

**Efecto del Acido Bórico, Neem y Tinopal en
la dieta de *Spodoptera frugiperda* sobre la
Tasa de Infectividad por el Virus de la
Poliedrosis Nuclear**

Victoria Alejandra Cáceres Coello

Honduras

Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria

Diciembre, 2002

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Efecto del Ácido Bórico, Neem y Tinopal en la
dieta de *Spodoptera frugiperda* sobre la Tasa
de Infectividad por el Virus de la Poliedrosis
Nuclear**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniera Agrónoma en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Victoria Alejandra Cáceres Coello

Honduras

Diciembre, 2002

El autor concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Victoria Alejandra Cáceres Coello

Honduras

Diciembre, 2002

Efecto del Ácido Bórico, Neem y Tinopal en la dieta de *Spodoptera frugiperda* sobre la Tasa de Infectividad por el Virus de la Poliedrosis Nuclear

Presentado por

Victoria Alejandra Cáceres Coello

Aprobada:

Rogelio Trabanino, M.Sc.
Asesor Principal

Jorge Iván Restrepo, MBA.
Coordinador de la Carrera
Ciencia y Producción

Alfredo Rueda, Ph. D.
Asesor

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador Área Temática

Mario Contreras, Ph. D.
Director General

DEDICATORIA

A Dios y a María Auxiliadora porque siempre los he sentido conmigo en mi camino.

A mi madre Rina del Carmen por ser mi inspiración para seguir adelante y por el apoyo que me da en todas mis decisiones. A mi padre Rigoberto por apoyarme en mi carrera y a mis hermanos Fernando, José David y José Mario los tres tesoros más grandes que Dios me ha dado, por todo su cariño y dulzura.

A la memoria de mi segunda mamá Ligia Isabel (QEPD) parte de mi motivación para alcanzar mis metas.

A todas las personas que han formado parte de mi vida.

A la gente que despierta cada día con deseos de brindar una sonrisa o una palabra de esperanza a los demás.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mis hermanos por ser los mejores del mundo, por todo el amor, la ternura y el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida. A mi familia especialmente a mis abuelitas Blanca Argentina (QEPD) y Victoria a mis tíos Enrique, Gloria, Juan y Lorena, a mis primos Ronald, Carlos, Miguel Armando, Rina y Heidy por todas las cosas que han compartido conmigo.

Al Ing. Rogelio Trabanino por toda su confianza y sus exigencias y por el apoyo brindado para la realización de mi proyecto especial.

Al Dr. Alfredo Rueda por su disponibilidad y su tiempo en la elaboración de mi proyecto especial.

Al personal del edificio administrativo de la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria y del Laboratorio de Control Biológico, en especial a Silvia, Carolina, Ana, Doña María, Olga, Sonia, Rosa Ortega y Maximino por el apoyo que me brindaron en mis actividades de tesis.

A mis compañeros Ever y Luciano y a la Ing. Claudia Kuniyoshi y Marcos Michel por haber sido más que compañeros de trabajo, amigos y consejeros.

A mis amigas y compañeras: Karina, Siby, Wendy, Rose y Roxana por su compañía y apoyo en estos años de estudio.

A mis buenos amigos: Vera, Ligia, Rafa, Wilfredo, Milton, Mauricio, Nubia, Carlos R., René, Luis Rubén, Marlen, Diana y Grace por los momentos que hemos compartido.

A César Luis por todo el apoyo, el cariño y la comprensión brindada.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

A la Corporación Suiza para el Desarrollo (COSUDE) por el financiamiento brindado en mis tres primeros años de estudio.

A la Agencia Sueca de Desarrollo Internacional (ASDI) por financiar gran parte de mi cuarto año.

A mis padres por el soporte económico a lo largo de mi carrera.

RESUMEN

Cáceres, Victoria 2002. Efecto del Ácido Bórico, Neem y Tinopal en la dieta de *Spodoptera frugiperda* sobre la Tasa de Infectividad del Virus de la Poliedrosis Nuclear. Proyecto Especial del Programa de Ingeniero Agrónomo, El Zamorano, Honduras. 33p.

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*, es sin duda la plaga más importante del maíz y sorgo en Mesoamérica. Para reducir los daños ocasionados por esta plaga, los agricultores usan insecticidas organosintéticos para su control, que pueden ser costosos, no selectivos y causar daños ambientales. Para reducir estos problemas, buscamos soluciones que disminuyan los efectos negativos sobre el agroecosistema y de un menor costo, como el uso de las prácticas culturales y controladores biológicos, entre los que se encuentra el virus de la poliedrosis nuclear (VPN). El VPN no causa daño ambiental, ni afecta los enemigos naturales ya que es específico, pero es degradado fácilmente por las condiciones ambientales. Por ello el objetivo de este estudio fue evaluar en el laboratorio de control biológico de Zamorano, Honduras, el efecto del neem, ácido bórico y tinopal en la dieta de *Spodoptera frugiperda* sobre la tasa de infectividad por el VPN, midiendo dos factores; tiempo letal medio (TL₅₀) y larvas equivalentes (LE). Se realizaron dos experimentos, en el primero se evaluó el ácido bórico, neem y tinopal con y sin VPN ofrecidos en la dieta, en el inóculo y en ambos sin variar la concentración de ninguno; 0.101% de ácido bórico (p:p en dieta y p:v en inóculo), 0.1% de neem (v:p en dieta y v:v en inóculo) y 1% de tinopal (p:p en dieta y p:v en inóculo) con y sin VPN en larvas del tercer estadio. El ácido bórico con VPN en la dieta tuvo un TL₅₀ menor que el resto de los tratamientos y el tinopal con VPN en dieta disminuyó el número de larvas necesarias para obtener una larva equivalente. En el segundo experimento se evaluó el ácido bórico y tinopal al 1, 0.1 y 0.045% en la dieta (p:p) con VPN solos y mezclados, utilizándose la misma concentración de cada uno en la mezcla, en larvas del tercer y cuarto estadio. El ácido bórico solo y mezclado con tinopal al 1% en la dieta redujo el TL₅₀ en larvas del tercer y cuarto estadio (2.5 y 3.6 días respectivamente). El tinopal al 0.045% resultó ser el más efectivo en larvas del tercer estadio y el ácido bórico al 0.045% en larvas del cuarto estadio para reducir el número de larvas muertas necesaria para obtener una larva equivalente (3.32 y 3.47 larvas muertas/ LE respectivamente). El ácido bórico al 1% en dieta debe evaluarse en ensayos de campo para reducir el tiempo de muerte de la larva, ya que para producción de virus en el laboratorio no muestra respuestas satisfactorias como el tinopal, o puede utilizarse en el laboratorio para inocular larvas que pasan del tercer estadio. Se recomienda utilizar ácido bórico al 0.045% en la dieta para reducir el número de larvas necesarias para obtener una larva equivalente y así mejorar la producción de virus en el laboratorio.

Palabras clave: Aditivo, estadio, gusano cogollero, larvas equivalentes, tiempo letal medio, VPN.

NOTA DE PRENSA

Uso de aditivos que pueden mejorar la infectividad por el VPN en las dietas ofrecidas a *Spodoptera frugiperda*

En el laboratorio de control biológico de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano se produce un virus para controlar el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*), una de las plagas más importantes en el cultivo de maíz en Mesoamérica. Este virus conocido como virus de la poliedrosis nuclear (VPN) debe ser ingerido por la larva de *Spodoptera frugiperda* para que cause la muerte. Tiene la ventaja de que no afecta al hombre, no causa daños ambientales, no afecta a las plantas ni a otros insectos que muchas veces son enemigos naturales en el campo, sin embargo tiene el inconveniente de ser fácilmente degradado por condiciones ambientales y lento para matar a la plaga en comparación con insecticidas químicos. Los síntomas más comunes que presentan las larvas infectadas es que se vuelven letárgicas, dejan de alimentarse, se suben a las partes más altas de la planta en el campo y en el laboratorio se suben a la tapadera del recipiente que contiene la dieta y cuando mueren el integumento se observa blando, de color blanquecino o negro como una bolsa de líquido.

En la búsqueda de alternativas para superar los inconvenientes para reducir el tiempo de muerte de la larva y con el objetivo de aumentar la tasa de infectividad por el VPN para aumentar su producción en el laboratorio, se evaluaron los efectos de tres aditivos: 1) neem que interfiere en la síntesis de la hormona ecdisona (la hormona del crecimiento en los insectos) impidiendo su desarrollo, 2) ácido bórico que en estudios realizados se ha observado que reduce el tiempo de muerte de la larva 3) tinopal que mejora la infectividad y la producción de virus. Estos aditivos fueron evaluados en diferentes concentraciones mezclados en la dieta y en el inóculo de VPN en larvas del tercer y cuarto estadio, para evaluar la tasa de infectividad por el VPN, midiendo factores como tiempo letal medio (TL₅₀) y la cantidad de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente (LE) que contiene 6×10^9 cuerpos poliédricos de inclusión.

Se encontró que el ácido bórico al 1% en la dieta dio las mejores respuestas en reducir el TL₅₀ en larvas del tercer y cuarto estadio (2.52 y 3.62 días respectivamente), pero que incrementó la cantidad de larvas necesarias para obtener una larva equivalente (43.7 larvas del tercer estadio/ LE y 29.45 larvas del cuarto estadio/ LE), comparado con tinopal que necesitó 3.3 larvas cuando se utilizó 0.045% en la dieta y 3.98 larvas cuando se aplicó al 1% en la dieta en larvas del tercer estadio y 3.9 larvas cuando se aplicó 0.045% en la dieta y 4.5 larvas cuando se aplicó al 1% en la dieta en larvas del cuarto estadio. Con el neem se observaron resultados intermedios entre los obtenidos con ácido bórico y tinopal,

aunque se encontró que en la presencia de neem las larvas dejaron de comer y el tiempo necesario para pasar de un estadio a otro fue más largo que cuando no se utilizó aditivo o cuando se utilizó ácido bórico y tinopal.

El tinopal mejora la producción de VPN en el laboratorio puesto que se requieren menos larvas muertas para obtener una larva equivalente, pero su uso es factible solo si emplea a concentraciones mínimas por el costo que representa (L 333.00/500g en comparación con el ácido bórico que son L 20.00/ 500g).

El control del gusano cogollero por medio de agentes microbiales como el VPN es una opción viable, pero se deben hacer investigaciones para evaluar alternativas para mejorar la eficiencia en el uso de este producto, sin olvidar que es un producto biológico cuya finalidad es controlar plagas en los cultivos, sin causar daños ambientales

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de prensa.....	viii
	Contenido.....	x
	Índice de Cuadros.....	xii
	Índice de Figuras.....	xiii
	Índice de Anexos.....	xiv
1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	UTILIZACIÓN DE AGENTES MICROBIALES.....	3
2.2	VIRUS.....	3
2.3	LOS BACULOVIRUS.....	4
2.3.1	Modo de acción de los baculovirus.....	4
2.3.2	Síntomas que presentan los insectos infectados con VPN.....	4
2.3.3	Producción de VPN.....	5
2.4	ADITIVOS EVALUADOS.....	5
2.4.1	Neem.....	6
2.4.2	Tinopal.....	6
2.4.3	Acido bórico.....	7
2.5	DATOS GENERALES DE LA PLAGA.....	7
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1	UBICACIÓN.....	8
3.2	EXPERIMENTO I.....	8
3.2.1	Diseño experimental.....	10
3.3	EXPERIMENTO II:	10
3.3.1	Diseño experimental.....	11

3.4	VARIABLES MEDIDAS.....	12
3.4.1	Tiempo Letal Medio (TL ₅₀).....	12
3.4.2	Larvas Equivalentes (LE).....	12
3.4.3	Porcentaje de Larvas Muertas.....	12
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1	EXPERIMENTO I.....	13
4.1.1	Tiempo Letal Medio (TL ₅₀).....	13
4.1.2	Larvas Equivalentes (LE).....	14
4.1.3	Conclusiones.....	15
4.1.4	Recomendaciones.....	16
4.2	EXPERIMENTO II.....	16
4.2.1	Tiempo Letal Medio (TL ₅₀).....	17
4.2.2	Larvas Equivalentes (LE).....	18
4.2.3	Conclusiones.....	20
4.2.4	Recomendaciones.....	20
5.	CONCLUSIONES GENERALES	21
6.	RECOMENDACIONES GENERALES	22
7.	BIBLIOGRAFÍA	23
8.	ANEXOS	26

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Pag.
1.	Tratamientos donde se evaluaron tres aditivos en diferentes formas de aplicación en dietas artificiales ofrecidas a larvas de <i>S. frugiperda</i> . El Zamorano, Honduras, 2002.....	9
2.	Tratamientos donde se evaluaron tres concentraciones de ácido bórico y tinopal ofrecidos en la dieta solos y mezclados a larvas del tercer y cuarto estadio. El Zamorano, Honduras, 2002.....	11
3.	Porcentaje de larvas muertas obtenidas en el primer experimento. El Zamorano, Honduras, 2002.....	13
4.	Porcentaje de larvas muertas obtenidas en el segundo experimento. El Zamorano, Honduras, 2002.....	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pag.
1. Medias del TL ₅₀ en días para todos los aditivos en sus diferentes formas de aplicación. El Zamorano, Honduras, 2002.....	14
2. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente (LE) para todos los aditivos en sus diferentes formas de aplicación. El Zamorano, Honduras, 2002.....	15
3. Medias del TL ₅₀ en días para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del tercer estadio en tres diferentes concentraciones. El Zamorano, Honduras, 2002.....	17
4. Medias del TL ₅₀ en días para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del cuarto estadio en tres diferentes concentraciones. El Zamorano, Honduras, 2002.....	18
5. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente (LE) para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del tercer estadio en tres diferentes concentraciones. El Zamorano, Honduras, 2002.....	19
6. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente (LE) para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del cuarto estadio en tres diferentes concentraciones. El Zamorano, Honduras, 2002.....	19

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Pag.
1. Flujo de los procesos de producción de VPN en el laboratorio de control biológico.....	27
2. Ingredientes de la dieta especial para <i>Spodoptera frugiperda</i> utilizados por repetición.....	28
3. Medias del TL ₅₀ en días para todos los aditivos en sus diferentes formas de aplicación.....	28
4. Análisis de Varianza para TL ₅₀ para los aditivos evaluados en el experimento I en diferentes formas de aplicación.....	28
5. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una LE para todos los aditivos en sus diferentes formas de aplicación.....	29
6. Análisis de Varianza para LE para los aditivos evaluados en el experimento I en diferentes formas de aplicación.....	29
7. Medias del TL ₅₀ en días para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del tercer estadio en tres diferentes concentraciones.....	29
8. Medias del TL ₅₀ en días para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del cuarto estadio en tres diferentes concentraciones.....	30
9. Análisis de Varianza para TL ₅₀ para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del tercer y cuarto estadio en tres diferentes concentraciones.....	30
10. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una LE para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del tercer estadio en tres diferentes concentraciones.....	30
11. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una LE para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del cuarto estadio en tres diferentes concentraciones.....	31

12.	Análisis de Varianza para LE para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del tercer y cuarto estadio en tres diferentes concentraciones.....	31
13.	Diferencias en tamaño de larvas muertas por virus + ácido bórico a diferentes concentraciones en la dieta.....	31
14.	Diferencias en tamaño en larvas muertas por tinopal a diferentes concentraciones en la dieta.....	32
15.	Diferencias en tamaño en larvas muertas por VPN + ácido bórico y VPN + tinopal al 1% en la dieta.....	32
16.	Diferencias en tamaño en larvas muertas por VPN + ácido bórico al 1% en larvas del tercer y cuarto estadio.....	33

1. INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*, (Smith, 1976) (Lepidoptera: Noctuidae) es sin duda la plaga más importante del maíz y sorgo en Mesoamérica (Andrews y Quezada 1989). La larva joven hace ventanitas en las hojas y la larva grande se alimenta vorazmente del cogollo dejando agujeros grandes e irregulares y abundante excremento. Esta especie también causa aún más daño como gusano cortador en plántulas, como elotero durante la etapa del llenado del grano y ocasionalmente como gusano arrasador o barrenador en todas las etapas.

Spodoptera frugiperda está presente en todas las plantaciones de maíz que están debajo de 1500 msnm, pero el impacto económico de los ataques varía de un campo a otro dependiendo de la densidad poblacional de la plaga, edad o tamaño de la plaga, etapa fenológica del hospedero (las etapas de plántula y prefloración parecen ser las más susceptibles), densidad de siembra, disponibilidad de agua y nutrientes, variedad y otros factores (Van Huis 1981).

Con el objetivo de reducir los daños ocasionados por esta plaga, los agricultores recurren al uso de insecticidas organosintéticos para su control, que pueden ser costosos y no selectivos. Van Huis (1981) indica que si se usa un producto sistémico, las plantas pueden ser protegidas contra *Spodoptera frugiperda* por 20 días aproximadamente, pero el ataque de la plaga después de este tiempo puede ser más severo debido a que cuando se elimina la plaga, se eliminan también los enemigos naturales. Otra de las desventajas del uso insecticidas sistémicos es que pueden crear resistencia de los insectos plaga y la contaminación ambiental, además que pueden crear residuos en los alimentos y contaminar las aguas superficiales.

Para reducir estos problemas ambientales y económicos en el control de plagas, busquemos soluciones que no provoque o al menos disminuya los efectos negativos sobre el agroecosistema y que impliquen un menor costo de utilización como es el uso de las prácticas culturales controladores biológicos y agentes microbiales pero que tienen la desventaja de actuar lentamente en el insecto en comparación con los insecticidas químicos.

Uno de los productos biológicos más utilizados para el control del gusano cogollero es el Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN), que tiene las ventajas de que no causa daño ambiental, no afecta los enemigos naturales por ser específico, no crea resistencia en el insecto plaga y no afecta al hombre ni los animales, pero es degradado fácilmente por las condiciones ambientales, especialmente por la radiación ultravioleta, y es lento para matar al insecto (Morales *et al.*, 1997).

Por ello, el propósito de este estudio es evaluar el uso de tres aditivos, en condiciones controladas en el laboratorio, para mejorar la tasa de infectividad por el Virus de la Poliedrosis Nuclear y medir el efecto que tienen en aspectos como tiempo de muerte de la larva, cantidad de virus cosechado, forma de aplicación y cantidad de aditivo utilizado.

1.1. OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar el efecto del ácido bórico, neem y tinopal sobre el grado de infectividad del virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera frugiperda* a través de ensayos realizados en el laboratorio.

1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Experimento I

1. Medir el efecto que tiene la adición de ácido bórico, neem y tinopal en las dietas ofrecidas a las larvas de *S. frugiperda* del tercer estadio sobre la tasa de infectividad del Virus de la Poliedrosis Nuclear.

Experimento II

1. Determinar dosis apropiada para los aditivos que dieron el mejor resultado en el experimento I.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. UTILIZACIÓN DE AGENTES MICROBIALES

Al igual que los humanos, otros animales y las plantas, los insectos son afectados por microorganismos capaces de causar enfermedades y mortalidad en sus poblaciones. Entre estos organismos encontramos los virus, bacterias, hongos, protozoarios y rickettsias. El control microbial se refiere al uso inteligente de entomopatógenos para regular o reducir las poblaciones insectiles. El uso de entomopatógenos incluye tanto el manejo adecuado de microorganismos presentes para tornarlos más efectivos, como es el uso de insecticidas microbiales, que son formulaciones comerciales de los entomopatógenos o sus productos tóxicos usados en el control de insectos (Andrews y Quezada, 1989).

2.2. VIRUS

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

Los virus patogénicos a insectos se clasifican de acuerdo con el criterio establecido para otros virus de animales. Estos incluyen el tipo de ácido nucleico dentro del virión o partícula infecciosa del virus, la morfología del virión, la simetría de las subunidades de la capa proteinácea, la presencia o ausencia de una envoltura rodeando el virión, su tamaño y grado de resistencia a ciertos químicos (Andrews y Quezada, 1989). Wildy (1971) divide los virus en dos grandes grupos de acuerdo a la composición del ácido nucleico (ADN o ARN). Para fines prácticos, los entomovirus se dividen en cinco grupos: baculovirus, virus citoplasmáticos, entomopoxvirus, virus denonucleosos y virus iridiscentes. La familia de los baculovirus es de la que mayor información se tiene de los virus entomopatógenos. Más de 600 especies de insectos de los órdenes Lepidóptera, Hymenoptera, Coleoptera, Diptera y especies de algunos otros órdenes de insectos han sido reportadas como infectadas por baculovirus (Granados y Federici, 1986). La familia de los baculovirus se dividía en tres subgrupos: los virus de la poliedrosis nuclear (VPN) que presentan cuerpos de inclusión en forma de poliedros con uno o varios viriones, el tamaño de estos cuerpos de inclusión puede variar en tamaño de 0.15 a 15 μ m (Reichcigl y Reichcigl, 2000), los virus de la granulosis (VG) que tienen solo un nucleocápsido por

envoltura y presentan inclusiones virales en forma de gránulos cuyo tamaño varía entre 0.13 a 0.5um y los virus no oclusivos que no forman cuerpos de inclusión (Cave, 1995).

En el caso del maíz uno de los más utilizados para el control del gusano cogollero es el Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN), que pertenece a la familia de los baculoviridae, pero que a diferencia de insecticidas sistémicos tiene poca o ninguna patogenicidad para invertebrados benéficos debido a su especificidad, no son peligrosos para mamíferos, incluso el hombre y otros vertebrados, y presentan poca resistencia para los hospederos (Cave, 1995). Su comercialización es limitada debido a los altos costos de producción. Los virus son reproducidos en insectos vivos. El desarrollo de bioinsecticidas virales también es restringido debido a que los virus son altamente específicos, por lo que habría un mercado muy reducido, sin embargo, se está investigando el desarrollo de virus menos específicos como es el caso del virus aislado de *Autographa californica*, que ha mostrado un amplio rango de hospederos de Lepidópteros (Maramorosch y Sherman, 1985).

2.3. LOS BACULOVIRUS

2.3.1. Modo de acción de los baculovirus

El VPN debe ser ingerido, para que cause enfermedad y muerte a su hospedero susceptible. Los virus afectan sitios específicos dentro del insecto, destruyendo las células, en el caso del virus de la poliedrosis nuclear las células epiteliales del intestino medio (INFOAGRO, 1999).

El proceso de infección depende de varios factores internos y externos tales como la susceptibilidad del insecto, edad o tamaño del insecto, virulencia del virus y temperatura (Andrews y Quezada, 1989). Los baculovirus, contaminan los insectos vía oral; normalmente los viriones se encuentran en las hojas y tallos de la planta y en el caso de laboratorio son ofrecidas en las dietas. Después de la ingestión, los poliedros de VPN que contienen los viriones se disuelven en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 7.5$) del intestino medio y liberan los viriones. Una vez que entran en contacto con la microvellosidades del intestino, los viriones liberan los cápsidos a las células epiteliales del intestino donde el virus normalmente realiza su primera vuelta de replicación. Posteriormente, el virus afecta otros tejidos susceptibles del hospedero, donde continúa reproduciéndose y multiplicándose. Otros tejidos atacados son principalmente el cuerpo graso, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda (Cave, 1995). El número de nucleocápsidos, y el número de partículas de virus por poliedro puede afectar la transmisión de la infección. El tiempo que el virus tarda en matar las larvas hospederas, parece ser una gran desventaja para el uso de insecticidas virales como sustitutos de insecticidas químicos (Dent, 1991).

2.3.2. Síntomas que presentan los insectos infectados por VPN

Las larvas enfermas presentan lentitud de movimientos, falta de apetito, y el integumento cambia de color usualmente llega a ser blanquecino que más tarde se torna oscuro se vuelve flácido y finalmente se rompe (Maramorosch y Sherman, 1985). Las larvas se desplazan lentamente hacia el ápice de la planta, en donde se cuelgan con las propatas y

mueren. El esqueleto externo queda como un saco, que cuando se desintegra libera su contenido infestado de partículas virales, que caen sobre las hojas inferiores. Más tarde las larvas sanas de la especie plaga, ingieren el follaje infectado y mueren. Las larvas infectadas mueren generalmente en unos cinco a doce días, pero las cepas más virulentas pueden matar larvas muy jóvenes en dos a cuatro días (Tanada y Kaya, 1993). La muerte del insecto ocurre en el estado larval, aunque hay algunas que sobreviven a los estados pupales y de adulto.

2.3.3. Producción de VPN

Para la producción de virus es necesaria la presencia de la plaga, ya sea en el campo o en el laboratorio. La forma que facilita el manejo de la producción es mantener una cría de la plaga en el laboratorio o método *in vivo*, que involucra la utilización de una colonia de insectos que se ha desarrollado en un laboratorio (Granados y Federici, 1986). Éste es el método que se usa en el Laboratorio de Control Biológico de la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano para la producción de virus. Se mantiene una cría de *S. frugiperda* en una dieta que cubre los requerimientos nutricionales y cuando las larvas llegan al tercer estadio son inoculadas con VPN. Estas larvas comienzan a morir entre el cuarto y quinto día hasta el doceavo día, se cosechan y son maceradas con agua destilada para obtener el nuevo inóculo (VPN) (Anexo 1).

2.4. ADITIVOS EVALUADOS

Se consideran legalmente como aditivos aquellas sustancias añadidas intencionalmente a los alimentos para modificar sus propiedades físicas, sabor, conservación, etc., pero no a aquellas añadidas con el objetivo de aumentar su valor nutritivo. Esta definición incluye cualquier sustancia usada en la producción, tratamiento, empaquetado, transporte o almacenamiento de alimentos. En aquellos casos en los que la sustancia añadida es eliminada, o la cantidad de ella que queda en el alimento no tiene función alguna, no se considera un aditivo. Los aditivos se probaron con el objetivo de evaluar su efecto en la mejora de la tasa de infectividad por el VPN. Estos aditivos afectan mayormente el comportamiento alimenticio del insecto causando efectos inhibidores en la alimentación. Una sustancia con efectos inhibidores en la alimentación, se define como un producto natural o químico sintético que actúa inhibiendo las células receptoras gustativas, que normalmente reconocen el alimento apto para ser consumido. Con una cobertura completa en la dieta, estos aditivos actúan inmediatamente deteniendo la alimentación de la larva pero solamente si son ofrecidos en la superficie del alimento, es decir lo primero que consumen las larvas. Los insectos que se alimentan bajo la superficie (ya sea de dietas artificiales o de la vegetación en el campo) o los insectos chupadores, no son afectados por estos productos inhibidores de la alimentación. Cuando los insectos no mueren por este efecto antialimenticio, es probablemente porque no hay buena cobertura y se mueven a partes no protegidas de la planta o de la dieta (Coppel y Mertins, 1977).

2.4.1. Neem

Neem (*Azadirachta indica*) es una planta de la familia Meliaceae, conocida por la diversidad de usos que tienen sus partes y por los compuestos que pueden extraerse de ellas. Este árbol se mantiene verde todo el tiempo y solo en condiciones muy secas bota sus hojas por períodos cortos. El neem posee diferentes compuestos pero la azadirachtina es probablemente la sustancia antialimentaria más potente que ha sido reportada (Lewis, 1983). Los compuestos del neem actúan en los insectos inhibiendo el desarrollo de huevos, larvas o pupas, bloqueando la muda de larvas o ninfas, afectando la comunicación sexual y el apareo, repeliendo larvas y adultos, reduciendo la oviposición, esterilizando adultos, envenenando larvas y adultos, produciendo efecto antialimentario y reduciendo la movilidad del aparato digestivo del insecto (Schmutterer y Ascher, 1985). Su efecto más específico como insecticida es intervenir el sistema neuroendocrino del insecto para controlar la síntesis de la hormona ecdisona que controla el proceso de metamorfosis desde el estado de larva hasta que llega a ser adulto, causando una reducción en la población, ya que no pueden reproducirse y se alimentan menos. (Alves, 1986).

Se han realizado estudios para evaluar el efecto que tiene el neem sobre el virus de la poliedrosis nuclear de *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) y *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) donde se observó que a concentraciones de 0.1 a 1% inhibió el crecimiento y desarrollo de la larva, y que a medida se aumentaba la concentración de neem en la dieta, la ganancia de peso de la larva disminuyó. En cuanto al desarrollo, se observó que el día 14 después de inoculada, todavía un porcentaje de las larvas estaban entre el tercer y cuarto estadio. No se observaron diferencias visibles en las pupas, sin embargo hubo un efecto supresivo en la emergencia del adulto (Shapiro *et al.*, 1994). También se han realizado estudios de sus efectos sobre la metamorfosis, longevidad y reproducción de algunos insectos del orden de los dípteros, donde se observó que el neem redujo significativamente la fecundidad por interferir con el proceso de oogénesis y que la oviposición disminuyó como resultado de un bloqueo en la actividad ovárica y que produjo una reducción drástica en la sobrevivencia del insecto (Cristofaro *et al.*; 1999).

2.4.2. Tinopal

Es un abrillantador óptico que inicialmente fue estudiado por sus propiedades de protección de los virus contra los rayos UV, pero después se observó que ciertos tipos de abrillantadores ópticos mejoran la infectividad de esos virus *in vivo*. Los abrillantadores ópticos son usados en la fabricación de pinturas, detergentes, papel y plásticos. Los tipos de abrillantadores ópticos de mayor interés por sus interacciones con baculovirus pertenecen a un grupo de sustitutos de ácido sulfúrico estilbeno de los cuales el más estudiado es Tinopal LPW (Argauer y Shapiro, 1997). Shapiro (2000) postula que algunos abrillantadores entre ellos Tinopal LPW y M2R inhiben o alteran la membrana peritrófica quitina, creando aberturas en la membrana del intestino y permitiendo que más nucleocápsidos pasen del lumen del intestino al hemocelo, aumentando la infectividad del virus entre cien y mil veces debido a un efecto bioquímico en el intestino del insecto. También afectan el crecimiento de la larva ya sea directamente o inhibiendo la alimentación. Se realizaron ensayos sobre los efectos del tinopal en la actividad

infecciosa del baculovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) donde se observaron efectos en la reducción del TL₅₀ (tiempo que tardan en morir el 50% de las larvas de la población) de un 43-57% en la presencia de 1% de Tinopal y la CL₅₀ (concentración a la que mueren el 50% de las larvas de la población) también se redujo (Shapiro, 2000). Argauer y Shapiro (1995) argumentan que el uso de los abrillantadores ópticos será importante en reducir los costos de producción del virus, manteniendo su actividad aún después de ser expuestos a la radiación ultravioleta, mejorando la actividad, y que incrementará el uso de virus patogénicos a insectos como agentes de control microbial en estrategias de control de plagas.

2.4.3. Ácido bórico

Ácido bórico son partículas blancas sólidas, inodoras que tienen un pH de 3.7 (solución al 4.7% a 20 °C) - 5.1 (solución al 1% a 20 °C) es soluble en Agua, Alcohol Etilico, Éter Etilico y Glicerol tiene una densidad de 1.43 kg/L y su dosis letal para el humano por ingestión es de 429mg/kg. Por medio de un bioensayo de laboratorio y dos experimentos de campo se estudió el ácido bórico, el cual demuestra un incremento de aproximadamente el 20% en la mortalidad de la plaga tratada con virus + ácido bórico a concentraciones del 0.5 al 2%. Además, se ha demostrado que esta sustancia no tiene efectos nocivos hacia las poblaciones de enemigos naturales en el maíz (EPA, 2001). Se han hecho ensayos en insectos como *Lymantria dispar*, *Heliothis armigera* (Morales *et al.*; 1997) y en este caso se probó en *Spodoptera frugiperda*. No se ha encontrado información acerca de los efectos directos en el insecto, pero en los ensayos realizados se observaron cambios en el comportamiento alimenticio del insecto. Es usado como atrayente en formulaciones en cebos. Ha sido utilizado para el control de la langosta migratoria y probado contra otras plagas como *Spodoptera spp*, pero es más usado para el control de plagas caseras como hormigas y cucarachas (Dent, 1991) En humanos los principales órganos y tejidos afectados son el tracto gastrointestinal, piel, sistema vascular y cerebro. Puede ocasionar vómito, letargo, debilidad e inquietud.

2.5. DATOS GENERALES DE LA PLAGA

El gusano cogollero es considerado una de las plagas principales en el cultivo de maíz afectando el rendimiento en un 30 a 60% (Van Huis, 1981). Esta plaga afecta al maíz en casi todas las etapas de su crecimiento. En las primeras etapas corta las plántulas, en crecimiento vegetativo daña hojas y perfora tallos y puede llegar a atacar la mazorca. (CATIE, 1990).

El ciclo de vida de *S. frugiperda* empieza con la etapa de huevo, donde las hembras ponen masas en grupos de 40 a 400 huevos y continúa su desarrollo pasando por cinco estadios larvales y es en la etapa de larva donde constituyen una plaga para el cultivo porque se alimentan de las hojas, del cogollo o del tallo de la planta, después esta larva se convierte en pupa, etapa en la que el insecto no se alimenta, luego de lo cual emergen los adultos. (Cañas, 1993). El ciclo dura alrededor de 28 a 32 días. Es importante mencionar que a partir del quinto estadio, las larvas no son afectadas por el VPN, y hasta en el cuarto estadio algunas llegan a convertirse en pupa

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El ensayo se realizó entre abril y septiembre de 2002 en el Laboratorio de Control Biológico de Zamorano que está ubicada en el Valle Yeguaré a 32 km al este de Tegucigalpa, a una altura de 800 m.s.n.m. La precipitación media anual es de 1100 mm y la temperatura media anual es de 23°C.

Para realizar el estudio se contó con materiales e ingredientes necesarios para la preparación de la dieta para larvas de *S. frugiperda*, desde el primer estadio hasta el tercer estadio y dieta para ser inoculada con VPN (Anexo 2). Para producción de virus se preparan dos dietas, en la primera se incluyen todos los ingredientes y las larvas permanecen desde el primer hasta el tercer estadio en esa dieta (aproximadamente 10 días) y luego cuando las larvas están en el tercer estadio son pasadas a otra dieta donde se eliminan las vitaminas con el propósito de provocarle un estrés a la larva y es esta la dieta que se contamina con VPN (Anexo 2) aplicándolo con una micropipeta en la superficie. Cinco días después de ser inoculada, se observan las primeras larvas infectadas y muertas por virus.

3.2 EXPERIMENTO I: ADITIVOS Y FORMA DE APLICACIÓN

En este experimento se evaluaron tres aditivos, neem, ácido bórico y tinopal, ofrecidos a las larvas en la dieta, en el inóculo y en ambos (inóculo + dieta). (Cuadro 1).

- Mezclados en la dieta, donde los ingredientes de la dieta se cocinaron, se licuaron y se esterilizó la dieta en el autoclave (sin aditivo) y cuando se enfrió, se agregó el aditivo previamente pesado según la concentración utilizada (peso / peso) y finalmente se dispensó en los vasitos donde se colocaron las larvas del tercer estadio para ser inoculadas con VPN.
- Mezclado con el inóculo de la dieta, donde el aditivo se pesó según la concentración utilizada y se mezcló con agua o con VPN (peso / volumen) y luego se aplicó a la superficie de la dieta ya colocada en los vasitos con una micropipeta, usando 30.5ul del inóculo por vasito
- Mezclado en la dieta e inóculo a la vez, en el inóculo y en la dieta, donde el aditivo se mezcló con los ingredientes de la dieta después de ser esterilizada, y también se mezcló con el inóculo que se colocó en la superficie de la dieta (agua o VPN) aplicando siempre 30.5ul por vasito. En esta aplicación se utilizó la misma concentración del aditivo en el inóculo y en la dieta, pero doble dosis.

La concentración de los aditivos fue la misma sin importar la forma de aplicación utilizada. Por ejemplo el neem se utilizó al 0.1% de peso cuando fue ofrecido en la dieta y al 0.1% de volumen cuando fue ofrecido en el inóculo y cuando fue ofrecido en ambos se utilizó la misma concentración pero doble dosis (0.1% en dieta y 0.1% en inóculo). Las concentraciones fueron obtenidas de literatura donde se han hecho ensayos en larvas de Lepidópteros con baculovirus.

Cuadro 1. Tratamientos donde se evaluaron tres aditivos en diferentes formas de aplicación en dietas artificiales ofrecidas a larvas de *S. frugiperda*. El Zamorano, Honduras, 2002.

Tratamiento	Aditivo y cantidad	Aplicación
1	Ácido Bórico al 0.101%	En dieta + VPN
2	Ácido Bórico al 0.101%	En inóculo + VPN
3	Ácido Bórico al 0.101%	En dieta e inóculo + VPN
4	Ácido Bórico al 0.101%	En dieta sin VPN
5	Ácido Bórico al 0.101%	En inóculo sin VPN (mezclado con agua)
6	Neem al 0.1%	En dieta + VPN
7	Neem al 0.1%	En inóculo + VPN
8	Neem al 0.1%	En dieta e inóculo + VPN
9	Neem al 0.1%	En dieta sin VPN
10	Neem al 0.1%	En inóculo sin VPN (mezclado con agua)
11	Tinopal al 1%	En dieta + VPN
12	Tinopal al 1%	En inóculo + VPN
13	Tinopal al 1%	En dieta e inóculo + VPN
14	Tinopal al 1%	En dieta sin VPN
15	Tinopal al 1%	En inóculo sin VPN (mezclado con agua)
16	Testigos VPN	En dieta
17	Testigos VPN	En inóculo
18	Testigos VPN	En dieta e inóculo

La concentración de VPN utilizada para todos los tratamientos fue de 6×10^9 cuerpos poliédricos de inclusión (CPI), que es la concentración que se utiliza en el laboratorio y que equivale a una larva equivalente (LE), se utilizó una dosis de 30.5ul del inóculo por vasito de dieta. Este vasito contiene aproximadamente una cantidad de 3.6g de dieta (la cantidad de dieta para larvas que serán inoculadas es menor que la cantidad de dieta que se pone para mantener la cría de *Spodoptera frugiperda* donde se ofrecen de 4.5 a 5g de dieta), se coloca una larva del tercer estadio por vasito. Los ingredientes usados para preparar la dieta que fue inoculada son básicamente los mismos que para preparar la dieta de cría, pero en la dieta inoculada no se incluyen vitaminas, ni formalina (Anexo 2). Después de inoculadas los vasitos que contienen la dieta con 30.5ul de VPN a una concentración de 6×10^9 se pasan a un cuarto donde permanecen hasta que termina la cosecha de larvas muertas por virus, a una temperatura de 28°C y se trata de mantener una humedad relativa de 50%.

3.2.1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño factorial con 18 tratamientos: Aditivos (3) * Forma de aplicación (3) * VPN (2).

Para cada tratamiento en ambos experimentos se realizaron tres repeticiones en el tiempo. Cada repetición consistía de dos bandejas con 30 larvas cada una, es decir sesenta larvas por repetición. Para el análisis estadístico en ambos experimentos, se utilizó el programa estadístico MINITAB®.

Una vez colocadas las larvas en los respectivos tratamientos y después de inoculadas, se comenzaron a evaluar al cuarto día después de inoculadas y luego cada 24 horas. Para el análisis de variables se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una separación de medias Tuckey $P < 0.05$ de los siguientes parámetros:

- El tiempo letal medio (TL_{50}) que es el tiempo que tarda en morir el 50% de la población de las larvas evaluadas.
- Larvas equivalentes (LE) que es la cantidad de larvas muertas que se necesitan para obtener una larva equivalente de 6×10^9 CPI.

Las larvas muertas por bacterias, hongos y las larvas escapadas, fueron incluidas en los registros como larvas escapadas, pero éstas no se incluyeron en las proporciones finales de larvas muertas por virus, aunque la cantidad de larvas registradas como escapadas fue muy baja porque hubo muy poca o casi ninguna contaminación por bacteria y ninguna contaminación por hongos en las dietas inoculadas. Para distinguir entre una larva muerta por virus y una muerta por bacteria se observaron las siguientes características:

- 1) Las larvas muertas por virus presentaron el integumento blando como una bolsa de líquido, de color negro o blanquecino y normalmente estas larvas fueron encontradas en las tapaderas colgadas hacia abajo, como normalmente se encuentran en el campo.
- 2) Las larvas muertas por bacterias presentaron un color rojizo pálido, olor fétido, y las dietas contaminadas se observaron con una coloración rojiza, olor desagradable y algunas veces se encontraron moscas o huevos de moscas en los vasos con dieta.

Para reducir la probabilidad de contaminación, las dietas fueron esterilizadas en el autoclave por 20 minutos en frascos erlenmeyer y luego dispensadas en los vasitos.

3.3. EXPERIMENTO II:

EVALUACIÓN DE ÁCIDO BÓRICO Y TINOPAL AL 1, 0.1 Y 0.045% DE PESO EN DIETA EN LARVAS DEL TERCER Y CUARTO ESTADIO.

Del experimento I se observó el mejor comportamiento de las variables medidas cuando se utilizó ácido bórico y tinopal, los cuales se evaluaron en este experimento en tres concentraciones. Inicialmente se iba a utilizar solo un aditivo pero al analizar los datos se observó que el ácido bórico fue el mejor para reducir el tiempo de muerte de la larva y el tinopal dio mejores resultados para aumentar la cantidad de virus cosechado por larva.

Ambos aditivos fueron ofrecidos en la dieta que fue la forma de aplicación que dio mejores resultados en el primer experimento.

Para este experimento se utilizó la misma cantidad de VPN (30.5ul por vasito) a la misma concentración (6×10^9 CPI), variando solamente las concentraciones de los aditivos en la dieta. Ácido bórico y tinopal se aplicaron solos y mezclados a concentraciones de 1%, 0.1% y 0.045% de peso en la dieta (Cuadro 2), se midió el efecto que tienen estos productos en larvas del tercer y cuarto estadio evaluando variables como la tasa de mortalidad, tiempo de muerte de la larva y cantidad de virus cosechado para obtener la cantidad de larvas necesarias para obtener una larva equivalente (LE). Las revisiones se hicieron al cuarto día de inoculadas las bandejas y después cada 24 horas.

Cuadro 2. Tratamientos donde se evaluaron tres concentraciones de ácido bórico y tinopal ofrecidos en la dieta solos y mezclados a larvas del tercer y cuarto estadio. El Zamorano, Honduras, 2002.

Tratamiento	Aditivo y cantidad	Estadio
1	1% AB + VPN	3er estadio
2	0.1% AB + VPN	3er estadio
3	0.045% AB + VPN	3er estadio
4	1% Tinopal + VPN	3er estadio
5	0.1% Tinopal + VPN	3er estadio
6	0.045% Tinopal + VPN	3er estadio
7	1% AB + 1% Tinopal + VPN	3er estadio
8	0.1% AB + 0.1% Tinopal + VPN	3er estadio
9	0.045% AB + 0.045% Tinopal + VPN	3er estadio
10	1% AB + VPN	4° estadio
11	0.1% AB + VPN	4° estadio
12	0.045% AB + VPN	4° estadio
13	1% Tinopal + VPN	4° estadio
14	0.1% Tinopal + VPN	4° estadio
15	0.045% Tinopal + VPN	4° estadio
16	1% AB + 1% Tinopal + VPN	4° estadio
17	0.1% AB + 0.1% Tinopal + VPN	4° estadio
18	0.045% AB + 0.045% Tinopal + VPN	4° estadio

3.3.1 Diseño experimental

En este experimento se utilizó un diseño factorial, con 18 tratamientos y tres repeticiones. Cada repetición de dos bandejas de treinta vasitos con una larva por vasito es decir sesenta larvas por repetición:

Aditivos (3) * Concentración (3) * Estadio (2).

Para el análisis estadístico en ambos experimentos, se utilizó el programa estadístico MINITAB® realizándose un análisis de varianza (ANDEVA) y una separación de medias Tuckey $P < 0.05$ de los siguientes parámetros:

- El tiempo letal medio (TL_{50}) que es el tiempo que tarda en morir el 50% de la población de las larvas evaluadas.
- Larvas equivalentes (LE) que es la cantidad de larvas muertas que se necesitan para obtener una larva equivalente de 6×10^9 CPI.

3.4 VARIABLES MEDIDAS

3.4.1. Tiempo Letal Medio (TL_{50})

Es el tiempo que tarda en morir el 50% de las larvas evaluadas. Se realizaron conteos diarios del número de larvas muertas obtenidas por tratamiento a partir del cuarto día de inoculadas.

3.4.2. Larvas Equivalentes

Es el número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente de 6×10^9 CPI. Después de realizar la cosecha de larvas muertas por virus en ambos experimentos, se realizó el conteo de viriones colocando 20 microlitros de una dilución de 1:1000 de la solución madre en la cámara de Neuber, para conocer la cantidad de cuerpos poliédricos obtenidos por tratamiento.

3.4.3. Porcentaje de larvas muertas

Se contó el número de larvas muertas obtenidas en cada tratamiento y con estos datos, se sacó un porcentaje final de mortalidad por virus.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 EXPERIMENTO I

Para decidir qué aditivo fue más efectivo se tomó en cuenta el porcentaje de mortalidad, tiempo letal medio (TL₅₀) y larvas equivalentes (LE).

La mayoría de los tratamientos presentaron mortalidad por el virus a excepción de los tratamientos testigos (Cuadro 3). El mayor porcentaje de larvas muertas se obtuvo cuando se utilizó ácido bórico en sus tres formas de aplicación con valores del 93 al 100% de mortalidad y con neem cuando fue aplicado en dieta y en dieta + inóculo. Cuando se usó tinopal se encontraron porcentajes de mortalidad entre 66 y 81% y con VPN sin aditivo ofrecido en inóculo se obtuvo 85% de mortalidad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Porcentaje de larvas muertas obtenidas en el primer experimento. Zamorano, Honduras, 2002.

Aplicac Aditivos	aditivo inóculo	aditivo dieta	dieta+inóculo + VPN	inoc+VPN	dieta+VPN	Promedio
Ac. Bórico	5.0	38.3	100.0	93.3	100.0	67.3
Neem	1.6	61.6	98.3	70.0	96.6	65.6
Tinopal	3.3	25.0	66.6	81.6	71.6	49.6
Testigo			83.0	85.0	5.0	57.6
Promedio	3.3	41.7	87.0	82.4	68.3	56.5

4.1.1 Tiempo Letal Medio (TL₅₀)

Para la variable TL₅₀ se encontraron diferencias significativas entre los aditivos, las formas de aplicación evaluadas y su interacción (Anexo 4). La separación de medias muestra que el ácido bórico no presentó diferencia significativa con el neem en cuanto al tiempo requerido para matar el 50% de la población de *Spodoptera frugiperda*. En los promedios obtenidos (Figura 1), se observa que con ácido bórico ofrecido en la dieta y en la dieta + inóculo se requirió un TL₅₀ significativamente menor que cuando se utilizó tinopal y VPN sin aditivo en dieta (Anexo 3). El VPN aplicado en la dieta presentó TL₅₀ significativamente mayor que los demás tratamientos, requiriendo 14.57 días para matar el 50% de las larvas evaluadas (Figura 1).

El ácido bórico aplicado en la dieta requirió 5.13 días para matar el 50% de los individuos de la población evaluada comparado con 5.8 días cuando fue aplicado en el inóculo y 5.2 días cuando fue aplicado en la dieta + inóculo (Anexo 3).

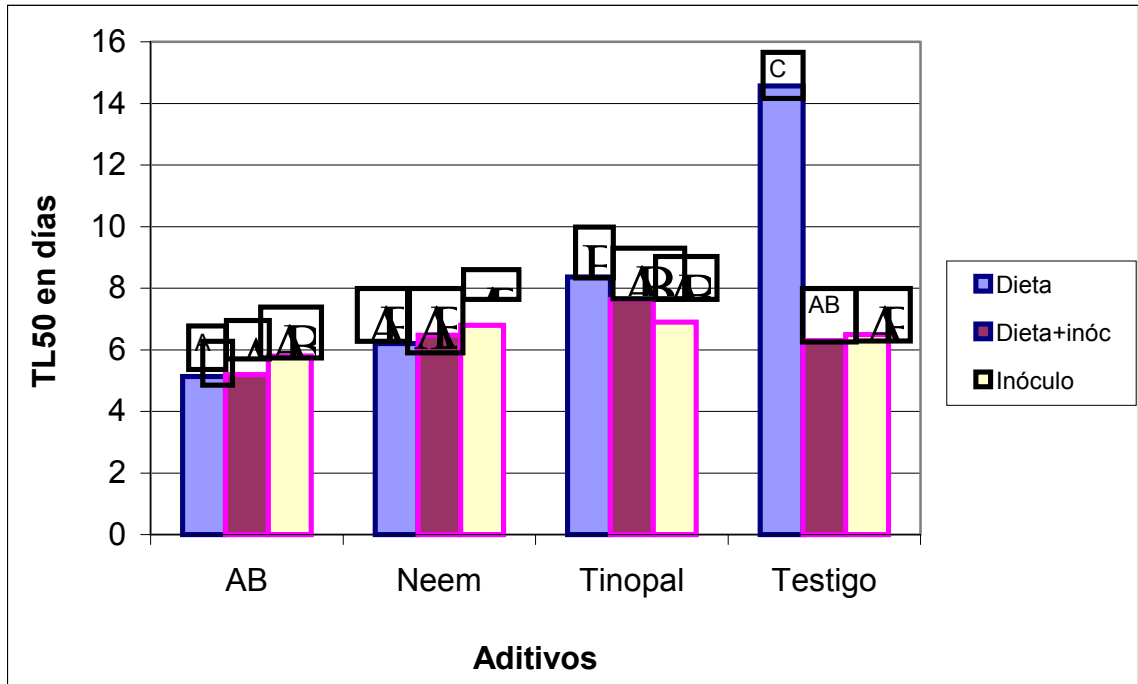


Figura 1. Medias del TL_{50} en días para todos los aditivos en sus diferentes formas de aplicación. Zamorano, Honduras, 2002.

4.1.2 Larvas Equivalentes (LE)

Para la variable LE se encontraron diferencias significativas entre los aditivos, las formas de aplicación de estos y su interacción lo que indica que los aditivos se comportan diferente de acuerdo a la forma de aplicación en sus respuestas a LE (Anexo 6). Se encontró que con tinopal se requirió un número significativamente menor de larvas muertas para obtener una larva equivalente, aunque no presentó diferencias significativas con el neem y con el ácido bórico ofrecidos en el inóculo y tampoco con el VPN sin aditivo ofrecido en el inóculo y en la dieta + inóculo (Figura 2). El VPN ofrecido en la dieta requirió un número de larvas muertas significativamente mayor para obtener una larva equivalente que los demás tratamientos (28.3 larvas muertas / LE) (Figura 2). En la presencia de ácido bórico ya sea en la dieta o en la dieta + inóculo, se requirió un número significativamente mayor de larvas muertas para obtener una larva equivalente en comparación con tinopal, VPN en inóculo y en dieta + inóculo, neem y ácido bórico en inóculo, pero menor que el VPN aplicado en la dieta (Anexo 5).

El tratamiento con el que se requirieron menos larvas muertas para obtener una larva equivalente fue con el tinopal en dieta (3.35 larvas / LE), aunque no se presentaron diferencias significativas entre las diferentes formas de aplicar el tinopal.

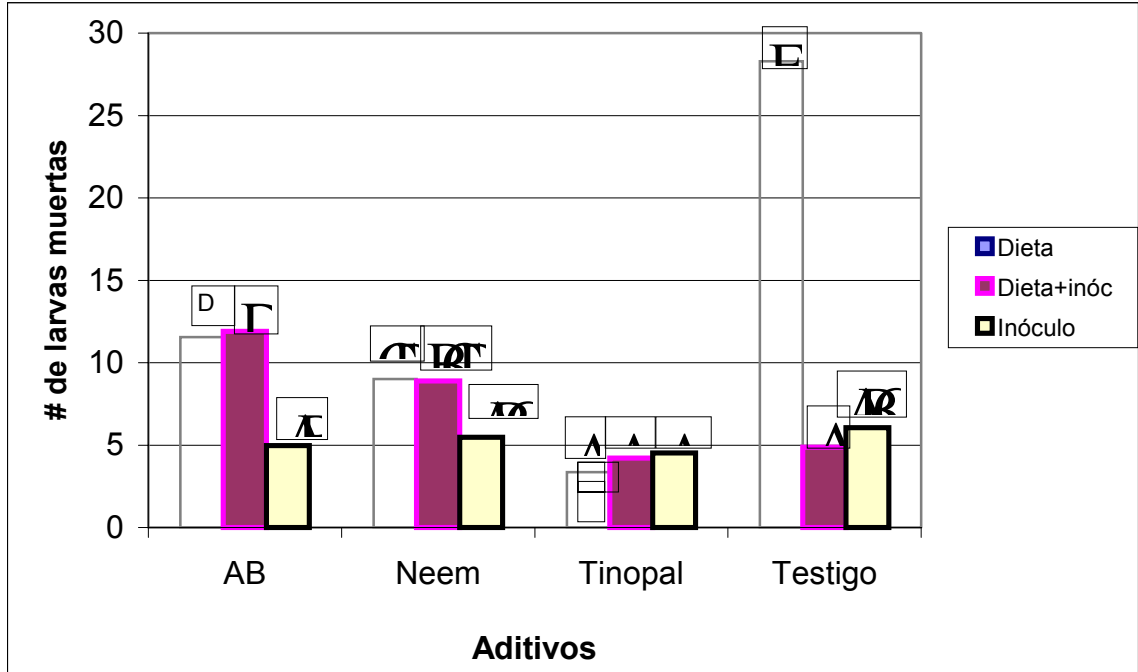


Figura 2. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente (LE) para todos los aditivos en sus diferentes formas de aplicación. Zamorano, Honduras, 2002.

4.1.3 Conclusiones

1. La presencia de VPN, ya sea en el inóculo o en la dieta es un factor determinante para causar mortalidad, ya que cuando se utilizaron los aditivos sin VPN mezclados solamente con agua destilada no se produjo o se obtuvo muy bajo porcentaje de larvas muertas por lo que no se pudieron obtener datos de TL_{50} ni de LE.
2. El ácido bórico aplicado en dieta redujo el TL_{50} a 5.13 días y presentó mayor porcentaje de larvas muertas que el resto de los tratamientos.
3. El VPN aplicado en la dieta sin aditivo incrementó el TL_{50} en comparación con las aplicaciones de VPN mezclado con aditivos, y resultó en un bajo porcentaje de larvas muertas (5%).
4. El tinopal en dieta redujo el número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente a 3.35.
5. El VPN ofrecido en la dieta sin aditivo necesitó mayor número de larvas muertas para obtener una LE (28.3).
6. El tinopal fue el más costoso de los aditivos y el más difícil de obtener en comparación con el ácido bórico.

4.1.4 Recomendaciones

1. Evaluar el efecto del ácido bórico con VPN en el campo sobre la reducción del tiempo de muerte de la larva.
2. Evaluar diferentes concentraciones de neem que puedan mejorar las respuestas a TL_{50} y LE.
3. Buscar un aditivo que pudiera ser un sustituto del tinopal para la producción de virus dentro del laboratorio de control biológico, que tenga similares efectos sobre la cantidad de larvas necesarias para obtener una larva equivalente, pero que mejore la mortalidad y que implique un menor costo de utilización.
4. Evaluar otras alternativas de productos que pudieran ser utilizados como aditivos para la producción de VPN ya sea que tengan efectos fagoestimulantes como la melaza o efectos antialimentarios como los aditivos evaluados en este experimento.
5. Continuar aplicando el VPN como inóculo en la superficie de la dieta, ya que si se ofrece mezclado en la dieta no se tendrán resultados satisfactorios para el porcentaje de larvas muertas, TL_{50} y LE.

4.2 EXPERIMENTO II

Los mayores porcentajes de mortalidad se obtuvieron en la presencia de ácido bórico solo y mezclado con tinopal a una concentración del 1% en la dieta tanto en larvas del tercer como del cuarto estadio. Con tinopal se alcanzaron mortalidades de hasta 76.6% en larvas del tercer estadio, pero en larvas del cuarto estadio no llegó a causar la mortalidad ni del 50% de la población evaluada en ninguna concentración utilizada (Cuadro 4). Para determinar el mejor aditivo y la mejor concentración se evaluaron otros factores como TL_{50} y LE.

Cuadro 4. Porcentaje de larvas muertas obtenidas en el segundo experimento. Zamorano, Honduras, 2002.

Concentración Aditivo (estadio)	0.045%	0.1%	1%
Acido bórico (3 estadio)	63.3	70.0	98.3
Tinopal (3 estadio)	56.6	76.6	61.6
Acido bórico + tinopal (3 estadio)	67.5	69.2	98.3
Acido bórico (4 estadio)	13.3	26.6	100.0
Tinopal (4 estadio)	26.6	41.6	43.3
Acido bórico + tinopal (4 estadio)	30.0	29.2	97.5

4.2.1 Tiempo Letal Medio (TL₅₀)

Para la variable TL₅₀ se encontraron diferencias significativas entre los estadios, lo que indica que larvas del tercer estadio tienen respuestas diferentes en TL₅₀ a larvas del cuarto estadio. No se encontraron diferencias significativas entre los aditivos, pero sí en las concentraciones en la dieta ($P = 0.000$) (Anexo 9). En larvas del tercer estadio se observó que a una concentración de 1% de ácido bórico y ácido bórico + tinopal se redujo significativamente el TL₅₀ comparado con el resto de los tratamientos (Figura 3). En larvas del cuarto estadio no se encontró diferencia significativa en TL₅₀ entre aplicar ácido bórico y tinopal al 1 y al 0.1%, pero al aplicar ácido bórico + tinopal al 1% se presenta un TL₅₀ menor significativamente que al aplicarlo al 0.1% (Figura 4). El ácido bórico al 1% en la dieta redujo el TL₅₀ a 2.52 días en larvas del tercer estadio y el ácido bórico + tinopal redujo el TL₅₀ a 2.88 días en larvas del cuarto estadio (Anexo 7 y 8).

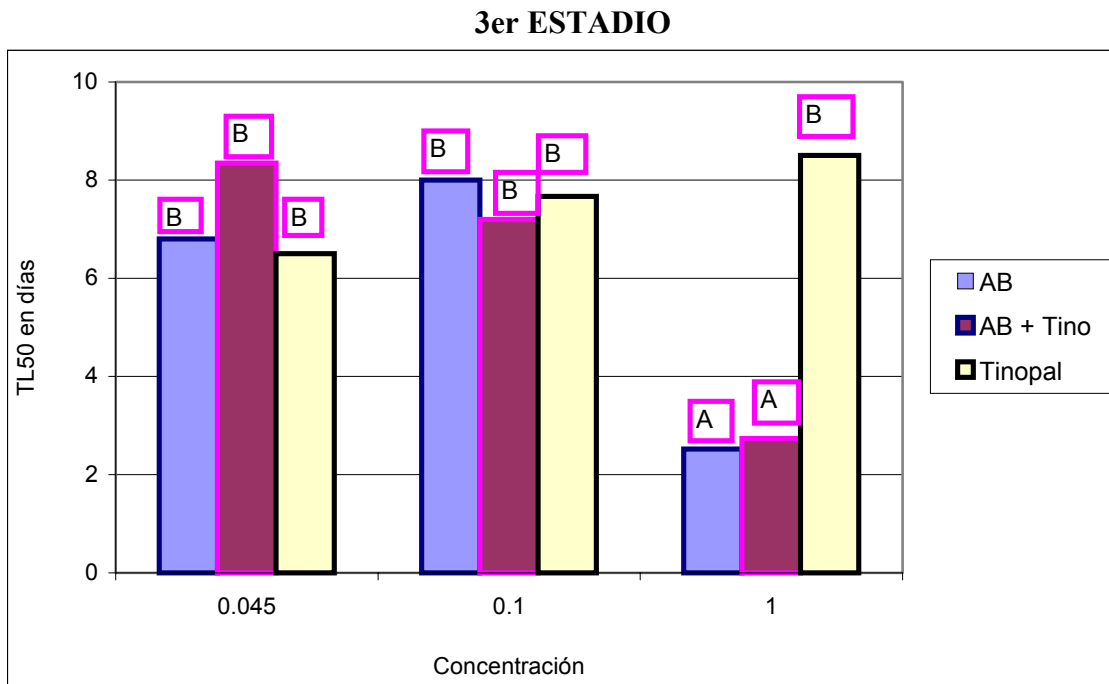


Figura 3. Medias del TL₅₀ en días para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados en diferentes concentraciones a larvas del tercer estadio. Zamorano, Honduras, 2002.

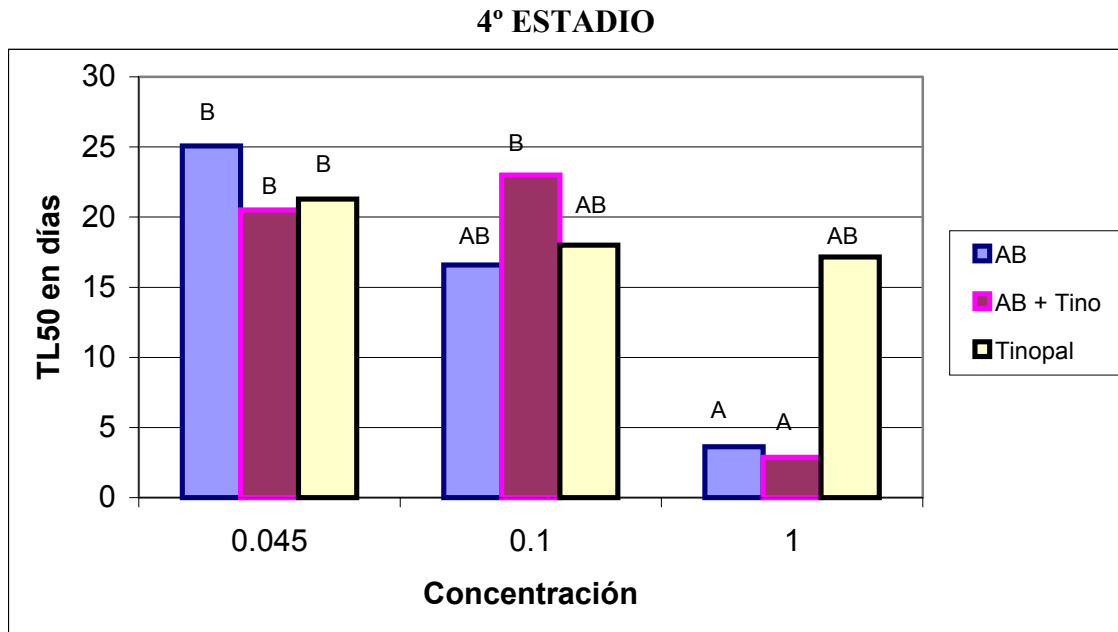


Figura 4. Medias del TL_{50} en días para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del cuarto estadio en tres diferentes concentraciones. Zamorano, Honduras, 2002.

4.2.2 Larvas Equivalentes (LE)

No se encontraron diferencias significativas entre los estadios, pero se encontraron diferencias significativas entre los aditivos y la concentración de estos en la dieta (Anexo 12). Se observó que se requirió un número significativamente menor de larvas para obtener una larva equivalente en la presencia de ácido bórico, ácido bórico + tinopal al 0.045 y 0.1% y tinopal al 0.045, 0.1 y 1%, que en la presencia de ácido bórico y ácido bórico + tinopal al 1% tanto en larvas del tercer como del cuarto estadio. (Figura 5 y 6). Para larvas del tercer estadio se observa que a concentraciones de 0.045 y 0.1% no hay diferencias entre los aditivos, pero que al 1% el tinopal requirió un número de larvas para obtener una larva equivalente menor significativamente que el ácido bórico y que el ácido bórico + tinopal, requiriéndose con este último un número de larvas muertas para obtener una larva equivalente mayor significativamente que el resto de los tratamientos (Figura 5). En larvas del cuarto estadio, tampoco se encontraron diferencias entre los aditivos a concentraciones de 0.045 y 0.1%, pero al 1% el tinopal requirió un número de larvas / LE menor significativamente que el ácido bórico y ácido bórico + tinopal (Figura 6). Se observó que a menor concentración del aditivo en la dieta, se requieren menos larvas para obtener una larva equivalente en larvas del tercer y cuarto estadio (Figura 5 y 6), esto se debe a que las larvas viven más tiempo y mueren de mayor tamaño que a concentraciones mayores (Anexo 13).

3er ESTADIO

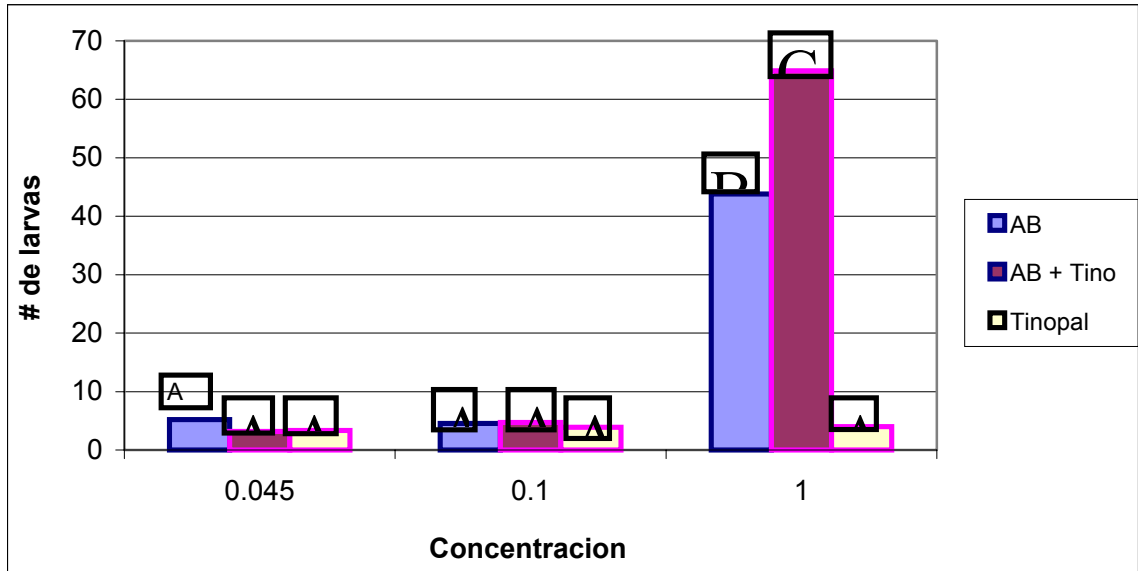


Figura 5. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente (LE) para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del tercer estadio en tres diferentes concentraciones. Zamorano, Honduras, 2002.

4° ESTADIO

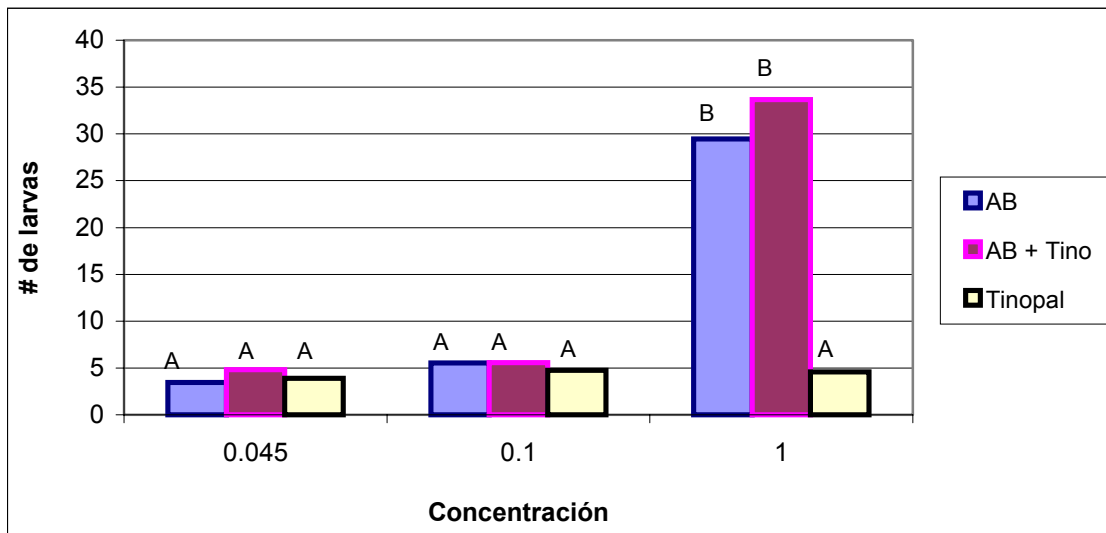


Figura 6. Medias del número de larvas muertas necesarias para obtener una larva equivalente (LE) para dos aditivos ofrecidos solos y mezclados a larvas del cuarto estadio en tres diferentes concentraciones. Zamorano, Honduras, 2002.

4.2.3 Conclusiones

1. El ácido bórico aplicado solo o mezclado con tinopal al 1% presentó los mayores porcentajes de mortalidad tanto en larvas del tercer como del cuarto estadio.
2. El ácido bórico aplicado a una concentración de 1% en la dieta presentó las mejores respuestas en la reducción del TL_{50} con una media de 2.52 días para larvas del tercer estadio.
3. Se observaron mejores respuestas en el TL_{50} en larvas del cuarto estadio en la presencia de ácido bórico + tinopal a una concentración del 1% en la dieta, con una media de 2.88 días.
4. El ácido bórico + tinopal al 0.045% redujo el número de larvas necesarias para obtener una larva equivalente a 3.17 en larvas del tercer estadio.
5. En las respuestas a LE en larvas del cuarto estadio, el ácido bórico al 0.045% requirió 3.47 larvas muertas para obtener una larva equivalente.
6. El ácido bórico aplicado solo y mezclado con tinopal a una concentración de 1% necesitó un mayor número de larvas muertas para obtener una larva equivalente tanto en larvas del tercer como del cuarto estadio.
7. Para los factores medidos (TL_{50} y LE) los aditivos evaluados a concentraciones de 0.1% en la dieta, presentaron resultados intermedios a concentraciones de 0.045% y 1% aunque no significaron diferencias significativas.

4.2.4 Recomendaciones

1. Evaluar otras alternativas de aditivos que se puedan aplicar con el ácido bórico y que tengan respuestas efectivas en TL_{50} pero que mejoren la respuesta a LE.
2. Evaluar las respuestas de VPN + ácido bórico al 1% en larvas del cuarto estadio en el campo.
3. Evaluar el efecto de ácido bórico + VPN al 1 % en larvas del quinto y sexto estadio.
4. Evaluar concentraciones mínimas de tinopal que puedan ser ofrecidas a larvas del tercer estadio pero que tengan las mismas respuestas en LE, y que impliquen un menor costo de utilización.
5. Realizar ensayos de campo con ácido bórico y tinopal, solos y mezclados.

5 CONCLUSIONES GENERALES

1. Para la producción de virus en el laboratorio se debe utilizar ácido bórico mezclado con tinopal al 0.045% en la dieta de larvas del tercer estadio.
2. Se deben inocular las larvas que pasan del tercer estadio con ácido bórico al 1% en la dieta, ya que fue el único tratamiento con el que se obtuvo mortalidad en larvas del cuarto estadio.

6 RECOMENDACIONES GENERALES

1. Para reducir las pérdidas que se tienen en el laboratorio por larvas que pasan el tercer estadio y no pueden ser inoculadas, se puede hacer uso de ácido bórico al 1%, ya que tienen buen efecto sobre larvas del cuarto estadio.
2. Aplicar ácido bórico al 1% mezclado con VPN en el campo y evaluar su efecto, ya que en el campo no nos interesa cosechar mayor cantidad de virus, sino que la larva muera más rápido y consuma menos follaje.
3. Para producción de virus en el laboratorio se pueden evaluar otros aditivos que tengan efectos fagoestimulantes como la melaza, para que la larva consuma la dieta, muera de mayor tamaño, y se pueda obtener mayor cantidad de virus por larva.
4. Informar a los agricultores que utilizan controladores biológicos de los resultados de ensayos e investigaciones que se realizan y que puedan ser adoptados por ellos para mejorar la efectividad de estos productos en el manejo de plagas.
5. Evaluar el efecto del neem en los procesos de crecimiento y desarrollo de la larva, porque se pudo observar que cuando era el tiempo en que las larvas debían convertirse en pupa, todavía las larvas a las que se les ofreció neem en la dieta, se encontraban en el tercer estadio.

7 BIBLIOGRAFÍA

ADITIVOS ALIMENTARIOS. Algunas informaciones útiles. 2001. Consultado 18 sep. 2002. Disponible en <http://milksci.unizar.es/adit/aditivos.html>

ALVES, S.B. 1986. Control Microbiano de Insectos. Sao Paolo, Brasil, 407 p

ANDREWS, K.L.; QUEZADA, J.R. 1989. Manejo Integrado de Plagas Insectiles en la Agricultura. Estado Actual y Futuro. El Zamorano, Honduras. 623 p.

ARGAUER, R.; SHAPIRO, M. 1995. Effects of pH, Temperature, and Ultraviolet Radiation on the Activity of an Optical Brightener as a Viral Enhancer for the Gypsy Moth (Lepidoptera:Lymantriidae) Baculovirus. J. Econ. Entomol. 88: 1602-1606.

ARGAUER, R.; SHAPIRO, M. 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gipsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) baculovirus. J. Econ. Entomol. 90: 416-420.

CAÑAS, L.A. 1993. Evaluación Técnico-Económica de diferentes niveles críticos para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith) en sorgo para grano. Tesis Ing. Agr. Zamorano, Honduras. 144 p.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1990. Guía para el Manejo Integrado de Plagas del Cultivo del Maíz. Serie Técnica, Informe Técnico No. 152. Turrialba, Costa Rica. 88 p.

CAVE, R. 1995. Manual para la Enseñanza del Control Biológico. Academic Press. Zamorano, Honduras. 187 p.

COPPEL, H.C.; MERTINS, J.W. 1977. Biological Insect Pest Supresión. University of Wisconsin, Department of Entomology. New York. 314 p.

CRISTOFARO, M.; DI ILIO, V.; MARCHINI, D.; NOBILI, P.; DALLAI, R. 1999. Effects of a Neem Compound on the Fecundity and Longevity of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). J. Econ. Entomol. 92(1): 76-82.

DENT, D. 1991. Insect Pest Management. Editorial CAB. Reino Unido. 604 p.

EPA (Agencia de Protección del Ambiente). Otros Insecticidas, Acaricidas y Repelentes. 2001. Consultado 30 ago. 2002. Disponible en <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/spanish/healthcare/handbook/Spch8.pdf>

Ficha de Seguridad Química & Z. Riesgos a la salud. Consultado 15 ago. de 2002. Disponible en <http://www.winklerltda.com/msds/AC-0050.htm>

- GRANADOS, R.; FEDERICI, B. 1986. The Biology of Baculoviruses: Biological Properties and Molecular Biology. Vol.1. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 275 p.
- INFOAGRO. 1999. Enemigos naturales. Consultado 2 sep. 2002. Disponible en http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/enemigosnaturales3.asp#5.1.%20VIRUS. Síntomas
- LEWIS, W.H 1983. Neem (*Azadirachta indica*) cultivated in Haiti. Economic Botany. 37 (1) 69-70.
- MARAMOROSCH, K.; SHERMAN, K. 1985. Viral Insecticides for Biological Control. Academic press. Orlando, Florida. 250 p.
- MORALES, L.; MOSCARDI, F.; SOSA, D.; PARO, F.E.; SOLDORIO, I.L. 1997. Enhanced Activity of *Anticarsia gemmatilis* Hub. (Lepidóptera:Noctuidae) Nuclear Polyedrosis by Boric Acid in the Laboratory. An. Soc. Entomol. 26(1): 115-120.
- REICHCIGL, J.E.; REICHCIGL, N.A. 2000. Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. Lewis Publishers. Orlando, Florida. 374 p.
- RIZO, C.; NARVAEZ, C. 2001. Uso y Producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear en Nicaragua. CATIE. Consultado 31 jul. 2002. Disponible en <http://www.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev61/90-96.pdf>
- SCHMUTTERER, H.; ASCHER, K.R.S. 1985. Natural Pesticides from the neem tree and other tropical plants. Editorial GTZ. Alemania. 587 p.
- SHAPIRO, M. 2000. Enhancement in Activity of Homologous and Heterologous Baculoviruses Infectious to Beet Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) by an Optical Brightener. J. Econ. Entomol. 93: 572-576.
- SHAPIRO, M.; ROBERTSON, J.; WEBB, R. 1994. Effect of Neem Seed Extract upon the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and its Nuclear Polyedrosis Virus. J. Econ. Entomol. 87: 356-360.
- SMITH, K.M. 1976. Virus-Insect Relationships. Longman Group Limited, EEUU. 291p.
- TANADA, Y.; KAYA, H. 1993. Insect Pathology. Academia Press Inc, San Diego, California. 666 p.
- VAN HUIS, A. 1981. Integrated pest management in the small farmers' maize crop in Nicaragua. Meded Land bouwhogeschool Wageningen 81-6. Países Bajos. 221p.
- WILDY, P. 1971. Classification and nomenclature of viruses. Monographs in Virology, Vol.5., Karger, Basel, 81p.

