus SeVPN formulado en polvo mantenido en refrigeración a 18°C. Campus Agropecuario, UNAN-León, 2004



**Gráfica 4.** Porcentaje de mortalidad producida en larvas de *Spodoptera exigua* por el virus formulado en polvo y mantenido a temperatura ambiente ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ). Campus Agropecuario, UNAN-León, 2004.

En cambio cuando se compara el virus crudo después de 7.5 meses de formulado, con la mortalidad producida del virus formulado después de 7.5 y mantenido a  $28^{\circ}\text{C}$ , la disminución de la mortalidad producida en las larvas de *Spodoptera exigua* se incrementó a un 25.4 % disminuyendo aún más el porcentaje de mortalidad hasta un 32.5 % a los 11.5 meses.

Este mismo comportamiento ha sido reportado para diferentes tipos de formulaciones de virus, en donde las temperaturas cálidas ( $30^{\circ}\text{C}$ ) ambientales han reducido significativamente la actividad residual del virus (Behle *et al*, 2003).

Existe una tendencia a disminuir el porcentaje de mortalidad en la medida que pasa el tiempo, independientemente de la temperatura de almacenamiento, como se observa en las gráficas 1 y 2.. Sin embargo, comparten igualdad estadística mostrando una clara diferencia con el virus crudo mantenido en temperatura de congelamiento durante el período de la investigación, como se muestra en la Tabla 2 al realizar la prueba de Turkey para detectar las diferencias entre los tratamientos.

**Tabla 2.** Promedios de porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera exigua* alimentadas con hojas de ajonjolí asperjadas con el formulado de virus almacenado por diferentes períodos de tiempo. Campus Agropecuario, 2004.

Formulado	Porcentaje de mortalidad		
	7.5 meses	8.5 meses	11.5 meses
Virus crudo	100 <sup>abcdef</sup>	100 <sup>abcdef</sup>	97.2 <sup>abcdef</sup>
Virus formulado y mantenido a 18°C	89 <sup>befg</sup>	75.5 <sup>aghi</sup>	75.7 <sup>aghi</sup>
Virus formulado y mantenido a 28°C	74.6 <sup>aghi</sup>	74.5 <sup>aghi</sup>	64.7 <sup>ghi</sup>

\*Medias seguidas por la misma letra comparten igualdad estadística

Por otro lado, en la Tabla 3, se muestra el conteo de Cuerpos de inclusión poliedral realizado al virus crudo y al virus recién formulado muestra que hay una pérdida de CIP del orden de un exponente, lo que puede ser provocado por el recalentamiento del virus en el proceso del molido. No obstante los conteos realizados posteriormente no reflejan una mayor disminución.

Tabla 3. Concentración del virus después de formulado y en el momento de la aplicación en el campo. Campus Agropecuario, UNAN-León, 2004.

Tratamiento	Concentración del virus recién formulado (CIP/ml)	Concentración antes de la aplicación (CIP/gr)
Virus liquido (crudo)	2.5 x 10 <sup>10</sup>	
Virus formulado en polvo recién formulado	2.45 x 10 <sup>9</sup>	
7.5 meses 18°C	-	<b>7.4 x 10<sup>9</sup></b>
7.5 meses 28°C	-	3.6 x 10 <sup>9</sup>
8.5 meses 18°C	-	<b>9.3 x 10<sup>9</sup></b>
8.5 meses 28°C	-	6.5 x 10 <sup>9</sup>
11.5 meses 18°C	-	<b>6.2 x 10<sup>9</sup></b>
11.5 meses 28°C	-	5.2 x 10 <sup>9</sup>

## VI. CONCLUSIÓN

- La actividad del virus formulado disminuye en un rango de 11 a 32.5% con respecto al virus crudo mantenido en congelación.
- La temperatura de refrigeración (18°C) mantiene más estable la actividad biológica del virus formulado en un rango de 89 % - 75.6 % de mortalidad en larvas de *Spódoptera exigua*. Por lo que el virus formulado y mantenido en refrigeración debe almacenarse por un período no mayor de 11 meses.
- La temperatura ambiental de 28°C disminuye en mayor grado (64.7%), la actividad biológica después de 11 meses de almacenamiento del formulado, que la temperatura de refrigeración. Por lo tanto, el virus formulado y mantenido a temperatura ambiente debe almacenarse hasta por un período no mayor de 8 meses.
- La concentración de Cuerpos de Inclusión Poliedral se disminuye durante el proceso de formulación

## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar evaluando la pérdida de viabilidad del virus formulado, con otros períodos de tiempo para dar una adecuada recomendación de su uso en el campo.
- Desarrollar y evaluar otro tipo de formulación que mejore la actividad del virus para su uso en el campo.
- Realizar estudios sobre otros tipos de material inerte y aditivos que le confieran mayor estabilidad de la actividad biológica después de almacenado.
- Realizar estudios de costos de producción del virus formulado con caolín para determinar la factibilidad económica del mismo.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. **ALVES B. S.** 1986. Controle Microbiano de Insetos.. Editora Monole, Sao Pablo, Brasil.407p.
2. **BEHLE, R.W., TAMEZ-GUERRA, P. Y McGUIRE, M. R.** 2003. Field Activity and Storage Stability of *Anagrapha falcipera* Nucleopoliedrosis (AfNPV) in Spray-Dried Lignin-Based Formulations. *Journal Economic Entomology* 96(4): 1066-1075.
3. **BUSTILLO. A. E.** 1986. Utilización de agentes microbiológicos. In Manejo integrado de plagas insectiles en la agricultura.
4. **COUCH, T.L. AND IGNOFFO, C. M., 1980.** Formulation of insect pathogens. In *Microbial Control of pest and plant disease 1970-1980*. Ed. Burges, H. D. Editorial Academic press. London. P 621-634.
5. **DEBACH, P.** Control Biológico de Plagas y Malas Hiervas. Editorial Revolucionaria, Cuba. Tomado de la 1ª ED. 1968. 949p.
6. **ENTWISTLE, P. F Y EVANS H. F.** Viral Control In *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology* Kerkur and Guiller Eds. Vol. 12 1985.
7. **EVANS, H. F. Y ENWISTRLE, P. F.** Viral Diseases. In *Epizootiology of insect diseases*. Fuxa, J. R and Tanada , Y. Eds., John Wiley y Sons, Inc. 1987.
8. **FERNÁNDEZ L. V., O.** Control de calidad de los insecticidas microbianos. Capacitación impartida en el proyecto fitosanitario NOQ – CATIE 16t2..
9. **FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION Y ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD.** 1974. El empleo de virus para combatir plagas de insectos y vectores de enfermedades.

10. **GARCÍA R. E. Y SUÁREZ, B.** [en línea] Las Arcillas: propiedades y usos. Una guía [on line]. In Yacimientos Minerales. Revisado en noviembre 2004. [www.uclm.es/users/higueras/yymm/Arcillas.htm](http://www.uclm.es/users/higueras/yymm/Arcillas.htm).-64k
11. **MARTINEZ, R Y SWEZEY, 1985.** Prueba de una formulación VPN Baculovirus Heliothis contra larvas de Helicoverpa zea en cultivos comerciales del algodón en Nicaragua 1983. In memoria de resumen UNAN-DGTA-CEA. León.
12. **McGUIRE, M. y TAMEZ- GUERRA, P.** Bioactive agents Research, National center for Agricultural Utilization Research USDA- ARS 1815 N. University St. Peoria IL. USA. 61600- 3999.
13. **NARVÁEZ, C.,** 1993. Informe de prueba de validación del virus de la Poliedrosis Nuclear para el control de *Spodoptera exigua* en Sébaco UNAN –LEON.
14. **NARVÁEZ, C Y CASTILLO, P.** Uso de Virus de la Poliedrosis Nuclear para el control de *Spodoptera exigua* en el Cultivo de Cebolla. Primer Congreso Regional. Manejo Integrado de Plagas. Matagalpa – Jinotega, mayo 1997 13p
15. **PROYECTO DE CAPACITACIÓN EN MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS PARA PEQUEÑOS PRODUCTORES EN NICARAGUA.** Manejo Integrado de Plagas de Cebolla, Centro de Recursos didácticos, El Zamorano, Honduras /USAID-Nicaragua.
16. **SAUNDERS, J.L. Y KING, A. B.** Las Plagas de invertebradas de Cultivos Anuales Alimenticios en Centro América. Segunda ED. Turrialba, Costa Rica, 1998.

17. **RIZO, C. Y NARVÁEZ, C.** Uso de virus para el control de plagas. Revista de Manejo integrado de plagas. No 61. Turrialba, Costa Rica, Septiembre 2001. 90-95p.
  
18. **RÍOS P. 1999.** Estación experimental agrícola, Conjunto tecnológico para la producción de cebolla. Universidad de Puerto Rico, Colegio de ciencias agrícola. Pág., 33 pp.



# ANEXOS







Larvas de *Spodoptera exigua* muerta después de la aplicación del virus formulado.



Moliendo el virus formulado de *Spodoptera exigua*



**Molida del virus de *Spodoptera exigua* formulado con caolín**

## Hoja de toma de datos.

Tratamiento \_\_\_\_\_ Repetición \_\_\_\_\_ Especie \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_ .

Numero de larvas	Virus	hongo	Bacteria	otros	pupa
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

# DISEÑO DE CAMPO

RIV									RIII									RII					RI															
5	3	8	4	2	1	6	7	9		3	4	6	9	8	1	2	5	7		4	3	2	6	9	8	5	7	1		3	4	6	9	2	1	7	8	5

