

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS**

Departamento de Agroecología



Actividad bioinsecticida de dos formulaciones a base de Oxido de zinc y Glicerina, del Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (SfVPN), aplicado en el cultivo de maíz y evaluado en laboratorio, durante abril a noviembre del 2006. Campus Agropecuario, UNAN-LEON.

Monografía presentada como requisito previo para optar al título de Ingeniero en Agroecología Tropical.

Presentado por:

**Br. José Benito Lovo Rivera
Br. Denis Rubén Morales Pérez**

Tutora: MSc. Carmen Marina Rizo

León, septiembre del 2007

INDICE GENERAL

ÍNDICE 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	5
4.2 Manejo Integrado de Plagas	5
4.2.1 Control Biológico	5
4.2.2 Control Microbial	6
4.3 Virus entomopatógenos.....	6
4.4 Virus de la Poliedrosis Nuclear.....	7
4.5 Producción de virus	12
4.6 Almacenamiento	13
4.7 Control de Calidad	14
4.8 Formulación	14
4.9 materiales usados para formulación	18
V. MATERIALES Y METODOS.....	20
5. Elaboración de los formulados.....	20
5.1.1 Elaboración del formulado líquido (Virus Crudo más Glicerina).....	20
5.1.2 Elaboración del formulado polvo (caldo, Virus mas oxido zinc).....	20
5.2 Aplicación en el campo en el cultivo de maíz (Zea mays) para determinar la actividad biológica de los formulados	21
5.2.2 Aplicación del virus en el cultivo.....	22
5.2.3 Evaluación de la actividad biológica del virus	22
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
VII. CONCLUSIONES.....	30

VIII. RECOMENDACIONES.....	31
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	32
X. ANEXOS.....	34

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a nuestro Señor Jesucristo, por ser fuente de confianza y brindarnos sabiduría y así finalizar este extenso trabajo que ha llegado a su fin.

A nuestras familias quienes con mucho esfuerzo y sacrificio han sido la base de nuestra educación y quienes con espíritu emprendedor, son dignos ejemplos a seguir para ser mejores cada día.

A nuestra tutora **MSc. Carmen Marina Rizo**, quien con sus conocimientos, paciencia, esfuerzo y dedicación nos guió hacia la culminación de una mas de nuestras metas, no teniendo las palabras para agradecerle, cariñosamente decirle **GRACIAS**.

A nuestros profesores y todas aquellas personas que con su esfuerzo y su generosa entrega contribuyeron en la labor auténtica de una formación ética, científica y moral.

A nuestra alma mater **UNAN-León**, por habernos brindado las condiciones y el medio para forjar poco a poco lo que hoy es nuestra carrera finalizada, haciendo de nosotros personas de bien y provechosas.

A nuestros compañeros que con su afecto incondicional nos han acompañado siempre en la edificación de nuevos y mejores senderos, para el cumplimiento de nuestras propias metas.

DEDICATORIA

Dedicamos primeramente a Dios por habernos brindado fuerza, sabiduría y voluntad para la realización de este trabajo y culminar con éxito nuestra carrera.

Tengo plena satisfacción de dedicarle este trabajo a:

A mi Señor Jesucristo por ser mi fuente de confianza para darme un poco de su sabiduría y así recorrer este largo y extenso trabajo que ha llegado a su fin.

A mis padres Erlinda Rivera Rocha que en paz descanse y Juan Agustín Lovo Aguilar por haberme dado su apoyo incondicional.

A mis queridos hermanos que siempre colocaron cada uno un poco de su ayuda incondicional, no teniendo las mejores palabras para agradecerles que yo siguiera adelante.

A mis amigos, que con su afecto, sus consejos me acompañaron siempre en la edificación de nuevos y mejores senderos.

José Benito Lovo Rivera

A Dios por darme vida y a todos los que me rodean, por darme confianza, fuerza y voluntad para seguir adelante siempre.

A mis padres Juana Pérez y Daniel Morales por haberme brindado su apoyo, confianza y comprensión.

A mis hermanos que siempre me apoyaron y motivaron para seguir adelante siempre y así culminar este trabajo.

A mis amigos que siempre me apoyaron y me motivaron para seguir adelante siempre en la edificación de nuevos y mejores senderos.

Denis Rubén Morales Pérez

RESUMEN

El virus de la poliedrosis nuclear es una alternativa viable para la regulación del gusano cogollero en el maíz. El propósito de este estudio fue determinar la actividad biológica de los formulados de Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (VPN), a base de Oxido de zinc y Glicerina almacenados por un período de seis meses en dos condiciones de temperatura. El estudio se realizó en dos momentos: 1. elaboración de los formulados; 2 aplicación en campo de cada formulado y evaluación en condiciones de laboratorio en larvas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda*. Los tratamientos evaluados fueron: virus crudo (testigo), virus formulado con glicerina, virus formulado con óxido de zinc, cada uno de los formulados fue almacenado en dos condiciones de temperatura, ambiente (30°C) y en refrigeración (18°C) y evaluados al mes, cuatro meses y seis meses de almacenamiento. Cada tratamiento fue aplicado en el cultivo de maíz . Para ello se realizó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 4 repeticiones. La dosis que se utilizó para todos los tratamientos fue de 700 LE/Mz. Las aplicaciones de los diferentes tratamientos en el campo se realizaron a las 7 de la mañana, 3 horas después se cortaron las hojas y se trasladaron al laboratorio, se colocaron en platos petri y se agregaron 2 larvas de segundo instar de *Spodoptera frugiperda* proveniente del laboratorio de cría de Noctuidos, 24 horas después se trasladaron en tasas individuales con dietas. De 6 a 7 días después se obtuvo un porcentaje diferente de mortalidad en todos los tratamientos; en el tratamiento recién formulado muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos, el virus crudo produjo una mortalidad de 47.5%, el virus con glicerina de 37.5% y el virus con óxido de zinc 35%. Esta mortalidad fue similar en los siguientes meses evaluados, por lo que no se observaron diferencias entre las dos formulaciones y la temperatura de almacenamiento, aunque se observó una tendencia de mayor mortalidad de 60 y 62.5% en el formulado con óxido de zinc mantenido tanto a temperatura refrigerada como ambiente. El análisis de varianza indica que no existe diferencia significativa a un nivel de significancia de 0.05 entre los tratamientos estudiados.

I. INTRODUCCION

La agricultura se ha desarrollado a través del tiempo con nuevas tecnologías en áreas extensas de cultivo, con el fin de satisfacer las necesidades de una población creciente; sin embargo, con el manejo que se ha venido dando a los recursos agrícolas en particular el uso intensivo de insecticidas ha conducido al desarrollo de resistencia de las plagas, así como, el resurgimiento de plagas secundarias, y la contaminación ambiental, lo que ha provocado un desequilibrio en todos los agroecosistemas, haciendo que estos se degraden.

El cultivo de maíz, en Nicaragua es uno de los más importantes, pues es parte de la dieta diaria. Una de las plagas claves del maíz es el gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Los agricultores pueden realizar un promedio de 6 aplicaciones de insecticidas químicos para controlar éstas poblaciones.

Por esa razón se han buscado alternativas ecológicas que contribuyan al desarrollo de una agricultura sostenible, una de ellas es el control biológico de plagas donde se hace uso de depredadores, parasitoides, bacterias, hongos y virus entomopatógenos para el control de plagas.

En Nicaragua la UNAN – LEÓN desde 1986, ha estado trabajando en el desarrollo del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN). Actualmente se dispone de laboratorios para la producción de virus nativo, aislados de diferentes especies como *Spodoptera frugiperda*, *S. exigua* y *Spodoptera sunia*. Todos ellos han sido usados por los agricultores en forma cruda, macerando las larvas muertas por virus y adicionando agua, o sea sin ningún aditivo o material inerte, lo que dificulta su uso, especialmente para los pequeños agricultores, pues requiere ser congelado para que no pierda su actividad biológica y por tanto la capacidad de enfermar y matar a las larvas huéspedes.

Por otro lado, al formular el virus con materiales inertes es importante mantenerlo almacenado en condiciones óptimas sin pérdida de virulencia y por un período de tiempo adecuado para permitir la comercialización. Por esta razón es necesario probar diferentes

aditivos o ingredientes inertes que puedan ser usados para formulaciones en polvo o líquidas.

Una de las primera etapas en el desarrollo de una formulación de un insecticida viral es la prueba en condiciones de laboratorio y posteriormente de campo, que permita evaluar la estabilidad de la actividad biológica durante el almacenamiento. La prueba de campo permite conocer el efecto del almacenamiento en la sobrevivencia y patogenicidad del virus, y la protección que los materiales inertes le confieren para una mayor resistencia a las condiciones adversas de campo, para luego seleccionar el que mantenga la virulencia y patogenicidad, esperando así brindar a los agricultores un producto eficaz para la regulación de las poblaciones de *Spodoptera frugiperda*.

Esto permitirá la utilización del mismo como un insecticida microbial efectivo para el control de la población de *Spodoptera frugiperda*, asegurando de esta manera un mejor manejo en el cultivo de maíz.

Por ello el estudio se plantea con el objetivo de evaluar la eficacia de diferentes formulaciones virales usando oxido de zinc y glicerina, aplicado en condiciones de campo y evaluado en laboratorio. Los resultados contribuirán a desarrollar una alternativa ecológica para el manejo integrado de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz y su uso contribuirá a la sostenibilidad y a la restauración de los agroecosistemas.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad biológica de dos formulados de Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera frugiperda* (SfVPN), a base de oxido de zinc y glicerina, bajo condiciones de campo y laboratorio por un período de seis meses .

Objetivos específicos

- Elaborar dos formulados con el Virus *Spodoptera frugiperda*, *SfVPN*, una en polvo a base de oxido de zinc y la otra líquida a base de glicerina.
- Medir la efectividad del SfVPN formulado y almacenado en dos condiciones de temperatura por un período de seis meses, usando el cultivo de maíz para su aplicación y evaluado en condiciones de laboratorio.
- Comparar la efectividad de cada formulación y período de almacenamiento, mediante el porcentaje de mortalidad producida en larvas de *Spodoptera frugiperda*

III. HIPÓTESIS

Ho: El Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera frugiperda* VPN crudo causa la misma mortalidad en larvas de *S. frugiperda* y se mantiene a lo largo del tiempo, que el virus formulado a base de oxido de zinc y glicerina.

Ha: El Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Spodoptera frugiperda* VPN crudo causa una mortalidad diferente en larvas de *S. frugiperda* que disminuye a lo largo del tiempo, que el virus formulado a base de oxido de zinc y glicerina.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Aspectos Generales

La agricultura es una de las actividades más antiguas que el hombre a desarrollado y constituye una de las fuentes fundamentales de subsistencia; dicha actividad es una de las principales proveedoras de materia prima, siendo utilizadas para la elaboración de diversos productos y subproductos. Sin embargo, las prácticas inadecuadas para el control de plagas, que se han implementado a través del tiempo han 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 papel importante en la disminución de daño económico en los cultivos. No obstante, la toxicidad elevada de algunos de ellos, su residualidad y mal manejo han llevado a un replanteo de las tácticas de control de plagas, dentro de las que encontramos las implementadas por el Manejo Integrado de Plagas, MIP (Lecuona, 1996).

4.2 Manejo Integrado de Plagas

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 el Control Biológico de Plagas, que no es más que la manipulación de los enemigos naturales, depredadores, parasitoides y entomopatógenos (Debach, 1968).

4.2.1 Control Biológico

El Control Biológico desde el punto de vista ecológico es considerado como una fase de control natural, se define como “la acción de parasitoides, depredadores, o patógenos para mantener la densidad de poblaciones de otros organismos a una densidad mas baja que el que existía en su ausencia (DeBach, 1968).

4.2.2 Control Microbial

El control microbiano es la utilización de microorganismos patógenos de insectos, por lo que se les conoce como entomopatógenos, entre ellos se reportan bacterias, hongos, nemátodos y virus. Los cuales regulan la abundancia de un organismo por debajo del nivel que causa un daño económico. Los virus son los más utilizados como agente microbianos de control de plagas. (Alves, 1986).

4.3 Virus Entomopatógenos

Los virus entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos hasta, eventualmente, ocasionar su muerte. Son parásitos intracelulares obligados, pues no pueden reproducirse fuera de la célula huésped, ya que necesitan un organismo vivo para su multiplicación y diseminación (Alves 1986; Evans y Entwistle, 1987).

Son considerados como entidades infecciosas, cuyo genoma está constituido por un ácido nucleico, ya sea ADN o ARN. Necesitan de un organismo vivo, el hospedante para poder multiplicarse y diseminarse en los agroecosistemas. Se presentan naturalmente en forma enzoóticas, esto es causando enfermedades en un número bajo de individuos en la población de insectos susceptibles.

Existen más de 700 virus infectando diversos órdenes de insectos pero, solo algunos virus son candidatos promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos en programas de control de plagas. El grupo o familia de virus más utilizada en el control microbiano de plagas son los Baculoviridae.

4.3.1 Baculoviridae

La familia Baculoviridae, son los virus que presentan el mayor potencial para ser utilizados en el control microbiano, gracias a su especificidad hacia determinadas plagas, su alta

virulencia, la protección extra que le brinda el cuerpo de inclusión y la facilidad de producción.

Este virus consta de un genoma ADN, de doble fila que infecta invertebrados, multiplicándose en los tejidos de los insectos hasta ocasionar la muerte. Son parásitos intracelulares obligados debido a que solo se reproducen en las células del huésped y necesitan de un organismo para su multiplicación y diseminación. (Alves, 1986, Evans y Entwistle, 1987).

La mayoría de los 300 Baculovirus, que han sido aislados de diversos órdenes de insectos y otros artrópodos pertenecen al grupo A de la familia Baculoviridae y son conocidos como Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) (Evans, H. F y Entwistle, 1987).

4.4 Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)

Estos Baculovirus tienen un poliedro cuyo tamaño varía de 0.5 a 15 μm de diámetro y su forma depende de los aislados del que proviene. La matriz de este cuerpo de inclusión está compuesta esencialmente de un polipéptido llamado poliédrina, de un peso molecular de alrededor de 30,000 dalton. Pueden contener hasta 100 viriones por poliedro y solo se multiplican en el núcleo.

La estructura del virus de la poliedrosis nuclear (VPN), consiste de una capa interna de proteína llamada capsida que rodea o protege el ácido nucleico en dos bandas que, en este caso es el ADN. A este conjunto se le denomina nucleocápsida. Este se puede presentar individualmente en su envoltura de lipoproteína por lo que se le denomina simple *sVPN* o bien estar en grupos dentro de ella y se le denomina múltiples o *mVPN*.

4.4.1 Modo de acción

Las partículas virales penetran en el insecto a través de la boca cuando las larvas consumen alimento que está contaminado con los viriones o unidades infecciosas. También, es posible la contaminación a través de los huevos de los insectos por vía interna y externa por

contaminación del corium, de modo que la contaminación de las larvas recién nacidas es facilitada por su hábito de comer el corium de los huevos. Posteriormente, los poliedros ingresan al intestino. El sitio principal para la unión y entrada de las partículas virales son las células epiteliales del intestino medio.

Las partículas (Poliedros) que llegaron al intestino de las larvas se disuelven por acción del jugo digestivo altamente alcalino (pH de 9.5 a 11.5), resultando en la liberación de la partícula viral o virión, lo cual constituye la infección primaria. Esta partícula viral se fusiona con las membranas de las microvellosidades del intestino y de los núcleocápsides y se libera el ADN y comienza la replicación del virus.

El ADN viral es la plantilla para replicar el nuevo ADN (genoma viral). El virus toma el control de los mecanismos para la producción de macromoléculas celulares (polipéptidos y ácidos nucleicos.) y los utiliza para la producción de nuevas partículas virales. La progenie del virus se libera en el hemocelo y pasa de una célula a otra, convirtiendo al insecto en un saco de virus. A partir del sexto día, ocurre la muerte del insecto dependiendo de la especie, con la siguiente rotura del integumento. Finalmente se presenta la liberación y dispersión de las partículas virales. Los principales tejidos atacados son: tejido adiposo, epidérmico, matriz traqueal, glándulas salivares, tubo de malphigy, y células sanguíneas (Rizo y Narváez, 2001).

4.4.2 Ecología de los virus

4.4.2.1 Dispersión y Persistencia

La radiación solar y el fotoperíodo son muy importantes para preservar la actividad biológica de los virus, porque la luz ultravioleta mata las partículas virales (ADN). En algunos casos, la temperatura del suelo es importante para la sobrevivencia del virus. La persistencia del virus en el ambiente se da por medio del follaje de las plantas y del suelo. También pueden persistir en el mismo hospedante (Evans, H. F. y Entwistle, 1987).

Los cadáveres de las larvas muertas representan una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles presentes en un cultivo. También al avanzar el ciclo de cultivo, tanto el agua

de lluvia, como las larvas caídas al suelo, transportan las partículas virales hasta el suelo, donde permanecen y serán el inóculo inicial para futuras infecciones.

La dispersión del inóculo ocurre por medio de factores abióticos y bióticos. Los factores abióticos más importantes son el viento, lluvia riego, laboreo, entre otros y los factores bióticos como parásitos, depredadores, adultos del hospedante, detritívoros y aves (Alves, 1986).

4.4.3 Factores que influyen sobre la eficiencia de los virus aplicados en el campo

a) El inóculo del virus

La variabilidad genética en poblaciones de virus en el campo puede ser traducida en grandes variaciones de la virulencia a su hospedante. De modo que la primera etapa para la utilización en el campo es la selección de aislados naturales basándose en su virulencia o sea la mortalidad y tiempo de acción para el insecto plaga. El virus seleccionado por su virulencia debe ser multiplicado y servir como un patrón de referencia. Este procedimiento disminuye las posibilidades de pérdida de virulencia por el continuo passage (Moscardi y Sosa-Gómez, 1996).

b) Dosis del patógeno

La dosis eficiente del virus para la aplicación en campo constituye un factor importante para el empleo adecuado. Puede resultar en un fracaso si no se considera la densidad y la edad de la población en el campo, la desactivación por la luz solar, persistencia, hábito del hospedante y fase fenológica del cultivo. Por ello hay que analizar la eficiencia en base a una diversidad de situaciones y seleccionar la dosis que proporcione los mejores resultados.

Por otro lado, se ha discutido mucho sobre como se determina la dosis aplicada. La mayoría de los autores utilizan la dosis de virus entomopatógenos como larvas equivalentes (LE), la cual es válida pero muy variable dependiendo de los criterios utilizados y el material usado, resultando en cantidades de partículas virales variables. Por ello se recomienda usar el número de CIP por larva que se utilizan en el cultivo.

Una LE es una larva muerta en su último estadio larval que contiene 10^9 unidades internacionales, variando de acuerdo al aislamiento viral. Para *Spodoptera frugiperda*, en Nicaragua se utiliza una dosis de 708 LE/ha (Rizo y Narváez, 2001).

Alves (1996), sugiere que cuando las infestaciones de larvas son elevadas o hay larvas de diferentes instares, es recomendable aplicar una dosis alta al inicio y después aplicar dosis mas bajas según la densidad poblacional de la plaga, con el objetivo de mantener el inóculo en el campo.

c) La Radiación solar

La radiación solar, principalmente la del espectro ultravioleta, se ha señalado como el principal factor de desactivación de los virus. El VPN posee una mayor capacidad de persistencia en el ambiente que los virus de partículas libres (Jackes, 1972). Se ha demostrado que longitudes de onda entre los 280 y 300nm inactivan los baculovirus. De esta manera los virus aplicados en el campo pueden ser desactivados rápidamente, variando entre 2 a 5 días. Por otro lado también depende del cultivo y de la estructura de la planta, del lugar donde el patógeno fue depositado y de la dosis utilizada.

d) Temperatura

La temperatura no ejerce aparentemente un efecto directo significativo sobre los virus asociados a cuerpos de inclusión, particularmente los baculovirus en los rangos que 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, citado por Moscardi y Sosa-Gómez, 1996). En cambio cuando se considera su asociación con el hospedante, puede ocurrir inhibición del proceso infectivo tanto en temperaturas bajas como en temperaturas elevadas.

e) Humedad

Es uno de los factores que tiene poco efecto sobre la eficiencia y estabilidad de los virus de insectos, en cambio la alta humedad facilita la diseminación del virus presente en las larvas muertas, como resultado 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 lluvia (Moscardi, y Sosa-Gómez, 1996). En cambio, en periodos de sequía 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. La lluvia generalmente no reduce significativamente la cantidad y actividad del depósito de virus sobre las hojas u otras partes de la planta.

f) Sustrato

La eficacia de aplicaciones en el campo y la persistencia del mismo están estrechamente relacionadas 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 y distribución espacial evitan la penetración mayor de los rayos solares en su interior lo que propicia mayor persistencia y actividad viral. (Jaques, 1972)

g) Edad y hábitos de la población del hospedante

En la edad adulta los insectos son generalmente resistentes a los virus, aunque pueden transmitirlo a su progenie. En la fase larval son más susceptibles y tienden a ser más resistentes en la medida que avanza en su desarrollo. Por ello la estructura de edad de una población en el campo es un factor limitante para el éxito de una aplicación de virus. Y se debe aplicar cuando las larvas tienen un tamaño no mayor de 1.5 cm. Con respecto al hábito alimenticio es importante conocer en que etapa de la plaga está expuesta, como el caso de *Spodoptera frugiperda* y *Helicoverpa zea* en maíz

h) Equipos y técnicas de aplicación

En general, para la mayoría de las especies plagas, una cobertura adecuada de plantas es un factor fundamental para una aplicación eficiente, ya que éste debe ser ingerido para actuar sobre la plaga hospedante. La cobertura, por otro lado, es afectado por el tamaño de gota y el volumen del vehículo utilizado (agua, aceite, etc). Otros factores como la formulación, viscosidad del líquido, altura de la aplicación, presión velocidad del viento, tipo de planta

también influyen en gran medida sobre la calidad de la cobertura y por tanto sobre la eficiencia de aplicación de virus. En relación a los equipos se ha demostrado que la aplicación con equipos terrestres son más eficientes que los aéreos.

4.5 Producción de virus

La producción de virus entomopatógenos **in vivo**, con la utilización del hospedante original, es la práctica más empleada. El desarrollo de dietas artificiales ha permitido la producción masiva de estos virus.

La metodología de producción que se utiliza actualmente en el laboratorio de la UNAN, está basado en los resultados de evaluaciones sobre concentración de virus y sobre el instar larval más adecuado para obtener una larva equivalente con una producción de seis unidades virales (10^9 cuerpos poliédricos de inclusión (CIP) /LE). (Rizo y Narváez, 1996)

Se coloca la dieta semilíquida sobre el recipiente utilizado para la producción, donde permanece hasta su solidificación; cuando está completamente fría se procede a inocular con una solución viral, luego se colocan las larvas. De tres a seis días después se procede a examinar las larvas que mueren por efecto del virus y se almacenan en recipientes de plástico, los cuales se le coloca la información necesaria (nombre del virus, número de LE, fecha de inoculación y de cosecha). Cada larva equivalente producida en el laboratorio debe contener una concentración adecuada de CIP por ml de solución viral.

4.5.1 Producción a campo

La producción a campo tiene como objetivo principal obtener virus en grandes cantidades y producirlo a bajo costo. Uno de estos métodos que involucran menores costos, es la producción sobre poblaciones que ocurren naturalmente durante el ciclo del cultivo.

4.5.2 Producción en laboratorio

a) producción en gran escala

Se debe disponer de una cría masiva del hospedante susceptible, con todas las etapas de cría, inoculación, incubación y producción sincronizadas entre si, para mantener un flujo continuo el proceso de producción. Estas instalaciones para la producción de virus deben estar apartadas y aisladas de las áreas donde se realiza la cría masal de los laboratorios donde se elabora la dieta. El personal que manipula el material contaminado con virus no debe tener acceso a la sala de cría.

b) Producción en escala experimental

En escala experimental se limita a aquellos hospedantes cuyo ciclo de vida no se completa en laboratorio, cuando los costos de producción son altos o cuando es necesaria la multiplicación con elevada pureza, realizándola entonces sobre cultivos de tejidos.

4.5.3 Producción combinando laboratorio y campo

Esta producción combinada consiste en liberar larvas criadas en laboratorio sobre plantas tratadas con virus de la poliedrosis nuclear y colocadas en el interior de jaulas de campo (Moscardi y Oliveira, 1984, citado por Lecuona, 1996).

4.5.4 Producción en sistemas *in Vitro*

Esta producción se basa en técnicas empleadas para la producción del cultivos de células de insectos, teniendo la ventaja de permitir mejor control de calidad del producto, por que el virus es producido en un sistema libre de contaminantes (Lecuona, 1996).

4.6 Almacenamiento

En forma general, los VPN se almacenan congelados (-18° -4°C), para evitar la degradación del producto. Una vez congelado, la actividad insecticida permanece por años. Inclusive en refrigeración se conserva la mayor actividad biológica del virus. La sabiduría convencional podría sugerir que el secado de productos virales podría mejorar la conservación de los mismos a temperatura ambiente. Sin embargó, en experiencias prácticas se ha visto que los virus que se almacenan secos, generalmente continúan

perdiendo actividad. Es necesario realizar trabajos de investigación en estas áreas 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 la formulación (Behle, R. W. y Tamez Guerra, P, 2003).

4.7 Control de calidad

El control de 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 en el proceso de formulación (Lecuona, 1996).

4.8 Formulación

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

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 en una telilla de muselina para evitar que las cápsulas cefálicas obstaculicen las boquillas de la bomba de aplicación. Esta es la formulación que actualmente elabora la UNAN-León y es utilizada por los productores de Nicaragua (Rizo y Narváez, 2001).

4.8.1 Componentes en toda formulación

Se distinguen tres tipos: a) el principio activo, una molécula química o un microorganismo o sus toxinas en el uso de bioisecticidas; b) diluyente o vehículo, que puede ser sólido o líquido, es un material inerte; y c) adyuvante que son materiales inertes, pero que tienen acciones protectoras, dispersantes y adherentes, etc.

4.8.2 Formulaciones más comunes de productos fitosanitarios sintéticos

a) Concentraciones líquidas

Son formulaciones líquidas cuyo contenido principio activo esta directamente relacionado con la dosis a utilizar, son aplicaciones con o sin diluyentes. Generalmente se le agrega agua, utilizando equipo especial para aplicarlos. Las gotas producidas ultra bajo volumen (UBV), no se evaporan como sucede con la emulsión acuosa. El calibrage de los equipos y las aplicaciones debe de ser realizado muy cuidadosamente, sobre todo cuando se utilizan formulaciones de alta concentraciones de principio activo. Normalmente, se emplean en tratamientos con equipos aéreos.

b) Polvo para espolvorear

El ingrediente activo se encuentra disperso en material inerte sólido, las concentraciones de ingrediente activo generalmente es de 1% a 20%, se recomienda para usar en lugares secos, con poco agua disponible o un ambiente con poca humedad. Generalmente son partículas de menos de 30 mm de diámetro los materiales más utilizados son: arcilla, minerales, sílice, distomita, etc.

c) Polvo humectantes

Es un polvo capaz de humedecerse y mantenerse en condición 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 de 50% a 80% de la formulación lo constituye el ingrediente activo, 15% a 45% el diluyente y entre 1% a 10% el dispersante, el agente humectante entre 3% y el 5%.

Se presenta como partículas muy pequeñas en las cuales se adhieren las estructuras de los microorganismos. La mayoría de las partículas son mayores de 5 micras y todas deben ser mayores de 44 micras, se emplea generalmente arcilla, sílica, gel, tierra diatomeas y caolín.

d) Granulados

Son formulaciones sólidas que se aplican directamente al suelo; tienen formas de gránulos con tamaño de 0.2 a 0.5 mm, presentan de 5% a 20% de principio activo, de 80% a 95% de soporte y de 1.5% de adherente. Se emplean preferiblemente contra insectos de suelo y acuáticos, con una formulación especial. La formulación más utilizada es la mezcla con aceites y emulsificantes.

e) Concentraciones emulsificantes

Muchos principios activos no son solubles en agua pero pueden disolverse en diferentes solventes orgánicos, aromático o alifáticos, normalmente se les ha denominado hasta ahora como líquidos emulsificantes. Estos productos llevan como soporte un solvente y la sustancia acompañante mejora sus características.

Los solventes no son solubles en agua y se mezclan con ella con dificultad, pero la presencia de los emulsificantes permite que se puedan mezclar en forma muy homogénea formando emulsiones de aspecto lechoso. Una vez hecha la emulsión es necesario mantener cierta agitación para mantener la homogeneidad de la misma dentro del tanque 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.) puede manipularse con facilidad, pero por ser líquido representa algunos riesgos para operarios.

f) Concentraciones solubles

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

4.8.3 Criterios para la formulación de un bioplaguicida

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 efectividad y eficacia. Estas desventajas deben ser resueltas en gran medida mediante la preparación de la formulación, para lo cual el ingrediente activo, una vez obtenido, se mezcla con los diferentes componentes (Fernández, O, 2002).

4.8.3.1 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, las formulaciones deben de ser apropiadas para proteger al virus de los factores abióticos que afectan la supervivencia y actividad biológica. Por ello el proceso debe de 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 la estabilidad en el almacenamiento. Existe una amplia variedad de posibilidades para los formulados como: polvos, polvos humedecibles y suspensión concentradas. El desarrollo de una formulación a partir de formulados resulta similar a la de un insecticida químico (Fernández, O, 2002).

Un insecticida microbiano además de ser económico debe de satisfacer algunos requerimientos comerciales y de aplicación en condiciones de campo. Uno de los aspectos que debe 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, aumentar la persistencia a las condiciones ambientales (lluvia, temperatura, radiación, etc.) y facilitar la aplicación.

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

4.9. Materiales usados para formulación

4.9.1 Glicerina

La glicerina es un líquido espeso, neutro, de sabor dulce, que al enfriarse se vuelve gelatinoso al tacto y a la vista, y que tiene un punto de ebullición alto. La glicerina puede ser disuelta en agua o alcohol, pero no en aceites. Por otro lado, muchos productos se disolverán en glicerina más fácilmente de lo que lo hacen en agua o alcohol, por lo que es, también, un buen disolvente.

La glicerina es también altamente "hidroscópica", lo que significa que absorbe el agua del aire. Por ejemplo: si deja una botella de glicerina pura expuesta al aire en tu cocina, tomará humedad del aire y se convertirá, con el tiempo, en un 80% de glicerina y un 20% de agua.

A causa de esta cualidad hidroscópica, la glicerina pura al 100% puesta en la lengua puede causar una ampolla, ya que es deshidratante. Diluída en agua, sin embargo, la glicerina suaviza tu piel. Se dice que esta acción suavizante es el resultado de que la glicerina atraiga la humedad.

Pero la glicerina también tiene una amplia gama de aplicaciones en formulaciones farmacéuticas; se usa como vehículo y disolvente de diversos principios activos, como conservador en algunas formulaciones líquidas y como plastificante en el recubrimiento de comprimidos. Se incluye a menudo en preparaciones tópicas como gotas oculares, cremas y lociones debido a su efecto lubricante.

Sus efectos adversos cuando se administra por vía oral e intravenosa se deben principalmente a su acción deshidratante. Por vía oral puede causar dolor de cabeza, náuseas, vómitos y menos frecuente diarrea, mareos y confusión mental.

4.9.2 Óxido de cinc (no micronizado) puede ser usado para la curación de heridas porque es un polvo absorbente, astringente y ligeramente antiséptico.

V. MATERIALES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Control Biológico de producción de virus del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos (CIRCB), del Campus Agropecuario de la UNAN – León, ubicado a 1 ½ Km carretera La Ceiba, al este de la ciudad de León, en el período de mayo a febrero del 2006 - 2007.

El estudio se realizó en dos fases, la primera consistió en la formulación de virus usando dos materiales inertes, oxido de zinc y glicerina; la segunda consistió en la evaluación de la actividad biológica aplicando el virus formulado y almacenado, en diferentes condiciones de temperatura, en el cultivo de maíz (*Zea mays*) y evaluado en larvas de *Spodoptera frugiperda* en condiciones de laboratorio.

5. Elaboración de los formulados

5.1.1 Elaboración del formulado líquido (Virus Crudo más Glicerina)

Se tomaron dos lotes, el primero de 140 LE y el segundo de 18 LE de la producción del laboratorio y se procedió a macerar, para ello se le agregó 7ml de agua destilada y luego se filtró con una tela de organdí, obteniendo una solución total de 23 ml. De la solución total se utilizó 10.35 ml mezclándolo con glicerina en una proporción de 1:1 (volumen / volumen). La mezcla se realizó en una probeta obteniendo un volumen total de 20.70 ml de Virus crudo más Glicerina. Este se guardó en 8 frascos debidamente rotulados con nombre del formulado, fecha de formulación y fecha de evaluación (tiempo de almacenamiento), cuatro de ellos se mantuvieron a temperatura ambiente $\pm 30^{\circ}\text{C}$ y los otros cuatro a temperatura de refrigeración $\pm 18^{\circ}\text{C}$.

5.1.2 Elaboración del formulado en polvo (Virus crudo más Oxido de zinc)

Para la formulación del caldo se mezcló virus crudo con Oxido de zinc en proporción 1: 1 (peso / peso). Se tomaron tres lotes de 44 LE de 37 LE y 50 LE, respectivamente, producidos en el laboratorio, para un total de 131 LE. Luego se procedió a macerar y se

agregó 7ml de agua destilada para su filtrado en una tela fina de organdí, evitando el paso de restos de larvas. Se obtuvo una solución de 20 ml de Virus crudo.

De la solución obtenido de VPN se utilizaron 10.35 ml, mezclando el ingrediente inerte oxido de zinc más virus en una proporción de 1:1 (peso/peso.). A esta mezcla se le adiciono agua destilada hasta obtener una pasta homogénea blanda de coloración blanca, la cual se colocó sobre una bandeja que contenía plástico negro, extendiendo la pasta sobre éste de manera que quedó de 2 mm de espesor, luego se recubrió con tela organdí y se colocó una lámpara con luz para el proceso de secado. Después del secado, se procedió a moler en un molino manual para obtener el formulado de Virus más Oxido de zinc en polvo. Se obtuvo un peso total de 9.94 gr. Inmediatamente se procedió a almacenar en 8 frascos diferentes debidamente rotulados con el nombre del formulado, fecha de evaluación y diferentes condiciones de almacenamiento (temperatura ambiente $\pm 30^{\circ}\text{C}$ y temperatura refrigerada $\pm 18^{\circ}\text{C}$).

5.2 Aplicación en el campo en el cultivo de maíz (*Zea mays*) para determinar la actividad biológica de los formulados

5.2.1 Establecimiento del cultivo en el campo

La evaluación se realizó en diferentes períodos de tiempo, para ello se hizo una siembra escalonada en cuatro momentos diferentes, que coincidieran con los tiempos de evaluación del formulado, éstos fueron: recién formulado, un mes, cuatro y seis meses de almacenamiento del formulado.

Para evaluar el virus recién formulado se sembraron 12 parcelas de maíz de 1 mt de largo por 2 surcos de ancho, cuya área fue 1.52m^2 para un área total de 18.24m^2 establecido con un diseño completamente aleatorio (DCA) con tres tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos fueron: 1. virus recién formulado con glicerina; 2. virus formulado con óxido de zinc y 3. virus crudo como testigo.

En las siguientes evaluaciones, se sembraron 20 parcelas, de igual dimensión que la descrita anteriormente, para un área total de 30.4m², los tratamientos evaluados fueron: 1) Virus formulado con glicerina y almacenado a temperatura ambiente; 2) Virus formulado con glicerina almacenado a temperatura de 18°C; 3) Virus formulado con óxido de zinc almacenado a temperatura de 18°C; 4) Virus formulado con óxido de zinc almacenado a temperatura ambiente y 5) Virus crudo como testigo.

5.2.2 Aplicación del virus en el cultivo

La aplicación se realizó con una bomba microaspersora (micro ulva) MicronSprayers Ltd.UK, que deposita una gota de agua de aproximadamente 58 micrones de diámetro (Poveda y Saravia, 1994). Previamente se calibró para obtener una buena cobertura sobre las plantas. Las aplicaciones se llevaron a cabo a las 7:00 de la mañana, para evitar que los rayos ultravioleta desactiven el virus. El volumen total utilizado por tratamiento fue de 40 ml. Para evitar contaminación en la parcela se colocó una barrera plástica entre las parcelas en el momento de la aplicación, la aplicación se llevó a cabo cuando el cultivo alcanzó la altura de 25-30 cm. Para el cálculo de la dosis se hizo una relación del área de la parcela con la dosis de 700 LE /mz.

5.2.3 Evaluación de la actividad biológica del virus

Después de tres horas de aplicado cada tratamiento en el cultivo de maíz (*Zea mays*) y después que el virus asperjado se hubiese secado, se procedió a cortar 10 hojas (cogollo) cortadas al azar. Las hojas cortadas se colocaron en bolsas plásticas esterilizadas rotuladas con el tratamiento y repetición correspondiente. Inmediatamente fueron trasladadas al laboratorio para la evaluación de la actividad biológica.

En el laboratorio se colocó un trozo de hoja de 6 cm en un plato petri, colocando algodón impregnado de agua sobre el pecíolo para evitar que la hoja se deshidratara, luego se colocaron 2 larvas de *Spodoptera frugiperda* del segundo estadio larval, provenientes de la

cría de insectos Noctuidos del laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León. Se usaron 10 larvas por repetición para un total de 40 larvas por tratamiento. Las larvas se dejaron por un período de 24 horas para que se alimentaran de las hojas de maíz contaminadas por el virus formulado. Transcurrido este tiempo todas las larvas fueron trasladadas en tazas individuales con dieta. Se observó a diario hasta la muerte o entrada al estado de pupa.

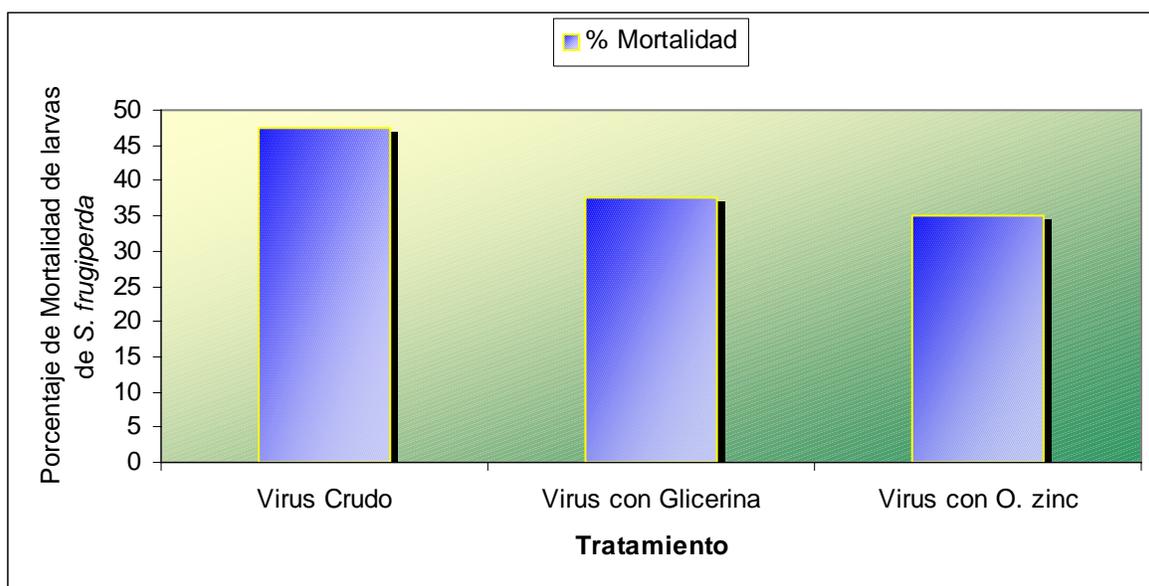
Se consideró una larva muerta por virus, aquella que al tocarla se rompía el integumento fácilmente y se liberaba el líquido que contiene los cuerpos de inclusión poliedral (CIP).

Los datos obtenidos fueron introducidos en una hoja de EXCEL y luego analizados en el programa SPSS, para determinar diferencia entre los tratamientos. Se elaboraron gráficos de los porcentajes de mortalidad producida por el virus en cada tratamiento.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a) Actividad biológica del virus recién formulado

La actividad biológica del virus recién formulado se muestra en la Gráfica 1, donde se observa que el porcentaje de mortalidad fue mayor en el virus crudo de un 47.5 %, lo cual era de esperarse; sin embargo, al comparar la actividad biológica de este aislado viral con investigaciones hechas por Narváez, 2000, quién reporta una mortalidad en campo de 70-75%, se nota una disminución de su actividad entre un 27.5 a 22.5%.



Gráfica 1. Mortalidad producida en larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas de maíz previamente asperjadas con diferentes tratamientos de virus recién formulado. Campus Agropecuario, 2006-2007.

Por otro lado, se observó que la mortalidad ocasionada en las larvas de *Spodoptera frugiperda*, cuando fue mezclado con glicerina y con óxido de zinc fue de 37.55% y 35%, respectivamente. La mortalidad producida por el óxido de zinc fue la más baja con una disminución de 12.5% de mortalidad al compararlo con el testigo, ésto se explica debido a

que el proceso de secado y molido calienta ligeramente el virus, afectando la sobrevivencia del virus. La disminución de la mortalidad al agregar glicerina fue de 10%.

El análisis de varianza muestra que estas diferencias de mortalidad producidas por los tratamientos no son estadísticamente significativas, p:95% (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis de varianza de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas del cultivo de maíz (*zea mayz*), contaminadas de Virus de la Poliedrosis Nuclear VPNSf recién formulado con Glicerina y Oxido de zinc. Campus Agropecuario UNAN-León 2006-2007.

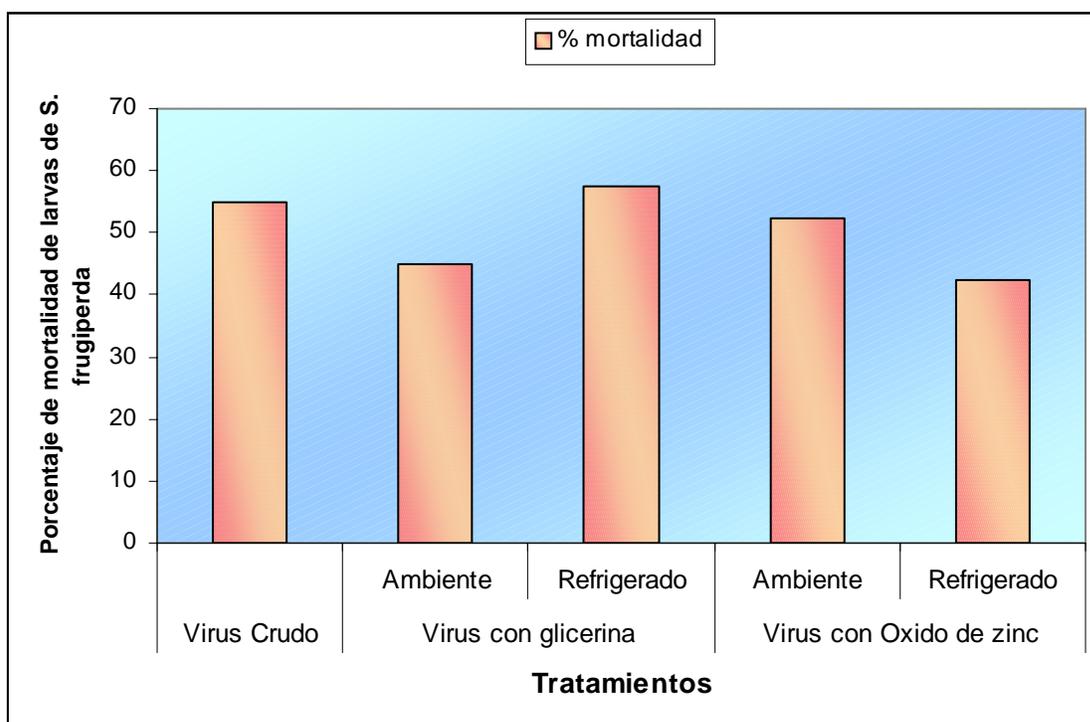
	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	Significación
Inter grupo	40.667	20.333	1.76	.226
Intra grupo	104.000	11.556		
Total	144.662			

b) Actividad biológica del virus después de un mes de formulado

En la gráfica 2, se observa la mortalidad producida en las larvas de *Spodoptera frugiperda*, después de alimentarse con hojas de maíz asperjadas con virus formulado un mes antes. La mortalidad producida por el virus crudo fue de 55%, al compararla con el virus crudo usado cuando se aplicó el virus recién formulado se observa un ligero incremento de un 7.5% de la mortalidad, esta diferencia con respecto al virus crudo se explica debido a que las partículas virales tienen diferentes grado de patogenicidad a causa de la condición de almacenamiento de la cepa en el laboratorio de virus, particularmente por efecto de la temperatura, o bien, las larvas de *Spodoptera frugiperda* tienen diferentes grados de susceptibilidad al virus, tal como lo señala Soza da Silva (1986).

Al comparar el efecto de las condiciones de almacenamiento a un mes de formularse, se nota que el porcentaje de mortalidad en las larvas ocasionado por el virus formulado con glicerina y mantenido a temperatura ambiente fue de 45%, mientras que el mantenido en

refrigeración logró una mortalidad de 57.5%, se mantiene prácticamente la mortalidad, pero es mayor que la mortalidad observada cuando se aplicó el virus con glicerina recién formulado, esta diferencia podría ser causada por variaciones de las partículas virales distribuidas en la formulación, por otro lado se señala que el virus tiende a quedarse adherido a las paredes del frasco plástico lo que pudo afectar estos resultados (comunicación personal, C. Rizo).



Gráfica 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas de maíz asperjadas con diferentes formulaciones de virus después de un mes de formulado. Campus Agropecuario. 2006-2007.

En cambio la mortalidad producida por el formulado con óxido de zinc, muestra una mortalidad más baja, siendo inclusive más alta la mortalidad del virus mantenido a temperatura ambiente de 52.2% que el virus formulado y almacenado en refrigeración que ocasionó una mortalidad de 42.5%. El patrón de mortalidad producida por el formulado es similar, manteniéndose más bajo el óxido de zinc. Al efectuar el análisis de varianza para

deteminar las diferencias entre las medias de los tratamientos (Tabla 2), se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas (p:95%).

Tabla 2. Análisis de varianza de la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas del cultivo de maíz (*zea mayz*), contaminadas de Virus de la Poliedrosis Nuclear VPNSf después de un mes de formulado con Glicerina y Oxido de zinc. Campus Agropecuario UNAN- León 2006-2007.

	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Sig
Inter grupos	6,700	4	1,675	,779	,556
Intra grupos	32,250	15	2,150		
Total	38,950	19			

c) Actividad biológica del virus después de cuatro meses de formulado

Los resultados de mortalidad obtenidos en las larvas de *S. frugiperda*, muestra que a pesar de estar el virus formulado por un período de cuatro meses, el comportamiento del virus es similar. De igual manera lo fue el virus crudo (testigo), observándose una mortalidad de 60%.

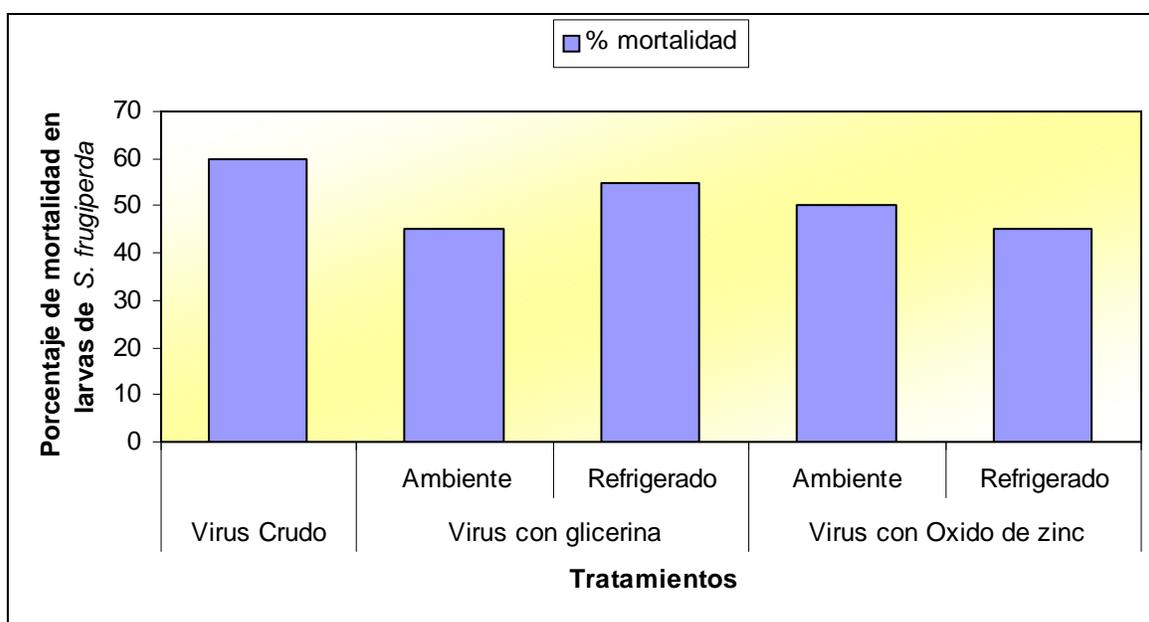


Grafico 3. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas de maíz (*zea mays*), contaminadas con virus de la Poliedrosis Nuclear VPNSf mas Glicerina y Oxido de zinc después de cuatro meses de formulado. Campus Agropecuario UNAN-León, 2006-2007.

El virus formulado con glicerina mostró una mortalidad de 45% cuando fue mantenido a temperatura ambiente y de 55% el que se mantuvo refrigerado, con una diferencia de 10%, mientras que el formulado con oxido de zinc mostró una diferencia de 5%, como se muestra en la Tabla 3, estas diferencias no son singnificativas, por lo que todos los tratamientos mantienen igualdad estadística.

TABLA 3. Análisis de varianza de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de maíz (*zea mayz*), contaminadas de VPNSf formulado y almacenado cuatro meses bajo condiciones de temperatura ambiente y refrigerado. Campus Agropecuario UNAN-León 2006-2007.

	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F	Sig
Inter grupos	6,800	4	1,700	,823	,531
Intra grupos	31,000	15	2,067		
Total	37,800	19			

d) Actividad biológica del virus después de seis meses de formulado

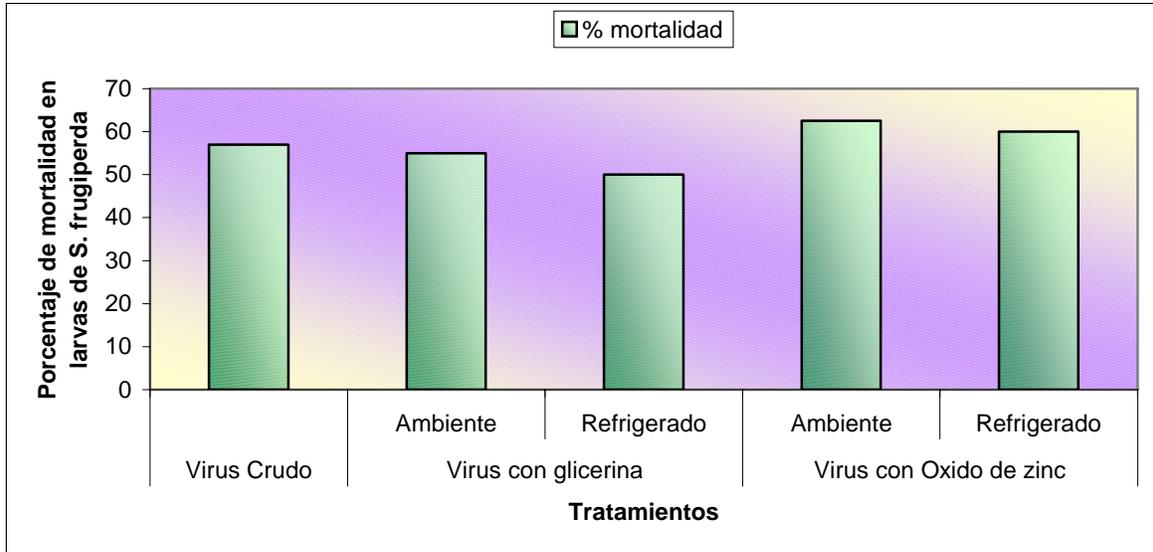


Grafico 4. Porcentaje de mortalidad en larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas con hojas de maíz (zea mays), contaminadas con virus formulado después de 6 meses. Campus Agropecuario UNAN-León, 2006-2007.

Como se muestra en la Gráfica 4, el comportamiento del virus es muy similar. Lo que indica que el período de almacenamiento no afecta significativamente la actividad biológica del virus, tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre las dos formulaciones (Tabla 4), puesto que el porcentaje de mortalidad ocasionado por el virus formulado con glicerina fue de 55% cuando fue mantenido a temperatura ambiente y de 50% cuando se mantuvo en refrigeración, ésta diferencia del 5% pudo haber sido causada por variación entre las partículas virales agrupadas en el formulado; por otro lado, la mortalidad producida por el formulado con óxido de zin, mostró una mortalidad en las larvas de 62.5% cuando el formulado se mantuvo a temperatura ambiente y de 60% en refrigeración, la diferencia en este caso fue de 2%, lo que indica una mayor estabilidad del efecto biológico del virus con el óxido de zinc, aunque ésta no es significativa cuando se compara con el virus crudo.

TABLA 4. Análisis de varianza de la mortalidad de larvas de *S. frugiperda* alimentadas con hojas de maíz (*zea mayz*), contaminadas de VPNSf formulado con Glicerina y Oxido de zinc y almacenado por seis meses bajo condiciones de temperatura ambiente y refrigerado. Campus Agropecuario UNAN- León 2006-2007.

	Suma de	Media	F	Significancia
--	---------	-------	---	---------------

	Cuadrados	Cuadrática		
Inter grupo	6700	1,675	.779	.556
Intra grupo	32.250	2.150		
Total	38.950	1.2067		

VII. CONCLUSIONES

1. Es factible la elaboración de los formulados virales a base de Oxido de zinc y glicerina.
2. La actividad biológica del virus aislado de *Spodoptera frugiperda* sin ningún aditivo, virus crudo, mostró una mortalidad entre 47 a 60%.
3. La actividad biológica del virus cuando se adiciona glicerina produjo una mortalidad en las larvas de *S. frugiperda* entre 37% a 55%
4. La actividad biológica del formulado con glicerina no muestra ningún efecto al almacenarlo puesto que las diferencias en la mortalidad a temperatura ambiente fue de 10% y refrigerado fue 7.5%.
5. La actividad biológica del virus formulado con óxido de zinc mostró un rango entre 42.5 y 62.5%,
6. Al comparar la actividad biológica del formulado refrigerado y el mantenido en condiciones de temperatura ambiente no muestra diferencias significativas, mostrando una tendencia a una mayor mortalidad a temperatura ambiente entre 50 y 62.5%

7. Ambas formulaciones y condiciones de almacenamiento tienen un comportamiento similar a la mortalidad producida en las larvas de *S. frugiperda* por el virus crudo.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios que evalúen factores como: temperatura, humedad y el pH del cultivo de maíz (*zea mays*), para determinar efectos positivos y/o negativos que causan en la actividad biológica del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN).
2. Estudiar la actividad biológica del virus de *S. frugiperda* por un período de 18 meses para dar una recomendación eficiente de su uso en el campo.
3. Desarrollar y evaluar otros tipos de formulaciones que incluyan materiales protectantes y/o fagoestimulantes, que mejoren la actividad del virus para su uso en el campo.
4. Mantener el virus crudo, en condiciones óptimas de almacenamiento que mejore la mortalidad producida en las larvas de *S. frugiperda* y disminuya la contaminación por otros microorganismos.

IX. BIBLIOGRAFÍA

ALVES, S. B. 1986. Controle microbiano de insectos. Sao Paulo, Brasil, editora Monole. 407 p.

BEHLE, R. W. Y TAMEZ -GUERRA, P, 2003. Sistemas de producción de baculovirus del tipo poliedro nucleares. *In* Proceso Biotecnológicos. Eds. L. Galán, et al. Universidad Autónoma de Nuevo León. 86-108pp.

COUCH, T.L and IGNOFFO, C.M. 1981. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticida. *In* Microbial Control of pests and plant diseases-1970-1980. Ed. Burges, H, D., 243-362pp.

DeBACH, P. 1968. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. Ed. Revolucionaria Cuba.

ENTWISTLE, P., EVANS HF.1985. Viral Control. In Comprehensive insect Physiology. Biochemistry and pharmacology, Eds. G. A. Ves Keed and L. I. Gilbert. Perganon Press. V, 12, 347-412pp.

EVANS, H.F; ENTWISTLE, P. 1987. Viral diseases. *In* Epizootiology of insect diseases. Eds. J. R. Fuxa and Y. Tanada. Wiley USA. 257-322pp.

FERNANDEZ, L. O. 2002. Formulación de bioplaguicidas microbiológicos. Capacitación Proyecto producto sanitario no sintéticos. NOQ-CATIE 16TZ.

JAQUES R. P. 1972. The inactivation of foliar deposits of viruses of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidades) y *Pieris rapae* (Lepidoptera : Pieridae) and tests on protectant additives. *Canadian Entomology*.104:1985-1994.

LECUONA, R. E. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Ed. R. E. Lecuona. Buenos Aires, Argentina. 338p.

MERCK, sf. Oxido de zinc. (en línea) consultado el 10 de agosto del 2007. Disponible en: www.merck.de/servlet/PB/menu/1393610/index.html

MOSCARDI, F. Y SOSA-GOMEZ, D. 1996. Utilización de virus a campo. *In* Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos Plaga. Ed. R. E. Lecuona. Buenos Aires, Argentina. 261-276.

NARVÁEZ S., C. 2000. Evaluación de la patogenicidad e infección del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) en *Spodoptera frugiperda*: J. E Smith (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis Maestría en Control Integrado de Plagas. León, Nicaragua. UNAN-LEON.

RIZO, C. Y NARVÁEZ, C. 2001. Uso y Producción del Virus de la Polihedrosis Nuclear en Nicaragua. *Revista Manejo Integrado de Plagas, CATIE, Costa Rica*. No 61: 90-96.

X. ANEXOS

Anexo 1.

Hoja de muestreo

Ensayo: _____ Fecha: _____
Especie: _____ Tratamiento: _____

Fecha	Repetición	No larva	Mortalidad	
			VPN	Otro

Observaciones: _____



Foto 1. Aplicación del virus en el cultivo de maíz (*Zea mays*), usando una microaspersora



Foto 2. Aplicación del virus mostrando el plástico usado como barrera para impedir la contaminación entre los tratamientos.



Foto 3. Bolsa de plástico conteniendo las hojas colectadas después de aplicar los formulados virales



Foto 4. Preparación de las platos con pedazos de hoja de maíz para cada formulado viral



Foto 5. Traslado de larvas de *Spodoptera frugiperda* a platos petri para la evaluación de la actividad biológica del virus.



Foto 6. Traslado de larvas de *Spodoptera frugiperda* a platos petri para la evaluación de la actividad biológica del virus.



Foto 7. Platos petri conteniendo larvas de *S. frugiperda* alimentándose de hojas de maíz por un período de 24 horas.



Foto 8. Traslado de larvas de *S. frugiperda*, después de transcurrido las 24 horas, para evaluar el efecto de cada formulado viral.