

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA UNAN-LEON
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE CONTROL INTEGRADO DE PLAGAS
Programa de Postgrado**



ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UNA FORMULACIÓN EN POLVO DEL *Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN)* ALMACENADO A DIFERENTES TEMPERATURAS Y EFICACIA PARA EL CONTROL DE *Spodoptera exigua* EN EL CULTIVO DE CEBOLLA, EN SEBACO-MATAGALPA

Presentada por:

LILLIAM DE JESUS LEZAMA GAITAN

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador de Postgrado de la Facultad de Ciencias y Tecnologías para optar al grado de Maestro en Control Integrado de Plagas

León, enero 2011

LILLIAM DE JESUS LEZAMA GAITAN

Esta Tesis presentada ha sido aceptada, cumple con los requisitos establecidos por el Programa de Postgrado de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León y aprobada por el Tribunal examinador para optar al grado de Maestro en Control Integrado de Plagas.

M.Sc. Carmen Marina Rizo Zeledón
Tutora

M.Sc. Luis Elias Dicovskiy Riovoó
Asesor

Miembros del Tribunal Examinador

M.Sc. Cony Narváez Solís

M.Sc. Tito Antón Amador

MSc. Wilber Salazar

Lilliam de Jesús Lezama Gaitán
Estudiante

AGRADECIMIENTO

**"El hombre siembra su campo y,
Sin que él sepa cómo,
La semilla germina y crece"**

Expreso mi más sincero agradecimiento a todo el Claustro de Catedráticos de la UNAN-León, especialmente de la Facultad de Ciencias y Tecnologías y del Programa de Postgrado que se han entregado a la formación, dedicando su tiempo y compartiendo todos sus conocimientos y experiencias. A mi tutora y asesor que con mucha paciencia y entusiasmo me han apoyado hasta llegar al final de la meta propuesta, hago mención especial a la Maestra Carmen Marina Rizo Zeledón, que con su valiosa asesoría pude desarrollar paso a paso cada uno de los capítulos de este trabajo de tesis.

En este espacio también agradezco a la Cooperativa El Chaguitillo, en Sébaco, Matagalpa, productores hortícolas que brindaron el espacio y tiempo necesario para poder realizar el ensayo de campo y hacer las aplicaciones de VPN a *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla.

Mi agradecimiento al personal del Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, especialmente a la Licenciada Ivania Baca, que tanto su apoyo técnico como sus palabras de ánimo me supieron conducir hasta llegar al final.

A todas la personas que de una u otra forma me brindaron su apoyo incondicional durante mi formación.

"Mi agradecimiento a todos con amor"

DEDICATORIA

Dios: Desde lo más profundo de mí ser, te doy gracias, desde ayer, hoy y siempre, dedico todos mis sacrificios mis esfuerzos, alegrías y tristezas, a tí Señor. Tú, me distes la vida, hiciste de mí una persona capaz de amar a la hermosa y bella Madre Naturaleza, su reino animal y su reino vegetal, que son alicientes de esta humanidad. Fuiste Tú, el inseparable amigo, que me guió por ese camino, a veces tan difícil de cruzar, pero deposité en Tí, todas mis esperanzas y me llevaste hasta el final. Hoy he culminado mis estudios de maestría, mañana iniciaré una nueva jornada, espero servir a la humanidad y no defraudarla jamás. Tú me distes este triunfo, por esto y mucho más, por siempre te daré infinitas gracias Señor.

A mi esposo Luis Armando Albuquerque Blandón: Mi dedicación con todo amor, por su apoyo incondicional, sus palabras de ánimo, su compañía, comprensión y ayuda, especialmente por la confianza que siempre ha demostrado tener en mi persona, gracias por apoyarme e impulsarme a seguir adelante.

A mis hijitos Yasser Josymar y Mayerling Dayanara Albuquerque Lezama: Ellos son la base fundamental para mi superación, gracias hijitos por traer tanta felicidad a mi vida, disculpen, por el tiempo que no les dediqué al estar con mis estudios, gracias por la sonrisa dulce que siempre encontraba en sus rostros al llegar a casa. ¡Hijito / Hijita!, son el regalo, más lindo, dulce y tierno que Dios me dio, y Mamá, siempre estará con Ustedes.

A mi Padre, mi Madre y Hermanitos (as): Que con mucho amor y cariño me han impulsado, depositando su confianza y, en medio de tantas limitaciones, hicieron posible el momento final de esta segunda etapa de mi formación profesional, poco o mucho que haya sido tu colaboración tú has ayudado a mi formación, por eso mi triunfo es tu triunfo.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. HIPÓTESIS	5
IV. MARCO TEÓRICO	6
4.1 Importancia del cultivo de la cebolla	6
4.2 Origen y distribución	7
4.3 Taxonomía y botánica de la cebolla.....	7
4.3.1 Taxonomía de la cebolla.....	7
4.3.2 Botánica de la cebolla.....	7
4.4 Plagas	8
4.4.1 <i>Thrips tabaco</i>	8
4.4.2 <i>Spodoptera exigua</i>	8
4.4.3 Manejo.....	9
4.5 Virus entomopatógenos.....	9
4.5.1 Clasificación y morfología	10
4.5.2 Familia Baculoviridae	10
4.5.3 Estructura de los baculovirus.....	11
4.5.4 Modo de acción del VPN	12
4.5.5 Síntomas de infección por VPN.....	12
4.5.6 Dispersión del VPN.....	12
4.5.7 Persistencia del VPN	13

4.6 Formulación	13
4.6.1 Insecticida microbial y su estabilidad en el campo	13
4.6.2 Formulación sólidas y semisólidas	15
4.6.3 Formulación de virus.....	17
4.6.4 Formulación y seguridad.....	18
4.6.4.1 Arcillas caolines.....	21
4.6.4.2 Arcilla caolinífera	21
4.7 Virus formulados utilizados en la agricultura.....	22
4.8 Evaluación de formulaciones en Lepidópteras	24
4.9 Bioensayos en dietas artificiales	24
4.10 Análisis probit.....	25
4.11 Determinación de la potencia relativa	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1 Ubicación del estudio.....	27
5.2 Fase de laboratorio.....	27
5.2.1 Preparación del material biológico.....	27
5.2.1.1 Semipurificación del virus <i>S. exigua</i>	28
5.2.1.2 Preparación del formulado.....	28
5.2.2 Evaluación de la actividad insecticida	29
5.2.2.1 Bioensayo para determinar DL ₅₀ del virus sin formular	29
5.2.2.2 Bioensayo del virus formulado.....	30
5.2.2.3 Medición de la viabilidad en el tiempo del virus formulado.....	30
5.3 Fase de campo	30
5.3.1 Efectividad del formulado en el campo.....	30
5.4 Análisis estadístico de los datos.....	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Fase de laboratorio.....	33
6.1.1 Actividad biológica inicial de virus sin formular y virus recién formulado en condiciones de laboratorio	33

6.1.2 Determinación de la actividad biológica del virus formulado en función del período y temperatura de almacenamiento en larvas de <i>S. exigua</i>	38
6.2 Determinación de la efectividad del VPN formulado, controlando larvas <i>S. exigua</i> en el cultivo de cebolla	44
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. RECOMENDACIONES.....	48
IX. BIBLIOGRAFÍA	49
X. ANEXOS	56

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Dosis-Respuesta de larvas de II instar de <i>Spodoptera exigua</i> sometidas a diferentes tratamientos de virus sin formular y virus formulado en el tiempo cero. Laboratorio de Control Biológico. UNAN-León. 1999	34
Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de II instar de <i>Spodoptera exigua</i> sometida a diferentes dosis de virus crudo y el virus recién formulado .	37
Cuadro 3. Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas de <i>Spodoptera exigua</i> , sometida a diferentes tratamientos virus sin formular y virus formulado, bajo condiciones de laboratorio. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.....	37
Cuadro 4. Viabilidad del VPN formulado en condiciones de laboratorio y almacenado a temperatura ambiente, mostrando la efectividad biológica (DL50) por un período de seis meses. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.....	38
Cuadro 5. Ecuaciones de respuestas en cada bioensayo realizado con el virus SeVPN formulado con caolín en larvas de <i>Spodoptera exigua</i> , y almacenado a temperatura ambiente. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.....	40
Cuadro 6. Viabilidad del VPN formulado en condiciones de laboratorio y almacenado en refrigeración, mostrando la efectividad biológica (DL ₅₀) por un período de seis meses. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.....	41

Cuadro 7. Ecuaciones para las respuestas en unidades probit de <i>Spodoptera exigua</i> formulado con caolín, SeVPN, temperatura 12°C. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.....	42
Cuadro 8. Análisis de varianza de porcentajes de larvas muertas de <i>Spodoptera exigua</i> , evaluando la viabilidad del virus formulado mantenido a T° ambiente. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999....	43
Cuadro 9. Análisis de varianza de porcentajes de larvas muertas de <i>Spodoptera exigua</i> , evaluando la viabilidad del virus formulado mantenido en refrigeración. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999	43
Cuadro 10. Población de larvas de <i>Spodoptera exigua</i> en el cultivo de cebolla, antes y después de la aplicación del virus sin formular y formulado, Sébaco-Matagalpa, 1999	45

INDICE DE ANEXOS

- Anexo 1.** Hoja de registro para el virus formulado elaborado en el Laboratorio de Control Biológico, UNAN-León, 1999.....56
- Anexo 2.** Hoja de bioensayos realizado en el Laboratorio de Control Biológico, UNAN-León, 199957
- Anexo 3.** Hoja de registro para realizar recuentos de plagas en el cultivo de cebolla, Sébaco-Matagalpa, 1999.....58
- Anexo 4.** Fotos que describen el proceso de preparación y aplicación de virus formulado y sin formular en laboratorio y campo, UNAN-León 1999.....59

RESUMEN

El Virus de la Poliedrosis Nuclear es una alternativa para el manejo de poblaciones de *Spodoptera exigua*. Sin embargo, para un fácil manejo y uso por los agricultores es necesario realizar una formulación que mantenga la actividad biológica por un período mínimo de seis meses. Por ello se realizó este estudio con el objetivo de determinar la actividad insecticida del virus SeVPN en condiciones de laboratorio, mediante la determinación de la DL₅₀ y comparar la actividad biológica en el tiempo del virus crudo vs formulado y almacenado a temperatura ambiente y en refrigeración, así como determinar la efectividad del formulado en el control de larvas de *S. exigua* en el cultivo de cebolla. El estudio fue realizado en dos etapas: una de campo en los meses de enero a febrero y de laboratorio de enero a agosto. El virus fue formulado usando una proporción de 1:1(p/p) de larvas muertas por virus y caolín. Después de secado y molido se chequeó la concentración del virus y se procedió a almacenarlo en dos condiciones de temperatura, ambiente y refrigeración. El ensayo de campo se realizó en un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA), con dos tratamientos y tres repeticiones, las variables evaluadas fueron número de larvas pequeñas y grandes, vivas y muertas por virus. El bioensayo de laboratorio se realizó a través del método de contaminación de dieta, aplicando cinco dosis y un control. Se usaron 50 larvas por dosis (300 larvas por bioensayo). Cada bioensayo fue realizado con una muestra del virus formulado almacenado desde un mes hasta por seis meses. Los datos fueron analizados a través del modelo estadístico PROBIT. Los resultados del bioensayo con virus sin formular muestra una DL₅₀ de 2040 CIP/mg, siendo esta la máxima actividad biológica del virus. Al realizar el bioensayo con el virus formulado con caolín, inmediatamente después de elaborarse, el valor de la DL₅₀ fue de 2758 CIP/mg, al compararla con la DL₅₀ del virus sin formular se observa un incremento de un 35%, lo cual indica que el proceso de la mezcla con caolín y su posterior secado ocasiona la muerte de algunos viriones. La potencia relativa entre ambos formulados fue de 0.65 lo que indica que ambos son igualmente potentes. El análisis estadístico de la mortalidad en larvas indica que no hay diferencia significativa ($P>0.05$). Al analizar la viabilidad del virus formulado y mantenido bajo refrigeración y virus formulado mantenido a temperatura ambiente en función del tiempo se observa que hay una variación a lo largo de los seis meses, pero que es más estable el formulado mantenido en refrigeración con un valor de la DL₅₀ de 860 CIP/mg el cual es más bajo que el mantenido a temperatura ambiente que fue de 1820 CIP/mg, lo que indica una actividad biológica similar al virus recién formulado, por lo que ambos son iguales. Sin embargo, se recomienda refrigerarlo porque mejora la estabilidad del virus formulado a lo largo del tiempo. La efectividad del virus sin formular y virus formulado aplicado en el cultivo de cebolla, resultó ser satisfactoria, como bioinsecticida regulador de las poblaciones de *Spodoptera exigua*. El virus formulado con caolín es un controlador biológico eficaz contra *Spodoptera exigua*, el productor puede llegar a obtenerlo y usarlo siendo confiable su efectividad hasta los seis meses.

Palabras claves: Baculoviridae, caolin, formulación, bioensayo

I. INTRODUCCIÓN

La cebolla (*Allium cepa*), de la familia Liliaceae es originaria del suroeste de Asia, usada por el hombre hace 3.000 años A.C. Puede ser cultivada en climas templados o cálidos (Casseres 1984), tiene mucha importancia nutritiva, el tallo verde es rico en vitamina A, el bulbo vitamina C y otros, además de ser un condimento universal en todas las comidas (Bednarek-Siegfried 1986). En Nicaragua se cultivan grandes extensiones en el Valle de Sébaco, Departamento de Matagalpa, se comercializa para el consumo nacional y para exportación (FAO 1987).

Este cultivo es atacado por insectos plagas como trips y larvas de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), entre otros. *Spodoptera exigua*, llamado gusano soldado, es una plaga polífaga encontrada en muchos cultivos, capaz de desfoliar totalmente un plantío, constituye uno de los problemas más serios, ya que su control se dificulta una vez que la larva penetra al follaje (Trabanino 1998). Esta plaga ha sido tradicionalmente controlada con aplicaciones de insecticidas como Profenophos, Cipermetrina, Clorfluazuron, Metomil) y Creolina (Narvaéz 1995), por lo que se considera que el contenido tóxico en éste cultivo es abundante, originando así problemas de residuos en los productos cosechados, contaminación ambiental y desarrollo de resistencia de las larvas de Lepidopteras (Vanegas 1994).

Este mismo autor menciona que en el ciclo productivo 1993-1994, la producción de cebolla para exportación bajó debido a las altas infestaciones de *Spodoptera spp*, la cual se trataba de controlar con numerosas aplicaciones de plaguicidas. Como una alternativa de control para dar respuesta a este problema surgió el uso de *Virus de la Poliedrosis Nuclear* (VPN), de la familia Baculoviridae, con miras a la disminución del uso de insecticidas químicos. Los virus juegan un papel importante en la

agricultura, porque regulan las poblaciones cuando se usan en un programa de control (Narvaéz *et al.* 1995).

En Nicaragua el Departamento de Control Integrado de Plagas de la UNAN-León, empezó a realizar estudios desde 1986, realizando colectas de larvas afectadas por virus, para ser identificadas y reproducidas en su huésped en el laboratorio, realizando posteriormente evaluaciones en el campo. El virus fue aplicado para el control de *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla obteniendo una efectividad de 85%, resultando más barato el costo del control utilizando virus (51%) que el control utilizando químicos (61%) (Narvaéz 1995). Además, el virus posee ventajas en comparación con los químicos, ya que no contaminan el ambiente, no hay peligro para los trabajadores, son fáciles de producir, no producen resistencia y no afecta la fauna benéfica (Narvaéz, *et al.* 1995).

Actualmente el virus se reproduce en condiciones de laboratorio. Las larvas muertas por virus se maceran y se filtran y la solución obtenida (virus sin formular), se oferta al productor. Sin embargo, requiere mantenerse en refrigeración para evitar su degradación y la carencia de este medio dificulta la obtención del virus a la mayoría de los productores porque no cuentan con un congelador para su almacenamiento. Otra dificultad es que el virus sin formular es sensible a la luz ultravioleta y al ser aplicado en el cultivo la radiación solar daña el ADN y disminuye su efectividad. Por tanto, se considera que al adicionarle un ingrediente inerte como la caolín, la persistencia del VPN mejora por la protección que hacen las partículas del caolín a los viriones. Por lo que, es necesario conocer si el proceso de formulación afecta la viabilidad y patogenicidad del virus en el tiempo.

Para dar respuesta a estos problemas y facilitar la obtención del virus, es necesario realizar estudios sobre su formulación lo cual conducirá a una mayor oferta y demanda de parte de los productores. El virus formulado facilitará no sólo su

almacenamiento, sino su uso y manejo en el lugar y momento que el productor lo necesite. El estudio pretende contribuir a resolver la problemática del cultivo de cebolla, en torno al control de plagas al ofrecer una alternativa viable, la cual nos encamina a una agricultura sostenible donde la protección del medio ambiente y la salud humana son la base para su desarrollo.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad biológica en el tiempo de un formulado en polvo del *Virus de la Poliedrosis Nuclear, SeVPN*, almacenado a diferentes temperaturas en condiciones de laboratorio y su eficacia para el control de *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla.

Objetivos Específicos

- 1- Determinar la actividad biológica del virus SeVPN sin formular y formulado, en condiciones de laboratorio, a través de la estimación de la Dosis Letal Cincuenta, DL_{50} .
- 2- Determinar la pérdida de viabilidad en el tiempo del virus formulado y almacenado a diferentes temperaturas.
- 3- Determinar la efectividad del virus recién formulado en el control de larvas de *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla.

III. HIPOTESIS

Hipótesis de investigación

La formulación del *Virus de la Poliedrosis Nuclear* (VPN) con caolín mantiene la actividad biológica por un período de tiempo de 6 meses, ya que lo protege de las condiciones ambientales, lo que permite una adecuada regulación de las poblaciones de *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla en Nicaragua.

Ho: El virus formulado con caolín mantiene la misma actividad biológica que el virus sin formular

Ha: El virus formulado con caolín presenta una actividad biológica diferente al virus sin formular.

Ho: La actividad biológica del virus SeVPN después de formulado y aplicado al campo es similar a la actividad del virus sin formular en el control de *Spodoptera exigua*.

Ha: La actividad biológica del virus SeVPN después de formulado y aplicado al campo es diferente a la actividad del virus sin formular en el control de *Spodoptera exigua*.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1 Importancia del cultivo de cebolla

Lo más importante es el bulbo comestible de la planta conocida como cebolla común, cabezona o de jardín, es una planta herbácea bulbosa de la familia Liliaceae y se cultiva en todo el mundo para su empleo en cocina. Se consume principalmente el bulbo, pero también las hojas. Toda la cebolla posee un sabor y olor fuerte, debido a la alicina, que se suaviza con la cocción. Hay numerosas variedades de cebollas de uso común en cocina: cebolla blanca, cebolla roja, cebolleta, cebollita francesa, chalota. La cebolla es una de las plantas culinarias más cultivadas en el mundo entero y sus numerosas formas y variedades ocupan miles de hectáreas de tierras de cultivo. La parte comestible de la planta de la cebolla es su carnoso bulbo globular, mientras que su inflorescencia es casi desconocida. Del bulbo se obtienen preparados de múltiples acciones terapéuticas. La cebolla tiene alto valor nutritivo, contiene vitaminas A, B y C con la ventaja de que difícilmente se destruyen durante la cocción, se usa en la fitoterapia para abrir el apetito y mantener la dentadura saludable (FHJC 2002).

Es importante mencionar que la cebolla es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia comercial a nivel mundial, las estimaciones más recientes al 2007 indican que el área de siembra de la cebolla en el mundo es actualmente de 3.53 millones de hectáreas, produciéndose 65.99 millones de toneladas métricas (TM) aproximadamente. En Nicaragua se cultiva principalmente en la zona del Valle de Sébaco del Departamento de Matagalpa. La superficie cultivada en el país durante 2007 fue de 3,000 hectáreas con una producción nacional de 6,500 TM y un rendimiento de 2.17 ton/ha. Debido a que en Nicaragua los productores enfrentan

problemas serios de plagas para la producción de cebolla de cara a las nuevas exigencias del mercado internacional y que las respuestas tecnológicas actuales no son en gran medida las más adecuadas, en los períodos 2000-2007 el crecimiento de la producción y del área cultivada anda alrededor del 2.5% y el rendimiento ha tenido un descenso porque hay prevalencia de condiciones climáticas desfavorables y plagas que no han permitido un crecimiento más substancial en la producción. En el 2008 Nicaragua exportó un total de 1,728.45 toneladas, con un valor de 549.82 miles de dólares. El principal destino de este producto en los últimos años ha sido Centroamérica y en menor grado los Estados Unidos (MIFIC 2009).

4.2 Origen y distribución

Esta planta es originaria de Asia Central, pero hoy su cultivo se encuentra extendido en todo el mundo (FHJC 2002). Según Galmaniri (1992) reporta que posiblemente la cebolla es originaria de Irán, Pakistán, Afganistán y en segundo lugar Asia Occidental y el Mediterráneo, luego fue llevada a Africa y de éste a Europa. En América fue introducida por los primeros colonizadores (Fusagri 1986). Nicaragua tiene el potencial de producir cebolla para el mercado nacional e internacional, aprovechando la existencia de los suelos fértiles, el Valle de Sébaco en Matagalpa, ha sido la zona tradicional del cultivo, actualmente el Valle de Namanjí en Jinotega ofrece buenas condiciones para la exportación, esta hortaliza se adapta a diferentes temperaturas (18 a 25 °C) y a altitudes entre los 300 -900 m (INTA 2005).

4.3 Taxonomía y botánica de la cebolla

4.3.1 Taxonomía de la cebolla

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Orden: Asparagales

Familia: Liliaceae
Género: Allium
Especie: *A. cepa*
Nombre binomial: *Allium cepa* L.

4.3.2 Botánica

La cebolla es una planta herbácea monocotiledónea, en la primera etapa de crecimiento se desarrolla el bulbo que es la parte comestible y en la segunda etapa crece el vástago o tallos florales, el sistema radicular es muy ramificado, con raíces fibrosas y pueden alcanzar hasta 90 cm de profundidad y 45 cm de crecimiento lateral, sus hojas son huecas y su tallo alcanza más de 1 m cuando florece, siendo estas de coloración lilas o blancas (FHJC 2002). Sosa (1998) menciona, además que sus hojas son huecas.

4.4 Plagas

Este cultivo es atacado por plagas del suelo que afectan principalmente las raíces y bulbo, en las hojas huecas se encuentran las plagas claves, los piojillos o totolate y gusano verde.

4.4.1 *Trips tabaci*

Conocido como piojillo o totolate (Thysanoptera: Thripidae) su adulto llega a poner de 50 a 100 huevos entre las hojas, después de siete días se rompen y salen las ninfas a chupar las hojas, estas se alimentan durante 12 días, después caen al suelo y se forma la pupa, después de tres días sale el adulto y vuela a la maleza o cultivo para seguir reproduciéndose INTA (2005). Los totolates pueden encontrarse durante todo el ciclo del cultivo.

4.4.2 *Spodoptera exigua* (Huebner)

Es conocida por los nombres comunes de gusano verde, soldado, pertenece al Orden Lepidóptero, Familia Noctuidae. En la actualidad se distribuye por África, Sur de Europa, India y Sur de Asia, Japón, Australia, Centro América, Estados Unidos y Canadá (INFOAGRO 2002).

Ataca el follaje de la cebolla, la hembra coloca sus huevos en la base de la planta y a veces sobre el bulbo, cuando las larvas nacen, atacan la planta atravesando el bulbo produciendo amarillamiento del follaje y pudrición del bulbo (FAO 1987). Esta especie ha ido incrementando su daño y puede deberse a la aparición de resistencias en las poblaciones de la plaga como consecuencia de la utilización de plaguicidas (INFOAGRO 2002).

El adulto pone entre 50 a 150 huevos en masa, son de color blanquesino o verde, a los tres días eclosionan y los gusanos se alimentan de las hojas, pasando por cinco estadios larvales que duran entre 12 a 15 días, Son de color verde pálido a amarillo en el primer y segundo estadio, durante el tercer estadio son de color verduzco y en el cuarto estadio adquieren un color oscuro en la parte dorsal. Durante el quinto estadio su apariencia varía, tienden a ser verde dorsalmente con rosado o amarillo en la parte ventral y blanco en la parte lateral. En la etapa de pupa son de color café y miden entre 15-20 mm, la cual se entierra en el suelo, a los siete días el adulto sale para seguir su reproducción. Los adultos miden 25-30 mm, poseen alas moteadas de gris y café, normalmente con una banda irregular y con puntos de forma circular. La longevidad del adulto es de 10 días. La oviposición inicia dos o tres días después de emerger, hasta por 10 días (INTA 2005).

4.4.3 Manejo

Estas plagas tradicionalmente han sido combatidas con productos químicos, sin tener resultados satisfactorios de control, ya que han adquirido resistencia por

excesivo uso de los mismos. Esto constituye una limitante para la cebolla de exportación ya que sólo deberán aplicar productos aprobados por la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA) (Narváez 1995). Como una alternativa para este problema surge el uso del *Virus de la Poliedrosis Nuclear*, que tiene muchos atributos de un plaguicida ideal (Ignoffo 1973). El virus está disponible naturalmente, es efectivo, biodegradable, específico, no tóxico y patogénico para los organismos vivientes diferentes a la plaga blanco, no producen resistencia, pueden ser aplicados con los mismos equipos convencionales y no hay peligro de contaminación (Narváez 1995).

4.5 Virus Entomopatógenos

El virus consiste en una serie de moléculas de ácido nucleico (ADN o ARN), encapsulado en una cubierta protectora de tipo lipoprotéica que es capaz de organizar su propia replicación dentro de las células hospederas apropiadas. Son parásitos obligados ya que necesitan de un organismo vivo, el hospedante, para poder multiplicarse y así diseminarse en el agroecosistema, en estos ambientes, los virus pueden estar presente naturalmente, en forma enzoótica, parasitando a un bajo número de insectos de la población susceptibles (Rizo y Narváez (2001).

4.5.1 Clasificación y morfología

Según Kalmakoff y Longworth (1980) citado por Lobo de Souza y Lecuona (1995) basándose en estudios morfológicos, bioquímicos y biofísicos reportan que los virus de insectos fueron agrupados en diversos grupos.

a) Los que presentan un cuerpo de inclusión de naturaleza proteica, visibles al microscopio óptico, dentro de ellos están el *Virus de la Poliedrosis Nuclear* (VPN), *Virus de Granulosis* (VG), *Virus Citoplasmática* (VCP) y *Entomopoxvirus*.

b) Los que no presentan cuerpo de inclusión y sólo pueden ser visualizado por medio de un microscopio electrónico como: *Baculovirus* no incluso de *Oryctes*, *Iridovirus*, *Densovirus*, *Sigmavirus*, *Virus X Drosophila*, *Picornavirus* y otros virus de ARN.

4.5.2 Familia Baculoviridae

Los buculovirus presentan el mayor potencial para ser utilizados en el control microbiano, debido a su especificidad para determinadas plagas, su alta virulencia, la protección extra que le brinda el cuerpo de inclusión, su compatibilidad con otras tácticas de control, sus buenas propiedades de almacenamiento, la facilidad de producción, por no afectar el balance natural del agroecosistema y ser inocuos para el hombre y otros animales (FAO 1974; Kurstak y Tijssen 1982) citado por Lobo de Souza y Lecuona (1995).

Evans y Entwistle (1987) describe las características de los Baculoviridae y menciona que el *Virus de la Poliedrosis Nuclear*, *Virus de la Granolosis* y *Virus no Ocluidos* son los virus patogénicos de mayor importancia. Esta familia se caracteriza porque la unidad viral tiene forma de barra, hay replicación de ácido nucléico, formación de capa protéica, unión en el núcleo de las células y tienen viriones ocluidos.

Según Bilimoria (1991) citado por Lobo de Souza y Lecuona (1995) menciona que el *Virus de la Poliedrosis Nuclear* presenta cuerpo de oclusión viral en forma poliédrica conteniendo partículas virales ocluidas al azar. Hay dos tipos definidos por el número de nucleocápsidos dentro de la envoltura o sea que un morfotipo tiene un único nucleocápsido por envoltura (SNPV) y el otro más de un nucleocápsido (MNPV) o nucleocápsido múltiple. Los nucleocápsidos envueltos en el núcleo están ocluidos en poliedros y pueden llegar a desarrollar hasta 200 viriones por poliedro dependiendo del virus, del insecto y del tejido.

4.5.3 Estructura de los baculovirus

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

4.5.4 Modo de acción del VPN

El hospedero adquiere al VPN principalmente por vía oral, aunque puede haber infección por otras formas: transmisión transovárica, la contaminación de la superficie del huevo y por heridas provocadas por el parásito (Santos 1998). Después de la ingestión los poliedros de VPN que contienen los viriones se disuelven en condiciones alcalina ($\text{pH} > 7.5$) del intestino medio y liberan los viriones, cuando entra en contacto con las microvellosidades del intestino, los viriones liberan los cápsidos a las células epiteliales del intestino donde el virus normalmente realiza su primera vuelta de replicación (Cáceres 2002). El número de nucleocápsidos y el número de partículas de virus por poliedros puede afectar la transmisión de la infección. Posteriormente el virus afecta otros tejidos susceptibles del hospedero, donde continua reproduciéndose y multiplicándose. Entre los tejidos que ataca se menciona el cuerpo graso, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda (Cave 1995).

4.5.5 Síntomas de infección por VPN

Los síntomas aparecen después del tercer o cuarto día de infección de las larvas, primero se observan manchas en el integumento y la piel, con un tono amarillento y

aparición oleosa, después la larva reduce su movilidad, dejan de alimentarse y se suben a la parte alta de la planta, luego se cuelgan de las hojas con las patas traseras y posteriormente se vuelven oscuras debido a la desintegración de los tejidos internos hasta la ruptura del integumento (Rizo y Narváez 2001).

4.5.6 Dispersión del VPN

Los cadáveres de las larvas muertas representan una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles presentes en un cultivo, cuando las membranas corporales de la larva se rompen liberan una gran cantidad de poliedros (cuerpos de inclusión) al ambiente (Lobo de Souza; Lecuona (1995), Cruz (2002). Al avanzar el ciclo del 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 (Rizo y Narváez 2001). Según Alves (1986) reporta que la dispersión del inóculo se da por medio de factores abióticos como el viento, lluvia, riego y laboreo entre otros y factores bióticos como parásitos, depredadores adultos del hospedante, detritívoros y aves.

4.5.7 Persistencia del VPN

La radiación solar y el fotoperíodo son muy importantes para preservar la biología 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 puede persistir en el mismo hospedero (Enwistle y Evans 1985).

4.6 Formulación

La formulación es definida como la composición resultante cuando el candidato a plaguicida es mezclado con cualquier cosa, incluyendo agua (Walkenburg 1973) citado por Couch e Ignoffo (1981) por tanto cualquier combinación de un biocida activo con un segundo material es técnicamente una formulación. Varios escritos

sobre formulación relatan que este proceso es comúnmente realizado en organismos como protozoos, bacterias, nemátodos, hongos y virus, que sirven como agentes controladores de insectos (Sosa y Moscardi 1996).

4.6.1 Insecticida microbial y su estabilidad en el campo

Un insecticida microbial puede ser formulado y en condiciones normales de almacenamiento ser estable, sin afectación de las propiedades insecticidas. Los estudiosos consideran en general que al menos 18 meses de estabilidad bajo condiciones ambientales de almacén son requeridos para servicio en los mercados agrícolas, si el patógeno es solicitado para aplicar en un tiempo específico, el ciclo de vida es un problema menor y la estabilidad de 3-6 meses puede ser aceptable (Couch e Ignoffo 1981).

Una vez que la formulación tiene el ciclo de vida aceptable para su aplicación, debe preservar la actividad de insecticida microbial sobre el sustrato al cual será aplicado. El sustrato usualmente es tejido vegetal, agua y granos almacenados. Estudios realizados sobre baculovirus en VPN *Heliothis* y *Trichoplusia ni*, muestran la influencia de los factores ambientales sobre la efectividad patogénica del VPN, entre estos factores tenemos la luz solar, temperatura, agua, humedad, pH y químicos (Couch e Ignoffo 1981).

En general los entomopatógenos son afectados por las radiaciones solares UV en el campo, la luz solar destruye la efectividad y persistencia de los insecticidas microbiales. La familia Baculoviridae es fuertemente dañada, siendo más importante la longitud de onda UV-B que tiene aproximadamente 285-320 nm, estas longitudes dañan el ADN viral desde la formación del ciclo-butano y los pirimidinas (6-4) (Couch e Ignoffo (1981).

Jaques (1972) apoya esta teoría y menciona, que el rol de la luz solar en la inactivación del virus en el campo fue comprobada observando que los depósitos de VPN para *Trichoplusia ni* eran fácilmente lavados del follaje y permanecían activos sobre plantas mantenidas en la oscuridad y los depósitos de virus fueron inactivos 10 días después de la aplicación en la planta en tres parcelas experimentales expuestas al sol.

Couch e Ignoffo (1981) mencionan que el proceso de formulación al parecer protege el ADN viral, lo cual conlleva a la protección de proteínas virales. Se han realizado formulaciones utilizando adyuvantes comerciales como absorbentes generales y selectivos, etc., éstos reducen la evaporación, incrementando la estabilidad en el sol y el aumento del alimento larval. Ignoffo *et al.* (1976) realizó una combinación de caolín, agua, VPN y mejoró la formulación al agregarle un coadyuvante para incrementar la cobertura y efectividad.

Entre los factores abióticos que afectan el VPN está la temperatura y el pH que en agroecosistemas típicos la temperatura tiene rangos de 5-50 °C que generalmente no afectan a los patógenos, una regla de oro para aplicar insecticida microbial, es aplicar el producto en temperaturas que permitan a los insectos blancos alimentarse. Ali y Sikorowski (1986) mencionan que el valor del pH de la superficie del follaje de plantas de algodón, soya, tomate y otras es importante en la inactivación de los virus entomopatógenos y los altos valores del pH del rocío sobre el follaje del algodón han reducido la persistencia del *Heliothis* VPN.

4.6.2 Formulaciones sólidas y semisólidas

No se debe asumir que las radiaciones solares UV no pueden penetrar las formulaciones sólidas o semisólidas o tener un efecto diferente, las posibilidades son probablemente menores que para formulaciones líquidas. El impacto de las radiaciones solares UV varía con la composición de la formulación y el tamaño de la

gota o partícula. Debido a la naturaleza del área superficial al volumen de la gota, tales efectos serán inversamente relacionados al tamaño de la gota. La penetración de una gota depositada de 5 nm (se asume es hemisférica) en reposo sería 200 nm de diámetros y un volumen de 7%, aceptando esta profundidad de penetración, se asume que no disminuye con la intensidad de las radiaciones solares UV (Ignoffo y Couch 1981).

En el desarrollo comercial de una formulación básica de un entomopatógeno la investigación implica el mantenimiento de la viabilidad del patógeno y la virulencia durante los procesos de producción y desarrollar un producto en forma que preserve o aumente estas propiedades. Para realizar estos trabajos el conocimiento de la biología del patógeno y del insecto blanco es esencial, en sus investigaciones iniciales la industria consideró los efectos de temperatura, humedad y sustrato (material inerte), como lo más importante, debido al efecto negativo de la temperatura, la humedad y calidad (química y física) del material o portador inerte, al no tener buena manipulación, como resultado disminuye la viabilidad y virulencia del patógeno (Ignoffo 1973).

Jaques (1977) reporta también que las suspensiones líquidas de virus de insectos han sido mantenidas frías o congeladas. Aunque las formulaciones comerciales de patógenos de insectos son generalmente expuestas a condiciones de almacenamiento en bodega, las formulaciones acuosas no estabilizadas de virus son generalmente inadecuadas. Los niveles de humedad en la formulación final de un virus de insecto probablemente se asemejan a los utilizados en la formulación de *Bacillus thuringiensis*.

El VPN *Heliothis* fue el primero en ser detectado en 1891 en Sudafrica, causando enfermedad o debilitamiento a orugas; sin embargo, el agente viral causante no fue demostrado en esa oportunidad, sino hasta 1936, cuando Parsons, citado por

Ignoffo y Couch (1981) realizó un diagnóstico y confirma el hecho. Otros investigadores de 1958 a 1962 trabajaron con experimentos en invernaderos, jaulas y parcelas experimentales en el campo en cultivos de algodón tabaco y maíz.

Ignoffo (1973) reporta que en 1970 la administración para alimentos y drogas en los EEUU, certificó el virus formulado para *Heliothis*, este VPN registrado para usar contra *Heliothis* en algodón, también ha sido probado sobre especies de *Heliothis* que atacan maíz, sorgo, tabaco y hortalizas. Esta fue la primera vez que un virus de insectos fue oficialmente registrado por una agencia federal para usarlo como un insecticida comercial. Más recientemente España registra este virus y otros gobiernos estaban en este proceso.

Este virus, aislado por primera vez, de larvas de *Heliothis* enfermas atacando algodón en el Valle de Rio Grande Texas, fue exitosamente desarrollado. Su desarrollo se realizó en diferentes fases: laboratorio, producción en planta piloto y comercialización, en cada fase el virus fue evaluado sobre la base de: a) Su seguridad para el hombre, animales y plantas; b) Su factibilidad de producción y costo; c) Su efectividad contra la plaga blanco específica.

4.6.3 Formulación de Virus

Como ya se ha mencionado la actividad insecticida de los virus entomopatógenos es afectada por factores biológicos y fisicoquímicos, ya sea en condiciones de campo o de laboratorio. Entre los factores biológicos que afectan la sobrevivencia de los virus se mencionan la estructura, composición química y fenología de las plantas, en particular la presencia de algunas sustancias en las hojas, edad y constituyentes de las dietas artificiales, así como el crecimiento de las plantas (reducción de la concentración aplicada en un área determinada); la genética y virulencia del agente biológico de cada lote de producción, estadio larvario y comportamiento del insecto blanco, contaminación de la dieta artificial con otros

microorganismos, genética y fisiología del insecto, multitropismo, prácticas culturales y proceso de infección del agente microbiano por un antagonista. Los factores fisicoquímicos más importantes son la radiación solar (provocando fotoinactivación), radicales libres y pH, hora, método y equipo de aplicación, método de secado y formulación, temperatura en campo y de almacenamiento, lluvia y humedad, nicho ecológico (densidad y distribución de la plaga), agregación y precipitación de las partículas virales, y procesos de derivatización (Tamez-Guerra *et al.* 2003).

Las formulaciones comerciales de VPN y los virus de la granulosis son generalmente asperjados o secados en seco y diluidos con un material inerte o secado en frío con un carbohidrato, usualmente lactosa, secado por aspersión y por flujo de aire, es un método sencillo y barato, pero tiene como desventaja que el material (matriz y agente activo) se puede contaminar con facilidad. En ciertos casos se utiliza el secado por aire con el de cama de lecho fluido, durante el cual se combina la matriz con el agente activo (Tamez-Guerra 2003). El secado por aspersión es sencillo y económico, pero no todos los agentes de biocontrol (especialmente los hongos) resisten el proceso de secado.

Cuando se seca en frío o por congelamiento (liofilización), tiene como ventaja que no afecta la viabilidad del agente activo y prolonga la actividad durante el almacenamiento, pero es muy costoso (Burges 1981). También las suspensiones líquidas de virus de insectos se han mantenido frías o congeladas. Sin embargo, a causa de que las formulaciones comerciales son generalmente expuestas a un rango amplio de condiciones de almacenamiento en bodegas, etc., las preparaciones acuosas de virus son generalmente inestables e incapaces de actuar. Los niveles de humedad en las formulaciones final de virus de insectos son similares a los problemas en la formulación de BT, señalados anteriormente. Los requerimientos para almacenar formulaciones son usualmente más restrictivos y

para asegurar una vida en estante adecuada la refrigeración es sugerida, especialmente para las formulaciones con altos contenidos de humedad (Couch e Ignoffo 1981).

4.6.4 Formulación y seguridad

Todos los materiales incluidos en la formulación de baculovirus, tanto para la protección de las radiaciones solares UV o para otros propósitos, deben ser considerados por seguridad humana, veterinaria y medioambiental. La tecnología de protectantes contra radiaciones solares UV y su inclusión dentro de la formulación de aspersiones de patógenos para insectos, es un área sujeta a desarrollo, por ejemplo, el valor de los cromóforos en la protección ha sido solo recientemente apreciado. En términos de su modo de acción los materiales protectantes contra las radiaciones UV parece agruparse en cinco grupos principales con la acción de algunos materiales todavía sin aclarar, esta clasificación está basada en aspectos funcionales. Ellos son: 1) Reflectantes; 2) Absorventes generales; 3) Absorventes selectivos; 4) Cromóforos; 5) Radiaciones libres (humus); y 6) Sustancias misceláneas (Ignoffo 1973).

Las formulaciones básicas ya sean de patógenos de insectos o sean químicos comprenden: 1. Líquidos (suspensiones acuosas o suspensiones emulsificables); 2. Polvos humectables; 3. Polvos; 4. Cebos; 5. Gránulos.

Una formulación básica en polvo constituye la mezcla de caolín más VPN. El caolín, ha sido utilizado 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.

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 nm). 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 2nm. 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 2004).

OCEANO (2004) define al caolín como roca arcillosa, blanca y desmesurable, compuesta esencialmente por caolinita, que entra en la composición de la porcelana dura. La caolinita es un Silicato natural de Aluminio, pertenece al grupo de las arcillas, éstas a su vez son rocas sedimentarias pulverulentas impermeables, formadas por silicatos de aluminios, y que, embebida de agua, adquiere plasticidad.

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 nm), 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 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.

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 (García 2004).

4.6.4.1 Arcillas caolines

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 caolinitizado, que es necesario procesar para enriquecer en minerales del grupo del caolín.

4.6.4.2 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 (García 2004)..

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, feldspatos, 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 (García 2004).

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

4.7 Virus formulados utilizados en la agricultura

El VPN *Heliothis* fue seleccionado para desarrollar un insecticida viral debido a que su hospedero, la especie de polilla Noctuidae-*Heliothis*, está distribuida mundialmente y ocasiona daños severos en varios cultivos. Los costos anuales para el control de *Heliothis* sobre los cultivos más importantes de Estados Unidos en 1965 fueron mayores a 50 millones de dólares, estimados actuales revelan que el control de *Heliothis* en algodón en Estados Unidos está por encima de los 50 millones. En muchas áreas de cultivos mundiales ha sido difícil encontrar un control contra *Heliothis*. Las poblaciones en el campo reportan resistencia a organoclorados, organofosforados, carbamatos y compuestos químicos (Ignoffo y Couch 1981).

Richter y Fuxa (1984) mencionan que el VPN fue probado como insecticida microbial para *Anticarsia gemmatalis* en frijol de soya. Un máximo de 66 a 88 % de infección fue logrado en tres experimentos, el tratamiento con VPN redujo significativamente a la plaga después de 7-11 días de su aplicación, los rendimientos de soya fueron significativamente más altos que aquellos obtenidos en la parcela de control, pero no fueron significativamente diferentes de parcelas tratadas con carbamato. Los porcentajes de infección y los rendimientos fueron similares después de la aplicación de formulación en spray o en polvo de VPN. Muestreos realizados en las parcelas tratadas con VPN tenían tasas de infección del 18 -29 % después de 1-3 años de la aplicación.

En Nicaragua, Martínez y Swezey (1983) utilizaron el VPN de *Heliothis* para controlar larvas de *Heliothis zea* en el cultivo del algodón, aplicaciones tempranas y frecuentes de una formulación comercial dieron una protección de cosechas igual a

regímenes químicos basados en piretroides sintéticos y ovicidas, estos autores precisaron que las implementaciones futuras dependían de estudios de dosificación más precisa, adyudantes apropiados y una revisión de los umbrales de acción para reducir el costo del control microbial. Narvaéz (1995) reportan el uso del VPN para controlar especies del Complejo *Spodoptera* y específicamente *Spodoptera exigua*, plaga importante en el cultivo de cebolla, indicando además que después de la tercera aplicación la población de larvas decreció en el tratamiento con VPN, no así en el lote tratado convencionalmente.

4.8 Evaluación de formulaciones en Lepidópteros

Para poder evaluar el potencial de los baculovirus como agentes de control de plagas, es necesario conocer la actividad insecticida de los mismos. Existen muchos métodos para evaluar la actividad insecticida de formulaciones granulares, una de las cuales es por medio de bioensayos usando dietas artificiales. Esta técnica es usada en pruebas de larvas de lepidópteros. Los bioensayos para determinar la actividad insecticida de los baculovirus generalmente están basados en la determinación del porcentaje de mortalidad de las larvas del insecto huésped, a diferentes dosis de poliedros por peso o volumen determinados (Sosa y Moscardi 1996).

4.9 Bioensayos en dietas artificiales

Dentro de las técnicas más empleadas para realizar los bioensayos con dietas artificiales se pueden mencionar la alimentación con gotas teñidas, inoculación sobre la dieta y por incorporación a dietas artificiales y capa superficial. También se pueden realizar bioensayos en plantas para evaluar la actividad de los agentes de control biológico. Las dosis necesarias se determinan en base a la referencia que se tenga de la actividad insecticida del material a ensayar. Generalmente, las dosis se preparan realizando una serie de diluciones en tubos de ensayo

debidamente marcados. Para cada dilución se recomienda emplear un promedio de 50 larvas, para tener datos representativos para el análisis estadístico e incluir uno o más controles, ej., control con agua y control con el material del formulado. Los bioensayos se pueden realizar con plantas (discos de hojas tratadas con los micro gránulos) y con dietas artificiales (alimentación con gotas teñidas) en forma individual y combinada (Lobo de Souza y Lecuona 1995).

4.10 Análisis probit

Este procedimiento mide la relación entre la intensidad de un estímulo y la proporción de casos que presentan una cierta respuesta a dicho estímulo. Este análisis permite estimar la intensidad necesaria para que un estímulo llegue a inducir una determinada proporción de respuestas, como la Dosis Letal cincuenta o dosis efectiva para la mediana.

Si se toman muestras al azar de organismos y se exponen a una serie de dosis de un tóxico y se hace una gráfica de porcentajes de respuestas o muertes corregidos por mortalidad en el testigo versus dosis, la curva que resulta tiene forma sigmoideal o de S y no simétrico. Esta curva se aproxima a una simple línea recta al convertir la mortalidad a una escala probit y las dosis a logaritmo. De esta curva se pueden deducir varias dosis que producen el porcentaje de respuestas correspondientes: la dosis que produce mortalidad de k se llama dosis letal K . por ejemplo: las dosis que producen mortalidad de 30, 50, 80, 90% se referirá como DL_{30} DL_{50} DL_{80} Y DL_{90} , respectivamente (Alves 1986).

La curva de respuestas se puede interpretar en términos del concepto de tolerancias individuales. La tolerancia individual es una característica del propio individuo respecto al tóxico utilizado. La tolerancia es la dosis de tóxico inmediatamente por debajo de la suficiente para matar al organismo.

El objetivo del análisis es deducir la ecuación de respuesta y la fiabilidad de los parámetros estimados, la ecuación se escribe $Y = a + bx$, en donde **a** es el intercepto y **b** es la pendiente de la línea. La pendiente provee una indicación de la variabilidad de la respuesta, cuanto más alta es la pendiente, menor es la varianza en respuesta al tóxico (Throne 1995).

4.11 Determinación de la potencia relativa

Los resultados de la DL_{50} , CL_{50} o TL_{50} pueden variar en un mismo aislado con una población de insectos sometidos a los bioensayos y con las condiciones realizadas en el bioensayo. La tasa de potencia sufre menos variaciones ya que está siempre correlacionada con un aislado patrón con una actividad insecticida conocida, que debe usarse en las pruebas cuando se compara con cualquier otro aislado o bien con una formulación.

La potencia relativa se calcula relacionando la DL_{50} del aislado de referencia o patrón con la DL_{50} de la muestra que se evalúa (Alves 1986).

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Ubicación del estudio

El estudio se realizó en el ciclo agrícola 98-99, en el Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León y en el Valle de Sébaco, municipio de Matagalpa, Nicaragua. Está ubicado a 110 Km al Norte de Managua, localizado entre las coordenadas 12°51´ de latitud norte y 86°06´ de longitud oeste. El clima predominante es de sabana tropical, caracterizada como semi-húmedo, las temperaturas oscilan entre 21° y 30 °C. La precipitación mínima es de 800 mm y la máxima es de 2000 mm y se caracteriza por tener una buena distribución durante el año. Posee una altitud de 469.67 msnm (INETER 2008).

El estudio se realizó en dos fases, una de laboratorio en la UNAN-León y la otra de campo en Sébaco.

5.2 Fase de Laboratorio

Esta fase comprende diferentes aspectos, tales como la preparación del material biológico (virus sin formular y virus formulado), la evaluación de la actividad insecticida.

5.2.1 Preparación del material biológico

En primer lugar se procedió a determinar la concentración del *Virus de la Poliedrosis Nuclear* expresada en Cuerpos de Inclusión Poliedral / μl (CIP/ μl), (ver foto 1a y 2a, anexo 4). Para ello se procedió a semipurificar el virus mediante un proceso de centrifugación diferencial hasta obtener los cuerpos de inclusión poliedral.

5.2.1.1 Semipurificación del Virus *S. exigua*

El virus *SeVPN* se obtuvo del Laboratorio de Producción Virus de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UNAN-León. Estas larvas muertas por virus se trituraron en una solución de Sodio Duodecyl Sulfato (SDS) al 0.1%. Luego se filtró a través de cuatro capas de tela de gasa, seguidamente se precedió a centrifugar.

El caldo de virus obtenido se colocó en tubos de ensayo en la centrifuga a 3,000 rpm por 1 minuto, como resultado se obtuvo un sobrenadante y un sedimento, para remover el virus se desechó el sedimento y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 6,000 rpm por 10 minutos, nuevamente se formó un sedimento y un sobrenadante, en esta el sobrenadante se desechó y el sedimento que contiene los cuerpos poliedricos de inclusión se resuspendió en agua destilada y se repitió el paso anterior. A este sedimento se le agregó un volumen de agua destilada, se agitó y se procedió a realizar el conteo para determinar la concentración de poliedros por ml (ver foto 3a, anexo 4).

5.2.1.2 Preparación del formulado

a) Formulación con caolín

Se usó caolín producido por la compañía Rotowa de Nicaragua. El contenido o composición química del caolín expresada en porcentaje fue de: SiO₂: 87.29; Al₂O₃:3.06; CaO: 0.74; MgO: 0.67; Fe₂O₃:1.28; Na₂O: 0.27; K₂O: 0.03; TiO: 0.08; H₂O: 4.26. El tamaño de las partículas era de 325 mesh.

El formulado se realizó en una proporción de 1:1, para ello se pesaron 150 larvas equivalentes (LE) las que fueron maceradas, luego el caldo se filtró dos veces con tela fina para evitar restos de tejido (ver foto 1b, 2b, anexo 4). Luego se pesó caolín y se mezcló con el caldo de virus, se formó una pasta de consistencia maciza (ver foto 3b, anexo 4). Esta mezcla se depositó en una bandeja forrada con plástico negro dejando una capa fina bien extendida. La bandeja se colocó en estantes en el

laboratorio de virus (ver foto 4b, anexo 4). Se tomó la temperatura del laboratorio a diario. Una vez que la mezcla se secó se procedió a moler la pasta en un molino mecánico de moler maíz (ver foto 5b, anexo 4), evitando el recalentamiento y así evitar la baja calidad del producto.

b) Control de calidad del formulado

Se tomaron 0.5 g del producto, a este se le agregó agua destilada hasta completar 100 ml y luego se agitó con un agitador magnético en un erlenmeyer. En un vial pequeño se preparó una dilución 1:10 (1 ml de la solución del erlenmeyer más 9 ml de agua estéril). Con una pipeta Pasteur se tomaron 20µl para colocarla en una cámara de conteo Neubauer y se procedió al conteo para obtener la concentración del formulado. Después de realizar el conteo se comparó con el patrón de virus semipurificado.

Se determinó la cantidad de gramos del formulado que tuviera la concentración de (CIP) necesaria para el control de *Spodoptera exigua* en el campo, estableciendo una relación del contenido de CIP en un gramo con la concentración usada en campo que es de 10^{11} CIP/ha.

5.2.2 Evaluación de la actividad insecticida

5.2.2.1 Bioensayo para determinar DL_{50} del virus sin formular

Para la realización del bioensayo, se utilizó el método de contaminación de la dieta. Se utilizaron larvas de *S. exigua* del II instar larval, criadas en el Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León. Estas larvas se pesaron previamente. A partir de la solución madre se prepararon 5 dosis, las cuales fueron: 1740, 870, 435, 217, 72 CIP / µl, más un control con agua. Cada uno fue repetido tres veces, usando 50 larvas por dosis para un total de 150 larvas por repetición. Se utilizó dieta de soya, la cual se dispensó con una jeringa y se colocó directamente en las celdas del microplato. Sobre la dieta se colocó posteriormente con una micropipeta 1µl de la

dosis de virus (ver foto 4a, anexo 4), teniendo cuidado al depositar el virus sobre la dieta para que la punta no se bloqueara.

Se inició el bioensayo con el control (agua) y se continuó con la concentración más baja del virus hasta concluir con la dosis más alta. Se colocó la larva del segundo instar en la celda con la ayuda de una pinza fina (ver foto 5a, anexo 4). Cuando todas las larvas estuvieron en su lugar, se cubrió con un papel absorbente ligeramente húmedo, se colocó nuevamente el porta objeto y se selló con una cinta adhesiva, rotulando cada microplato con la dosis y repetición respectiva. Se dejaron las larvas por un período de 24 horas hasta que consumieran la dieta contaminada.

Luego se procedió a trasladar todas las larvas que comieron la dieta a los vasos de plástico, anotando la fecha de traslado en las hojas de datos. La revisión de larvas se llevó a cabo diariamente (ver foto 6a, anexo 4) y se anotó en las hojas el número de larvas muertas y/o pupas. Se consideró una larva muerta por virus cuando al tocarla el integumento se rompía saliendo líquido que contienen las partículas virales. Todas las larvas que presentaron un síntoma diferente fueron examinadas al microscopio para determinar la causa de la muerte.

5.2.2.2 Bioensayo del virus formulado

Este bioensayo se realizó utilizando la misma metodología usada en el primer bioensayo descrito en el punto 5.2.2.

5.2.2.3 Medición de la viabilidad en el tiempo del virus formulado

Una vez realizado el formulado se colocaron seis muestras a temperatura ambiente (ver foto 6b, anexo 4) y seis muestras en refrigeración, manteniéndose un registro de la temperatura en ambas condiciones. Con cada una de estas muestras se realizó un bioensayo cada mes para medir la viabilidad del virus formulado durante

un período de seis meses. Se determinó la D_{L50} y se comparó el valor de cada una a lo largo del tiempo.

5.3 Fase de campo

5.3.1 Efectividad del formulado en el campo

El trabajo se realizó en Sébaco-Matagalpa, en el lote de un productor. Para llevar a cabo este ensayo se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 2 tratamientos y 4 repeticiones. Los tratamientos consistieron: 1) En la aplicación de virus formulado y 2) La aplicación del virus sin formular. El área de la parcela fue de 10 x 10 m de largo para un área de 100 m². El área del tratamiento fue de 400 m² y el área del bloque de 200 m², para un área total del ensayo de 800 m². Para evitar la dispersión del virus, la distancia entre parcelas fue de 2 m y 5 m entre bloques. La parcela útil fue de 6 surcos por 8 m.

Para evaluar en el campo se realizó un recuento poblacional antes de la aplicación de los tratamientos y se anotó el número de masas de huevos, larvas pequeñas, grandes y porcentaje de daño foliar. El recuento consistió en revisar al azar 10 plantas por parcela. El virus formulado y sin formular se asperjó con una bomba de mochila en horas tempranas de la mañana y la aplicación se decidió según la población plaga presente en el tratamiento. Si se encontraban 10 plantas con gusanos ó 2 masas de huevos en 100 plantas la aplicación se realizaba (ver foto 1c y 2c, anexo 4). Cuatro días después de la aplicación de los tratamientos se efectuó otro recuento poblacional y se llevaron muestras de larvas al laboratorio.

5.4 Análisis estadísticos de los datos

Para el análisis estadístico de los datos de campo se utilizó el Programa estadístico SPSS (Programa Estadísticos para las Ciencias Sociales), se realizó un Análisis de

Varianza (ANDEVA), con un nivel de confianza del 95 %, reflejando los resultados en cuadros.

Para los datos del laboratorio (bioensayos) se usó el análisis Probit del Programa Estadístico SPSS. Este análisis es utilizado para el estudio de dosis respuesta, que analiza la correlación entre la intensidad del estímulo (dosis) y la cantidad de organismos que responden. La cantidad de respuestas puede ser expresada como una probabilidad binomial de respuesta por sujeto. También estima la correlación lineal entre las desviaciones de la distribución y la dosis logarítmica aplicada al modelo de distribución de los datos observados, como una dosis media efectiva (DE_{50} o DL_{50}) que es la dosis que produce un 50% de la mortalidad en los organismos de la población (Throne 1995).

Para el cálculo de la potencia relativa la fórmula es:

$$PR = \frac{DL_{50} \text{ del aislado de referencia o estándar}}{DL_{50} \text{ de la muestra}} \times \text{Potencia del estándar (1000)}$$

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Fase de laboratorio

6.1.1 Actividad biológica inicial de virus sin formular y virus recién formulado en condiciones de laboratorio

Los resultados obtenidos en el bioensayo realizado con el virus sin formular en el laboratorio muestra una DL_{50} de 2040 CIP/ μ l (Cuadro 1), siendo esta la máxima actividad biológica del virus. Los registros previos de los valores de DL_{50} de la cepa viral aislada de *Spodoptera exigua* son relativamente bajos, oscilando entre 50 a 300 CIP/ μ l (UNAN León, 1992-04), lo que indica que es una cepa muy patogénica y virulenta. No obstante, el valor de la DL_{50} de 2040 CIP/ μ l en el virus sin formular resultó mucho mayor. Este es un indicativo de pérdida de patogenicidad o de viabilidad del virus, ya que es una cepa que tiene 10 años de estar reproduciéndose en el laboratorio y las condiciones de almacenamiento pueden afectar las propiedades del mismo. También podría indicar que la susceptibilidad de las larvas a la cepa viral se ha modificado.

Al realizar el bioensayo con el virus formulado con caolín, inmediatamente después de elaborarse (tiempo cero) y compararlo con el virus sin formular, mostraron un grado de patogenicidad similar. Estos valores son un punto de comparación y son los que determinan si el virus formulado es más o menos patogénico que el virus sin formular (Alves 1986).

El valor de la DL_{50} del virus formulado fue de 2758 CIP/mg, al compararla con la DL_{50} del virus sin formular se observa un incremento de 717 CIP/mg, lo que representa un 35% de incremento en la dosis necesaria para matar al 50 % de la población,

indicando que el proceso de la mezcla con caolín y su posterior secado ocasiona la muerte de algunos viriones. Esto puede deberse al efecto del incremento de la temperatura durante el proceso de molido ya que las partículas al triturarse en el molino se calientan, o bien por la deshidratación de la mezcla. Esto indica que sería necesario incrementar la cantidad de virus en el momento de la formulación para mantener la misma efectividad del virus para el control de *Spodoptera exigua* en el campo.

Estudios realizados usando diferentes formulaciones secas del virus AfMVPN mostraron un resultado similar a este estudio, aumentando el valor de la CL_{50} en el virus formulado, comparado con la CL_{50} del virus sin formular (Behle *et al.* 2003).

Otra explicación a este hecho observado es que el caolín tiene la propiedad de aglutinar las partículas virales en ciertas partes provocando una distribución irregular de los viriones, las unidades infecciosas del virus, por lo que al tomar una muestra del virus formulado, los valores pueden ser más altos o más bajos que el virus sin formular.

Cuadro 1. Dosis-Respuesta de larvas de II instar de *Spodoptera exigua* sometidas a los tratamientos de virus sin formular y virus formulado en el tiempo cero. Laboratorio de Control Biológico. UNAN-León. 1999.

Mes	Tratamiento	DL ₅₀	Límites fiduciales (95%)		χ^2	Pendiente B
			Inferior	Superior		
0	Sin formular	2040	997.53	4173.20	3.33	0.6033
0	Formulado	2758	1684.71	4515.17	8.65	1.0239

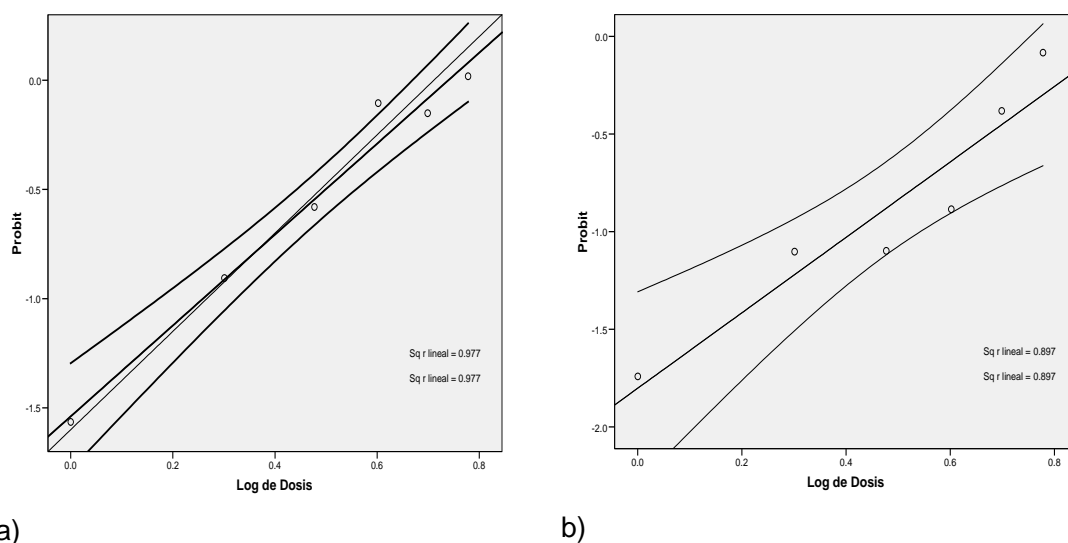
En el Cuadro 1 se muestran los valores de la prueba de X^2 de los bioensayos con el virus sin formular y recién formulado, el valor fue de 3.33 y 8.65, respectivamente. Este valor indica la bondad del ajuste de los datos observados a

los esperados representados en la línea de regresión. El valor de la X^2 del bioensayo del virus formulado, por lo tanto, presentan más heterogeneidad en los datos obtenidos, que el virus sin formular. Ibarra y León (1993) reportan que los valores de X^2 deben ser menores o iguales a 5. Esta heterogeneidad en los datos del virus formulado pueden deberse a las características del caolín de agrupar partículas virales, como se mencionó anteriormente. También sería necesario estudiar, para optimizar la formulación de virus, varias concentraciones del ingrediente inerte, en este caso el caolín, y su efecto en la variabilidad de la actividad insecticida del virus.

Por otro lado, el valor de la pendiente indica la variabilidad de la población a la preparación o la dosis, típicamente se reportan valores menores de 2 en bioensayos con patógenos de insectos y valores hasta de 20 en bioensayos con insecticidas químicos. Ibarra y León (1993) sugieren que cuando se obtienen valores bajos es un indicativo de que debe estrecharse el rango de la dosis probadas para distribuir mejor el efecto de la mortalidad y lo opuesto cuando el valor de la pendiente es muy alto. En el bioensayo con el virus crudo el valor de la pendiente fue de 0.60 indicando que a un cambio en la dosis incrementa la mortalidad en 0.60, mientras que en el formulado la pendiente obtenida fue de 1.02, indicando también que el efecto en la mortalidad larval es mayor al incrementar la dosis del virus formulado con respecto al virus sin formular.

Se observa además que el límite inferior, en ambos bioensayos, se desvía muy poco del valor de la DL_{50} , no ocurre lo mismo con el límite superior, que se incrementa con respecto al valor de la DL_{50} , estos límites amplios indican cierto grado de heterogeneidad de los bioensayos. Al hacer la prueba de paralelismo se observa que el límite fiducial inferior de la DL_{50} del virus formulado se traslapa con el límite superior de la DL_{50} del virus sin formular, lo que indica que hay cierto grado de

paralelismo (X^2 11.72, p 0.001) por lo que se estima la potencia relativa entre el virus crudo (patrón) y el virus recién formulado, obteniendo un valor de 0.625, esto indica que ambas formulaciones son igualmente potentes pues son menores que uno.



Gráfica 1. Línea dosis respuesta del virus crudo (a) y virus recién formulado (b) en larvas de *S. exigua*. Laboratorio de Control Biológico. UNAN-León. 1999.

Al analizar los datos de mortalidad producida en cada uno de los bioensayos, se muestra en el Cuadro 2, que la mortalidad estaba en ambos bioensayos en relación directa con la dosis aplicada, o sea aumenta en la medida que la dosis aplicada se incrementa, también cabe destacar que el control presentó una mortalidad en ambos bioensayos menor que el 10 % lo que se considera permisible.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad de larvas de II instar de *S. exigua* sometido a diferentes dosis de virus crudo y el virus recién formulado.

Dosis	Virus crudo			Virus formulado		
	No larvas	Larvas muertas	% de mortalidad	No larvas	Larvas muertas	% de mortalidad
Control	136	8	5.88	147	6	4.08
72	126	23	18.25	148	20	13.51
217	146	41	28.08	147	20	13.6
435	120	55	45.8	149	28	18.79
870	125	55	44	148	52	35.13
1740	138	70	50.72	150	70	46.66

En el cuadro 3 se muestra el análisis de varianza realizado con el acumulado de los porcentajes de mortalidad de las larvas sometidas a ambos tratamientos. Se observa que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$), entre los tratamientos, por lo que se acepta la hipótesis nula de que el virus formulado y sin formular son iguales. Sin embargo, el virus sin formular produce un mayor porcentaje de mortalidad que el virus formulado, lo que confirma los valores obtenidos en la DL_{50} .

Cuadro 3. Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas de *Spodoptera exigua*, sometidas a diferentes tratamientos virus sin formular y virus formulado, bajo condiciones de laboratorio. Laboratorio de Control Biológico. UNAN-León. 1999.

Fuente	G. L.	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	886.7466	886.7466	3.0540	0.0896 ns
Error	34	9871.9966	290.3528		
Total	35	10758.7432			

6.1.2 Determinación de la actividad biológica del virus formulado en función del período y temperatura de almacenamiento en larvas de *Spodoptera exigua*.

El virus formulado con caolín fue mantenido durante 180 días, bajo temperatura ambiental promedio registrada en el laboratorio de 29.3°C y a una temperatura promedio bajo refrigeración de 12.2°C. Los valores de DL₅₀ en cada uno de los bioensayos realizados desde los 30 a los 180 días después de elaborado el formulado, para cada uno de los tratamientos varían como se observa en el Cuadro 4 y 6.

Cuadro 4. Viabilidad del VPN formulado en condiciones de laboratorio y almacenado a temperatura ambiente, mostrando la efectividad biológica (DL₅₀) por un período de 6 meses. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.

Duración del almacenamiento (días)	DL ₅₀	Límites fiduciales (95%)		χ ²	Pendiente (a)
		Inferior	Superior		
30	1558.83	1080.41	2249.11	12.11	0.940
60	2327.02	1399.12	3870.32	4.85	0.886
90	1925.42	1279.40	2897.63	4.25	0.986
120	3445.87	1814.98	6542.23	0.72	0.826
150	1048.66	711.17	1546.30	3.20	0.727
180	1820.46	921.82	3595.16	5.80	0.538

El valor de la DL₅₀ después de 30 días de formulado resultó con un valor de 1558.83 CIP/mg, en larvas sometidas al virus formulado y mantenido a temperatura ambiente, al compararlo con el virus recién formulado se observa que el valor fue menor, lo que indica que aparentemente se mejora la actividad biológica pues se necesita menos virus para matar el 50% de la población.

Además se observa que, al pasar el tiempo, hay una variación en los valores de la DL_{50} , mostrando el valor más alto de 3445.87 CIP/mg a los 120 días indicando una pérdida de viabilidad del virus, pero disminuyendo hasta 1820 CIP /mg a los 180 días. Esta variación se puede explicar, por un lado, debido a que en cada bioensayo se trabajó con larvas de progenies diferentes y obviamente estados fisiológicos distintos en cada grupo de larvas aún a pesar de ser parte de la misma progenie, ya que la temperatura ambiental varía y afecta la tasa de crecimiento de los insectos (ectotermos) lo que también afecta los resultados, tal como señala Hughes y Wood (1981), por otro lado, las variaciones también son debidas a las propiedades del caolín de agrupar los viriones alrededor de sus partículas, como lo explicamos anteriormente.

Ahora bien, a pesar de esta variación, a los 180 días el valor de la DL_{50} disminuyó en 900 CIP/mg, lo que significa que todavía el virus mantiene una actividad biológica adecuada; sin embargo, es necesario adicionar algunos elementos (aditivos) que le confieran más estabilidad al formulado para que mantenga una actividad biológica adecuada y estable (Behle *et al.* 2003).

Steinhaus (1954) citado por Bahle *et al.* (2003) señala que el baculovirus después de 15 años de almacenamiento mantiene su actividad biológica. Sin embargo, otros autores han encontrado disminución de la actividad biológica del virus, después de 9 ó 6 años de almacenamiento en refrigeración y en suspensión acuosa. Se reporta también pérdida de actividad del virus formulado en seco cuando es almacenado a temperatura ambiente y refrigeración, manteniendo un nivel de actividad insecticida, siendo mayor la pérdida en el virus almacenado a temperaturas de 30°C.

Otros estudios realizados por Lasa *et al.* (2008) indican que los cuerpos de inclusión del virus almacenado a 25°C se deterioran probablemente debido a la proteólisis

durante el período inmediatamente después de formulado, antes que la proteasa se haya degradado o inactivado, actividad enzimática que es eliminada al almacenarse en bajas temperaturas.

El valor de X^2 a los 30 días de formulado el virus fue de 12.11, indicando una heterogeneidad de los datos, los valores obtenidos después de los 60 a los 180 días fueron entre 4.85 y 5.8, indican un buen ajuste entre los valores observados y los esperados, siendo el valor más bajo a los 120 días, expresando una máxima similitud entre los valores observados y la línea de regresión.

Con respecto a los valores de la pendiente todas fueron típicamente bajas, con un rango entre 0.538 a 0.98, indicando un rango estrecho de tolerancia al virus formulado; por otro lado, la similaridad de las pendientes sugieren cambios similares en la respuesta al incrementar la dosis en la población de *S. exigua*, independientemente del tiempo de formulación del virus.

Cuadro 5. Ecuaciones de respuestas en cada bioensayo realizado con el virus SeVPN formulado con caolín en larvas de *Spodoptera exigua*, y almacenado a temperatura ambiente. Laboratorio de Control Biológico. UNAN-León, 1999.

<i>Días</i>	<i>Ecuación</i>
0	$Y = 2.84925 + (0.62880 * X)$
30	$Y = 2.02824 + (0.92939 * X)$
60	$Y = 2.18300 + (0.83956 * X)$
90	$Y = 1.75614 + (0.98807 * X)$
120	$Y = 1.06086 + (1.17948 * X)$
150	$Y = 2.78986 + (0.73803 * X)$
180	$Y = 2.39500 + (0.85111 * X)$

Donde: $Y = b + mx$; siendo “Y” la mortalidad, “b” el intercepto, “m” la pendiente y “x” la dosis.

El cuadro 5 muestra las ecuaciones de respuesta, mostrando el ajuste de cada bioensayo, a partir de la cual se puede observar el ajuste de la línea de regresión y calcular los valores de la DL₅₀.

Al analizar los resultados obtenidos con el formulado almacenado en refrigeración, se observó también una variabilidad en las respuestas al transcurrir el tiempo en los valores de la DL₅₀, al igual que el formulado mantenido en condiciones ambientales, como se observa en el cuadro 6.

Cuadro 6. Viabilidad del VPN formulado en condiciones de laboratorio y almacenado en refrigeración, mostrando la efectividad biológica (DL₅₀), por un período de 6 meses. Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.

Duración del almacenamiento (días)	DL ₅₀	Límites fiduciales (95%)		X ²	Pendiente a
		Inferior	Superior		
30	3701.68	1234.69	11097.86	12.64 *	0.4641
60	556.94	466.51	664.90	4.48	1.3726
90	2484.27	1534.43	4022.07	0.83	0.9589
120	611.08	492.94	757.54	3.79	1.0762
150	1151.86	799.71	1659.08	3.09	0.8209
180	847.03	656.12	1093.48	0.21	1.0614

A los 30 días después de formulado el valor de la DL₅₀ se incrementó a 3701.68 CIP/mg, indicando pérdida de actividad del virus. Sin embargo, este incremento probablemente se debe a que la fracción del formulado utilizado en este bioensayo tenía menor cantidad de viriones agrupados a las partículas de caolín. Lo que se confirma con el valor de la DL₅₀ obtenido a los 60 días, que fue un valor bajo de 556.9 CIP/mg indicando una buena viabilidad del virus y por tanto su efecto se mantiene. Al finalizar el estudio a los 180 días el virus conserva la viabilidad ya que el valor de la DL₅₀ se mantiene en 847.03 CIP/mg.

Al observar los valores de X^2 obtenidos se observa que a los 30 días, el valor fue de 12.54, indicando una alta heterogeneidad en las respuestas de las larvas, lo que coincide con los límites fiduciales, que fueron muy amplios, lo que sugiere que el estimado no fue muy preciso. Esto se confirma al analizar los demás valores de X^2 que fueron bajos entre 0.21 y 4.48, lo que indica un buen ajuste de los datos a la línea de regresión y por tanto los valores no son heterogéneos.

Al analizar la pendiente, se observa que todos los valores oscilan entre 1.37 y 0.46 indicando un rango estrecho de tolerancia al virus formulado y mantenido en refrigeración; por otro lado, la similaridad de las pendientes sugieren cambios similares en la respuesta al incrementar la dosis en la población de *S. exigua*, independientemente del tiempo de formulación del virus de la misma manera que ocurre en el virus formulado y mantenido en temperatura ambiente.

En el cuadro 7 se muestran las ecuaciones de respuesta de cada bioensayo realizado con el virus almacenado en refrigeración, las cuales corresponden a una línea recta y a partir de ella se puede calcular la respuesta posible a cualquier dosis a la que se exponga la población de *Spodoptera exigua*.

Cuadro 7. Ecuaciones para las respuestas en unidades probit de *Spodoptera exigua* formulado con caolín, SeVPN, temperatura 12.3 °C. Laboratorio de Control Biológico, UNAN-León, 1999.

Meses	Ecuación
0	$Y = 2.84925 + (0.62880 * X)$
1	$Y = 3.55773 + (0.40636 * X)$
2	$Y = 1.29482 + (1.35016 * X)$
3	$Y = 1.79193 + (0.94116 * X)$
4	$Y = 2.04305 + (1.06041 * X)$
5	$Y = 3.28033 + (0.52423 * X)$
6	$Y = 1.88324 + (1.05861 * X)$

Al comparar los resultados del virus almacenado a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración, se observa que al mantener refrigerado el virus se mantiene más estable y las respuestas son más homogéneas, como era de esperarse. Sin embargo al analizar las mortalidades de las larvas sometidas al virus mantenido en refrigeración y ambiente las diferencias estadísticas no son significativas ($F=0.95$; $p= 0.05$) como se observa en el cuadro 8 y 9.

Es notorio también que, además de la fluctuación, que es común en ambos formulados, los valores de la DL_{50} son menores, lo que indica una adecuada conservación de la viabilidad del virus.

Cuadro 8. Análisis de varianza de porcentajes de larvas muertas de *Spodoptera exigua*; evaluando la viabilidad del virus formulado mantenido a T° ambiente. Laboratorio de Control Biológico. UNAN-León, 1999.

Fuente	G. L.	SC	CM	F	P
Tratamiento	5	1784.6686	356.9337	0.9558	0.4487 ns
Error	102	38092.7932	373.4588		
Total	107	39877.4618			

Cuadro 9. Análisis de varianza de porcentajes de larvas muertas de *Spodoptera exigua*; evaluando la viabilidad del virus formulado mantenido en refrigeración. Laboratorio de Control Biológico. UNAN-León, 1999.

Fuente	G. L.	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	549410.5400	549410.5400	0.5051	0.4909 ns
Error	12	13053081.78	1087756.815		
Total	13	13602492.32			

Cabe destacar por tanto, que las propiedades que posee el caolín, primero de aglutinar las partículas y en segundo lugar debido a que las partículas son untuosas al tacto, por el Filosilicato de Aluminio que contiene, le permiten ser un adherente protector. Considerando este hecho, nos induce a concluir que se debe

realizar una buena homogenización de la mezcla del virus con el caolín antes de proceder al secado ya que afectaría, según el grado de agregación, la respuesta de mortalidad por virus de las larvas aplicadas con el formulado.

6.2 Determinación de la efectividad del VPN formulado, controlando larvas de *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla

La dosis recomendada para la aplicación de virus en el campo es de 213 LE/ha, lo que equivale a 1.5×10^{11} CIP/mg. Al realizar el control de calidad del formulado, se obtuvo una concentración de virus de 1.125×10^{11} CIP/mg en 75 g del producto formulado, por lo que al hacer la relación de la dosis de campo necesaria para controlar las poblaciones de *S. exigua*, se recomienda usar la cantidad de 35.43 g para aplicar una ha.

Para probar la efectividad del formulado en el campo, se tomó en cuenta la densidad poblacional y el umbral de acción (una larva en 10 plantas). En el Cuadro 8, se muestra la densidad de población de las larvas de *S. exigua* en cada tratamiento antes y después de la aplicación y la mortalidad de las larvas colectadas en el campo y evaluadas en el laboratorio. Como se observa se encontró una población de 59 y 30 larvas en el tratamiento virus sin formular y virus formulado, respectivamente, estos valores indican que la población sobrepasó el umbral de acción, por lo que se aplicaron los tratamientos.

Cuadro 10. Población de larvas de *Spodoptera exigua* en el cultivo de cebolla, antes y después de la aplicación del virus sin formular y formulado, Sébaco-Matagalpa, 1999.

Tratamiento	Población de larvas en campo			Larvas colectadas en campo y evaluadas en Laboratorio		
	Larvas vivas	Larvas muertas	% de mortalidad	Larvas vivas	Larvas muertas	% de mortalidad
Virus sin formular	59	23	39	9	2	22
Virus formulado	30	19	63	14	4	29

Después de la aplicación en el tratamiento donde se usó virus sin formular se encontraron 23 larvas muertas, esto indica un 39 % de mortalidad de larvas pequeñas en el campo. Para el tratamiento virus formulado se encontraron 19 larvas muertas (63%). Esta mortalidad es adecuada para la regulación de larvas en el cultivo puesto que una de las ventajas de la aplicación de virus es que los cadáveres de las larvas muertas representan una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles presentes en un cultivo, ya que cuando el integumento de la larva se rompen liberan una gran cantidad de poliedros (cuerpos de inclusión) al ambiente (Hostetter, 1985 citado por Lobo de Souza; Lecuona, 1995 y Cruz, 2002), lo que significa que no es necesario hacer muchas aplicaciones de virus en el cultivo. Por otro lado, al avanzar el ciclo del cultivo, tanto el agua de lluvia, como las larvas caídas al suelo transportan las partículas virales hasta el suelo. Además, Alves (1986) citado por Rizo y Narváez (2002) reporta que la dispersión del inóculo se da por medio de factores abióticos como el viento, lluvia, riego y laboreo entre otros y factores bióticos como parásitos, depredados adultos del hospedante, detritívoros y aves. Por ello no fue necesario realizar una segunda aplicación en el cultivo de la cebolla.

Sin embargo, cabe destacar que estas diferencias en la mortalidad del virus se deben a que el caolín confiere cierta protección a las partículas virales de los rayos UV (Ali, S y Sikorowski, P. 1986). Por otro lado, el agua de la zona de Sébaco es alcalina y este es un factor que afecta la sobrevivencia del virus y por tanto la pérdida de actividad de los virus y su efectividad en el campo, por ello los valores bajos de control en *S. exigua* tal como lo señalan Moscardi y Sosa-Gómez (1996). Por esta razón se recomienda acidificar el agua antes de realizar una aplicación con virus.

Por tanto se concluye que a pesar de los valores relativamente bajos de mortalidad al compararlo con otros estudios realizados con el virus en el cultivo de cebolla que han ocasionado hasta un 85% de mortalidad (Narvaéz 1999) representa una mortalidad sustantiva, que permite el uso de este producto en condiciones de campo siempre y cuando se adicione un regulador del pH del agua.

VII.CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este estudio se concluye lo siguiente:

- El valor de la DL_{50} del virus sin formular fue de 2047/ μ l y el virus formulado fue de 2758 CIP/mg, no mostrando diferencias estadísticas significativas entre ambos.
- La potencia relativa de los dos formulados fue de 0.625 indicando que ambos son similares en su actividad biológica.
- La viabilidad en el tiempo del virus formulado y mantenido a temperatura ambiente fue relativamente estable, mostrando fluctuaciones en los valores de la DL_{50} , pero al finalizar los seis meses el virus se mantiene activo con una DL_{50} de 1820 CIP/mg.
- La viabilidad en el tiempo del virus formulado y mantenido a temperatura de refrigeración fue más estable que el virus mantenido a temperatura ambiente, mostrando fluctuaciones en los valores de la DL_{50} , pero al finalizar los seis meses el virus se mantiene activo con una DL_{50} de 847.03CIP/mg.
- La efectividad del virus formulado aplicado en el cultivo de cebolla, resultó ser satisfactoria con un promedio de larvas muertas de 63% por lo que funciona como un bioinsecticidas controlador de *Spodoptera exigua*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Incrementar la dosis de virus usada para su formulación con el fin de disminuir el efecto de la pérdida de viabilidad del formulado durante el proceso de secado y molido del mismo.
- Homogenizar bien la mezcla del virus con el caolín antes del proceso de secado para disminuir el efecto de aglutinación, de manera que se tengan resultados más estables a lo largo del tiempo de almacenamiento del formulado.
- Estudiar diferentes concentraciones del ingrediente inerte caolín en el formulado y otros aditivos para determinar el efecto en la variabilidad de la actividad insecticida del virus.
- Almacenar el virus formulado a temperaturas menores de 30°C para obtener un resultado más homogéneo al usarse para la regulación de las poblaciones de *S. exigua* en el cultivo de cebolla.
- Antes de aplicar el virus en el campo se debe asegurar un pH del agua menor o igual a siete para conferir una mayor sobrevivencia del virus en el cultivo.
- Continuar con las investigaciones sobre la formulación de virus con caolín y su viabilidad hasta por un período de 18 meses.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ALI, S.; SIKOROWSKI, P.P. 1986. Effects of sunlight, cotton foliage surface, and temperature on the infectivity of cytoplasmic polyhedrosis virus to *Heliothis virescens* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 79:364-367.
- ALVES, B. S. 1986. *Controle Microbiano de Insetos*. Editorial Manole. LTDA. Sao Paulo – Brasil. 407 p.
- BEHLE, R.; TAMEZ-GUERRA, P.; McGUIRE, M. 2003. Field Activity and Storage Stability of *Anagrapha falcifera* Nucleopoliedrovirus (AfMNPV) in Spray-Dried Lignin-Based Formulations. *Journal of Economic Entomology*. 96(4):1066-1075.
- BEDNAREK-SIEGFRIEN, G. 1986. *El huerto familiar, un libretto práctico para todas las familias que quieren sembrar hortalizas*. Managua-Nicaragua. 72 p.
- BURGES, H. D. 1981. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. *In* BURGES, H. D. ed. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London, Academic Press. 949 p.
- CASSERES, E. 1984. *Producción de Hortalizas*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 387 p.

- CACERES, C. A. 2002. Efecto del Ácido Bórico, Neem y Tinopal en dieta de *Spodoptera frugiperda* sobre la tasa de infectividad por el Virus de la Poliedrosis Nuclear. Tesis Ing. Agro. Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. 33 p.
- CAVE, R. 1995. Manual para la Enseñanza del Control Biológico. Zomorano Academic Press. Honduras. 187p.
- COUCH, T. L.; IGNOFFO, C.M. 1981. Formulation of insect pathogens. *In* BURGESS. H. D. ed. Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. London. Academic Press. 621- 634 p.
- CRUZ, V. E. A. 2002. Estimación de la DL₅₀ y DL₉₀ del Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Autographa californica* en *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*. Tesis Ing. Agro. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras. 27 p.
- ENTWISTLE, P. F.; EVANS, H. F. 1985. Virus control. *In* Comprehensive Insect Physiology. Biochemistry and Pharmacology. ed. G. A. Kerkut y L I Gilbert, Pergamon Press, Oxford.
- EVANS, H. F.; ENTWISTLE P. F. 1987. Viral Diseases. *In* Epizootiology of insect diseases Ed. Fuxa, R. Wiley & Sons, Inc. Oxford, England. 311 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación HN). 1987. Cultivo de Cebolla Amarilla con Riego. Secretaría de Recursos Naturales. Proyecto PNUD, FAO, HON 84 004. Boletín Técnico No. 1. Tegucigalpa, D. C., Honduras, C. A. 35 p.

- FINNEY, D. J. 1971. Probit Analysis. Ed. Prensa de la Universidad de Cambridge, Londres.
- FHJC (Fundación Hogares Juveniles Campesinos CO). 2002. Manual Agropecuario Tecnologías Orgánicas de la Granja Integral Autosuficiente. Tomo I. Bogota. Colombia. 1093 p.
- FUSAGRI. 1986. Cebolla y ajo. Fundación Servicio para el Agricultor VE. Serie Petróleo y Agricultura No. 9. 89 p.
- GALMANIRI, C. 1992. Recursos genéticos de la cebolla (*Allium cepa* L): Importancia recolección, conservación, caracterización y uso en Argentina. Onion newsletter for tropics La Consulta. INTA. Argentina. 58 p.
- GARCIA, R. E. 2004. Génesis de arcillas magnésicas en la cuenca de Madrid: interrogantes planteados. Boletín Geológico y Minero (en línea). Consultado ene. 2008 disponible en http://www.igme.es/internet/boletin/2004./115_4_2004/ART%202pdf
- HUGHES, P. R.; WOOD, H. A. 1981. A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. J. Invert. Pathol. 37:154-159.
- IBARRA, J.; LEON, T. 1993. Cuantificación toxicológica de *Bacillus thuringiensis* bajo condiciones de laboratorio. Centro de Investigación y Estudios Avanzados, unidad Irapuato. 7 p.
- INETER (Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales NI). 2008. Informe de la Estación Meteorológica de Sébaco, San Isidro. Estación Experimental del Valle de Sébaco - INTA. Región Centro Norte. Matagalpa, Nicaragua.

- IGNOFFO, C. M. 1973. Development of a Viral Insecticide: Concept to Commercialization. *Experimental Parasitology*. 33: 380 - 406.
- IGNOFFO, C. M.; HOSTETTER, D. L.; SMITH, D. B. 1976. Gustatory stimulant protectant, evaporation retardant: three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. *Journal of Economic Entomology*. 69: (2): 207-210 p.
- IGNOFFO, C. M.; COUCH, T. L. 1981. The nucleopolyhedrosis virus of *Heliothis* species as a microbial insecticides. *In* BURGESS, HD. Ed. Microbial control of pest and plant diseases. London. Academia Press. 329-362 p.
- INFOAGRO. 2002. Manejo de lepidopteros plagas. (en línea). Consultado 02 may. 2002. Disponible en: http://www.infoagro.com/hortalizas/lepidópteros_plaga.asp#2.%20CICLO%20DE%20VIDA%20Y%20MORFOLOGIA.
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria NI). 2005. Guía MIP en el cultivo de cebolla. Manejo Integrado de Plagas. 28 p.
- MIFIC (Ministerio de Fomento, Industria y Comercio NI). 2009. Ficha Producto Cebolla. Dirección de Políticas Comerciales Externas (DPCE). Departamento de Análisis Económico. 22 p.
- JAKES, R. P. 1972. The inactivation of foliar deposits of viruses of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) and tests on protectant activities. *Can. Ent.* 104: 1985-1994.

- JAUQUE, R. P. 1977. Field efficacy of viruses infections to the cabbage looper and imported cabbage worm on late cabbage. *Journal of Economic Entomology*. 70: 111 – 118.
- LASA, R. WILLIAM, T.; CABALLERO, P. 2008. Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. *Journal of Economic Entomology*. 101(1): 42 – 49 (2008).
- LOBO DE SOUZA, M.; LECUONA, R. E. 1995. Virus Entomopatógenos. *In* LECUONA, R. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. p. 73 - 86.
- MARTINEZ, R.; SWEZEY, S. 1983. Control de larvas de *Heliothis zea* (Boddie) con Virus de la Poliedrosis Nuclear (*Baculovirus heliothis*) en el algodónero. León, Nicaragua. 6 p.
- MOSCARDI, F.; SOSA-GOMEZ, D. R. 1995. Utilización de virus a campo. *In* LECUONA, R. ed. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. p. 271 – 276.
- NARVÁEZ, S. C. 1995. Uso del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) para el control de *Spodoptera exigua* en el Cultivo de Cebolla Amarilla. *Revista del Exportador APENN*. 40 p.
- NARVÁEZ, S. C. 1995. Utilización de Virus Entomopatógenos para el Control de Plagas. Informe del Departamento de Control Integrado de Plagas. UNAN-León. Nicaragua. 7 p.

OCEANO, 2004. Diccionario Enciclopédico Universal. Universo Océano. Editorial Océano. Barcelona. España. 1024 p.

RIZO, C. M.; NARVAEZ, S. C. 2001. Uso y producción de *Virus de la Poliedrosis Nuclear* en Nicaragua. Avances en el fomento de productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Revista de Manejo Integrado de Plagas. 61:90 - 96.

RICHTER, A. R.; FUXA, J. R. 1984. Timing formulation, and persistence of a nuclear polyhedrosis virus and a microsporidium for control of the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) in soybeans. Journal of Economic Entomology 77:1299-1306.

SANTOS, E. F. 1998. Uso combinado de VPN *Spodoptera frugiperda*, *Telenomus remus* y aplicaciones de azúcar para el control biológico del cogollero, *Spodoptera frugiperda*, en maíz. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 63 p.

SOSA, G. D.; MOSCARDI, F. 1996. Producción de virus patógenos de ácaros e insectos. In LECUONA, R. ed. Microorganismo patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. p. 223-236.

SOSA G. R. 1998. El poder medicinal de las plantas. Asociación publicadora interamericana. Miami Florida. Estados Unidos de Norteamérica. 384 p.

TAMEZ – GUERRA, P.; M. R. MACGUIRE y R. W. BEHLE. 2003. Microcapsulación para mejorar la calidad de bioinsecticidas y técnicas para la evaluación de *Bacillus thuringiensis* y baculovirus en lepidópteros. In Procesos Biotecnológicos Galán, L. et al. eds. Universidad Autónoma de Nuevo León. p. 157-169.

TRABANINO, R. 1998. Guía para el Manejo Integrado de Plagas Invertebradas en Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. El Zamorano, Honduras, Zamorano Academic Press. 156 p

THRONE, J. 1995. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *Journal of Economic Entomology*. 88(5): 1510-1512.

VANEGAS, H. 1994. Utilización de virus para el manejo de *Spodoptera* spp en el cultivo de Cebolla. Informe. Sébaco- Matagalpa, Nicaragua. 5 p.

X ANEXOS

Anexo 1. Hoja de registro para el virus formulado elaborado en el Laboratorio de Control Biológico de la UNAN – León, 1999.

Fecha de mezcla _____ Ingrediente inerte _____

Virus _____ Peso de ing. Inerte _____

No. larva equivalente _____ Proporción de la mezcla _____

Peso de larvas (LE) _____ Concentración (CIP) mezcla _____

Concentración (CIP/ml) _____ Cantidad preparada _____

Sub- muestra	Peso en gramos	Concentración CIP

Anexo 2. Hoja de bioensayos realizado en el Laboratorio de Control Biológico de la UNAN-León, 1999.

Fecha de elaboración del formulado _____ Fecha de traslado _____

Formulado _____ Dosis _____

Sub – muestra _____ Especie _____

Temperatura _____ Estadío larval _____

Fecha de bioensayo _____ Peso promedio larval _____

Fecha	No. Larvas	Virus	Hongos	Bacterias	Otros	Observación

Anexo 3. Hoja de registro para realizar recuento de plagas insectil en el cultivo de cebolla, Sébaco-Matagalpa, 1999.

Lote _____ Nombre _____ Fecha _____
 Tratamiento _____ Repetición _____

No. Plantas	No. Masas Huevos	Larvas.		%Daño	
		Pequeñas	Grandes	Viejo	Reciente

Anexo 4. Fotos que describen el proceso de preparación y aplicación de virus formulado y sin formular en laboratorio y campo, UNAN-León 1999.

a) Preparación y montaje de bioensayo con VPN



Foto 1a. Preparación de la cámara de Neubauer para el conteo de CIP.



Foto 2a. Conteo de CIP en el microscopio de contraste de fase.



Foto 3a. Preparación de dosis de VPN para el bioensayo.



Foto 4a. Proceso de contaminación de dietas para el bioensayo.



Foto 5a. Colocación de larvas L₁ en los microplatos para el bioensayo.



Foto 6a. Revisión de larvas muertas por virus en diferentes bioensayos.

B) Proceso de elaboración del formulado viral



Foto 1b. Maceración de larvas muertas por VPN



Foto 2b. Filtrado de larvas previamente maceradas para preparar el formulado.



Foto 3b. Mezcla de la solución viral con el caolín.



Foto 4b. Proceso de secado del virus formulado.



Foto 5b. Proceso de molida del VPN formulado



Foto 6b. Virus formulado y mantenido a temperatura ambiente.

c) Ensayo de campo



Foto 1c. Aplicación de virus formulado en el cultivo de cebolla, Sébaco Matagalpa.



Foto 2c. Aplicación de virus sin formular en el cultivo de cebolla, Sébaco Matagalpa.