

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



“INTERACCIÓN DE UN BACULOVIRUS CON AZADIRACTINA PARA EL
CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO, *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). MORELIA, MÉXICO”

Práctica Final de Graduación para optar por el título Ingeniero en Biotecnología con el
grado académico de Bachiller.

Jorge Alonso Vargas Leandro

Cartago, 2009

INTERACCIÓN DE UN BACULOVIRUS CON AZADIRACTINA PARA EL
CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO, *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Jorge Alonso Vargas Leandro*

RESUMEN

La palomilla del maíz o gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidea), es considerada la principal plaga del maíz a nivel mundial ya que causa grandes pérdidas en la producción de este grano. Existen diversos mecanismos para el control de *S. frugiperda*, siendo los más utilizados los insecticidas sintéticos a base de hidrocarburos. La agricultura actual busca la manera de ejercer un control efectivo de las plagas, protegiendo el medio ambiente, por lo que la búsqueda de insecticidas biológicos o botánicos se ha incrementado. Los baculovirus (Baculoviridae) son considerados como agentes efectivos del control debido a su alta especificidad y patogenicidad. La azadiractina es un insecticida botánico extraído del árbol de neem, el cual produce efectos antialimenticios en los insectos e interfiere con su sistema neuroendocrino al actuar como un regulador del crecimiento. El presente estudio pretende evaluar la interacción entre un baculovirus (el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda*, SfMNPV) y azadiractina para el control del gusano cogollero. Dicha interacción se evaluó en términos de mortalidad, desarrollo y producción de partículas infectivas o cuerpos de inclusión (OBs, por sus siglas en inglés). Para esto, se ensayaron los insecticidas solos, empleando una concentración de virus de 430 OBs/mm² y dos concentraciones de azadiractina, 13,3 y 26,42 mg/l, así como el efecto de la mezcla de las mismas concentraciones. Se utilizaron un aproximado de 144 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* por cada tratamiento. La técnica utilizada fue la contaminación por superficie de dieta. En los resultados se encontró que la incorporación de 13,3 y 26,42 mg/l de azadiractina al formulado del SfMNPV la mortalidad aumentó 1,34 y 1,82 veces en relación con la aplicación de azadiractina sola y 2,3 y 1,9 veces comparado con la aplicación del virus solo. Además, se observó que la interacción entre estos dos insecticidas, produce una disminución considerable en la evolución del peso de las larvas, así como un retraso de los tiempos de muda, en comparación con la aplicación de cada insecticida por separado. Con respecto a la producción de OBs, la incorporación de azadiractina en el formulado del SfMNPV, disminuyó significativamente la concentración de OBs/mg de larva. A pesar de esto, se recomienda evaluar el aspecto de producción empleando concentraciones de azadiractina más bajas que las utilizadas en este trabajo.

Palabras clave: baculovirus, *Spodoptera frugiperda*, virus de la poliedrosis nuclear, azadiractina.

*INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009

INTERACTION OF A BACULOVIRUS WITH AZADIRACHTIN FOR THE CONTROL
OF FALL ARMYWORM, *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDE)

Jorge Alonso Vargas Leandro*

ABSTRACT

The fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), is considered the main pest of corn worldwide, causing great losses in production. There are various control mechanisms, using synthetic insecticides based primarily hydrocarbons. Today's agriculture is seeking ways to exercise effective control of pests, protecting the environment, so that the search for biological or botanical insecticides has increased. Viruses, specifically those belonging to the family Baculoviridae, are regarded as effective biocontrol agents, this due to their high specificity and mortality of *Spodoptera sp.* This study attempts to assess the interaction of two insecticides, one biological Baculovirus SfMNPV based insecticide, and the azadirachtin (AZA), as botanical insecticide extracted from the neem tree, which produces antifeedant effects and blunders in the times of larvae molting in several species of Lepidoptera, in order to determine changes in mortality rates, changes in weight and development time of the treated larvae molt, and the increase in the production of inclusion bodies. Insecticides were tested separately, using a baculovirus concentration of 430 Obs/mm² and two concentrations of AZA, 13,3 and 26,42 mg/l, and the effect of their mixture at the same concentrations. And approximately of 144 larvae of *S. frugiperda* third instar stage were used for each treatment. The technique used was surface contamination by drop. The results found that the addition of 13,3 and 26,42 mg/l of azadirachtin to SfMNPV formulate, increase the mortality by 1,34 and 1,82 times in relation to the application of AZA alone and, at 2,3 and 1,9 times compared to single virus application. It was further observed that the interaction between these two insecticides, produces a considerable decrease on the evolution of the weight of larvae as well as a slowdown from the days of silent, regarding the application of each insecticide separately. With respect to OBs production, the addition of AZA to SfMNPV formulated, significantly decrease the concentration of OBs/larvae mg. mixtures should be evaluated using lower azadirachtin concentration than the used in this study.

Key words: baculoviridae, *Spodoptera frugiperda*, Nucleopolyhedrosis virus, azadirachtin

REPORT OF FINAL GRADUATION WORK. Escuela de Biología, Ingeniería en Biotecnología (Biotechnology Engineering), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2009

ACREDITACIÓN

INTERACCIÓN DE UN BACULOVIRUS CON AZADIRACTINA PARA EL
CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO, *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal



Ing. Vladimir Villalba Velásquez
Profesor, Investigador
ITCR



Dra. Ana Mabel Martínez Castillo
Profesor Investigador Titular
UMSNH



Ing. Randall Chacón Cerdas
Profesor, Investigador
ITCR

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Dios por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente y alcanzar mis sueños y metas establecidas.

Asimismo a mi familia por estar siempre conmigo en todos momentos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios primeramente.

A mi familia por apoyarme de manera incondicional en el transcurso de toda mi carrera.

A la Dra. Ana Mabel Martínez por darme la oportunidad de trabajar bajo su tutela en el Laboratorio de Entomología, depositar en mí la confianza para llevar a cabo este proyecto y permitirme aprender de una excelente investigadora.

A mi tutor interno, el Ing. Vladimir Villalba por haberme aceptado como practicante para la realización de este trabajo. En general también a mis profesores del ITCR por la excelente preparación tanto profesional como personal que me brindaron a lo largo de la carrera.

A los doctores Samuel Pineda, Isaac Figueroa y Jeannette Bayuelo del IIAF por ayudarme y aconsejarme en el trascurso del desarrollo de esta práctica.

A Susy por la ayuda incondicional a distancia y por darme fortaleza para acabar con éxito este trabajo.

A mis amigos del IIAF por ayudarme y acompañarme durante el desarrollo de los ensayos y en general durante mi estancia en Morelia.

A mis amigos de Costa Rica por apoyarme desde la distancia y darme ánimos en los momentos que lo necesitaba.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT) por brindar el financiamiento para el viaje y la estancia en México.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
ACREDITACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Características generales de los baculovirus	3
2.1.1. Taxonomía	3
2.1.2. Estructura y composición.....	5
2.1.3. Patogénesis.....	7
2.1.4. Los procesos de replicación y transcripción	10
2.1.5. Sintomatología	11
2.1.6. Aspectos ecológicos y diversidad	12
2.2. Los baculovirus como bioinsecticidas	13
2.2.1. Métodos de producción.....	15
2.2.1.1. Producción <i>in vivo</i>	16
2.2.1.2. Producción <i>in vitro</i>	20
2.2.2. Formulación	22
2.2.2.1. Tipos de formulación	23
2.2.2.2. Coadyuvantes	24
2.2.2.2.1. Potenciadores de la actividad insecticida	26
2.3. El SfMNPV como agente de control de <i>S. frugiperda</i>	28

2.4. El gusano cogollero, <i>Spodoptera frugiperda</i>	32	
2.4.1. Importancia económica	32	
2.4.2. Plantas hospederas	33	
2.4.3. Métodos de control.....	33	
3. OBJETIVOS.....	35	
3.1. Objetivo General.....	35	
3.2. Objetivos Específicos.....	35	
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36	
4.1. Cría del Insecto	36	
4.2. Insecticidas ensayados	36	
4.3. Efecto de azadiractina y el SfMNPV sobre el desarrollo larvario de <i>S. frugiperda</i>	37	37
4.4. Efecto de azadiractina sobre la producción de OBs del SFMNPV	37	
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39	
5.1. Mortalidad larvaria.....	39	
5.2. Efecto del SfMNPV y azadiractina sobre el peso y tiempo de desarrollo larvario de <i>S. frugiperda</i>	43	
5.3. Producción de cuerpos de inclusión (OBs)	47	
6. CONCLUSIONES.....	49	
7. RECOMENDACIONES	50	
8. LITERATURA CITADA.....	51	
9. ANEXOS.....	69	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies descritas en el género <i>Nucleopolyhedrovirus</i> y abreviaturas utilizadas.....	4
Tabla 2. Especies tentativas en el género <i>Nucleopolyhedrovirus</i> y abreviaturas utilizadas.....	5
Tabla 3. Tropismo tisular de los nucleopoliedrovirus.....	10
Tabla 4. Baculovirus utilizados actualmente para el control de plagas.....	18
Tabla 5. Portadores empleados en las formulaciones de bioinsecticidas.....	24
Tabla 6. Compatibilidad del neem con algunas especies de Nucleopoliedrovirus.....	28
Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> tratadas con SfMNPV, azadiractina y en mezclas.....	41
Tabla 8. Efecto del SfMNPV y azadiractina sobre el peso (mg \pm EE) de larvas de <i>S. frugiperda</i>	46
Tabla 9. Efecto de SfMNPV, azadiractina y su interacción sobre el tiempo medio de desarrollo de larvas de <i>S. frugiperda</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la localización de componentes estructurales de los baculovirus.....	7
Figura 2. Ciclo general de infección de los baculovirus.....	8
Figura 3. Ilustración esquemática del proceso de infección de los baculovirus en el epitelio del intestino medio de una oruga infectada.....	9
Figura 4. Sintomatología de una larva de lepidóptero por acción de un nucleopoliedrovirus.....	12
Figura 5. Diagrama representativo del establecimiento de un cultivo celular primario de diferentes tejidos de insectos de Lepidoptera.....	21
Figura 6. Estructura molecular de la azadiractina.....	27
Figura 7. Distribución del SfMNPV en los suelos de parcelas de maíz en el sur de México, Belice y Guatemala.....	30
Figura 8. Daños causados por <i>S. frugiperda</i> en el maíz.....	33
Figura 9. Síntomas producidos por la azadiractina en larvas de tercer estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	42
Figura 10. Síntomas producto de la infección viral.....	42
Figura 11. Producción media de OBs/mg para larvas de tercer estadio de <i>S. frugiperda</i>	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Elaboración de la dieta artificial.....	68
Anexo 2. Técnica de purificación de SfMNPV con sacarosa.....	69

1. INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero o la palomilla del maíz (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith), constituye la plaga más importante de este cultivo en América Latina, principalmente en la región Neotropical. Las pérdidas ocasionadas por esta son cuantiosas, pudiendo reducir los rendimientos en 0,8 t/ha de maíz seco, lo equivalente a un 40% de la producción en condiciones tropicales (Pérez, 1993).

Además, las orugas de *S. frugiperda* son polífagas y se encuentran en más de 60 especies de 23 familias, atacando principalmente a gramíneas; no obstante se ha recolectado de las familias tales como Amaranthaceae (*Amaranthus spp.*), Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Cruciferae, Euphorbiaceae, Gramineae; y entre especies cultivadas tales como la papaya (*Carica papaya*), fresa (*Fragaria vesca*), Espinaca (*Spinacia oleracea*), entre otras (Pérez *et al*, 2003).

La costumbre de los productores para su control generalmente ha sido a través del uso de plaguicidas sintéticos (Sotelo, 2004). El uso exclusivo de estas sustancias químicas presenta ciertos inconvenientes directos dentro de los que se encuentran la selección de nuevas resistencias a los insecticidas en las poblaciones de plagas; el resurgimiento de las poblaciones tratadas; residuos, riesgos y complicaciones legales; destrucción de especies beneficiosas; costo de fumigantes, en equipo, mano de obra y material (Badii y Abreu, 2006); además de implicaciones indirectas relacionadas con el uso de hidrocarburos para su fabricación, y la contaminación que esta conlleva.

Esta problemática provocada por el uso indiscriminado de agroquímicos, ha sugerido realizar investigaciones dirigidas hacia el desarrollo de formas integrales o biológicas de control, con el fin de reducir el impacto medioambiental y a la salud humana (Martínez *et al*, 2003), de manera que, según el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (1990), se armonicen tácticas de control utilizando enemigos naturales (sean nativos o transferidos y establecidos) para el manejo de la plaga, conociendo los organismos benéficos y evitando que estos sean perturbados, o que lo sean en menor grado.

Referida como la principal meta de la Patología de Insectos, el Control Microbiano está definida dentro de la rama del biocontrol que utiliza

microorganismos tales como hongos, bacterias, virus, protozoarios o nemátodos, para reducir y estabilizar las poblaciones de insectos plaga (Lecuona, 2002). Generalmente se caracterizan por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente así como para los humanos, y por su aptitud para ser tratados industrialmente (Badii y Abreu, 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1. Características generales de los baculovirus

La familia *Baculoviridae* está conformada por un grupo de virus muy numeroso, específico de artrópodos y uno de los más estudiados en el área del control biológico de insectos plaga. Esta familia incluye a todos los virus cuyos viriones presentan una estructura en forma de varilla o bastón (*baculum* = bastón), y que en algún momento determinado de su morfogénesis, son incluidos en matrices de naturaleza proteica o cuerpos de inclusión (OBs, por sus siglas en inglés) (Siocco de Cap, 2001). Genéticamente los baculovirus están conformados por una molécula circular de ADN de doble cadena con un tamaño entre 80 y 180 kpb. Los análisis del ADN genómico mediante enzimas de restricción o endonucleasas (REN, por sus siglas en inglés) son considerados como una herramienta indispensable para la distinción de aislados, determinando con éstos las diferencias genéticas entre especies aisladas de diferentes regiones o países, entre aislados de una misma localidad e inclusive entre aislados con un mismo hospedero (Escribano *et al.*, 1999; Murillo *et al.*, 2000). Para el caso de los baculovirus, la mayoría de los aislados han sido identificados mediante su espectro de huéspedes, perfiles de ADN y secuencia de nucleótidos (Tabla 1). Sin embargo, existen otros aislados que han sido caracterizados parcialmente, por lo cual han recibido el nombre de especies tentativas (Caballero y Williams, 2008) (Tabla 2).

2.1.1. Taxonomía

La familia *Baculoviridae* incluye a dos géneros: *Nucleopolyhedrovirus* (NPVs) y *Granulovirus* (GVs), los cuales se han clasificado con base a sus características morfológicas, serológicas y genéticas (Murphy *et al.*, 1995; Martínez, 2003). Los NPVs han sido aislados de más de 500 especies de insectos, la mayor parte pertenecientes al orden *Lepidoptera*. Dentro de este grupo se identifican dos tipos morfológicos; simples (SNPVs), aquellos que tiene una sola nucleocápside por virión o múltiples (MNPVs) los que contienen un número variable de nucleocápsides por virión. Los GVs han sido aislado de aproximadamente 100

especies todas ellas pertenecientes al orden Lepidoptera (Rohrmann, 1992; Molina y Jiménez, 2007).

Tabla 1. Especies descritas en el género Nucleopolyhedrovirus y abreviaturas utilizadas.

Nombre de la especie	Abreviatura
<i>Adoxophyes honmai</i> NPV	(AdhoNPV)
<i>Agrotis ipsilon</i> MNPV	(AgipMNPV)
<i>Anticarsia gemmatalis</i> MNPV	(AgMNPV)
<i>Autographa californica</i> MNPV	(AcMNPV)
<i>Anagrapha falcifera</i> MNPV	(AnfaMNPV)
<i>Galleria mellonella</i> MNPV	(GmMNPV)
<i>Rachiplusia ou</i> MNPV	(RoMNPV)
<i>Spodoptera exempta</i> MNPV	(SpexMNPV)
<i>Trichoplusia ni</i> MNPV	(TnMNPV)
<i>Bombyx mori</i> NPV	(BmNPV)
<i>Buzura suppressaria</i> NPV	(BuzuNPV)
<i>Choristoneura fumiferana</i> DEF MNPV	(CfDefNPV)
<i>Choristonerura fumiferana</i> MNPV	(CfMNPV)
<i>Choristonerura rosaceana</i> NPV	(ChroNPV)
<i>Culex nigripalpus</i> NPV	(CuniNPV)
<i>Ecotropis obliqua</i> NPV	(EcobNPV)
<i>Epiphyas postvittana</i> NPV	(EppoNPV)
<i>Helicoverpa armígera</i> NPV	(HearNPV)
<i>Helicoverpa zea</i> SNPV	(HzSNPV)
<i>Lymantria dispar</i> MNPV	(LdMNPV)
<i>Mamestra configurata</i> NPV-B	(MacoNPV-B)
<i>Neodiprion lecontei</i> NPV	(NeleNPV)
<i>Neodiprion sertifer</i> NPV	(NeseNPV)
<i>Orgyia pseudotsugata</i> MNPV	(OpMNPV)
<i>Spodoptera exigua</i> MNPV	(SeMNPV)
<i>Spodoptera frugiperda</i> MNPV	(SfMNPV)

Tabla 1. Continuación

Nombre de la especie	Abreviatura
<i>Spodoptera littoralis</i> NPV	(SpliNPV)
<i>Spodoptera litura</i> NPV	(SpltNPV)
<i>Thyanoplusia orichalcea</i> NOV	(ThorNPV)
<i>Trichoplusia ni</i> SNPV	(TnSNPV)
<i>Wiseana signata</i> NPV	(WisiNPV)

Tabla 2. Especies tentativas en el género *Nucleopolyhedrovirus* y abreviaturas utilizadas.

Nombre de la especie	Abreviatura
<i>Aedes sollicitans</i> NPV	(AesoNPV)
<i>Hyphatria cunea</i> NPV	(HycuNPV)
<i>Orgyia pseudotsugata</i> SNPV	(OpSNPV)
<i>Penaeus monodon</i> NPV	(PemoNPV)
<i>Panolis flammea</i> NPV	(PafiNPV)

2.1.2. Estructura y composición

Las nucleocápsides. Estas estructuras cumplen básicamente la función de transportar el genoma en una forma altamente compacta hasta la célula huésped. Las nucleocápsides tienen un diámetro entre los 30-60 nm y una longitud de 250-300 nm, la variación se debe al tipo de virus ya que su tamaño es proporcional al material genético. La forma condensada del genoma se debe a la presencia de la proteína P69, la cual se une con el ADN y neutraliza sus residuos ácidos. Otras proteínas presentes son VP39 y PP78/83 cuya función es el desplazamiento de la nucleocápside a través de la célula, actualmente, el modelo aceptado de la estructura de la esta consiste en una serie de anillos apilados perpendicularmente que configuran la forma cilíndrica (Federici, 1986).

Una vez establecidas en el núcleo, las nucleocápsides destinadas a ser viriones brotados (BVs, por sus siglas en inglés) son transportadas a través del citoplasma y brotan pasando por la membrana plasmática modificada con GP64 EFP (*Envelope fusion protein*). Durante este proceso de brotación, las nucleocápsides

se envuelven por esta membrana modificada (Caballero y Williams, 2008). Esta proteína GP64 (también conocida como GP67), es la proteína envolvente de mayor peso en los BVs, la cual es una glicoproteína tipo I integral de la membrana y constituyente también de los peplómeros adquiridos por el virión durante la brotación (Monsma *et al.*, 1996).

Los viriones. Presentan forma bacilar y miden aproximadamente 2 μm (Molina y Jiménez, 2007). La complejidad de los baculovirus se debe en parte a la presencia de dos fenotipos estructuralmente diferentes (Figura 1), los cuales cumplen un papel específico en su ciclo de vida. Los BVs, conocidos también como virus extracelular, son producidos durante las etapas tempranas de la infección y propagan la infección de célula a célula al utilizar el sistema de las traqueolas respiratorias como vía para llegar a todas las partes del cuerpo (Jacas y Urbaneja, 2008; Monsma *et al.*, 1996). Los viriones derivados de los OBs (ODV, por sus siglas en inglés), conocidos también como el virus ocluido (OV), son producidos durante la fase terminal de la infección viral. Estos se concentran en el núcleo de la célula para ser ocluidos en una estructura proteica y conformar lo que se conoce como OBs (Rohrmann, 1992).

Los OBs. Estas entidades están compuestas principalmente de proteínas denominadas granulina (en el caso de los GVs) y poliedrina (en el caso de los NPVs) (Ecale *et al.*, 1998), ambas con un tamaño entre 25 y 33 kDa (Caballero *et al.*, 2001). Los OBs de los GVs son pequeños (entre 0,16 y 0,30 μm x 0,30 y 0,50 μm) y normalmente contienen uno u ocasionalmente dos viriones, mientras que los OBs producidos por los NPVs son de mayor tamaño (0,5-15 μm) y contienen varios viriones (Federici, 1986; Marina y Narváez, 2001). Estos presentan variedad en sus formas: dodecaedricas, cúbicas e irregulares, los tamaños y formas son considerados como propias de la fuente del aislado del virus (Woo y Ahn, 2006). Los OBs le brindan estabilidad a los viriones al mantenerlos viables por largos periodos en el ambiente, utilizando el suelo como principal reservorio (Rohrmann, 1992; Ecale *et al.*, 1998; Caballero y Williams, 2008).

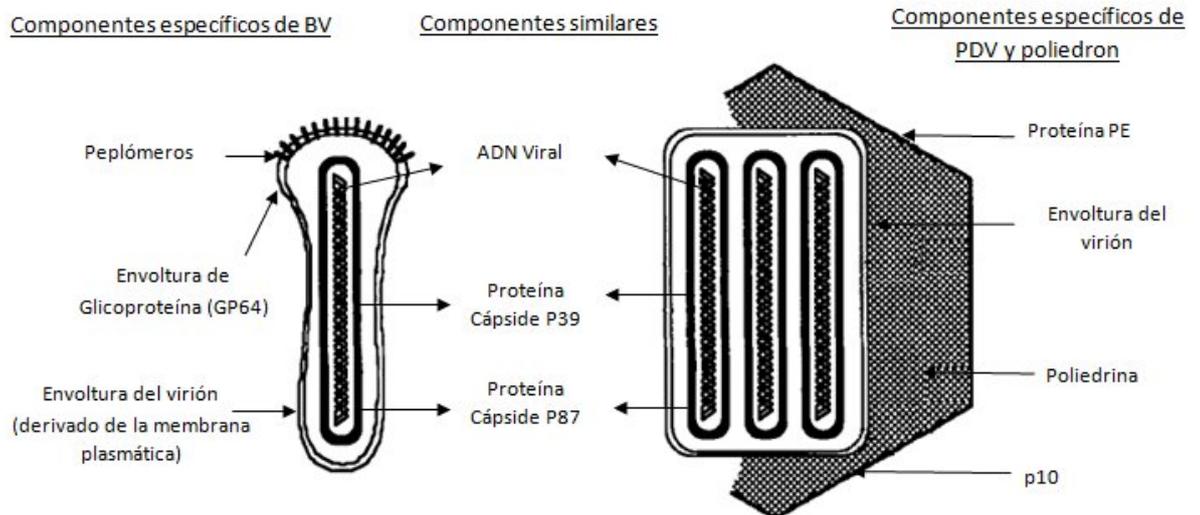


Figura 1. Diagrama de la localización de componentes estructurales de los baculovirus (modificado de Rohrmann, 1992).

2.1.3. Patogénesis

La principal vía de infección de los baculovirus es por vía alimenticia (Evans y Entwistle, 1987), aunque puede ser transovárica (por contaminación superficial de los huevos), transóvulo (por contaminación interna de los huevos) (Tanada y Kaya, 1993), parasitismo y/o a través de los espiráculos (Kirkpatrick *et al.*, 1994). El ciclo de infección de los baculovirus depende del tipo de virus, pero debido a que el SfMNPV es objeto del presente estudio, la siguiente descripción sólo corresponde a la patogénesis de los NPVs (Figura 2).

Infección primaria. En la etapa inicial de la infección, los viriones son rápidamente liberados por la acción combinada de la alcalinidad de los jugos intestinales (pH 9,5-11) y proteasas, produciendo la hidrólisis de la proteína mayoritaria de los OBs. Posteriormente, los viriones pasan a través de la membrana peritrófica del intestino, la cual está formada de quitina y proteína y tiene como principal función el proteger al epitelio intestinal de agentes infecciosos o de daños físicos (Koul y Dhaliwal, 2002). Una vez que cierta proporción de los viriones logran tener contacto con las células epiteliales del intestino, éstos se fusionan con las microvellosidades permitiendo que las nucleocápsides penetren al citoplasma y se dirijan hacia el núcleo, en donde se

libera el ADN a través de los poros nucleares (Figura 3) (Siocco de Cap, 2001; Cory y Myers, 2003). De esta manera se forma una nueva progenie viral, produciendo alteraciones en las funciones fisiológicas del insecto en beneficio de un mejor desarrollo de la enfermedad en el huésped (Caballero *et al.*, 2001).

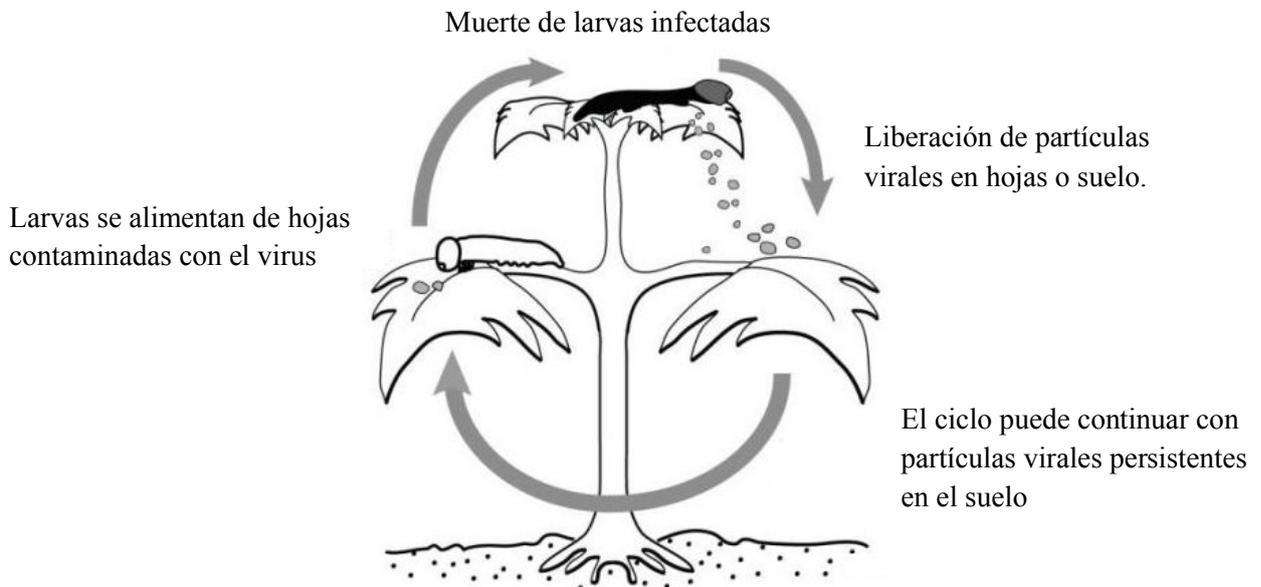


Figura 2. Ciclo general de infección de los baculovirus.

Ocho horas después del comienzo de la infección, el núcleo de la célula del intestino medio se hipertrofia, los nucleolos se alargan, se mueven hacia la membrana nuclear y disminuyen su tamaño. Simultáneamente, se forma un estroma virogénico en el centro del núcleo y, a medida que éste se desarrolla, las nucleocápsides formadas en el núcleo se ensamblan alrededor de la periferia. Posterior a su formación, estas salen del estroma y pasan a través de la membrana nuclear, adquiriendo una envoltura de esta membrana. Los BVs atraviesan la lámina basal al circular a través de la hemolinfa, produciendo la infección secundaria de los tejidos dentro del hemocele, dando paso posteriormente a la dispersión de la enfermedad por el paso de estos viriones de célula en célula, los cuales penetran por medio de endocitosis (Siocco de Cap, 2001).

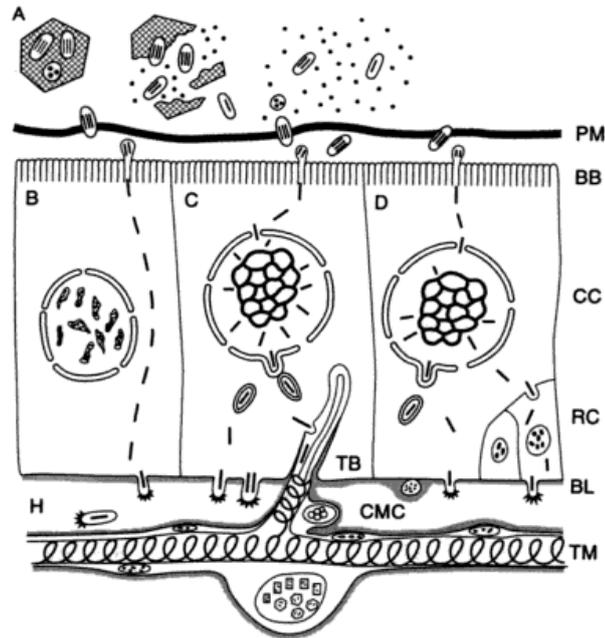


Figura 3. Ilustración esquemática del proceso de infección de los baculovirus en el epitelio del intestino medio de una oruga infectada. (A) Disolución de los poliedros en el lumen del intestino medio y el paso de los viriones por la membrana peritrófica (PM). (B) Fusión de los viriones con la membrana de las microvellosidades y el paso directo de las nucleocápsides a través de las células a la lámina basal. (C) El ciclo inicial de replicación ocurre en el núcleo de las células epiteliales del intestino medio. (D) Invasión de las células regenerativas después de la replicación inicial e invasión de la hemolinfa por parte de la progenie de los viriones brotantes. PM, membrana peritrófica; BB, borde de las microvellosidades; CC, células columnares; RC, células regenerativas; BL, lámina basal; TM, matriz traqueal; CMC, músculo circular; H, hemolinfa (Miller, 1997).

Infeción secundaria. Durante el proceso de la infección secundaria se producen los VO, expresándose principalmente algunos genes muy tardíos (p10, poliderina, granulina, entre otros). Aquí se inicia la inclusión de los viriones dentro de los OBs, dando paso a la fase final de la infección; los tejidos susceptibles a la infección secundaria dependen del tipo de virus (Siocco de Cap, 2001). Sin embargo, los primeros tejidos reportados en presentar síntomas de infección en hospederos susceptibles luego del intestino medio son los hemocitos, matriz traqueal y células del tejido graso (Tabla 3) (Miller, 1997).

En la fase terminal de la infección, dos enzimas, la quitinasa y la catepsina, actúan conjuntamente para facilitar el rompimiento de la cutícula del insecto, de manera que se liberan millones de OBs al medio ambiente al morir el hospedero. Los OBs permanecen en el ambiente por periodos largos de tiempo, mayormente si se encuentran protegidos de los rayos UV. Los baculovirus permanecen hasta que

vuelven a ser ingeridos por otro hospedero susceptible o son inactivados (Cory y Myers, 2003; Szewczyk *et al.*, 2006).

Tabla 3. Tropismo tisular de los nucleopoliedrovirus (modificado de Siocco de Cap, 2001).

Baculovirus (VPNs)	Principales Tejidos Infectados						
	Intestino Medio	Hemocitos	Tejido adiposo	Matriz traqueal	Epidermis	Tejido muscular	Tejido nervioso
Lepidópteros	+	+	+	+	+	+	+
Himenópteros	+	-	-	-	-	-	-
Dípteros	+	+/-	-	-	-	-	-
Tisanópteros	+	-	-	-	-	-	-
Crustáceos	+	-	-	-	-	-	-

2.1.4. Los procesos de replicación y transcripción

Los procesos de replicación se inician inmediatamente después de que las partículas virales entran al núcleo, comenzando con la expresión de los genes de una manera estrictamente controlada. Se reconocen cuatro fases de transcripción: inmediatamente temprana, temprana, tardía y muy tardía. Los genes inmediatamente tempranos, son activados por factores de transcripción del huésped sin ocupar proteínas del virus. La transcripción de los genes tardíos requiere la activación por algunos productos de los genes inmediatamente tempranos. El inicio de la transcripción ocurre con elementos promotores altamente conservados: CGT para genes tempranos y TAAG para genes tardíos, los cuales usualmente están ubicados 30-90 pb después del codón de inicio ATG (Szewczyk *et al.*, 2006).

La fase temprana, es seguida por la síntesis de ADN y los productos de los genes tardíos del virus (Szewczyk *et al.*, 2006). En esta fase es donde se produce los BVs, los cuales inician una segunda fase de replicación (fase tardía) en la cual se producen los VO y los OBs en la gran parte del tejido del insecto infectado (Miller, 1997).

La fase final de infección, está definida como aquellos eventos que ocurren posteriores a la iniciación de la replicación del ADN viral (Szewczyk *et al.*, 2006).

En esta etapa se sintetizan las proteínas estructurales de la nucleocápside, incluyendo la glicoproteína GP64, la cual cumple un papel importante en la infección horizontal de los NPVs, cubriendo a los virus que son liberados de la membrana 10-24 horas luego de la infección (Szewczyk *et al.*, 2006). En el caso de los GVs, normalmente se observan nucleocápsides entre los componentes núcleo-citoplasmáticos resultantes de la mezcla de ambos contenidos a las 36 horas post-infección (Siocco de Cap, 2001).

En la etapa muy tardía, la producción de VBs se disminuye significativamente. La nucleocápside interacciona con la membrana nuclear y eventualmente se convierte en la envoltura de varias partículas. La envoltura de la nucleocápside parece ser un paso primario esencial en el proceso de inclusión por la proteína de la fase muy tardía, la poliedrina. A medida que el proceso de inclusión continúa, se da la expresión de grandes cantidades del gen p10, el cual forma estructuras fibrilares que se acumulan en el núcleo e inclusive en el citoplasma. Estos tubos penetran tanto el núcleo como el citoplasma. Cuando los OBs maduran, las fibrillas de p10 se alinean con la superficie del poliedro y parecen estar íntimamente involucrados en el ensamblaje de la envoltura poliédrica en el OBs (Rohrmann, 2008).

2.1.5. Sintomatología

Las larvas infectadas por baculovirus, exhiben un conjunto de síntomas característicos que inician uno o varios días luego de la infección, dentro de los que se encuentran cambios en el color del tegumento y en el comportamiento de las larvas, además de ablandamiento del tejido de manera que este queda muy frágil, rompiéndose con facilidad y liberando el contenido líquido con millones de OBs (Siocco de Cap, 2001). Antes de la muerte, las larvas de varias especies de lepidópteros suelen arrastrarse a la parte superior de la planta huésped donde mueren sostenidas con las propatas, aunque los mecanismos detrás de esta conducta se desconocen (Figura 6) (Evans y Entwistle, 1987).



Figura 4. Sintomatología de una larva de lepidóptero por acción de un nucleopoliedrovirus (Williams, 2009).

2.1.6. Aspectos ecológicos y diversidad

El mantenimiento del virus en el ambiente natural, requiere de la transmisión del baculovirus de larvas infectadas a larvas sanas, para lo que la transmisión horizontal juega el papel más importante. Esta se produce principalmente mediante la ingestión de los cuerpos de oclusión presentes en la planta, los cuales pueden ser distribuidos por el excremento de larvas infectadas y depredadores (Szewczyk *et al.*, 2006). La eficiencia de esta transmisión depende tanto de la densidad poblacional del virus como del huésped. Cuanto mayor sean la densidad de los insectos susceptibles mayor es la probabilidad de contacto entre virus y el huésped. Por otra parte, la densidad y distribución de los OBs determina la cantidad de inóculo a la que están expuestos los insectos en la naturaleza (Caballero y Williams, 2008).

A pesar de ser este tipo de transmisión es el más importante, la transmisión vertical también tiene un papel importante, se menciona que puede ser una forma de evolución de los baculovirus y se produce particularmente durante periodos de baja densidad poblacional del huésped, o cuando las oportunidades de transmisión horizontal son limitadas. Además, esta permite que el virus sea transportado dentro del insecto infectado a larga distancia, de manera que se puedan iniciar nuevos focos de infección, tal como ha ocurrido con los nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* y *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (Caballero y Williams, 2008).

La posibilidad de coevolución del baculovirus y su hospedero está muy definida por el rango de hospederos. Las diferentes especies de baculovirus varían en el número de hospederos que pueden matar, por ejemplo, el NPV que infecta a *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1759), parece tener a este como hospedero específico, mientras que el NPV de *Mamestra brassicae* L. infecta a cuatro especies de diferentes familias de lepidópteros, el NPV del gusano gris de la alfalfa, *Autographa californica* (Speyer) (AcMNPV) puede infectar especies al menos 15 familias (Cory y Myers, 2003).

2.2. Los baculovirus como bioinsecticidas

Durante muchos años, los insecticidas químicos o sintéticos fueron los únicos medios de control de insectos plaga en todo el mundo. No obstante, estos insecticidas generaron problemas de contaminación ambiental, intoxicación humana, desarrollo de resistencia por parte de la plaga, así como eliminación de insectos benéficos dentro del ecosistema (Ojeda *et al.*, 2002). Williams *et al.* (1999), mencionan el caso de los agricultores a pequeña escala de maíz en México y Centro América, los cuales utilizan básicamente paration metilico, clorpirifó y metamidofos para el control del gusano cogollero. La aplicación de estos compuestos no sólo incrementa los costos de producción sino que además provoca un claro deterioro en la salud de los trabajadores que laboran en las fincas rurales. Debido a estas circunstancias, se han buscado estrategias para el control de plagas y enfermedades en los cultivos.

El biocontrol se puede definir como la acción de parasitoides, depredadores o patógenos para mantener la densidad de la población de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia (Szewczyk, 2006). Dentro de esta alternativa se incluyen principalmente el uso de hongos, bacterias, nematodos y virus (Ibarra *et al.*, 2006). Los baculovirus han generado mayor interés debido a su especificidad y compatibilidad con los enemigos naturales de los insectos plaga. Además, éstos patógenos generan un daño ambiental mínimo y niveles de resistencia inferiores en comparación con los insecticidas químicos (Ojeda *et al.*, 2002). Debido a que no existe evidencia de resistencia cruzada entre

los baculovirus y los plaguicidas químicos, se pueden hacer aplicaciones periódicas de un baculovirus como medio para reducir la presión de selección por resistencia hacia los productos químicos (Williams, 2002).

En la literatura se señalan cuatro estrategias básicas para el uso de los baculovirus para el control de plagas. La primera estrategia se relaciona con la introducción y establecimiento del virus en el ambiente, con la cual se pretende obtener un control permanente de la plaga. Sin embargo, solamente unos pocos baculovirus han sido usados bajo esta estrategia. Moscardi (1999) resalta el caso del NPV de *Gilpinia hercyniae* (Hartig), el cual fue introducido en Canadá en los años 1930 a través de los parasitoides del insecto plaga. Debido a que el patógeno se estableció exitosamente entre la población huésped, no fueron necesarias otras medidas para control durante 50 años. Asimismo, se cita el caso del NPV de *Pseudoplusia includens* (Walker) como el mejor ejemplo de implementación de un baculovirus como agente de control (Moscardi, 1999).

La segunda estrategia se refiere a la colonización temporal del virus, la cual involucra la liberación del inóculo de baculovirus para controlar la plaga por más de una generación, requiriendo liberaciones subsecuentes aún cuando la población de la plaga haya disminuido. La tercera estrategia se refiere a la manipulación del ambiente, implicando cambios en el hábitat del huésped para favorecer la conservación y el aumento de los baculovirus en el sistema donde habitan naturalmente o han sido introducidos. El control de *Wiseana* spp. en Nueva Zelanda y los cambios en el calendario de pastoreo para implementar el control biológico de *Spodoptera frugiperda* por NPV en Lousiana, Estados Unidos, son ejemplos de la aplicación de esta tercer estrategia (Moscardi, 1999).

La cuarta estrategia se refiere a la aplicación continua y sistemática de dosis letales de los insecticidas virales (Moscardi, 1999; Szewczyk, 2006). Como ejemplo de esta estrategia, se encuentra el impulso en la producción de productos comerciales con compuestos base de baculovirus, dentro de los que destaca SPOD-X desarrollado con un inóculo aislado de Florida, EUA y utilizado para el control biológico de *Spodoptera exigua* (Hubner) (Williams, 2002). En Brasil se ha desarrollado el programa de control de plagas con baculovirus más exitoso, involucrando un virus que infecta la oruga de la soya, *Anticarsia gemmatalis*

Hübner. Los preparados del virus de *A. gemmatalis* (AgMNPV) son aplicados a una concentración de $1,5 \times 10^{11}$ cuerpos de inclusión por hectárea. En el año 1990, la producción del virus en el campo se convirtió en un negocio rentable, logrando producir grandes cantidades de larvas muertas a un bajo costo. Para 2005, el área tratada se había expandido a más de dos millones de hectáreas (Szewczyk, 2006; Rohrmann, 2008).

El primer insecticida basado en baculovirus se comercializó en 1975 bajo el nombre de Elcar™ por la casa comercial Sandoz Inc., para el control de *Helicoverpa zea* (Boddie). A la fecha, más de 30 bioinsecticidas se han utilizado en diversos países para el control de plagas agrícolas (Martínez, 2003) (Tabla 4).

En Centroamérica, la Universidad de León en Nicaragua cuenta con dos virus de la poliedrosis nuclear producidos de manera semi-comercial y distribuidos de manera congelada, uno para el control de *S. frugiperda* y otro para *Spodoptera sunia* (Hubner) y *S. exigua* (López *et al.*, 2004).

2.2.1. Métodos de producción

Los baculovirus son patógenos obligatorios que necesariamente deben ser replicados en sus larvas hospederas (*in vivo*) o en cultivos celulares (*in vitro*) (Gupta *et al.*, 2007). En los años 70's, se desarrollaron las primeras dietas artificiales que permitieron la cría de insectos bajo condiciones controladas, lo cual abrió un mercado óptimo para producir masivamente a éstos patógenos. Al mismo tiempo, se establecieron las primeras líneas celulares de insectos lepidópteros, lo que permitió utilizar una tecnología alternativa para la multiplicación del virus (Claus y de Cap, 2001).

Actualmente, la producción *in vivo* es la metodología más utilizada para la producción comercial de los baculovirus. Mediante este sistema se logra obtener una mayor producción del virus por unidad de volumen y un producto de alta calidad. Además, la producción *in vivo* ofrece la ventaja de no requerir un equipo altamente especializado (Ziennicka, 2007). En contraste, el sistema *in vitro* tiene un alto costo y es raramente utilizado. Aunado a ello, los baculovirus obtenidos de los procesos *in vitro* se adaptan rápidamente al cultivo celular y pierden algunos genes de supervivencia en el medio ambiente, dando como consecuencia una

menor actividad insecticida de los OBs producidos (Caballero y Williams, 2008); sin embargo, la creciente demanda y la posibilidad de introducir a los baculovirus genéticamente modificados, han estimulado el interés por desarrollar procesos alternativos de producción basados en la propagación viral en cultivos de células del insecto (Gioria *et al.*, 2006).

2.2.1.1. Producción *in vivo*

La replicación *in vivo* a gran escala o a nivel experimental de los baculovirus tiene el objetivo principal de lograr el mayor rendimiento de los OBs biológicamente activos al menor costo (Claus y de Cap, 2001; Ziemnicka, 2007). Gupta *et al.* (2007) señalan que los costos de producción pueden fluctuar entre 3,33 y 5,33 dólares/100 ml a una concentración de 1×10^{11} OBs/100 ml. El procedimiento se basa fundamentalmente en el mantenimiento del insecto bajo condiciones controladas sobre una dieta semi-sintética o natural, para luego ser alimentados con dieta tratada con virus (Claus y De Cap, 2001; Ziemnicka, 2007). No obstante, la cría de algunas especies de lepidópteros bajo dieta artificial es complicada, ya que especies como *Leucoma salicis* L., presentan preferencias específicas de alimento y solamente se alimenta de hojas del álamo, *Populus nigra* L. (Ziemnicka, 2007). Asimismo, especies como *S. frugiperda* presentan problemas para la producción del virus debido a la biología de sus larvas, las cuales presentan canibalismo y para su cría masiva es necesario contar con contenedores separados, además las larvas se tornan con aspecto líquido en las etapas finales de la infección, dificultando la recolección de los cuerpos de inclusión y dando como resultado una pérdida de poliedros (Szewczyk *et al.*, 2006).

Los OBs también pueden ser obtenidos de larvas contaminadas con el virus en condiciones de campo, tal es el caso exitoso de producción del AgMNPV en Brasil en los años ochentas (Zsewczyk *et al.*, 2006). Sin embargo, esta vía no es recomendable por los siguientes factores:

- i) la gran cantidad de agentes no deseados que pueden ingresar al sistema de producción, reduciendo la calidad y seguridad del insecticida producido.

ii) ii) la producción anual depende de la incidencia natural del insecto huésped.

iii) iii) la producción obtenida no es suficiente para satisfacer la demanda, estimándose la producción en solamente un 20 a un 30% de la demanda total (Román, 1998; Moscardi, 2007).

El establecimiento de las condiciones más favorables para el desarrollo del insecto y la replicación viral es muy importante para la producción masiva de estos patógenos. El inóculo viral, la dieta artificial y el estado larval son unos de los factores más significativos (Moscardi *et al.*, 1997; Ziemnicka, 2007).

A continuación se presentan algunos factores que influyen en el proceso de cría del hospedero, así como de la inoculación viral para su respectiva producción:

Insecto huésped. La cría de los insectos que se destinarán a la producción del virus, demanda del conocimiento previo de los hábitos de la especie y de sus requerimientos nutricionales y ambientales (Claus y de Cap, 2001; Chapman *et al.*, 1999). Las larvas mantenidas en el laboratorio deben de tener un crecimiento rápido y vigoroso para garantizar el rendimiento del proceso, este crecimiento y vigor dependen de factores como la nutrición, el tamaño del recipiente de cría, la temperatura, la humedad, la densidad poblacional, la luz y la relación machos:hembras (Román, 1998).

El estadio de desarrollo de las larvas utilizadas para inocular el virus también es importante para maximizar la producción de los OBs. Claus y de Cap (2001) mencionan la existencia de una relación constante entre el peso del huésped al momento de la muerte y la producción de OBs, la cual depende además de incremento en peso registrado durante el proceso de infección. Debido a esto, los penúltimos instares larvarios son los comúnmente seleccionados como fuente de inóculo viral, ya que los últimos estadios tienden a pupar antes de finalizar la infección (Lasa *et al.*, 2007).

La incorporación de hormonas de crecimiento en la dieta artificial aumenta el rendimiento de OBs y es un método utilizado en la producción de diversos baculovirus. Esto ha sido comprobado en la producción de CpGV (*Cydia pomonella* granulovirus) en larvas de *Cydia pomonella* L. y en la producción de

NPV/larva de *Heliothis zea* (Boddie), en donde la adición de la hormona sintética conocida como *methoprene* aumentó el rendimiento de granulovirus por larva (Claus y de Cap, 2001). Asimismo, el uso de hormonas juveniles en la producción de ciertos virus como el SeMNPV, puede incrementar en la producción del virus en comparación con la producción estándar de OBs en larvas no tratadas (Lasa *et al.*, 2007).

Tabla 4. Baculovirus utilizados actualmente para el control de plagas (modificado de Inceoglu *et al.*, 2001; Martínez, 2003).

País	Baculovirus	Nombre comercial	Hospedero
Brasil	NPV	Baculoviron	<i>Anticarsia gemmatalis</i>
	GV		<i>Erinnys ello</i>
	NPV		<i>Spodoptera frugiperda</i>
Canadá	NPV	--	<i>Orgyia pseudosugata</i>
	NPV	Disparvirus	<i>Lymantria dispar</i>
China	GV	--	<i>Agrotis segetum</i>
	NPV		<i>Buzura suppressaria</i>
	NPV		<i>Helicoverpa armigera</i>
Egipto	GV	--	<i>Phthorimaea operculella</i>
Francia	GV	Carpovirusine	<i>Cydia pomonella</i>
	NPV	Mamestrin	<i>Mamestra brassicae</i>
Alemania	GV	Granusal	<i>Cydia pomonella</i>
	GV	Capex	<i>Adoxophyes orana</i>
Guatemala	NPV	VPN 80	<i>Autographa californica</i>
	NPV	VPN 82	<i>Spodoptera sunia</i>
Japón	GV	--	<i>Adoxophyes</i> sp.
	GV		<i>Homona magnánima</i>
Perú	GV	PMT baculovirus	<i>Phthorimaea operculella</i>
Rusia	GV	Virin-GvAp	<i>Cydia pomonella</i>
	NPV	Virin-HS	<i>Helicoverpa armigera</i>
	NPV	Virin-ABB	<i>Hypanea cunne</i>
España	GV	Carpovirusine	<i>C. pomonella</i>

Tabla 4. Continuación

País	Baculovirus	Nombre comercial	Hospedero
Tailandia	NPV	SPOD-X	<i>Spodoptera exigua</i>
		Spodopterin	<i>Spodoptera littoralis</i>
Holanda	NPV	SPOD-X	<i>S. exigua</i>

Estados Unidos		Spodopterin	<i>S. littoralis</i>
	GV	CYD-X	<i>C. pomonella</i>
	NPV	Elcar, GemStar	<i>Helicoverpa zea</i>
	NPV	Elcar, GemStar	<i>H. virescens</i>
	NPV	Gypchek	<i>L. dispar</i>
	NPV	TM Biocontrol 1	<i>O. pseudosugata</i>
	NPV	SPOD-X	<i>Spodoptera exigua</i>
	NPV	AfNPV	Varias especies de Lepidóptera
Venezuela	NPV	Spodopterin	<i>S. littoralis</i>
	GV	--	<i>E. ello</i>
Nicaragua	NPV	VPN	<i>Spodoptera sunia</i>
	NPV	VPN	<i>Spodoptera frugiperda</i>

Inóculo viral. En la producción *in vivo* de los baculovirus, el inóculo viral es previamente amplificado y caracterizado morfológica, biológica y bioquímicamente para lograr establecer parámetros de calidad utilizables a lo largo del proceso de producción (Claus y de Cap, 2001). El inóculo viral debe de tener una baja carga de bacterias (aproximadamente 10^4 aerobios/g) y además estar libres de ciertos contaminantes como virus de otros insectos o enterobacterias patógenas de humanos (Black *et al.*, 1998). De manera contraria, el producto final podría presentar contaminantes que afecten la estabilidad física y las propiedades del insecticida, o bien presentar riesgos para la salud humana (Lasa *et al.*, 2008). La determinación de la dosis a administrar para el inóculo del virus en las larvas, se realiza seleccionando la concentración más baja de virus que produzca el 100% de mortalidad de las larvas destinadas a la producción, variando aproximadamente entre 1×10^5 a 1×10^7 OBS/ml (Claus y de Cap, 2001).

Condiciones ambientales en el proceso de producción. Durante el proceso de multiplicación del virus se deben considerar varios factores ambientales. La temperatura es un factor que en igualdad de dosis de inóculo, afecta el proceso. Al respecto, Claus y de Cap (2001) mencionan que la producción se debe llevar a cabo a temperaturas entre los 20 y los 26°C, y que un aumento del valor máximo puede provocar una disminución en el rendimiento y calidad del producto final obtenido. Factores como la humedad relativa (HR) y el fotoperiodo no influyen significativamente en el proceso de replicación viral; sin embargo, la HR debe ser

considerada para evitar la proliferación de contaminantes como bacterias, hongos u otros microorganismos, un rango óptimo de este factor oscila entre un 50 y 70%.

La dieta del insecto. La dieta artificial es un factor de importancia durante el proceso de producción de OBs, ya que se relaciona con el incremento de peso del insecto (Murúa *et al.*, 2003). Estas dietas incorporan básicamente fuentes de proteínas, lípidos y esteroides, carbohidratos, vitaminas y sales. No obstante, algunos de estos compuestos pueden ser omitidos con el fin de reducir el costo de la misma (Claus y de Cap, 2001). Román (1998), menciona que las dietas utilizadas para la inoculación viral carecen mayoritariamente de vitaminas, puesto que causan estrés a las larvas y lograr que estas sean más susceptibles al virus.

2.2.1.2. Producción *in vitro*

El fundamento de este proceso de producción se basa en que las células en cultivo constituyen el sustrato sobre el cual se lleva a cabo la multiplicación viral (Claus y de Cap, 2001).

Un primer requisito para el desarrollo de un cultivo celular, es la selección de una línea celular susceptible a la infección viral, capaz de llevar a cabo eficientemente las etapas del ciclo de replicación viral y de producir elevados rendimientos volumétricos de OBs. Además, el proceso de producción *in vitro* de los baculovirus requiere de una línea celular que logre soportar el cultivo en suspensión agitada. Un ejemplo es la línea celular homóloga UFL-AG-286, la cual parece exhibir una mayor susceptibilidad a la infección y mayores niveles de producción viral para la replicación del AgMNPV (Gioria *et al.*, 2006; Claus y de Cap, 2001). En la figura 7, se representa esquemáticamente el establecimiento de un cultivo celular primario de diferentes tejidos de insectos de Lepidoptera. Posterior a la escogencia del tejido, este se macera de manera que las células individuales resultantes se coloquen en un medio de cultivo, para que el virus sea posteriormente inoculado en el cultivo celular, dando inicio a su replicación (Román, 1998) (Figura 7).

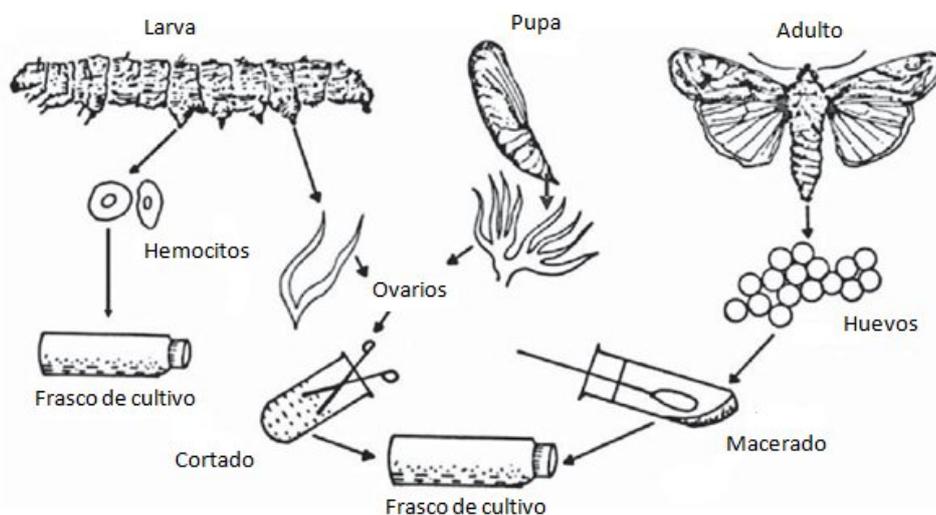


Figura 5. Diagrama representativo del establecimiento de un cultivo celular primario de diferentes tejidos de insectos de Lepidoptera.

Mitsubishi (2002) señalan que existen tres tipos de medio de cultivo. El primero contiene sustancias naturales como compuestos principales. El segundo, está conformado por constituyentes de origen químico, suplementado con sustancias naturales. Estos dos tipos comúnmente son suplementados con suero, pero existen medios libres de suero los cuales pueden soportar el crecimiento celular. El tercer tipo contiene únicamente sustancias químicas definidas y no requiere de ningún suplemento para el mantenimiento de las células.

Requerimientos nutricionales y fisicoquímicos de células de insectos. Entre los requerimientos nutricionales, algunas sales inorgánicas tienen la función de mantener el balance iónico y la presión osmótica de las células. En general, el Na^+ , K^+ , Mg^+ , Ca^+ , Cl^- y H_2PO_4^- , son considerados como esenciales para la sobrevivencia y crecimiento celular. Por otra parte, los azúcares como la glucosa (forma en que las células lo metabolizan), fructosa, maltosa y manosa, entre otras, también son esenciales el lograr un adecuado desarrollo celular.

Además, los cultivos celulares también requieren de amino ácidos como fuentes de nitrógeno (fundamentalmente los 20 amino ácidos constituyentes de proteínas y la β -alanina) y vitaminas, las cuales pueden utilizarse en concentraciones altas para aumentar la multiplicación celular (Lery y Fediere, 1990). Cabe destacar que

algunas líneas celulares requieren de lípidos y proteínas como estimulantes de la proliferación y funcionalidad celulares, además cumplen la función de anclaje a la superficie y diseminación de las células. Los medios de cultivo para líneas celulares con estos requerimientos, son enriquecidos básicamente con suero fetal bovino (SFB) o suero de otras especies de vertebrados (Claus y de Cap, 2001; Mitsuhashi, 2002).

Entre los requerimientos fisicoquímicos, básicamente se toman en cuenta la temperatura (25-30°C), el pH (6 -6,50), la osmolaridad (300 y 310 mOsm/Kg) y el oxígeno. Cabe destacar que existen diferencias entre las necesidades de consumo de oxígeno entre líneas celulares; sin embargo, se han determinado concentraciones específicas de oxígeno que van de 1 a 11 mmoles/10⁹ células/día en ensayos con líneas celulares, en su mayoría, de *S. frugiperda* (Claus y de Cap, 2001).

Infección de las líneas celulares con baculovirus. A la masa de partículas virales no incluidas (viriones libres) que se agregan al cultivo para dar inicio al proceso de infección, es lo que se conoce como el inóculo viral y de este depende la calidad del producto final obtenido, además que ejerce una significativa influencia sobre la productividad de baculovirus en cultivos celulares. La elección del inóculo para el proceso de infección dependerá de los parámetros de virulencia y su capacidad de replicación en cultivos celulares, de manera que su producción sea proporcional económicamente al costo del proceso de producción (Claus y de Cap, 2001).

2.2.2. Formulación

El resultado de mezclar un ingrediente activo con una o más sustancias que le ayuden a mejorar la eficiencia, estabilidad y manejo del insecticida, es lo que se conoce con el término de formulación (Williams y Cisneros, 2001). En toda formulación se distinguen tres tipos de componentes: el principio activo responsable de la actividad controladora; los excipientes, los cuales comprenden el vehículo que puede ser sólido o líquido (Tabla 6) y los coadyuvantes que

ayudan a mejorar la acción del ingrediente activo. Todos los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas (Chaparro, 2008).

Importancia de la formulación. La formulación es vital para asegurar la eficiencia del proceso de infección, por lo que uno de sus principales objetivos es permitir que se aplique de manera uniforme en todo el alimento, lográndose mediante el agregado de coadyudantes (Burges y Jones, 1998, Williams y Cisneros, 2001). En la naturaleza cuando los baculovirus se replican en el tejido blanco, estos utilizan el cadáver del insecto para protegerse de una eventual degradación, principalmente de la exposición a los rayos ultravioleta de la luz solar (Burges y Jones, 1998; Devisetty *et al.*, 1998; Goulson *et al.*, 2003). Por lo anterior, la incorporación de coadyuvantes a la formulación también reemplaza la protección natural brindada por los cadáveres de los insectos, maximizando la persistencia ambiental del virus (Burges y Jones, 1998; Williams y Cisneros, 2001).

2.2.2.1. Tipos de formulación

Formulaciones líquidas. En las suspensiones acuosas el portador más común es el agua. En la mayoría de los casos la adición de un aceite no es necesaria, pero cuando el volumen de la aplicación es bajo, la incorporación de aceites es requerida para evitar la evaporación de las gotas. A este tipo de preparación se le conoce con el nombre de emulsiones (Williams y Cisneros, 2001; Chaparro, 2008) (Tabla 6).

Formulaciones sólidas. En esta se utilizan portadores inertes sólidos como la arcilla o sílice sintética y la adición de un surfactante (Caballero y Williams, 2008). Este último tiene la función de diluir y mantener el virus disperso en la formulación, por lo que se requiere una sustancia inerte, fácil de obtener y de bajo costo (Williams y Cisneros, 2001). Existen diferentes tipos de preparaciones sólidas, dentro de las que se encuentran los polvos (partículas entre un rango de 5 a 20 μ m). Los polvos humectables pueden mantenerse en suspensión líquida durante el periodo de aplicación y requieren por lo general de un surfactante que

permita que el líquido sobrepase la tensión superficial de la interfase líquida-sólida y penetre la superficie. Los gránulos y cápsulas contienen entre un 5 y un 20% de producto activo, 80 a 95% de soporte y entre un 1 a 5% de adherente, son aplicados directamente a la planta o al suelo y tienen aspecto de arenilla con un tamaño de partícula entre los 0,2 y 1,5 mm (Chaparro, 2008).

Finalmente, se encuentran las formulaciones encapsuladas, las cuales consisten de microcápsulas conteniendo los microorganismos, rodeándolos de materiales como gelatina, almidón, celulosa y varios polímeros (Chaparro, 2008). Para lograr esto se utilizan técnicas como la microencapsulación por coacervación, estudiada para la producción de microcápsulas de SfNPV mediante la coacervación del patógeno con el copolímero del ácido metacrílico (Eudragit S100®) (Villamizar y Martínez, 2008).

Tabla 5. Portadores empleados en las formulaciones de bioinsecticidas (Williams y Cisneros, 2001).

Mineral	Vegetal	Carbohidratos	Aceites
Atapulgita	Salvado (trigo, arroz)	Lactosa	Aceite Codacide
Bentomita	Cáscara de nuez molida	Harina (maíz, trigo, soya)	Aceite de algodón
Polvo de mármol	Elote molido	Almidón (maíz, papa)	Aceite de cacahuete
Arena de sílica		Sémola con caolín	Aceite de coco
Caolinita			Aceite de soya
Talco			Aceite UVL (ultra bajo volumen)
Zeolita			Actipron
Acido silícico			Diesel
Silica amorfa (Aerosil 200)			Top Oil (aceite mineral)

2.2.2.2. Coadyuvantes

Estos compuestos son utilizados para facilitar la aplicación del producto (surfactantes), mejorar el depósito del virus en el sitio de alimentación de la plaga (adherentes), incrementar la alimentación del fitófago (fagoestimulantes), incrementar su persistencia en el ambiente (fotoprotectores) y aumentar la estabilidad del principio activo durante el tiempo de almacenamiento (Caballero y

Williams, 2008; Chaparro, 2008). Los surfactantes son utilizados como emulsionantes para que la mezcla con el aceite evite la separación de las sustancias (Williams y Cisneros, 2001; Vega, 2007). En el control de plagas se utilizan principalmente el Tween, Span y algunos nonil-fenol-etoxiliados como el NFE (Chaparro, 2008).

Los adherentes más utilizados son sustancias como la gelatina, dextrina, albúmina, caseína, gomas y carragenos, entre otras (Chaparro, 2008). Cabe destacar que varios de los surfactantes comerciales son tanto dispersantes como adherentes y su aplicación depende de la naturaleza de la superficie de la hoja, así como de la frecuencia de lluvias (Williams y Cisneros, 2001). La adición de fagoestimulantes o estimulantes alimenticios se realiza con el fin de incrementar la alimentación del fitófago de manera que este consuma una mayor cantidad de inóculo en menos tiempo, permitiendo que se requiera menor cantidad de inóculo en una aplicación para lograr el mismo grado de control (Williams y Cisneros, 2001; Cisneros *et al.*, 2002; Lasa *et al.*, 2003; Chaparro, 2008). El uso de estas sustancias se ha estudiado en el control de *S. exigua* con un producto comercial llamado Spod-X (a base del SeMNPV), en donde la adición de harina de soja, germen de trigo o levadura de cerveza fueron los más efectivos (Lasa *et al.*, 2003).

Los compuestos fotoprotectores pueden dividirse según su modo de acción en reflejantes, absorbentes, colorantes, cromatóforos, captosres de radicales libres y más recientemente, blanqueadores ópticos o fluorescentes (Williams y Cisneros, 2001). Estos últimos son un grupo de compuestos derivados del estilbena, muy utilizados en la elaboración de pinturas, telas, detergentes, papel y plásticos, en donde mejoran la apariencia blanca del producto al absorber la radiación UV y emitir luz en la porción azul del espectro luminoso. Además, han demostrado un gran potencial como agentes protectores para muchos insecticidas biológicos y como mejoradores de la patogenicidad viral (Goulson *et al.*, 2000; Chaparro, 2008). Como para el caso de *S. frugiperda* NPV, en donde el uso del abrillantador Tinopal LPW mejoró la actividad del virus en instares tempranos de la plaga por un factor de más de 100x (Martínez *et al.*, 2003).

2.2.2.2.1. Potenciadores de la actividad insecticida

El sinergismo o potencialización se define como la acción en conjunto o suplementaria de dos agentes resultando en un efecto mejor que el logrado por la acción de estos compuestos por separado (Koppenhöfer, 2007). El potencial que tiene los abrigadores ópticos para este fin es muy prometedor; sin embargo, existen otros aditivos que poseen un efecto sinergista con los baculovirus, brindándole a la formulación la posibilidad de reducir las dosis letales y los tiempos de muerte (Burges, 1998).

Azadiractina. La azadiractina es un compuesto extraído inicialmente de la fruta de *Melia azadirach* L. (Meliaceae) y posteriormente aislado de otra especie de esta misma familia de árboles, *Azadirachta indica* A. Juss (árbol de neem de la India) (Kubo y Klocke, 1982), la cual es originaria del Sur y Sureste de Asia (Guan y Bottrell, 1994). Las semillas del árbol del neem producen un conjunto de triterpenoides, entre los cuales destaca la azadiractina (Figura 8). Este compuesto se considera un regulador del crecimiento de los insectos (RCI) (Guan y Bottrell, 1994; Isman, 1999), ya que interfiere en el proceso de la metamorfosis debido a la similitud estructural de su molécula ($C_{55}H_{44}O_{16}$) con la hormona de la muda de los insectos llamada ecdisona, la cual controla la metamorfosis de la larva. Además funciona como repelente de insectos, inhibe la reproducción y causa otras alteraciones en los insectos (Guan y Bottrell, 1994). En dosificaciones de 100 $\mu\text{g/g}$, la actividad insecticida de la azadiractina inhibe la oviposición y presenta efectos antialimentarios en lepidópteros y otro grupo de insectos. Cabe destacar que unas de las principales ventajas de la azadiractina radica en su nula persistencia y baja toxicidad para mamíferos, enemigos naturales y agentes polinizantes (Isman, 1999; Ramos *et al.*, 2004).

Por otro lado, algunos autores han estudiado la compatibilidad del aceite extraído de las semillas del neem y la azadiractina con diferentes especies de nucleopoliedrovirus (Tabla 7) (Guan y Bottrell, 1994; Raguraman *et al.*, 2004). Senthil y Kalaivani (2006), observaron que cuando el VPN de *Spodoptera litura* (Frabicius) se mezcló con 0.25 y 0.50 ppm de azadiractina, hubo un aumento significativo de la mortalidad larvaria cuando el virus se ensayó en

concentraciones de 1×10^3 y 1×10^6 OBs/ml, respectivamente. Además observaron un aumento en el tiempo de la mortalidad de las larvas de *S. litura* (Senthil y Kalaivani, 2006).

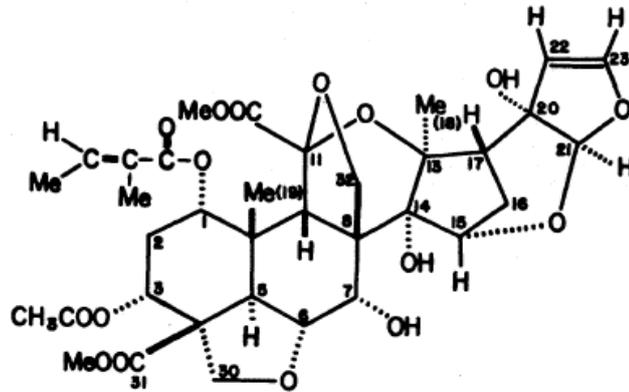


Figura 6. Estructura molecular de la azadiractina (Kubo y Klocke, 1982).

Similarmente, Senthil *et al.* (2008) observaron que cuando las larvas de tercer estadio de *Helicoverpa armigera* fueron expuestas a su NPV + azadiractina la mortalidad se incrementó significativamente en comparación con el virus solo. Aunado a ello, se observó una disminución en el tiempo de muerte del 100% de las larvas. Además se determinó una disminución significativa en el peso de las larvas a los 14 días post-emergencia, obteniendo un peso promedio de 420 mg en las larvas testigo, 299 mg y 248 mg para los tratamientos de NPV (5×10^2 OBs/ml) y AZA (0,025 ppm), respectivamente y hasta 99 mg en las larvas tratadas con el VPN en combinación con AZA a las mismas dosis mencionadas (Senthil *et al.*, 2008). Estos mismos efectos fueron obtenidos en *S. litura*, en donde se obtuvo una disminución del peso de las larvas entre 59 y 72% en los tratamientos con combinación de ambos insecticidas. Además se destacó que los efectos son más pronunciados en larvas de estadios tempranos (Senthil *et al.*, 2005).

A nivel bioquímico se ha determinado que la combinación de AZA con VPN o su uso individual, presenta un efecto sobre las enzimas intestinales de larvas de *S. litura*, reduciendo la actividad de ácido fosfatasa, alcalino fosfatasa, adenosin trifosfatasa y lactato deshidrogenasa de manera significativa (Senthil *et al.*, 2005).

Tabla 6. Compatibilidad del neem con algunas especies de Nucleopoliedrovirus (Raguraman *et al.*, 2004).

Insecto	Concentración
<i>Lymantria dispar</i>	Extracto de semilla de Nim a 2300 ppm con NPV
<i>Spodoptera litura</i>	Nim amargo (0,1%) con NPV (5×10^5 OBS/ml) y azúcar crudo (0,1%)
<i>S. litura</i>	SINPV 2×10^4 OBS/ml + extracto de nim (5%)
<i>Helicoverpa armigera</i>	HaNPV (500 LE/ha) + extracto de nim (5%)
<i>Thysanoplusia sp.</i>	Neemark (0,25%) con NPV (150 LE/ha)
<i>H. armigera</i>	Anonna 36 EC + nim 36 EC
<i>H. armigera</i>	Nimbecidina 2% con NPV (250 LE/ha)

Otros potenciadores. El ácido bórico ha sido utilizado en la historia para el control de hormigas y cucarachas; no obstante, se ha demostrado su capacidad de potenciar la actividad de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Berliner) y muchos baculovirus. Debido a su reducido costo y baja toxicidad en los mamíferos, el ácido bórico es una proposición atractiva para su incorporación en las formulaciones de baculovirus (Cisneros *et al.*, 2002). Williams y Cisneros (2001) realizaron estudios más a fondo con el ácido bórico, determinando una disminución de la concentración letal 50 (CL_{50}), pasando de $5,0 \times 10^3$ OBS/ml a $0,8 \times 10^3$ OBS/ml, al utilizar ácido bórico en la formulación del virus. Además, al incorporar 0,5 y 0,1% de ácido bórico a una concentración determinada de baculovirus, se aumentó el porcentaje de mortalidad, pasando de un 33,7% con solo virus, hasta un 57,7% y un 63,7% respectivamente. El ácido bórico también ha sido probado con el VPN de *A. gemmatalis*, en donde se logró la disminución de la CL_{50} con la incorporación de ácido bórico al 0,0045%, pasando de $1,52 \times 10^5$ OBS/ml a $7,95 \times 10^2$ OBS/ml. Además se redujo el tiempo letal 50 (TL_{50}) de 13,7 a 7,4 días (Morales *et al.*, 1997).

2.3. El SfMNPV como agente de control de *S. frugiperda*

El SfMNPV es un virus altamente prevalente en las poblaciones naturales de *S. frugiperda* (Garden y Fuxa 1980) y puede ocasionar epizootias de la enfermedad en altas densidades del mismo (Hamm y Young 1971). Estudios sobre la

distribución y abundancia del SfMNPV en el sur de México Belice y Guatemala han indicado que, en ausencia del huésped, éste virus puede estar presente en parcelas de maíz en producción, parcelas con residuos del cultivo o con antecedentes de infestación de la plaga (Williams, 2009). Dicha detección se ha observado en muestras de suelo colectadas en el sur de México, Belice y Guatemala (Williams, 2009) mediante una técnica desarrollada por Richards y Christian (1999) (Figura 9).

El SfMNPV presenta una alta patogenicidad en contra de su hospedero homólogo y una virulencia semi-permisiva en hospederos alternativos como *S. exigua* y *S. littoralis* (Simón *et al.*, 2004c). Dichas características han motivado la realización de estudios enfocados al uso del SfMNPV como un agente de control en Estados Unidos (Hamm y Young 1971), Nicaragua (Mullock *et al.*, 1990), México, Honduras (Williams *et al.*, 1999), Colombia, Brasil y Argentina (De Oliveira 1998). A finales de los años 90's, el SfMNPV fue caracterizado por Escribano *et al.* (1999). Estos autores reportan que aislados procedentes de Argentina, Nicaragua y Estados Unidos fueron estructural y genéticamente muy similares, aunque pruebas biológicas determinaron que las larvas de *S. frugiperda* fueron más susceptibles al aislado procedente de Nicaragua.

En estudios más recientes se determinó que una población natural del SfMNPV posee una amplia diversidad genómica (Simón *et al.*, 2004a), por ejemplo en el aislado procedente de Nicaragua (Sf-NIC) se identificaron nueve genotipos diferentes. El genotipo completo fue caracterizado en términos de su mapa físico con las endonucleasas *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y *BamHI* (Simón *et al.*, 2005a). De los otros genotipos clonados, tres se identificaron como defectuosos porque no causaron infección *per se*, mientras que el resto fueron significativamente menos infectivos comparados con el aislado silvestre después de ser ingeridos por larvas del segundo estadio de *S. frugiperda* (Simón *et al.*, 2004a). De modo interesante, cuando se produjeron mezclas artificiales de dos de los genotipos, uno completo y el otro defectuoso, se observó que la mezcla restableció la patogenicidad a la del aislado silvestre (López-Ferber *et al.*, 2003). Asimismo, se ha determinado que el aislado Sf-NIC es más infeccioso que cualquiera de los genotipos que lo componen utilizado de manera pura, indicando que esta interacción entre

genotipos representa un aspecto importante en la biología del baculovirus, aumentando la patogenicidad de la población silvestre (Simón *et al.*, 2004a; Simón *et al.*, 2005b).

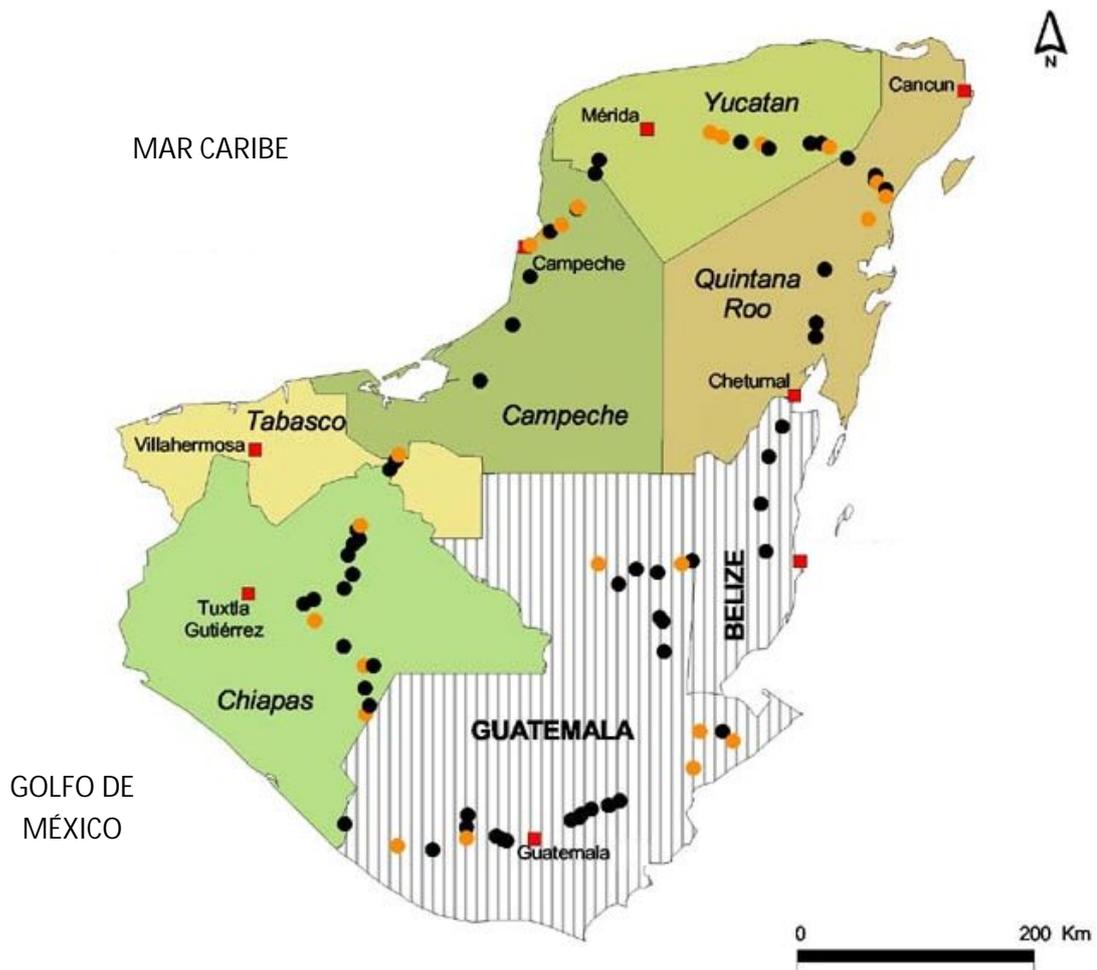


Figura 7. Distribución del SfmNPV en los suelos de parcelas de maíz en el sur de México, Belice y Guatemala. Muestras negativas (puntos negros) y positivas (puntos amarillos) (Williams, 2009).

Las diferencias genéticas antes señaladas son posibles encontrarlas entre aislados provenientes de un mismo lugar, siendo variantes clonales derivadas de un virus silvestre y que se pueden determinar por pruebas moleculares como el análisis de endonucleasas de restricción (REN por sus siglas en inglés) (Escribano *et al.*, 1999). Interesantemente, Cory y Mayers (2003) sugieren que los perfiles obtenidos de un análisis REN de SfmNPV varían además si el hospedero es parasitado o no. Aunque actualmente se sigue investigando la naturaleza y las

consecuencias de la interacciones entre los diferentes genotipos (Simón *et al.*, 2005b, 2006) en términos de la patogenicidad, virulencia y transmisibilidad de este virus, es claro que la diversidad e interacción entre genotipos representa una importante contribución al conocimiento de la biología y ecología de los baculovirus (Muñoz y Caballero, 2001).

En países como Brasil, Perú y Venezuela se han realizado varios estudios para validar la efectividad del SfMNPV en laboratorio y campo (Moscardi, 1999; Vásquez *et al.*, 2002; Ferrer, 2001). El caso más sobresaliente es Brasil, donde el SfMNPV fue utilizado para tratar entre 5 000 y 10 000 ha de maíz en el año de 1995. Dicha extensión se ha incrementado hasta aproximadamente 20.000 ha para controlar larvas de primer y segundo estadio de *S. frugiperda* mediante una formulación granulada humectable a una concentración de $2,5 \times 10^{11}$ OBs/ha (Moscardi, 1999; Szewczyk *et al.*, 2006). Además, se han caracterizado mediante técnicas moleculares 22 aislados diferentes del virus (Shapiro *et al.*, 1991; Barreto *et al.*, 2005). Específicamente, se ha encontrado un aislado, el 6NR, el cual no causa la licuefacción del integumento de las larvas inmediatamente después de la muerte (Caldas *et al.*, 2008). Además se ha identificado el aislado llamado SfMNPV-19 el cual presentó la dosis letal cincuenta más baja y la mortalidad más alta a bajas concentraciones (Barreto *et al.*, 2005; Caldas *et al.*, 2008).

Los estudios de secuenciación para el NPV de *S. frugiperda* iniciaron en 1989 con el gen *polyedrina*. Seis años después, se determinó la secuencia del gen *gp41* y se analizó su patrón de expresión. En el año 2003 se determinó la secuenciación de una región de 5122 pb en donde se ubicaban los genes *gp37*, *ptp-2* y *egt* y tres marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés). En los últimos años fueron obtenidas las secuencias del gen inmediatamente temprano (*p74*) y el gen *pif* (*factor infeccioso per sé*) involucrado en la fusión entre la envoltura del virus y las microvellosidades del insecto, así como la secuenciación parcial de 38 ORF localizados en el término de fragmentos de restricción clonados (Simón *et al.*, 2005a; Caldas *et al.*, 2008). Dentro de estos ORFs se ubica el ORF29 o gen *Sf29*, el cual es homólogo al gen *Se30* de *S. exigua* y aparenta estar involucrado en la determinación del número de partículas virales por OBs (Simón *et al.*, 2008).

Finalmente, Caldas *et al.* (2008) y Caldas *et al.* (2008), completaron la secuencia del aislado SfMNPV-19 conteniendo 132.565 pb y 141 ORF.

2.4. El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*

2.4.1. Importancia económica

El cultivo del maíz, *Zea mays* L., es originario del América y representa uno de los alimentos de mayor consumo popular en este continente. El maíz tropical se cultiva en 66 países y es de importancia económica en 61 de ellos. Para el caso de Costa Rica, datos recientes de la Secretaría de Planificación Sectorial Agropecuaria indican que el área de cultivo del maíz es solamente de 8 894 ha aproximadamente, con una producción de 18 197 ton/ha; sin embargo, este cultivo es el principal producto agrícola importado al país, con un total de 613 697 ton.

Al igual que otros cultivos agrícolas, el maíz puede ser afectado a lo largo de su ciclo de vida y en el almacenamiento por varias especies de insectos que pueden interferir con su desarrollo normal y la calidad del grano (Sotelo, 2004). El gusano cogollero del maíz es una especie originaria de América y ampliamente distribuida desde Argentina hasta el sur de Canadá (Murua y Virla, 2004; Murúa *et al.*, 2006; Clark *et al.*, 2007). Es una especie que presenta dos cepas morfológicamente indistinguibles, una que se alimenta principalmente del maíz y el sorgo y otra que se alimenta preferentemente de arroz y zacate bermuda (Molina *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007). El gusano cogollero es considerado la principal plaga del maíz, al que ataca con niveles variables en las regiones tropicales y subtropicales de América Latina, constituyendo un factor limitante del cultivo (Murua y Virla, 2004; Murúa *et al.*, 2006).

En América Central y México se estiman entre 13 y 60% las pérdidas en el campo causadas por *S. frugiperda* (Fernández, 2002). Para el caso de Argentina se reportan pérdidas que fluctúan entre el 17% y 72%, donde su control, en el caso del maíz tecnificado, significa un costo en la producción de aproximadamente un 5.6% (Murúa *et al.*, 2006; Zenner *et al.*, 2007). El mayor problema por el ataque de *S. frugiperda* se presenta entre las semanas 1-6 posteriores a la emergencia del maíz. Las plantas jóvenes pueden ser destruidas o debilitadas, ya que las larvas se alimentan de las hojas centrales produciendo huecos hasta llegar al ápice o

cogollo de la planta, el cual puede ser completamente destruido. La espiga se puede convertir en un blanco de la plaga cuando la ocurrencia de esta es tardía, provocando la disminución de las mazorcas y permitiendo la entrada de humedad y patógenos (Santos *et al.*, 2003; Sotelo, 2004) (Figura 10).



Figura 8. Daños causados por *S. frugiperda* en el maíz.

2.4.2. Plantas hospederas

Las larvas de *S. frugiperda* son polífitas puesto que se alimentan de más de 60 especies pertenecientes a 23 familias, aunque prefiere plantas de las familias Fabaceae y Gramineae. Específicamente, se pueden mencionar las siguientes especies: maíz, sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), soya (*Glycine max* L.), espinaca (*Spinacia oleracea* L.), lechuga (*Lactuca sativa* L.), menta (*Mentha spicata* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), pimiento (*Capsicum annuum* L.), tomate (*Lycopersicon* sp), papa (*Solanum tuberosum* L.) y vid (*Vitis vinifera* L. (Van Huis 1981, Pérez *et al.*, 2003).

2.4.3. Métodos de control

Las costumbres de los productores para controlar las plagas generalmente han sido a través del uso de plaguicidas sintéticos (Sotelo, 2004). No obstante, el uso exclusivo de sustancias químicas presenta ciertos inconvenientes como son: la selección de nuevas resistencias a los insecticidas en las poblaciones de plagas; el resurgimiento de las poblaciones tratadas; residuos, riesgos y complicaciones legales; destrucción de especies benéficas; costo de fumigantes, equipo, mano de obra y material (Badii y Abreu., 2006), así como los perjuicios provocados por la

fabricación y uso de los plaguicidas, tanto por la contaminación en el ambiente como por los riesgos para la salud humana. Es por esto que día a día se están tratando de desarrollar nuevas estrategias de control que sean menos contaminantes (Lecuona, 2002).

Según el Servicio Fitosanitario del Estado de Costa Rica, existen actualmente registrados 23 insecticidas para el control de *S. frugiperda* en maíz, siendo en su mayoría de origen químico con ingredientes activos como metomil, carbaril, diazinón y clorpirifos. Además, hay registrado un producto de origen botánico a base de piretrinas naturales y otro de origen microbiológico a base de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* (Servicio Fitosanitario del Estado de Costa Rica, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar la interacción entre el SfMNPV y azadiractina para el control del gusano cogollero, *S. frugiperda*.

3.2. Objetivos Específicos

Determinar la influencia de la azadiractina en formulados de SfMNPV sobre el peso y el tiempo de desarrollo de larvas de *S. frugiperda*.

Evaluar el efecto de azadiractina sobre la producción de los cuerpos de oclusión del SfMNPV en larvas de *S. frugiperda*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cría del Insecto

La cría de *S. frugiperda* se estableció a partir de una población colectada en cultivos de maíz ubicados en el municipio de Tarimbaro, Michoacán, México. Esta fue mantenida en el laboratorio de Entomología Agrícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. Las larvas del insecto se alimentaron con dieta semisintética elaborada a partir de sémola de maíz, germen de trigo y levadura (Anexo 1). Los adultos fueron confinados en cámaras de apareamiento las cuales consistían de bolsas de papel de aproximadamente 40 cm de largo por 15 cm de ancho y, se alimentaron con una solución de miel al 15%. La cría se mantuvo en una cámara de crecimiento a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% de HR y un fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad).

4.2. Insecticidas ensayados

El SfMNPV fue obtenido de un aislado silvestre procedente de Nicaragua y caracterizado por Escribano *et al.* (1999). La multiplicación se realizó en larvas de *S. frugiperda* del tercer estadio mediante la técnica de contaminación por superficie, la cual consiste en esparcir el inóculo viral sobre la dieta y colocar las larvas una vez secada la superficie de la misma. Las larvas infectadas y muertas fueron colectadas en microtubos y maceradas en una solución de sodio duodecil sulfato (SDS) al 0,1%. La purificación de los cuerpos de inclusión (OBs por sus siglas en inglés) se realizaron por centrifugación y un gradiente de sacarosa al 40% (Anexo 2). El virus precipitado fue resuspendido en agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1 ml y la cuantificación de los OBs se realizó en una cámara de conteo Neubauer (10^{-4} cm^3) a 40x en contraste de fases. La suspensión del virus fue almacenada a -20°C hasta su uso. La azadiractina (Neemix[®]) fue utilizada en emulsión concentrada (4.5%) de la casa comercial CERTIS (E.U.A).

4.3. Efecto de azadiractina y el SfMNPV sobre el desarrollo larvario de *S. frugiperda*

En este ensayo, las larvas de tercer estadio (≤ 8 h después de la ecdisis) de *S. frugiperda* se alimentaron sobre discos de dieta semisintética (1 cm de diámetro) tratados superficialmente con dos concentraciones de azadiractina (13,3 y 26,42 mg de ingrediente activo (i.a./kg de dieta, T₁ y T₂ respectivamente), con las cuales se esperaba obtener 25 y 50% de mortalidad, respectivamente. Asimismo, se aplicó el SfMNPV a una concentración de 430 OBs/mm² (T₃) para lograr obtener 50% de mortalidad. Los discos se colocaron individualmente en cajas de doce celdas cada una (3 x 4 celdas) y cada disco fue tratado con 50 μ l de la solución insecticida. Después de aproximadamente treinta minutos de la aplicación se colocó una larva por disco. Se realizaron cuatro repeticiones por concentración con 36 larvas por repetición. Previo a la exposición del insecticida, todas las larvas fueron pesadas en una balanza analítica. A partir de las 24 h posteriores al bioensayo, las larvas se examinaron y se pesaron diariamente. Cabe señalar, que la elaboración de la dieta para este experimento se realizó de acuerdo con el protocolo expuesto en el Anexo I, con la excepción del agua la cual se redujo a 700 ml y el agar el cual se aumentó a 11,9 g. Dicha modificación se realizó con el fin de aumentar levemente la dureza en la consistencia de la dieta y poder facilitar su manipulación para ser insertada en las celdas utilizadas para los ensayos.

4.4. Efecto de azadiractina sobre la producción de OBs del SFMNPV

Para evaluar el efecto de azadiractina sobre la producción de OBs del SfMNPV se aplicaron las mismas condiciones expuestas en el apartado anterior, pero en este caso se realizaron mezclas del virus con azadiractina bajo los siguientes tratamientos: i) T₄: virus (430 OBs/mm²) + azadiractina [26,42 mg (i.a)/kg de dieta] y ii) T₅: virus (430 OBs/mm²) + azadiractina [13,33 mg (i.a)/kg de dieta]. Como testigo (T₀) se utilizó dieta tratada sólo con SDS al 0,1%. En este experimento, además de dar seguimiento al peso y desarrollo larvario, las larvas que mostraron signos de infección por el virus se colectaron e individualizaron en microtubos de 2 ml y fueron mantenidas a temperatura ambiente hasta el

momento de su muerte. Posteriormente, fueron congeladas a -20°C con el fin de mantener la actividad de las partículas virales. Cada muestra fue macerada utilizando 0,5 ml de agua destilada estéril, filtrada inicialmente por una tela de tul y finalmente por una tela de muselina, utilizando 0,5 ml de agua destilada estéril para limpiar cada tela luego del filtrado. La suspensión resultante fue ajustada a un volumen de 2,0 ml con agua destilada estéril. El número de OBs de cada larva fue determinado en una cámara de Neubauer con un microscopio de contraste de fases a 40x. Todos los conteos se realizaron por triplicado.

Análisis. Se analizó el incremento promedio de peso (mg) por cada larva así como el tiempo de duración en días entre un estadio larval y otro y, la producción de OBs por mg de larva. Dependiendo de la naturaleza de los datos, el peso larvario y número de OBs por larva se analizó mediante ANOVA o Kruskal-Wallis (prueba no paramétrica) en el programa estadístico Statgraphics PLUS 5.1.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Mortalidad larvaria

La aplicación del SfMNPV y azadiractina sobre la dieta del insecto provocaron una mortalidad larvaria significativamente mayor comparada con el testigo después de siete días de inicio del bioensayo (Tabla 7). Los tratamientos T₁, T₂ y T₃ provocaron una mortalidad de 28,20, 46,52% y 48,52 respectivamente, lo cual es congruente con la mortalidad esperada para las concentraciones aplicadas (CL₂₅ para T₁ y CL₅₀ para T₂ y T₃). La mortalidad por el SfMNPV fue significativamente diferente a todos los tratamientos, con excepción del tratamiento con la azadiractina sola a una concentración de 26.42 mg i.a./L (46,52%) (Tabla 7). En el presente estudio, la actividad del SfMNPV a una concentración de 430 OBS/mm², fue 5,24 y 3,5 veces menor en larvas de tercer estadio comparada con lo estimado por Martínez *et al.* (2000) (CL₅₀ = 82 OBS/mm²) y Cisneros *et al.* (2002) (CL₅₀ = 114 OBS/mm²), quienes utilizaron el mismo método de aplicación en larvas de segundo estadio. En contraste, Martínez *et al.* (2003) no observaron diferencias significativas entre el segundo [$2,6 \times 10^4$ OBS/ml ($1,3 \times 10^4 - 5,1 \times 10^4$)] y tercer estadio [$3,4 \times 10^4$ OBS/ml ($1,2 \times 10^4 - 7,9 \times 10^4$)] cuando las larvas fueron inoculadas mediante la técnica de ingestión de la gota, técnica diferente a la utilizada tanto para este ensayo como para el ensayo de Martínez *et al.* (2000) y Cisneros *et al.* (2002). Lo anterior confirma que la susceptibilidad hacia los baculovirus puede depender tanto de la edad de las larvas como de las técnicas de inoculación, entre otros factores.

Por otro lado, la susceptibilidad de *S. frugiperda* a azadiractina sola, a una concentración de 26,42 mg i.a./L (CL₅₀), fue 2,4 veces mayor que la observada por Zamora *et al.* (2008) (CL₅₀ = 63,49 mg i.a./kg de dieta) con larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* tratadas con dieta contaminada. En este caso, tales diferencias son atribuidas al tiempo en el cual se determinó la mortalidad larvaria de *S. frugiperda* en cada caso (168 y 120 h, respectivamente). En otras especies de lepidópteros como *Spodoptera littoralis* (Boisd) (Adel y Sehnal, 2000), *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) (Iannacone y Lamas, 2003) y *Sesamia nonagrioides* (Lefèbre) (Andreu *et al.*, 2000) la respuesta de las

larvas hacia azadiractina han sido muy variable, lo cual puede estar fuertemente influenciado por la especie del insecto tratado, estado de desarrollo, técnica de contaminación y el tipo de formulación (Schmutterer, 1995).

La interacción del SfMNPV con dos concentraciones de azadiractina aumentaron la mortalidad larvaria 1,34 (430 OBs/mm² + 13,3 mg i.a./L, T₄) y 1,82 veces (430 OBs /mm² + 26,42 mg i.a./L, T₅) comparado con el SfMNPV solo (Tabla 7). Asimismo, estas interacciones del SfMNPV con azadiractina incrementaron significativamente la mortalidad larvaria comparado con la azadiractina sola (T₁ y T₂), dicho incremento fue de 1,9 y 2,3 veces respectivamente. Estos resultados corroboran lo observado en otros estudios, en donde la mezcla de varias especies de baculovirus con insecticidas con diferentes modos de acción, mejoró significativamente la eficacia de éstos patógenos (Williams y Cisneros, 2001; Méndez *et al.* 2002; Pineda *et al.* (2008)). Específicamente, Pineda *et al.* (2008) observaron una relación sinérgica entre el SfMNPV y azadiractina en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* cuando las larvas fueron inoculadas con el virus y posteriormente alimentadas con dieta contaminada con el insecticida botánico. Similar al presente estudio, los anteriores autores observaron que las concentraciones de azadiractina tuvieron influencia sobre la respuesta de la mortalidad, en nuestro caso, dicha relación sinérgica estuvo positivamente relacionada con la concentración del insecticida.

En otros estudios, Cook *et al.* (1996) demostraron incrementos del 30 al 40% de la mortalidad en larvas de la palomilla gitana, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) alimentadas con dieta y hojas tratadas con su nucleopoliedrovirus (LdMNPV) en mezclas con azadiractina. En contraste, Shapiro *et al.* (1994) señalaron que la adición de cuatro diferentes concentraciones de azadiractina (0,10; 0,25; 0,50 y 1,0%) a una suspensión del LdMNPV, no afectó significativamente los valores de la CL50 en larvas de segundo estadio de *L. dispar*. Recientemente, Senthil *et al.* (2008) observaron que cuando las larvas de varios estadios de *H. armigera* (tercero-sexto) fueron expuestas a mezclas de varias concentraciones de su nucleopoliedrovirus y azadiractina, la mortalidad se incrementó significativamente en comparación con el virus solo.

De acuerdo con varios autores, los extractos de las semillas del neem y la azadiractina pura pueden alterar el comportamiento en insectos de diferentes órdenes debido a su acción antialimentaria y repelente, además de tener efectos negativos sobre el desarrollo y crecimiento larvario (Bahena, 2002; Isman y Akhtar 2007; Senthil *et al.* (2008). Posiblemente, el efecto sinérgico entre los baculovirus y azadiractina sea consecuencia de la prolongación de la duración del estado de las larvas, lo cual permite un incremento en el desarrollo de la infección por los virus (Senthil *et al.*, 2008).

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* tratadas con SfMNPV, azadiractina y en mezclas.

Tratamiento	N^a	Porcentaje de mortalidad (± EE)
Testigo	131	0,70 ± 0,70a
SfMNPV (OBS/mm ²) 430	136	48,52 ± 3,44b
Azadiractina (mg i.a./L)		
13,3	138	28,20 ± 3,86c
26,42	144	46,52 ± 7,80b
SfMNPV (OBS/mm ²) + azadiractina (mg de i.a /L)		
430 + 13,33	94	65,30 ± 0,89d
430 + 26,42	126	88,77 ± 4,98f

Valores entre columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, $P = 0,05$; separación de valores LSD; ^a $F = 141,07$; $gl = 5, 18$; $P \leq 0.001$.

^aNúmero total de larvas.

En los tratamientos con azadiractina, la manifestación de los síntomas producidos por este compuesto (Figura 9), aparecieron a partir de las 48 horas de iniciado el ensayo, mientras que en el tratamiento con virus solo, los síntomas típicos de infección viral se observaron a partir de las 96 a 120 horas (Figura 10).



Figura 9. Síntomas producidos por la azadiractina en larvas de tercer estadio de *Spodoptera frugiperda*. (a.) Apariencia de una larva sana de *S. frugiperda* en quinto estadio instar, (b.) (Flechas) Formación de una doble cápsula endocefálica, (c.) Desprendimiento parcial de la cutícula en el proceso de muda.



Figura 10. Síntomas producto de la infección viral. (a.) Apariencia de una larva sana de *S. frugiperda* en quinto estadio instar, (b.) coloración blancuzca observada al inicio de la infección, (c.) coloración rosa de la cutícula próxima al final de la infección, (d.), aspecto característico de una larva muerta por la acción del SfMNPV.

5.2. Efecto del SfMNPV y azadiractina sobre el peso y tiempo de desarrollo larvario de *S. frugiperda*

Las larvas de *S. frugiperda* tratadas con el SfMNPV y azadiractina solos y en mezclas presentaron una disminución significativa y progresiva del peso medio comparado con el testigo (Tabla 8). Para el tratamiento con el SfMNPV solo (T₃), las larvas mostraron una disminución del peso medio en un rango de 23,48 a 40,54% a partir del cuarto día de la aplicación del tratamiento (Tabla 8). Los tratamientos T₁ y T₂, provocaron los menores promedios de pesos de larvas comparado con el testigo y el SfMNPV solo, en donde las diferencias significativas se observaron desde las 24 h de inicio del bioensayo. Para las concentraciones de 13,3 y 26,42 mg de i.a./L, las larvas mostraron una disminución del peso medio en un rango de 16,2 a 95,3% y 21,3 a 93,1% comparado con el testigo, respectivamente. Al comparar el SfMNPV solo con la azadiractina, las larvas mostraron una disminución del peso medio en un rango de 20,3 a 89% para 13,3 mg de i.a./L y 15,1 a 92,4% para 26,42 mg de i.a./L.

La disminución del peso corporal por efecto de los baculovirus y azadiractina ha sido previamente observada en larvas de lepidópteros (Adel y Sehnal, 2000; Zamora *et al.*, 2008; Senthil *et al.*, 2008). Los nucleopoliedrovirus llevan a cabo una infección transitoria en el intestino medio, sin producción inicial de OBs, para luego invadir la mayoría de los tejidos generándose una infección de tipo poliorganotrófica con formación de OBs (Federici, 1997), durante este lapso de tiempo las larvas pueden cambiar de comportamiento e incluso dejar de alimentarse, lo cual explicaría la declinación del peso larvario de *S. frugiperda* después de tres días de ingestión de la dieta contaminada. Recientemente, este efecto también ha sido observado por Senthil *et al.* (2008) en larvas de *H. armigera*, mismas que fueron alimentadas con hojas de algodón contaminadas con varias concentraciones de un nucleopoliedrovirus. En tal caso, el peso larvario se redujo significativamente en un rango de 12 a 30% comparado con el testigo y dicha respuesta fue directamente proporcional al incremento de la concentración. En el caso de la azadiractina, la reducción del crecimiento puede también ser dosis-dependiente o inversamente proporcional al estadio de las larvas (Arnason *et al.*, 1985, Koul e Isman, 1991); es decir, las larvas más jóvenes son más

susceptibles que las más desarrolladas (Koul 1985). Este efecto también depende del método de aplicación del insecticida, siendo mayor cuando las larvas lo ingieren, o cuando se suministra por inyección, que cuando se aplica tópicamente. Senthil *et al.* (2008) determinaron una reducción del peso de larvas de tercer estadio de *H. armigera* en un rango de 17 a 42%, cuando fueron alimentadas con hojas de algodón contaminadas con azadiractina un rango de concentraciones de 0,01 a 0,1 ppm.

La incorporación de azadiractina al formulado del SfMNPV provocó una reducción progresiva y significativa en la evolución del peso de las larvas de *S. frugiperda* con respecto al SfMNPV solo desde el primer día posterior a la aplicación del tratamiento (Tabla 8). En este caso, las larvas presentaron una disminución del peso medio en un rango de 17 a 93% para el T₄ y 24 a 95% para el T₅. La reducción del peso también se observó al comparar la azadiractina sola con las mezclas con el SfMNPV, este efecto fue sistemático desde el primer día posterior a la aplicación del tratamiento. En un estudio similar, Senthil *et al.* (2008) observaron que la mezcla de azadiractina con un nucleopoliedrovirus provocaron una disminución significativa del peso de larvas de tercer estadio de *H. armigera* de 54, 44 y 63% en comparación con el virus, azadiractina y el testigo, respectivamente. Lo cual indica que dicha mezcla puede afectar mayormente el desarrollo larvario comparado con los propios tratamientos de virus y azadiractina, este mismo efecto fue observado en el presente estudio. Se considera que una reducción del peso corporal podría tener implicaciones prácticas, ya que bajo ciertas circunstancias esto tendría influencia sobre la dinámica poblacional en campo y el control de gusano cogollero.

Otro resultado derivado de nuestro estudio fue que la aplicación del SfMNPV solo sobre la dieta del insecto, no afectó significativamente la duración del tiempo medio de los estadios analizados con comparación con el testigo (Tabla 9). En contraste, la aplicación de la azadiractina sola y azadiractina en interacción con el SfMNPV, provocó un aumento significativo de la duración del tiempo medio del cuarto y quinto estadio en comparación con el testigo y SfMNPV solo. En los tratamientos con azadiractina no se registraron larvas en el sexto estadio en los días correspondiente a la evaluación, esto debido al retraso en el proceso de muda

ocasionado por este insecticida (Tabla 9). Adel y Sehnal (2000) señalaron que el efecto de azadiractina sobre el desarrollo del insecto puede ser debido a que este actúa directamente sobre los centros que controlan la alimentación y metabolismo. Similar a nuestro estudio, las larvas de *S. littoralis* alimentadas con dieta contaminada con azadiractina sufrieron un incremento significativo del estado larval, lo cual fue atribuido a un retraso en el desprendimiento de las mudas (Adel y Sehnal, 2000). Desde el punto de vista práctico, éste es un efecto aparentemente no deseado ya que un incremento en el desarrollo larval podría incrementar su tiempo de permanencia en el campo; sin embargo, otros estudio han confirmado que las larvas sobrevivientes a un tratamiento por azadiractina pueden morir en estados más avanzados de desarrollo, lo cual ayudaría reducir la población del insecto.

Tabla 8. Efecto del SfMNPV y azadiractina sobre el peso (mg \pm EE) de larvas de *S. frugiperda*.

Tratamiento	Días posteriores al tratamiento							
	0 ^a	1 ^b	2 ^c	3 ^d	4 ^e	5 ^f	6 ^g	7 ^h
Testigo	1,75 \pm 0,04a	6,3 \pm 0,15a	11,56 \pm 0,32a	29,63 \pm 0,83a	50,04 \pm 1,11a	104,59 \pm 3,09a	180,73 \pm 2,61a	248,09 \pm 6,52a
SfMNPV (OBs/mm ²) 430	2,12 \pm 0,05e	6,22 \pm 0,13a	10,48 \pm 0,26a	28,28 \pm 0,86a	38,29 \pm 1,29b	64,82 \pm 3,29b	107,45 \pm 5,16b	153,42 \pm 9,13b
Azadiractina (mg de i.a./L)								
13,3	1,75 \pm 0,04de	4,96 \pm 0,09bc	7,64 \pm 0,12b	8,78 \pm 0,30b	13,97 \pm 0,43c	16,45 \pm 0,50c	16,26 \pm 0,56c	17,08 \pm 0,74c
26,42	2,04 \pm 0,04ab	5,28 \pm 0,11b	7,04 \pm 0,13b	7,20 \pm 0,20c	9,89 \pm 0,36d	11,79 \pm 0,36d	11,86 \pm 0,35d	11,64 \pm 0,44d
SfMNPV(OBs/mm ²) + azadiractina (mg de i.a./L)								
430 + 13,33	1,86 \pm 0,04bc	5,17 \pm 0,09bc	6,40 \pm 0,13c	7,03 \pm 0,22c	10,04 \pm 0,39d	11,68 \pm 0,38d	10,80 \pm 0,44de	10,75 \pm 0,72d
430 + 26,42	1,92 \pm 0,04cd	4,70 \pm 0,11c	6,52 \pm 0,12c	6,67 \pm 0,20c	9,83 \pm 0,44d	9,90 \pm 0,47e	9,14 \pm 0,58e	7,92 \pm 0,84e

Valores entre columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, $P = 0.05$; ^a Separación de valores LSD; ^{b, c, d, e, f, g, h} Kruskal-Wallis, $P = 0.05$).

^a $F = 13,23$, $gl = 5$, 831 , $P \leq 0,001$; ^b $K = 122,47$, $P < 0,001$; ^c $K = 363,67$, $P < 0,001$; ^d $K = 530,12$, $P < 0,001$; ^e $K = 512,44$, $P = 0,0$; ^f $K = 501,32$, $P < 0,001$; ^g $K = 434,26$, $P < 0,001$; ^h $K = 350,22$; $P < 0,001$

Tabla 9. Efecto de SfMNPV, azadiractina y su interacción sobre el tiempo medio de desarrollo de larvas de *S. frugiperda*.

Tratamiento	Tiempo medio de desarrollo \pm EE (días)		
	4° estadio ^a	5° estadio ^b	6° estadio ^c
Testigo	2,42 \pm 0,04a	2,05 \pm 0,02 a	2,34 \pm 0,04a
SfMNPV (OBs/mm ²) 430	2,47 \pm 0,04a	2,52 \pm 0,07a	2,56 \pm 0,12a
Azadiractina (mg i.a./L)			
13,3	2,72 \pm 0,05b	3,61 \pm 0,08b	-
26,42	3,16 \pm 0,05b	3,36 \pm 0,09c	-
SfMNPV(OBs/mm ²) + azadiractina (mg de i.a /L)			
430 + 13,33	2,90 \pm 0,04b	3,32 \pm 0,08c	-
430 + 26,42	3,12 \pm 0,05b	4,0 \pm 0,58bc	-

Valores entre columnas seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (ANOVA, $P = 0,05$; ^c Separación de valores LSD; ^{a, b}Kruskall-Wallis, $P = 0,05$; ^c Mann-Whitney U, $P = 0,05$). ^a $K = 180,44$, $P \leq 0,001$; ^b $K = 238,78$, $P \leq 0,001$; ^c $U = 917$, $gl = 1$; $P = 0,087$.

5.3. Producción de cuerpos de inclusión (OBs)

La incorporación de azadiractina al inoculo viral a una concentración de 13,33 y 26,42 mg i.a./L, redujo significativamente el número medio de OBs por miligramo de larva ($10,6 \times 10^7$ OBs/mg y $15,3 \times 10^7$ OBs/mg, respectivamente) comparado con el SfMNPV solo ($26,9 \times 10^7$ OBs/mg); sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambas concentraciones de azadiractina (Figura 11). De acuerdo con varios estudios, existe una relación constante entre peso del huésped al momento de la muerte y la producción de OBs (Bilimoria, 1991; Hunter-Fujita *et al.*, 1998), por lo tanto, la reducción de OBs/mg puede ser atribuida a la reducción de peso de las larvas tratadas con azadiractina.

El hecho de que azadiractina minimice la producción de OBs puede tener varias implicaciones prácticas; primero, el insecticida no podría ser considerado en la producción masiva del virus *in vivo*, segundo, el insecticida podría teóricamente afectar a los programas de manejo integrado de plagas basados en estrategias de inoculación y que tengan el objetivo de transmitir la enfermedad en sucesivas generaciones. No obstante, este tipo de estrategias son poco comunes siendo la

inundación masiva y en altas dosis la que normalmente se utiliza para lograr un control del insecto plaga; en este tipo de aplicaciones el virus podría no ser afectado por el uso de azadiractina (Murillo *et al.*, 2003). Por otro lado, de acuerdo a lo observado en el presente y otros estudios la presencia de bajas dosis de azadiractina en los formulados de baculovirus, podría reducir la cantidad de inóculo necesario para causar un efecto letal.

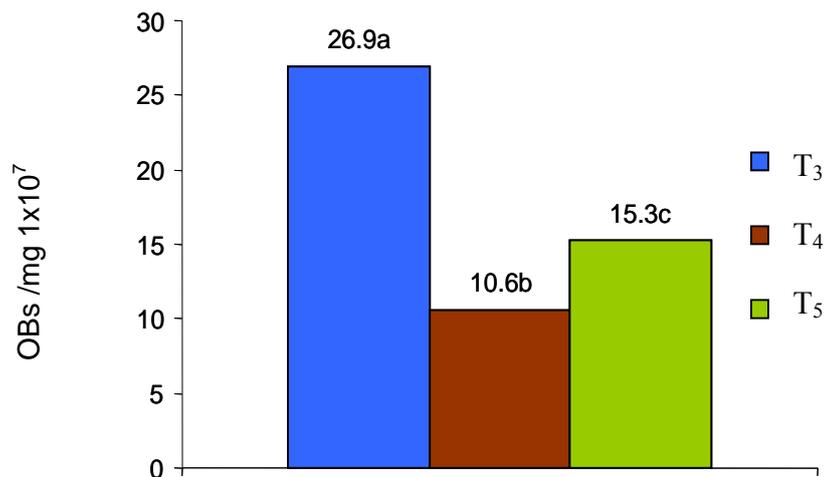


Figura 11. Producción media de OBs/mg para larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* inoculadas con el SfMNPV solo y en mezclas con dos concentraciones de azadiractina (AZA). Columnas con la misma letra no son estadísticamente diferentes (prueba de Mann-Whitney, $P > 0,05$).

6. CONCLUSIONES

» Los resultados de este estudio demuestran que la incorporación de azadiractina al formulado de SfMNPV, aumenta significativamente la mortalidad de las larvas de *S. frugiperda*, disminuye el peso de los insectos tratados y acelera el tiempo de muerte. Debido a esto se puede concluir que el uso de azadiractina en formulaciones de este baculovirus, podría mejorar la eficiencia de este producto en campo.

» La aplicación de la azadiractina sola y en interacción con el SfMNPV, provocó un aumento significativo de la duración del tiempo medio del cuarto y quinto estadio de *S. frugiperda*. En relación al manejo del insecto en campo, este efecto podría ser no deseado al incrementar su periodo de vida. Sin embargo, es altamente probable que la esperanza de vida los insectos sobrevivientes al tratamiento se disminuya substancialmente. Este resultado abre una ventana para continuar investigando sobre la razón de dicho efecto y su impacto sobre la dinámica del insecto en campo.

» En la agricultura moderna, los baculovirus son considerados como agentes de control muy competitivos debido a sus propiedades como bioinsecticidas, por lo tanto, evaluar un compuesto como la azadiractina que aumente y mejore esta actividad, ayuda a aumentar el conocimiento y las posibilidades de desarrollar formulaciones insecticidas biorracionales y con una alta capacidad controladora.

7. RECOMENDACIONES

» En el presente estudio, la incorporación de azadiractina en el formulado de baculovirus provocó una disminución en la producción de OBs, no obstante, se recomienda evaluar concentraciones más bajas del insecticida botánico con el fin de minimizar la reducción de peso en las larvas de *S. frugiperda* y, por ende, una disminución en la producción de OBs.

» Hasta nuestro conocimiento, éste es el primer registro que se tiene sobre el efecto de azadiractina sobre la producción de OBs, por lo tanto se recomienda corroborar dicho efecto con el uso de otros tratamientos; por ejemplo, incrementar la cantidad de inóculo inicial para provocar una mortalidad del 90% con el virus solo, de tal manera que la mortalidad final sea equiparable con la mortalidad del efecto sinérgico del virus con el insecticida botánico.

8. LITERATURA CITADA

- Adel, M.; Sehnal, F. 2002. **Azadirachtin potentiates the action of ecdysteroid agonist RH-2485 in *Spodoptera littoralis***. Journal of insect Physiology, (46): 267-274.
- Andreu, J.; Sans, A.; Riba, M. 2000. **Antifeedant activity of fruit and seed extracts of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides***. Phytoparasitica, (28): 311-319.
- Arnason, T.; Philogene, B.; Donskov, N.; Hudon, M.; McDougall, C.; Fortier, G.; Morand, P.; Gardner, D.; Lambert, J.; Morris, C.; Nozzolillo, C. 1985. **Antifeedant and insecticidal properties of azadirachtin to the European corn borer, *Ostrinia nubilalis***. Entomologia Experimentalis et Applicata, (38): 29-34.
- Badii, M.; Abreu, J. 2006. **Control biológico una forma sustentable de control de plagas**. Daena: International Journal of Good Conscience, 1(1): 82-89.
- Bahena, F. 2002. **El Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) (Meliaceae), insecticida vegetal para una agricultura sostenible en México**. En: Aragon G.; López, J.; Tornero, M. (Eds.). **Métodos para la generación de tecnología agrícola de punta**. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. 105-123 pp.
- Barreto, M.; Guimaraes, C.; Teixeira, F.; Paiva, E.; Valicente, F. 2005. **Effect of baculovirus *Spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD**. Neotropical Entomology, 34(1): 67-75.
- Bilimoria, S. 1991. **The biology of nuclear polyhedrosis viruses**. En: Kurstak, E. (Ed). **Viruses of Invertebrates**. Marcel Dekker, New York. 1-72 pp.

- Black, B.; Brennan, L.; Dierks, P.; Gard, I. 1998. **Commercialization of Baculoviral Insecticide**. En: Miller, L. (Ed). **The Baculoviruses. The Viruses**. Plenum Press. 447 p.
- Burges, H.; Jones, K. 1998. **Formulation of bacteria, viruses and protozoa to control insects**. En: Burges, H. (Ed). **Formulation of Microbial Biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes, and seed treatments**. Springer, Nueva York. 412 p. 33-128 pp.
- Caballero, P.; Williams, T. 2008. **Virus entomopatógenos**. En: Jacas, J.; Urbaneja, A. (Eds). **Control biológico de Plagas Agrícolas**. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Caballero, P.; López, M.; Williams, T. 2001. **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas**. Phytoma S.A., Valencia, España.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 2003. **Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de maíz**. Proyecto Manejo Integrado de Plagas, Programa de Mejoramiento de Cultivos Tropicales. CATIE.
- Chaparro, M. 2008. **Efecto de dos formulaciones en la fotoestabilidad y eficacia de un granulovirus para el control de *Tecia solanivora***. Trabajo de Grado para optar por el título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Chapman, J.; Williams, T.; Escribano, A.; Caballero, P.; Cave, R.; Goulson, D. 1999. **Fitness consequences of cannibalism in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda***. Behavioral Ecology, 10(3): 298-303.

- Cisneros, J.; Pérez, J.; Penagos, D.; Ruis, J.; Goulson, D.; Caballero, P.; Cave, R.; Williams, T. 2002. **Formulation of a Nucleopolyhedrovirus with Boric Acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize.** *Biological Control*, (23): 87-95.
- Cladas, J.; Hercos, F.; Martins, R.; Castro, J.; Andrade, P. 2008. **Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses.** *Journal of General Virology*, (89): 1202-1211.
- Clark, P.; Molina, J.; Martinelli, S.; Skoda, S.; Isenhour, J.; Lee, J.; Krumm, J.; Foster, J. 2007. **Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere.** *Journal of Insect Science*, (5): 1-10.
- Claus, J.; de Cap, A. 2001. **Producción masiva de baculovirus.** En: Caballero, P.; López, M.; Williams, T. (Eds). **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** Phytoma, España. 518 p. 260-312 pp.
- Cook, S.; Webb, R.; Thorpe, K. 1996. **Potential enhancement of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus with triterpen azadirachtin.** *Environmental Entomology*, (25): 1209-1214.
- Cory, J.; Mayers, J. 2003. **The ecology and evolution of insect baculoviruses.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, (34): 239-272.
- De Oliveira, N. 1991. **World survey: South America.** En: Hunter, F.; Entwistle, P.; Evans, H.; Crook, N. (Eds). **Insect viruses and pest management.** Wiley, Chichester, UK. 235-239 pp.

- Devisetty, B.; Wang, Y.; Sudershan, P.; Kirkpatrick, B.; Cibulsky, R.; Birkhold, D. 1998. **Formulation and delivery systems for enhanced and extended activity of biopesticides.** En: Nalewaja, J.; Goss, G.; Tann, R. (Eds). **Pesticide Formulations and Applications Systems.** ASTM International. Vol. 8. 344 p.
- Ecale, C.; Ko, R.; Maeda, S. 1998. **Polyhedron-like Inclusion Body Formation by a Mutant Nucleopolyhedrovirus Expressing the Granulin Gene from a Granulovirus.** *Virology*, (240): 282-294.
- Escribano, A.; Williams, T.; Goulson, D.; Cave, R.; Chapman, J.; Caballero, P. 1999. **Selection of a Nucleopolyhedrovirus for Control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, Genetic, and Biological Comparison of Four Isolates from the Americas.** *Journal of Economic Entomology*, 92(5): 1079-1085.
- Evans, H.; Entwistle, P. 1987. **Viral diseases.** En: Fuxa, J.; Tanada, Y. (Eds.) **Epizootiology of insect diseases.** John Wiley & Sons, Toronto. pp. 257-322.
- Federeci, B. 1986. **Ultrastructure of baculovirus.** En: Granados, R.; Federici, B. (Eds.). **The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology.** Vol 1. Academic Press, San Diego. 61-88 pp.
- Federici, B. 1997. **Baculovirus pathogenesis.** En: Miller, L. (Ed). **The Baculoviruses.** Plenum Press, New York 33-59 pp.
- Fernández, J. 2002. **Estimación de umbrales económicos para *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo del maíz.** *Investigación agraria. Producción y Protección Vegetales*, 17 (3): 467-474.

- Ferrer, F. 2001. **Biological control of agricultural insect pests in Venezuela; advances, achievements, and future perspectives.** Biocontrol, 22(3): 67N-74N.
- Garden, W.; Fuxa, J. 1980. **Pathogens for suppression of the fall armyworm.** Florida Entomologist, (63): 439-447.
- Gioria, V.; Beccaría, A.; Claus, J. 2006. **Crecimiento, metabolismo y producción de baculovirus en cultivos en suspensión de una línea celular del insecto lepidóptero *Anticarsia gemmatalis*.** Revista Química Viva, (1): 27-45.
- Goulson, D.; Derwent, L.; Penagos, D.; Williams, T. 2003. **Effects of optical brighteners included in biopesticide formulations on the growth of crops.** Agriculture, Ecosystems and Environment, (95): 235-240.
- Goulson, D.; Martínez A.; Hughes, W.; Williams, T. 2000. **Effects of optical brighteners used in biopesticide formulations on the behavior of pollinators.** Biological Control, (19): 232-236.
- Guan, L.; Bottrell, D. 1994. **Neem pesticides in rice: potencial and limitations.** IRRI, International Rice Research Institute. Filipinas. 68 p.
- Gupta, R.; Raina, J.; Monobrullah, M. 2007. **Optimization of *in vivo* production of nucleopolyhedrovirus in homologus host larvae of *Helicoverpa armigera*.** Journal of Entomology, (4): 279-288.
- Hamm, J.; Young, J. 1971. **Value of virus presilk treatment for corn earworm and fall armyworm in sweet corn.** Journal of Economic Entomology. pp. 144-146.

- Hunter-Fujita, F.; Entwistle, P.; Evans, H.; Crook, N. 1998. **Insect viruses and pest management**. Wiley, Chichester, UK.
- Iannacone, J.; Lamas, G. 2003. **Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú**. Entomotropica (18): 95-105.
- Ibarra, J.; Del Rincón, Ma.C.; Galindo, E.; Patiño, M.; Serrano, L.; García, R.; Carrillo, J.; Pereyra, B.; Alcázar, A.; Luna, H.; Galán, W.; Pardo, L.; Muñoz, C.; Gómez, I.; Soberón, M.; Bravo, A. **Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos**. Revista Latinoamericana de Microbiología. 48(2): 113-120.
- Inceoglu, A.; Kamita, S.; Hinton, A.; Huang, Q.; Severson, T.; Kang, K.; Hammock, B. 2001. **Recombinant baculoviruses for insect control**. Pest Management Science, (57): 981-987.
- Isman, M. 1999. **Neem and related natural products**. En: Hall, F.; Menn, J. (Eds). **Biopesticides use and Delivery**. Humana Press. New Jersey. pp. 139-153.
- Isman, M.; Akhtar, Y. 2007. **Plant Natural products as a Source for Developing environmentally Acceptable Insecticides**. En: Ishaaya, I.; Nauen, R.; Horowitz, A. (Eds.). **Insecticides Design Using Advanced Technologies**. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. pp. 235-248.
- Jacas, J.; Urbaneja, A. 2008. **Control biológico de plagas agrícolas**. Phytoma, España, S.L.

- Kirkipatrick, B.; Washburn, J.; Engelhard, E.; Volkman, L. 1994. **Primary infection of insect trachea by *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus**. *Virology*. 203: 184-186.
- Koppenhöfer, A. 2007. **Synergy with Microorganisms**. En: Pimentel, D. (Ed). **Encyclopedia of Pest Management**. CRC Press. Vol. 2. 784 p.
- Koul, O. 1985. **Azadirachtin interference with development of *Spodoptera litura* Fab**. *Indian Journal of Experimental Biology* (23): 160-163.
- Koul, O.; Dhaliwal, G. 2002. **Microbial Biopesticides**. En: Barret, J.; Primavera, M.; Retnakaran, A.; Arif, B.; Reddy, S. (Eds.). **Aspects of Nucleopolyhedrovirus Pathogenesis in Lepidoptera Larvae**. CRC Press. 340 p.
- Koul, O.; Isman, M.. 1991. **Effects of azadirachtin on the dietary utilization and development of the variegated cutworm *Peridroma saucia***. *Journal of insect Physiology* (37): 591-598.
- Kubo, I.; Klocke, J. 1982. **Azadirachtin, Insect ecdysis inhibitor**. *Agricultural Biology and Chemistry*, 46(7): 1951-1953.
- Lasa, R.; Caballero, P.; Williams, T. 2003. **La eficiencia de una formulación fagoestimulante del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) depende de la dieta precedente del insecto**. III Congreso Nacional de Entomología Aplicada. IX Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Entomología Aplicada. Octubre, 2003.
- Lasa, R.; Williams, T.; Caballero, P. 2007. **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.

Lasa, R.; Williams, 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.

Lecuona, R. 2002. **Situación Actual y Perspectivas de uso de Bioplaguicidas en Latinoamérica.** Conferencia ofrecida y publicada en el Manual del Curso Internacional de Producción y uso de Agentes Microbianos para el Control de Plagas en Agricultura Ecológica. CATIE y GTZ. Turrialba, Costa Rica. pp. 9-16.

Lery, X.; Fediere, G. 1990. **A new serum-free medium for lepidopteran cell cultura.** Journal of invertebrate pathology, 55(3): 342-349.

López-Ferber, M.; Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P. 2003. **Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 270: 2249-2255.

López, J.; Narváez, C.; Rizo, C. 2004. **Control biológico de insectos mediante virus entomopatógenos.** En: Carballo, M.; Guaharay, F. (Eds). **Control Biológico de Plagas Agrícolas** (1^a. Edición). CATIE, Managua, Nicaragua. 59-69 pp.

Marina, C.; Narváez, C. 2001. **Uso y Producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear en Nicaragua.** Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica), (61): 90-96.

- Martínez, A.; Goulson, D.; Chapman, J.; Caballero, P.; Dave, R.; Williams, T. 2000. **Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus insecticide for resource-poor maize farmers in Mesoamerica.** *Biological Control*. 17: 174-181.
- Martínez, A.; Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P. 2003. **Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Entomological Experimentalist et Applicata*. 109: 139-146.
- Martínez, A. 2003. **Lethal and sublethal interactions between optical brighteners and nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae).** Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra; Pamplona, España.
- Méndez, W.; Valle, J.; Ibarra, J.; Cisneros, J.; Penagos, D.; Williams, T. 2002. **Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize.** *Biological Control* (25): 195-206.
- Miller, L. 1997. **The Baculoviruses.** En: Federici, B (Ed.). **Baculovirus Pathogenesis.** Plenum Publiser Corporation. Springer, New York, 1997. 447 p.
- Molina N.; Jiménez R. 2007. **Ultraestructura de *Baculovirus dione* de larvas de *Dione juno andicola* (Bates, 1864) (Lepidoptera) en Ecuador.** *Revista Nicaragüense de Entomología*, (67):7-16.
- Molina, J.; Carpenter, J.; Lezama, R.; Foster, J.; González, M.; Angel, C.; Farías, J. 2004. **Natural distribution of hymenopteran parasitoids of *spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in mexico.** *Florida Entomologist*, 87(4): 461-472.

- Monsma, S.; Oomens, A.; Blissard, G. 1996. **The GP64 Envelope Fusion Protein Is an Essential Baculovirus Protein Required for Cell-to-Cell transmission of Infection.** *Journal of Virology*, 10(7): 4607–4616.
- Morales, L.; Moscardi, F.; Sosa, D.; Paro, F.; Soldorio, I. 1997. **Enhanced activity of *Anticarsia gemmatalis* Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) Nuclear Polyhedrosis Virus by Boric Acid in the Laboratory.** *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(1): 115-120.
- Moscardi, F. 1999. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera.** *Annual Review of Entomology* (44): 257-289.
- Moscardi, F. 2007. **A nucleopolyhedrovirus for control of velvetbean caterpillar in Brazilian soybeans.** En: Vincent, C.; Goettel, M.; Lazarovits, G. 2007. (Eds). **Biological Control. A global perspective.** Cabi. 344-352 pp.
- Moscardi, F.; Leite, L.; Zamataro, C. 1997. **Production of Nuclear Polyhedrosis Virus of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of virus dosage, host density and age.** *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 26(1): 121-132.
- Mullock, B.; Swezey, S.; Narvaez, C.; Castillo, P.; Rizo, C. 1990. **Development of baculoviruses as a contribution to biological control of lepidopterous pest of basic grains in Nicaragua.** *Proceedings XXIII. Society of Invertebrate Pathology.* Adelaide, Australia, 20-24 Agosto 1990, pp. 179-187.
- Muñoz, D.; P. Caballero. 2001. **Diversidad natural de los baculovirus.** En: Caballero, P.; López, M.; Williams, T. (ed.), **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** Phytoma S. A., Valencia, España. 313-372 pp.

- Murillo, R.; Lasa, R.; Goulson, D.; Williams, T.; Muñoz, D.; Caballero, P. 2003. **Effect of Tinopal LPW on the insecticidal properties y genetic stability of the nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae).** Journal of Economic Entomology. (96): 1668–1674.
- Murillo, R.; Lipa, J.; Muñoz, D.; Amate, J.; Barranco, P.; Cabello, T.; Caballero, P. 2000. **Caracterización bioquímica de un nucleopoliedrovirus de *Chrysodeixis chalcites* autóctono de España.** Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, (26): 637-644.
- Murphy, F.; Fauquet, C.; Bishop, D.; Ghabrial, S.; Jarvis, A.; Martelli, G.; Mayo, M.; Summers, D. 1995. **Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses.** En: **Sixth Report of International Committee on Taxonomy of viruses.** Springer-Verlag, Viena, Austria. 194-113 pp.
- Murúa, G.; Molina, J.; Coviella, C. 2006. **Population dynamics of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and its parasitoids in northwestern Argentina.** Florida Entomologist, 89(2): 175-182.
- Murúa, M.; Virla, E. 2004. **Presencia Invernal de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Nocturidae) en el Área Maicera de la Provicnai de Tucumán, Argentina.** Revista de la Facultad de Agronomía, 105 (2): 46-52.
- Murúa, M.; Virla, E.; Defagó, V. 2003. **Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides.** Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas, (29): 43-51.

- Mutsuhashi, J. 2002. **Invertebrate tissue culture methods**. Springe, Nueva York. 446 p. 15-24 pp.
- Ojeda, Z.; Rocha, P.; Calvache, H. 2002. **Baculovirus como insecticida biológicos**. Palmas, 23(4): 27-37.
- Pérez, E. 1993. **Control Biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith en Maíz**. Departamento de Manejo de Plagas, INISAV. La Habana, Cuba. Disponible en: <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/SPODOPTE.htm>. Consultado el: 27/Enero/2009.
- Pérez, F.; Montesdeoca, M.; Ertévez, J.; Carnero, A. 2003. **Una plaga potencial en los cultivos de Canarias: *Spodoptera exigua* (Lepidoptera, Noctuidae)**. Disponible en: <http://www.grancanaria.com/cabgc/granja/pdfs/2003/03.pdf>. Consultado el: 27/Enero/2009.
- Pineda, S. 2008. **Interacción de un baculovirus con compuestos de bajo impacto ambiental para el control de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Pineda, S.; Sánchez, R.; Figueroa, J.; Zamora, N.; Martínez, A. 2008. **Interacción de un Nucleopoliedrovirus con Azadiractina en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. En el XLIII Congreso Nacional de Entomología. León, Guanajuato, México, del 22 al 25 de Junio de 2008. 509-513. ISBN 968-839-357-6.
- Raguraman, S.; Ganapathy, N.; Venkatesan, T. 2004. **Neem versus entomopathogens and natural enemies of crop pests: the potential**

impact and strategies. En: Koul, O.; Wahab, S. (Eds). **Neem: today and in the New Millennium.** Kluwer Academic Publishers, Holanda. 276 p.

Ramos, C.; González, V.; Soto, M.; Engleman, E.; Rodríguez, D. 2004. **Variación en contenido de azadiractina en frutos de margosa durante su desarrollo.** Revista Fitotecnia Mexicana, 27(1): 81–85.

Richards, A.; Christian, P. 1999. **A rapid bioassay screen for quantifying nucleopolyhedroviruses (Baculoviridae) in the environment.** Journal of Virological Methods, 82(1): 63-75.

Rohrmann, G. 1992. **Baculovirus structural proteins.** Journal of General Virology, (73): 749-761.

Rohrmann, G. 2008. **Baculovirus Molecular Biology.** En: (MD): National Library of Medicine (US). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>. Consultado el: 23/06/2009.

Román, D. 1998. **Bioensayos de campo y análisis económico de la producción del virus de la poliedrosis nuclear *Spodoptera frugiperda*.** Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura. Zamorano, Honduras. 89 p.

Santos, L.; Redaelli, L.; Diefenbach, L.; Efrom, C. 2003. **Larval and pupal stage of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in sweet and field corn genotypes.** Brazilian Journal of Biology, 63(4): 627-633.

- Schmutterer, H. 1995. **The Neem Tree: Sources of unique natural products for integrated pest management, and medicinal, industrial and other purposes.** VCH, Weinheim, Germany. 691 p.
- Secretaría de Planificación Sectorial Agropecuaria. 2009. **Boletín estadístico agropecuario No. 19.** San José, Costa Rica.
- Senthil, C.; Sathiah, N.; Rabindra, R. 2005. **Optimizing the time of harvest of nucleopolyhedrovirus infected *Spodoptera litura* (Fabricius) larvae under *in vivo* production systems.** Current Science, 88(10): 1682-1683.
- Senthil, K.; Murugan, K.; Zhang W. 2007. **Additive interaction of *Helicoverpa armigera* Nucleopolyhedrovirus and Azadirachtin.** Biological Control, (53): 869-880.
- Senthil, S.; Kalaivani, K. 2006. **Combined effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus (SpltNPV) on *Spodoptera litura* Frabricius (Lepidoptera: Noctuidae) larvae.** Biological Control, 39(1): 96-104.
- Senthil, S.; Kalaivani, K.; Gene, P. 2005. **The effects of azadirachtin and nucleopolyhedrovirus on midgut enzymatic profile of *Spodoptera litura* Fab. (Lepidoptera: Noctuidae).** Pesticide Biochemistry and Physiology, 83(1): 46-57.
- Senthil, S.; Murugan, K.; Zhang, W. 2008. **Additive interaction of *Helicoverpa armigera* nucleopolyderovirus and azadirachtin.** Biological Control, (53): 869-880.
- Servicio Fitosanitario del Estado. 2009. **Insumosys.** Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. Disponible en: <http://www.protecnet.go.cr/insumosys/Principal.htm>. Consultado el: 17/07/09.

- Shapiro, D.; Fuxa, J.; Braymer, H.; Pashley, D. 1991. **DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Invertebrate Pathology, 58(1): 96-105.
- Shapiro, M.; Robertson, J.; Webb, R. 1994. **Effect of neem seed extract upon the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and its nuclear polyhedrosis virus.** Journal of Economic Entomology, (87): 356-360.
- Simón, O.; Chevenet, F.; Williams, T.; Caballero, P.; López, M. 2004b. **Physical and partial genetic map of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) genome.** Virus Genes, 30(3): 403-417.
- Simón, O.; Gutiérrez, S.; Williams, T.; Caballero, P.; López, M. 2005a. **Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the pif gene of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV).** Virus Research, (108): 213-220.
- Simón, O.; Williams, T.; Asencio, A.; Ros, S.; Gaya, A.; Caballero, P.; Possee, R. 2008. **Sf29 Gene of *Spodoptera frugiperda* Multiple Nucleopolyhedrovirus Is a Viral Factor That Determines the Number of Virions in Occlusion Bodies.** Journal of Virology, 82(16): 7897-7904.
- Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P.; López, M. 2006. **Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population.** Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, (273): 783 - 790.
- Simón, O.; Williams, T.; López, M.; Caballero, P. 2004a. **Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes.** Applied and Environmental Microbiology, 70(9): 5579-5588.

- Simón, O.; Williams, T.; López, M.; Caballero, P. 2004. **Virus entry or the primary infection cycle are not the principal determinants of host specificity of *Spodoptera* spp. Nucleopolyhedroviruses.** Journal of General Virology, (85): 2845–2855.
- Simón, O.; Williams, T.; López, M.; Caballero, P. 2005b. **Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population.** Applied and Environmental Microbiology, 71(8): 4254-4262.
- Siocco de Cap, A. 2001. **Biología y patología de los baculovirus.** En: Caballero, P.; López, M.; Williams, T. (Eds.). **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** Phytoma. S.A., Valencia, España. 48-65 pp.
- Sotelo, B.; Zelaya, V. 2004. **Evaluación de la eficacia de 5 bioplaguicidas sobre poblaciones de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith) y su efecto sobre el crecimiento y rendimiento en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.).** Trabajo de diploma. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Programa de Recursos genéticos. Managua, Nicaragua.
- Szeweczyk, B.; Hoyos, L.; Paluszek, M.; Skrzecz, I.; Lobo de Souza, M. 2006. **Baculoviruses. Re-emerging biopesticides.** Biotechnology Advances, (24): 143-160
- Tanada, Y.; Kaya, H. **Insect pathology.** Academic Press, San Diego, CA.
- Van Huis, A. 1981. **Integrated pest management in the small farmer's maize crop in Nicaragua.** Meded. Landbou. Wageningen. 221 p. 6-81 pp.

- Vásquez, J.; Zeddám, J.; Tresierra, A. 2002. **Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfVPN, en Iquitos-Perú.** Folia Amazónica, 13(1-2): 25-39.
- Vega, Y. 2007. **Evaluación y selección de auxiliares de formulación para la fotoestabilización de la levadura biocontroladora *Pichia onychis* frente a la radiación ultravioleta.** Trabajo de Grado para optar por el título de Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Villamizar, L.; Martínez, F. 2008. **Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100®.** Vitae (Medellín), 15(1): 123-131.
- Williams, T. 2002. **Diseño y aplicación de los bioinsecticidas basados en baculovirus.** 13º Simposio Internacional. **Control biológico de plagas y enfermedades: agentes microbianos y entomófagos.** Phytoma, España. No 144. Diciembre, 2002.
- Williams, T. 2009. **Distribución y abundancia de las poblaciones de los baculovirus en el suelo.** Disponible en: http://www.trevorwilliams.info/Baculovirus_en_suelo_es.htm. Consultado el: 15/Junio/2009.
- Williams, T.; J. Cisneros. 2001. **Formulación y aplicación de los baculovirus bioinsecticidas.** En: Caballero, P.; López, M.; Williams, T. (Eds.). **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** Phytoma. S. A., Valencia, España. pp. 313-372.
- Williams, T.; Goulson, D.; Caballero, P.; Cisneros, J.; Martínez, A.; Chapman, J.; Roman, D.; Cave, R. 1999. **Evaluation of a Baculovirus Bioinsecticide**

for Small-Scale Maize Growers in Latin America. *Biological Control*, (14): 67–75.

Woo, S.; Ahn, J. 2006. **Influence of polyhedrin and host cell on the polyhedra morphology of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus.** *Applied Entomology and Zoology*, 41(3): 435–443.

Zamora, M.; Martínez, A.; Nieto, M.; Schneider, M.; Figueroa, J.; Pineda, S. 2008. **Actividad biológica de algunos insecticidas biorracionales contra el gusano cogollero.** *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31(4): 351-357.

Zenner, I.; Arévalo, H.; Mejía, R. 2007. **The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and some transgenic plants.** *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 1(1): 103-113.

Ziemnicka, J. 2007. **Mass production of nucleopolyhedrovirus of the satin moth *Leucoma salicis* (LesanPV).** *Journal of Plant Protection Research*, 47(4): 457-467.

9. ANEXOS

Anexo 1. Elaboración de la dieta artificial para *S. frugiperda*.

INGREDIENTES	(GRAMOS POR LITRO)
Agua destilada	759.5 ml
Agar	10 g
Sémola de maíz	128.4 g
Germen de trigo	32.1 g
Levadura de cerveza	34.3 g
Acido benzoico	1.3 g
Acido ascórbico	4.5 g
Aldehido fórmico	0.3 g
Nipagin	1.1 g

PROCEDIMIENTO

- 1) Mezclar la sémola de maíz, germen de trigo, levadura y agar en una cantidad de agua destilada que permita una mezcla homogénea ($\approx \frac{3}{4}$ partes de la cantidad total de agua) (mezcla A).
- 2) Mezclar el Nipagin y ácido benzoico (mezcla B) en una cantidad mínima de agua, ésta se adicionará a la mezcla A.
- 3) Colocar la mezcla A + B en la autoclave y esterilizar a 15 libras de presión durante 15 min. Después del proceso de esterilización batir vigorosamente.
- 4) Agregar el ácido ascórbico a la mezcla A + B una vez que la temperatura haya bajado a 55°C. Añadir el formaldehído, mezclar y verter.
- 5) Dejar enfriar la dieta al menos 4 h y después mantenerla a 4°C.

Anexo 2. Técnica de purificación del SfMNPV mediante un gradiente de sacarosa (Muñoz *et al.*, 2001).

1. Macerar la muestra utilizando 500 µl de SDS al 0,1%.
2. Filtrar la muestra utilizando una tela de muselina.
3. Centrifugar a 800 rpm/5 minutos.
4. Guardar el sobrenadante.
5. Suspender la pastilla en 500 µl de SDS al 0,1% y homogenizar.
6. Centrifugar a 800 rpm/5 minutos.
7. Guardar el sobrenadante.
8. Mezclar los sobrenadantes de los pasos 4 y 7.
9. Centrifugar a 5000 rpm/10 minutos.
10. Descartar el sobrenadante.
11. Resuspender la pastilla en 200 µl de agua destilada estéril.
12. Colocar los 200 µl de suspensión viral en 500 µl de una concentración de sacarosa al 40% (Figura).
13. Centrifugar a 11000-12000 rpm/20 minutos.
14. Resuspender la pastilla en 500 µl de SDS al 0,1%.
15. Centrifugar a 5000 rpm/10 minutos.
16. Resuspender la pastilla en 1 ml de agua destilada estéril.
17. Centrifugar a 5000 rpm/10 minutos.
18. Resuspender la pastilla en 500 µl de agua destilada estéril.
19. Aforar hasta alcanzar un volumen de 1 ml de solución.
20. Almacenar a 4°C hasta su utilización.

