

**Estimación de la DL₅₀ y DL₉₀ del Virus de la
Poliedrosis Nuclear *Autographa californica*
en *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea***

Ever Antonio Cruz Valdez

ZAMORANO

Diciembre, 2002

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Estimación de la DL₅₀ y DL₉₀ del Virus de la
Poliedrosis Nuclear de *Autographa
californica* en *Spodoptera exigua* y
*Helicoverpa zea***

Proyecto especial como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura.

Presentado por

Ever Antonio Cruz Valdez

Zamorano, 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

Ever Antonio Cruz Valdez

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2002

**Estimación de la DL₅₀ y DL₉₀ del Virus de la Poliedrosis Nuclear de
Autographa californica en *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea***

presentado por

Ever Antonio Cruz Valdez

Aprobada:

Alfredo Rueda, Ph. D.
Asesor Principal

Alfredo Rueda, Ph. D.
Coordinador de Área Temática

Rogelio Trabanino, M. Sc.
Asesor

Jorge Iván Restrepo, M.B.A
Coordinador Carrera de Ciencia
y Producción Agropecuaria

Antonio Flores, Ph. D.
Decano Académico

Mario Contreras, Ph. D.
Director General

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso por darme fuerza y voluntad hasta el último momento, además por haberme permitido alcanzar esta meta, por su gran amor y porque nunca se apartó de mí.

A mis padres Juan y Betty, por todo su apoyo y por ser los mejores ejemplos en mi vida.

A mis hermanos Krissian, Harold, Eneida, Joshue y Elder, porque siempre fueron mi gran apoyo, y por confiar plenamente en mí.

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso por su inmenso amor, a la Santísima Virgen María por interceder siempre por mí y por llenarme de su Santo amor

A mis padres Juan y Betty, por enseñarme tantas cosas bellas del mundo, por confiar siempre en mí y por darme su apoyo y amor de forma incondicional.

A mis hermanos por darme todo su apoyo.

A mis colegas y amigos los ingenieros Hugo, José R., Rony, Yury, Gerson, Ever A., Luciano, Victoria, Agustín, Daniel, Jaime, José Z., Enrique A., Juan José, David, Rodolfo, Norberto y a todas las colegas de mi colonia, por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos.

Al Ing. Rogel Castillo y familia, por brindarme su amistad y confianza.

Al Dr. Alfredo Rueda por su colaboración y apoyo durante el desarrollo de este trabajo.

Al Ing. Rogelio Trabanino por sus consejos, paciencia y apoyo durante mi cuarto año.

Al personal del Laboratorio de Control Biológico: Olga, Sonia, Chimino, Rosa, Nancy, al Agr. Marcos y a la Ing. Claudia Kuniyoshi, por su amistad y apoyo.

Al Ing. Ronald Estrada por haberme facilitado el material y transmitido los conocimientos básicos para la realización de este proyecto.

A todas las personas que hicieron que mi estadía en la Escuela fuese una experiencia agradable e inolvidable, en especial al Grupo Católico Promesas por haberse convertido en mi gran familia en Zamorano.

AGRADECIMIENTO A PATROCINADORES

Agradezco a todos aquellas personas y entidades que me brindaron su apoyo financiero durante estos cuatro años para poder culminar mis estudios. Gracias a:

Mi Familia

Al Instituto Salvadoreño de Formación Profesional (INSAFORP)

Al Ministerio del Exterior del Gobierno de El Salvador

A la Fundación H. de Sola

RESUMEN

Cruz, Ever. 2002. Estimación de la DL₅₀ y DL₉₀ del Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Autographa californica* en *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*. Proyecto especial del programa de Ingeniería en Ciencia y Producción Agropecuaria. Zamorano, Honduras. 27 p.

Los virus entomopatógenos son agentes promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos en programas de manejo integrado de plagas y cultivos. El objetivo de este estudio fue determinar la Dosis Letal Media (DL₅₀) y la Dosis Letal 90% (DL₉₀) con el uso en el laboratorio del Virus de la Poliedrosis Nuclear *Autographa californica* (AcVPN) en el Laboratorio de Control Biológico de Zamorano, en larvas del tercer estadio en *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*, también se estimó el Tiempo Letal Medio (TL₅₀) que nos indica en cuanto tiempo muere el 50% de los individuos a determinada dosis. Para el estudio fue necesario realizar ensayos para conocer la ventana de respuesta biológica de los insectos al AcVPN, para lo que se establecieron las crías de las especies, alimentándolas con dieta artificial y colocando sobre la superficie de ésta la solución con el virus. Se utilizó el rango de concentraciones de 5×10^5 hasta 5×10^{13} Cuerpos Poliedros de Inclusión (CPI) en ambas especies. Posteriormente se seleccionaron cinco dosis tomando como único criterio la presencia de mortalidad a la dosis mínima, la que fue de 5×10^6 CPI para *Spodoptera exigua* y de 5×10^7 CPI en *Helicoverpa zea*. A partir de ellas se eligieron cuatro dosis más un testigo, y fueron evaluadas en 40 individuos por dosis. Para el análisis estadístico se utilizó la metodología Probit con el programa PriProbit ver 1.63. Se estimó que la DL₅₀ para *Spodoptera exigua* es 5×10^7 CPI y la DL₉₀ es 7.33×10^{14} CPI con un TL₅₀ de cinco días, mientras que para *Helicoverpa zea* la DL₅₀ es 5×10^{10} y la DL₉₀ es 3×10^{15} CPI, siendo el TL₅₀ de ocho días. Con este estudio se comprueba la efectividad del AcVPN producido en *Spodoptera exigua* como hospedero, por lo que se recomienda usarse como hospedero de AcVPN para la producción en el laboratorio.

Palabras clave: Baculovirus, bioensayos, rango de acción, tiempo letal, VPN *Autographa californica*

Dr. Abelino Pitty

Nota de Prensa

OTRA ALTERNATIVA PARA EL CONTROL DE PLAGAS

Los insecticidas químicos no son la única alternativa para el control de plagas, en muchos países ya se están utilizando otras opciones como los virus entomopatógenos, los cuales han dado muy buenos resultados.

Los virus entomopatógenos como agentes de control de plagas son utilizados en diferentes partes del mundo y han dado muy buenos resultados, representan una muy buena alternativa sobre todo para los pequeños agricultores ya que la inversión inicial no es alta, y posteriormente se puede reducir el número de aplicaciones, debido a que el virus se multiplica y disemina de forma natural en el campo por lo que puede perdurar por mucho tiempo.

Este virus ya ha sido utilizado en otros países y con el se pueden controlar muchas otras plagas de importancia agrícola como el Falso Medidor del repollo (*Trichoplusia ni*), Falso medidor de la yema del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano peludo (*Estigmene acrea*) y Plutela (*Plutella xylostela*), entre otros. Además no causa ningún riesgo a la salud humana o animal, no genera resistencia en los insectos, no contamina el ambiente y también preserva los insectos benéficos.

En el Laboratorio de Control Biológico en el Zamorano, en los meses de Abril a Septiembre se realizaron estudios en los que se utilizó el Virus de la Poliedrosis Nuclear *Autographa californica* (AcVPN) para el control de gusano elotero (*Helicoverpa zea*) y gusano soldado (*Spodoptera exigua*).

El propósito de este estudio fue determinar la cantidad de virus necesario para alcanzar mortalidades mayores al 50 por ciento en el menor tiempo posible, para ello se criaron los insectos en el laboratorio para ser expuestos a diferentes cantidades de virus, y se concluyó que la dosis más apropiada para estas especies es de 5×10^7 cuerpos de inclusión para gusano soldado y de 5×10^{10} para gusano elotero. Se observó que en el laboratorio puede haber mortalidades del 50 por ciento de los individuos en tan sólo cinco días, posteriormente estos insectos muertos pueden servir de fuente de infección en el campo.

Este virus podría ser utilizado muy pronto en los programas de Manejo Integrado de Plagas (MIP) y Manejo Integrado de Cultivos (MIC), ya que es una muy buena alternativa económica y sobre todo amigable al medio ambiente.

Lic. Sobeyda Álvarez

CONTENIDO

	Portadilla.....	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas.....	iii
	Dedicatoria.....	iv
	Agradecimientos.....	v
	Agradecimiento a patrocinadores.....	vi
	Resumen.....	vii
	Nota de prensa.....	viii
	Contenido.....	ix
	Índice de Cuadros.....	xi
	Índice de Figuras.....	xii
	Índice de Anexos.....	xiii
1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	OBJETIVOS.....	2
2	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	IMPORTANCIA DEL CONTROL BIOLÓGICO.....	3
2.2	DESCRIPCIÓN DE LAS PLAGAS.....	3
2.2.1	<i>Spodoptera exigua</i>	3
2.2.1.1	Importancia.....	3
2.2.1.2	Ciclo.....	3
2.2.2	<i>Helicoverpa zea</i>	4
2.2.2.1	Importancia.....	4
2.2.2.2	Ciclo.....	4
2.3	USO DEL VPN COMO INSECTICIDA EN LA AGRICULTURA.....	4
2.4	VIRUS ENTOMOPATÓGENOS.....	5
2.4.1	Caracterización de los virus entomopatógenos.....	5
2.4.2	Familia Baculoviridae.....	5
2.4.3	Modo de acción del VPN.....	5
2.4.4	Síntomas de infección por VPN.....	6
2.4.5	Diseminación del virus.....	6
2.4.6	Control de calidad y cuantificación biológica de virus.....	7
2.5	VIRUS DE LA POLIEDROSIS NUCLEAR <i>Autographa californica</i> ...	7
2.5.1	Rango de hospederos.....	8
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
3.1	GENERALIDADES DEL EXPERIMENTO.....	9
3.1.1	Pie de Cría de <i>Spodoptera exigua</i>	9
3.2.2	Pie de Cría de <i>Helicoverpa zea</i>	9
3.3	DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE CRÍA.....	9
3.3	INOCULO INICIAL DEL VIRUS.....	10
3.4	REALIZACIÓN DE LOS BIOENSAYOS.....	10

3.4.1	Ensayo Preliminar.....	11
3.4.2	Desarrollo del Experimento.....	11
3.4.3	Variables Medidas.....	12
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	12
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
4.1	ESTIMACIÓN DE DL ₅₀ Y DL ₉₀ EN <i>Spodoptera exigua</i>	13
4.2	Estimación de DL ₅₀ y DL ₉₀ en <i>Helicoverpa zea</i>	14
4.3	Estimación de TL ₅₀ para <i>Spodoptera exigua</i> y <i>Helicoverpa zea</i>	15
5	CONCLUSIONES.....	17
6	RECOMENDACIONES.....	18
7	BIBLIOGRAFÍA.....	19
8	ANEXOS.....	22

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1	Dosis y número de individuos evaluados de cada especie.....	12
2	Ecuaciones para las respuestas en unidades probit de <i>Spodoptera exigua</i> a AcVPN.....	13
3	Ecuaciones para las respuestas en unidades probit de <i>Helicoverpa zea</i> a AcVPN.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		
1	Relación de la concentración de PIB de <i>AcVPN</i> versus proporción de respuesta en <i>Spodoptera exigua</i>	14
2	Relación concentración de PIB de <i>AcVPN</i> versus proporción de respuesta en <i>Helicoverpa zea</i>	15
3	Determinación de TL ₅₀ para <i>Helicoverpa zea</i> y <i>Spodoptera exigua</i> con el uso de <i>AcVPN</i>	16

ÍNDICE DE ANEXOS

1	Dietas para la cría de Lepidópteros en el laboratorio.....	22
2	Fotografía de las jaulas utilizadas para la cría de (A) <i>Spodoptera exigua</i> y (B) <i>Helicoverpa zea</i>	23
3	Especies del estudio: <i>Helicoverpa zea</i> larva (A), pupa (B) y adulto (C), <i>Spodoptera exigua</i> larva (F), pupa (D) y adulto (E).....	24
4	Separación de medias y varianza para <i>Spodoptera exigua</i> , en la estimación del paralelismo y la homogeneidad entre los datos.....	24
5	Relación del logaritmo de la dosis y proporción de respuestas en unidades probit, para <i>Spodoptera exigua</i>	25
6	Estimación de Dosis Efectiva (DE) para <i>Spodoptera exigua</i>	25
7	Análisis asintótico de varianza para <i>Spodoptera exigua</i>	25
8	Separación de medias y varianza para <i>Helicoverpa zea</i> , en la estimación del paralelismo y la homogeneidad entre los datos.....	26
9	Relación logaritmo de la dosis y proporción de respuestas en unidades probit, para <i>Helicoverpa zea</i>	26
10	Estimación de Dosis Efectiva (ED) para <i>Helicoverpa zea</i>	26
11	Análisis asintótico de varianza para <i>Helicoverpa zea</i>	27

1. INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de establecer un control biológico de plagas, y así poder desarrollar una agricultura sostenible y amigable al ambiente, se están usando en diferentes países virus entomopatógenos específicos que pueden ser agentes de control natural muy efectivos en muchas especies. Según Cave (1995) “estos virus son considerados entidades infecciosas cuyo genoma está constituido por ácido nucleico, ya sea de ADN o ARN, y que se reproducen en el tejido del hospedero”.

Los estudios sobre virus que atacan a los artrópodos son muy importantes porque existen más de 700 virus que tienen la capacidad para infectar especies de varios órdenes. Muchos de estos virus ocurren naturalmente en insectos de importancia agrícola. Por lo tanto, son agentes promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos en programas de Manejo Integrado de los Cultivos (MIC). Los virus entomopatógenos son microorganismos que producen enfermedades infecciosas que se multiplican en los tejidos de los insectos hasta, eventualmente, ocasionar su muerte. Son parásitos intracelulares obligados, pues no pueden reproducirse fuera de la célula huésped, ya que necesitan un organismo vivo para su multiplicación y diseminación (Rizo y Narváez, 2001).

Existe una gran diversidad de virus entomopatógenos que son específicos sin embargo, esto representa una desventaja en aquellos cultivos en los que se presenta el ataque de varias plagas es por ello, necesario tener a disposición virus con los cuales se pueda controlar un rango más amplio de plagas, como es el caso del Virus de la Poliedrosis Nuclear *Autographa californica*, el cual según Estrada (2002) controla plagas de importancia económica, entre ellas *Helicoverpa zea*, *Spodoptera exigua*, *Diatraea lineolata*, *Estigmene acrea* y *Plutella xylostela*, y otros Lepidopteros. Es por ello, que en este estudio se llevaron a cabo bioensayos para estimar la Dosis Letal media (DL_{50}) y la Dosis Letal 90% (DL_{90}) para el control de *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea* en condiciones de laboratorio. Dichas dosis nos indican la concentración necesaria para que muera el 50 y el 90 por ciento de los individuos, respectivamente.

La literatura entomológica contiene numerosos reportes con la estimación de DL_{50} y DL_{90} usados para comparar respuestas químicas (Robertson y Preisler, 1992), debido a que estas demuestran la actividad biológica del virus (Jones, 2000). Otro de los factores importantes que se determinó fue el Tiempo Letal medio (TL_{50}) que nos muestra en cuanto tiempo muere el 50% de los individuos a una concentración específica. Para dicho análisis se hizo uso del programa PriProbit Ver. 1.63 diseñado por Throne (1996) con el que podemos saber las diferentes dosis efectivas para cada especie. Throne (1995) menciona que los programas de computadoras proveen un fácil método para analizar una serie de datos de mortalidad con respecto al tiempo y a la dosis utilizada, mostrando en los resultados las respuestas estadísticas necesarias para el análisis probit, con el que se puede establecer una gráfica logarítmica de la relación dosis-respuesta para cada uno de los parámetros evaluados.

1.1 OBJETIVOS

General

Estimar en el laboratorio la Dosis Letal (DL) y el Tiempo Letal (TL) óptimos del Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Autographa californica*, en *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*.

Específicos

- Estimar el tiempo letal 50 % (TL₅₀) para cada especie.
- Estimar la dosis letal media (DL₅₀) y 90% (DL₉₀) para cada especie.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 IMPORTANCIA DEL CONTROL BIOLÓGICO

Existe un gran interés en muchos países para reducir la cantidad de plaguicidas que están siendo usados en los cultivos, los cuales muchas veces contaminan especialmente el suelo y el ecosistema acuático; reducen el hábitat de la fauna y la flora, además de los daños que causa a la salud pública. Para aumentar la producción mundial de alimentos y suplir las necesidades de una sobrepoblación humana, la producción agrícola también debe ser incrementada, preferiblemente a través del control biológico de plagas en lugar del uso de plaguicidas (Castaño-Zapata, 1994).

El uso inapropiado y el abuso de los plaguicidas han generado muchos problemas como la selección de individuos resistentes, el brote de plagas secundarias, disminución de organismos benéficos y el incremento en el riesgo directo sobre la salud de los humanos. Por estas razones es que se están realizando muchas investigaciones en el uso de prácticas para el control microbiológico como una alternativa al control químico (Metcalf y Luckmann, 1994).

2.2 DESCRIPCIÓN DE LAS PLAGAS

2.2.1 *Spodoptera exigua* (Hübner)

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

Esta especie ha ido incrementando sus daños en invernaderos en los últimos años. Esto puede deberse a la aparición de resistencias en las poblaciones de la plaga como consecuencia de la utilización de plaguicidas (INFOAGRO, 2002). Cave (2002) menciona que los principales cultivos que afecta son: cebolla, remolacha, tabaco, soya y algodón, entre otros.

2.2.1.2 Ciclo. Los huevos son colocados en grupos de 50-150 huevos por masa, normalmente la producción de huevos es de 300 a 600 por hembra, son de color blanquecino o verde, y eclosionan al tercer día. El desarrollo larval esta compuesto por cinco estadios que duran de 12 a 18 días. Las larvas normalmente tienen cinco estadios que pueden durar a 30° C, entre 2-3 días cada uno. Son de color verde pálido a

amarillo durante el 1º- 2º estadio, pero durante el tercer estadio son de color verdusco y en el cuarto estadio adquieren un color oscuro en la parte dorsal. Durante el quinto estadio su apariencia varía, tienden a ser verde dorsalmente con rosado o amarillo en la parte ventral y blanco en la parte lateral. En la etapa de pupa son de color café y miden entre 15-20 mm, este periodo dura entre 6-7 días. Los adultos miden 25-30 mm, poseen alas moteadas de gris y café, normalmente con una banda irregular y con puntos de forma circular. La longevidad del adulto es de 10 días. La oposición inicia 2 ó 3 días después de emerger, y se extiende hasta por 10 días (Capinera, 1999).

2.2.2 *Helicoverpa zea* (Boddie)

2.2.2.1 Importancia. Se le conoce como gusano del fruto o elotero, es de la Familia Noctuidae y pertenece al Orden Lepidóptera, se encuentra en la mayor parte del hemisferio occidental. Es un insecto polífago de gran importancia económica en maíz, sorgo, tabaco, tomate, frijol, girasol y otros cultivos (Navarro, 2002).

2.2.2.2 Ciclo. Los huevos son aproximadamente de 0.5 mm de diámetro, de color blancos a verdes, eclosionan al tercer día. Las larvas pasan por seis estadios alcanzando de 30 a 40 mm de longitud. El color del cuerpo varía desde verde, amarillo, rosado y café rojizo, a casi negro, y la cabeza es usualmente gris pálido, también posee líneas finas, onduladas o quebradas que recorren su cuerpo, esta etapa dura 20 días aproximadamente. Las pupas poseen entre 14-20 mm de longitud son de color café oscuro, y emergen al séptimo día. Los adultos miden de 35 a 40 mm y el rango de colores es desde verde grisáceo a anaranjado oscuro. Sus alas están rodeadas por líneas oscuras y una banda de color café (DEFRA, 2000).

2.3 USO DEL VPN COMO INSECTICIDA EN LA AGRICULTURA

Según Castaño-Zapata (1994) considerando solamente al hemisferio occidental, alrededor del 30% de las plagas que afectan a la agricultura son susceptibles a virus, específicamente a los Baculovirus. Por lo tanto, los beneficios económicos potenciales de su desarrollo y uso son promisorios.

D´amico (2000) menciona que se han realizado liberaciones exitosas de estos virus en el Reino Unido y en EE.UU. Compañías como Dupont, Biosys, American Cyanamid y Agrivirion, entre otras están trabajando en el desarrollo de insecticidas virales. Recientemente, Biosys ha lanzado dos productos basados en Baculovirus genéticamente modificados (Spod-X y Gemstar). El primero para controlar *Spodoptera exigua*; y el segundo para *Heliothis (=Helicoverpa) zea*.

VPN *Autographa californica* tiene un amplio rango de hospederos, a sido evaluado para el control de diferentes plagas de insectos, en Estados Unidos esta registrado para el control de *Heliothis virescens* y *Trichoplusia ni*. Experimental y comercialmente el uso de VPN *Autographa californica* es reportado en Centroamérica (OECD, 2002) en donde se aplica aproximadamente en 17800 hectáreas anualmente (Estrada, 2002).

2.4 VIRUS ENTOMOPATÓGENOS

Los virus entomopatógenos específicos pueden ser agentes de control natural muy efectivos en muchas especies de larvas de lepidópteros. Muchas cepas del Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) y del Virus de la Granulosis (VG) se encuentran en bajo nivel en muchas poblaciones de insectos. Pero cuando se desatan epizootias pueden devastar a las poblaciones de algunas plagas, principalmente cuando éstas son altas (SANINET, 2002).

2.4.1 Caracterización de los virus entomopatógenos

Para clasificar los virus se toman en cuenta principalmente dos factores: el tipo de ácido nucleico y la presencia o ausencia de cuerpos de inclusión (Castillo *et al.*, 1995). Los virus se denominan después del binomio Latino del insecto del cual han sido aislados, por ejemplo, *Autographa californica* VPN y *Choristoneura fumiferana* VPN (Castaño-Zapata, 1994).

2.4.2 Familia Baculoviridae

La familia Baculoviridae, según Castaño-Zapata (1994) contiene solo un género, Baculovirus, dentro del cual se encuentran los Virus de la Poliedrosis Nuclear (VPN) y los Granulovirus (GV), los que tienen un gran potencial como agentes de control biológico.

Castillo *et al.* (1995) mencionan que esta familia es considerada como la más importante en el control de insectos ya que, ataca muchas de las plagas de importancia económica en varios cultivos. Las principales características de esta familia son:

- El genoma de estos virus está compuesto de una partícula de ADN.
- El ácido nucleico se encuentra envuelto por una capa proteica llamado cápsido.
- El cápsido y la molécula de ADN forman la unidad infectiva denominada virión.
- Los viriones envueltos en una matriz proteica forman el conjunto conocido como cuerpos poliédricos de inclusión.

Los nucleocapsidos son de 30-55 nm de diámetro y de 250 a 300 nm de largos, contienen una cadena superembobinada de forma circular con una doble cadena de ADN de 90-160 kb. Los cuerpos de inclusión son formados en el núcleo de la célula infectada y pueden ser fácilmente detectados en el microscopio en la fase contrastante o campo oscuro, como partículas de alta refracción, que pueden ser vistos a 40X (OECD, 2002).

2.4.3 Modo de acción del VPN

Los Baculovirus contaminan a los insectos por vía oral, los viriones son ingeridos con el alimento después de la ingestión, los poliedros del VPN que contienen los viriones se disuelven en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 7.5$) del intestino medio y se liberan los

Virus Poliedro-Derivados (VPD). Los VPD pasan a través de la membrana peritropica, una capa proteica-quitinica que es secretada por las células del intestino medio, que protege el epitelio del contacto directo con el material ingerido. Después de adherirse a las microvellosidades del epitelio del intestino medio, los núcleocapsides penetran el lumen de las células o por fusión de los viriones envueltos con la membrana epitelial, donde el virus normalmente realiza su primera vuelta de replicación. Los microcapsides son transportados, más comúnmente dentro de las envolturas de las estructuras microtubulares de las células, a los núcleos y llegan a liberarse en los poros nucleares o en los núcleos donde el ADN viral es liberado, la expresión y replicación es iniciada. Las siguientes etapas y las infecciones secundarias inician por el crecimiento de viriones en los tejidos hospederos. En las primeras etapas (8 horas post infección) de infección los núcleos desarrollan hipertropismo y un estroma virogenico es formado cuando la replicación del ADN y la liberación de los nucleocapsides suceden. La síntesis de las proteínas de las células hospederas es completada 24 horas post infección (OECD, 2002). Posteriormente, el virus afecta otros tejidos susceptibles del hospedero, donde continua reproduciéndose y multiplicándose. Otros tejidos atacados son principalmente cuerpo graso, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda (Cave, 1995).

2.4.4 Síntomas de infección por VPN

El primer síntoma es un hinchamiento de los segmentos, seguido por una anorexia y el insecto cesa de alimentarse. Las larvas infestadas por VPN suben a las partes superiores de las hojas y se cuelgan de las propatas permaneciendo con la cabeza hacia abajo. El integumento se vuelve blando y de un color oscuro. Al momento de la muerte ocurre una licuefacción de los tejidos internos por lo que la larva queda con una textura blanda, lo que facilita la diseminación del virus al permitir un fácil rompimiento de las membranas y la liberación de los viriones (Castillo *et al.*, 1995). La muerte de las larvas se da en un período promedio de siete días después de la ingestión de VPN reduciendo su alimentación en un 93% a partir de la ingestión hasta la muerte de la larva (Navon y Ascher, 2002).

2.4.5 Diseminación del virus

Los cadáveres de las larvas muertas representan una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles presentes en un cultivo. Cuando las membranas corporales de la larva se rompen liberan una gran cantidad de poliedros (cuerpos de inclusión) al ambiente (Hostetter, 1985) tanto el agua de lluvia, como las larvas caídas al suelo, transportan las partículas virales hasta el suelo, donde permanecen y serán el inóculo inicial para futuras infecciones. La diseminación de estos virus puede darse por factores bióticos y abióticos ya sea verticalmente (de una generación a otra) u horizontalmente (de un hospedero susceptible a otro) (Van Driesche, 1996).

La transmisión vertical se da principalmente al momento de la ovoposición y por la contaminación de la superficie de los huevos y puede darse de tres formas que son: por la contaminación directa de la superficie de los huevos (*transovum*), la infección de huevos dentro del sistema reproductivo de la hembra (*transovarial*) y cuando el patógeno (virus) pasa a través de algunas fases o por todo el ciclo de vida del

hospedante (*transstadial*). La transmisión horizontal se da principalmente por los adultos del hospedero y por otros organismos como depredadores y parasitoides; también puede haber diseminación por factores abióticos como la lluvia, el viento (en forma de polvo y aerosoles) y movimientos de cuerpos naturales de agua (Hostetter & Bell, 1985).

2.4.6 Control de calidad y cuantificación biológica de virus

Para controlar la calidad de los virus se requiere controlar principalmente el número y tipo de población presente. La calidad está asociada con la potencia biológica o virulencia de los virus. Se usan individuos totalmente susceptibles y se mide la capacidad de infección de los virus. La cuantificación de los virus se hace mediante conteos de cuerpos de inclusión (PIB, por sus siglas en inglés) por unidad de volumen, área u hospedero (Alves, 1986).

Generalmente se usa el parámetro de larva equivalente (LE) que indica un número estandarizado de cuerpos de inclusión (PIB) producidos por una larva criada, inoculada y cosechada en las condiciones óptimas (Estrada, 1994). Esta medida es un poco imprecisa si se habla del número de viriones ya que no existe una completa relación lineal entre PIB's y viriones infectivos. Esta medida varía según el virus y la especie del hospedero (Alves, 1986). Para el VPN de *S. frugiperda* se usa la concentración de 6×10^9 PIB's por larva equivalente (Santos, 1998), para VPN *Spodoptera albula* es 6×10^{10} (Estrada, 2002).

2.5 Virus de la Poliedrosis Nuclear *Autographa californica*

Virus de la Poliedrosis Nuclear *Autographa californica*, acorde con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Francki *et al.*, 1991), también es conocido como Virus de la poliedrosis nuclear multicapside *Autographa californica* (AcMVPN o AcVPN), y las propiedades de estas partículas son representativas del subgénero Virus Nucleocapside Múltiples (MVPN), donde los viriones pueden contener algunos o múltiples nucleocapsides dentro de una envoltura viral. La proteína de inclusión específica es referida como un poliedrin y envuelve nucleocapsides liberados desde la poliedra y son referidos como Virus Poliedra-Derivados (VPD). Los viriones que no han sido liberados y que naturalmente se liberan desde células infectadas son referidos como virus extracelulares (VEC).

En este proceso la transcripción de genes virales depende de ARN polimerasa II, que es sensitiva a alpha-amanitin. Estos genes son necesarios para la regulación de la transcripción del gen viral, la replicación de ADN viral y la expresión del gen de retraso. Los genes tienen un universal e invariable sitio inicial de transcripción que es (A/G/T)TAAG por un codón viral de ARN polimerasa insensitivo a alpha-amanitin. Cinco genes estimuladores iniciales (dnapol, p35, ie-2, lef7, y pe38) y cinco esenciales (p143, ie-1, lef-1, lef-2, y lef-3) fueron identificados en la replicación de ADN de AcMVPN. Además, estudios expresan que el uso de acetil cholamfenicol transferasa (cat) reporta genes de control de retraso y promotores de retraso (vp39, p6.9, poliedrin, p10) y que ocho genes de AcMVPN (los que son necesarios para la replicación de ADN y lef-4, lef-5, lef-6, lef-8, lef-9, lef-10, lef-11, p47, y 39K) fueron

esenciales para la expresión óptima desde estos promotores. Sin embargo, existe evidencia en que un Baculovirus que infecta diferentes hospederos dependen de genes específicos que establecen la infección y la replicación del virus, ese conjunto de genes puede cambiar no significativamente de una especie a otra (OECD, 2002).

2.5.1 Rango de hospederos

Según Estrada (2002) las principales plagas que afecta el Virus de la Poliedrosis Nuclear *Autographa californica* son: Falso medidor del repollo (*Trichoplusia ni*), falso medidor pata negra (*Pseudoplusia includens*), medidor de la alfalfa (*Autographa californica*), gusano de la yema del tabaco (*Heliothis virescens*), gusano soldado (*Spodoptera exigua*), barrenador del tallo del maíz (*Diatraea lineolata*), gusano peludo (*Estigmene acrea*), gusano elotero (*Helicoverpa zea*) y Plutela (*Plutella xylostella*); Kaya (1977) menciona también *Anagrapha falcifera* (Kirby), *Pectinophora gossypiella* (Saunders), *Halisidota caryae* (Harris), *Bucculatrix thurberiella* (Busck), *Galleria mellonella* (L.), *Alsophila pometaria* (Harris), *Hyphantria cunea* (Drury), *Malacosoma americanum* (F.), *Ennomos subsignarius* (Hübner), *Eupsilia sp.*, *Xylena curvimacula* (Morrison) y *Anisota senatoria* (Smith).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 GENERALIDADES DEL EXPERIMENTO

El presente experimento se desarrolló en el Centro de Control Biológico de Centro América (CCBCA) de la Escuela Agrícola Panamericana, Valle del Yeguaré, Zamorano, Honduras. Utilizando el pie de cría de *Helicoverpa zea*, y siendo necesario establecer el pie de cría para *Spodoptera exigua*.

3.1.1 Pie de cría de *Spodoptera exigua*

Las larvas para establecer la cría de *Spodoptera exigua* fueron recolectadas en Nicaragua, e identificadas en el CCBCA utilizando la clave de Caballero *et al* (1994). Para comenzar con la cría se hicieron dos selecciones de las larvas con el propósito de uniformizar en tamaño y coloración. Una vez estandarizada se procedió a desarrollar la cría en mayor escala.

3.1.2 Pie de cría de *Helicoverpa zea*

La cría de *Helicoverpa zea* ya establecida en el laboratorio y su origen eran larvas provenientes de los campos de producción de maíz dulce en Zamorano, por lo que solamente fue necesario seleccionar una jaula con 20 individuos para poder establecer la cría para el experimento.

3.2 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE CRÍA

El método que se utilizó fue el de producción *in vivo*, que consiste en la producción de virus en insectos hospederos vivos, ya que según Román (1998) éste es un parásito obligado, y actualmente es el más utilizado para obtener material utilizable en los insecticidas virales. El crecimiento y vigor de las larvas del insecto hospedero dependen de varios factores como son nutrición, tamaño del recipiente de cría, temperatura, humedad, densidad poblacional, la relación machos:hembras y la luz (Sherman, 1985), por lo que esto fue determinante para el desarrollo de las larvas.

Para la cría de ambas especies se utilizó el método descrito por Trabanino (2001) que consiste en proporcionarles a las larvas dieta artificial (Anexo 1) para su alimentación y todos los procedimientos apropiados para postura y desarrollo de las larvas en copitas plásticas de una onza, donde se colocó 6-7 ml de dieta artificial.

Las larvas fueron criadas en dieta artificial hasta la etapa de pupa, después de la cual fueron recolectas y lavadas durante dos minutos con agua destilada con el propósito de remover los residuos de dieta (Estrada, 1992), posteriormente fueron colocadas en platos petri hasta la emergencia de los adultos.

Para la cría de *Spodoptera exigua* los adultos (3 ó 4 parejas) eran colocados en jaulas de malla metálica (Anexo 2), los que se alimentaban de una solución mielosa colocada en un recipiente con algodón. Para la ovoposición eran colocadas dentro de las jaulas tiras de papel bond, dichas tiras de papel eran colectadas cada dos días y las masas puestas eran removidas en tiras de papel que median 7 cm de largo por 0.5 cm de ancho, las tiras eran colocadas en vasitos con dieta artificial hasta que las larvas eclosionaban (3-4 días después de haber sido ovopositadas). Una vez eclosionadas las larvas estas eran colocadas en copitas con dieta artificial colocando cuatro larvas de primer estadio por copita, donde las larvas completaban su desarrollo.

En *Helicoverpa zea* los adultos (5-10 parejas) eran colocados en jaulas de tela de manta (Anexo 2), los que eran alimentados con una solución mielosa colocada en un recipiente con algodón. Las hembras depositan los huevos sobre la tela de manta, los que eran cosechados todos los días. La metodología en la cosecha de los huevos consistía en invertir la tela para sumergirla en una solución de cloro comercial al 2 % para que los huevos se desprendieran. Al haberse desprendido todos los huevos de la tela, se extrajeron del recipiente por decantación, utilizando un pedazo de tela de manta donde eran colectados para posteriormente mantenerlos sobre un flujo de agua potable durante 30-40 segundos con el propósito de remover los residuos de cloro, después eran ubicados sobre papel toalla para secarlos. Una vez secos se ubicaron en las copitas sin dietas para esperar la eclosión (3-4 días). Posteriormente las larvas recién eclosionadas eran colocadas individualmente en copitas con dietas desde que nacían hasta completar su desarrollo.

3.3 INÓCULO INICIAL DEL VIRUS

El inóculo inicial de VPN *Autographa californica* fue obtenido de la Empresa Agrícola “El Sol”, proporcionado por el ingeniero Ronald Estrada, propietario de dicha empresa.

3.4 REALIZACIÓN DE LOS BIOENSAYOS

Una vez establecidas las crías se procedió a realizar los diferentes bioensayos.

3.4.1 Ensayo preliminar

Con el objetivo de determinar el rango de acción biológica del virus en ambas especies, se procedió a evaluar presencia de mortalidad en larvas de tercer estadio, no se midió tiempo ni cantidad de larvas muertas.

Se evaluaron 30 individuos por especies, no se realizó ningún análisis estadístico sobre los resultados, ya que para determinar la ventana de respuesta biológica, bastó con la

observación; debido a que el único parámetro que se evaluó fue mortalidad. Los datos eran recolectados cada 24 horas hasta que moría el 100% de los individuos con cualquiera de las dosis, o hasta que los individuos llegaban a la etapa de pupa, y los criterios utilizados en esta etapa eran determinar cuál era la dosis mínima a la que comenzaban a morir los individuos y también cuál era la dosis máxima en que mueren el total de los individuos en el menor tiempo posible.

Las concentraciones evaluadas fueron desde 5×10^4 hasta 5×10^{14} cuerpos de inclusión (PIB, por sus siglas en ingles).

3.4.2 Desarrollo del experimento

Una vez seleccionada la ventana de respuesta biológica se seleccionó la menor concentración a la cual las dos especies respondieron, a partir de ello se seleccionaron cinco dosis más un testigo y con ellas se desarrollaría la siguiente etapa.

Las dosis seleccionadas para *Spodoptera exigua* fueron desde 5×10^6 hasta 5×10^{10} PIB, mientras que para *Helicoverpa zea* desde 5×10^7 hasta 5×10^{11} PIB, con las cuales se estimó la DL_{50} que nos dice la dosis con la que muere el 50% de los individuos en un tiempo determinado, la DL_{90} que nos indica la dosis a la que muere el 90% de los individuos y el TL_{50} nos dice en cuanto tiempo, a una concentración conocida, muere el 50% de los individuos.

Una vez las larvas llegaron a tercer estadio fueron evaluadas a diferentes concentraciones de virus, las cuales eran colocadas sobre la dieta inoculada con VPNAc, las larvas eran revisadas periódicamente hasta que morían. Las larvas muertas se colectaban de los vasitos con pinzas entomológicas para luego ser almacenadas en recipientes plásticos los que eran colocados en refrigeración a 2 - 4 °C hasta el momento de hacer el conteo de los cuerpos de inclusión (PIB).

Para determinar el número de individuos para cada ensayo Sakuma y Throne (2000) mencionan que al usar el programa PriProbit Ver 1.63, se recomienda usar diferente número de individuos para cada tratamiento ya que, los resultados son expresados como una proporción de respuesta y de esta forma se reduce el error estándar y el número de sujetos es el total de individuos para todas las concentraciones, este programa puede analizar teniendo hasta 200 individuos por tratamiento, en LeOra Software (1987) se menciona que en análisis de laboratorio con larvas de lepidópteros no existe variación entre los resultados al incluir en los tratamientos más de sesenta individuos, mientras que Jones (2000) concluye que el número mínimo de larvas que se pueden utilizar en un análisis estadístico es de 20 individuos por tratamiento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Dosis y número de individuos evaluados de cada especie.

Dosis (PIB)	No. de individuos evaluados	
	<i>S. exigua</i>	<i>H. zea</i>
5,00E+06	60	-
5,00E+07	30	45
5,00E+08	30	44
5,00E+09	44	45
5,00E+10	28	45
5,00E+11	-	45

3.4.3 Variables medidas

Las variables medidas son las requeridas por el modelo estadístico utilizado (Probit) en el que se necesita conocer la cantidad de larvas expuestas al tratamiento y la respuesta de estas en un periodo de tiempo. Las variables medidas fueron:

- Número de larvas muertas por día
- Número de días para que muera un 100% de la población
- Número de larvas muertas necesarias para producir una larva equivalente.

Este último parámetro se estimo con el propósito de poder observar el comportamiento infectivo del virus en cada una de las especies.

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para el análisis de datos se utilizó el programa PriProbit *ver. 1.63*, el cual según Throne (1998) es exclusivo para calcular dosis letales, el que provee modelos de regresión para una gran variedad de dosis-respuestas, este programa utiliza el modelo Probit. Marcus y Eaves (1999) mencionan que el modelo probit es comúnmente usado para describir la relación entre la concentración y la mortalidad, la que es expresada como:

$$\zeta(x) = F(\alpha + \beta x) \quad [1]$$

Cuando $x \Rightarrow 0$, donde F representa la función de la distribución normal acumulada, α y β son parámetros desconocidos. $F^{-1}(\zeta)$ denota la función inversa de F, la que muestra un valor único. La Y que corresponde a la probabilidad ζ de una mortalidad acumulada, la función es:

$$Y = b + mx \quad [2]$$

Donde Y representa la probabilidad acumulada, b, es el coeficiente de correlación, m es la pendiente de la grafica y x la dosis utilizada, cuando los datos son analizados como el Log (dosis) este valor puede ser reemplazado en la ecuación 2.

PriProbit es un programa estadístico que analiza la correlación entre la intensidad del estímulo (dosis) y la cantidad de organismos que responden. La cantidad de respuestas puede ser expresada como una probabilidad binomial de respuesta por sujeto. También

estima la correlación lineal entre las desviaciones de la distribución y la dosis logarítmica aplicada al modelo de distribución de los datos observados, como una dosis media efectiva (DE_{50}) donde el 50% de los organismos de la población pueden presentar respuesta (Throne, 1998).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 ESTIMACIÓN DE DL₅₀ Y DL₉₀ EN *Spodoptera exigua*

Al utilizar un modelo probit para obtener la relación dosis-respuesta con el uso de VPN *Autographa californica* a diferentes concentraciones usando como hospedero larvas de *Spodoptera exigua* en tercer estadio se observó homogeneidad entre los datos y paralelismo entre las diferentes concentraciones (Anexo 4) no mostrando diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) ajustándose a las ecuaciones obtenidas para cada día (Cuadro 2).

La relación entre el logaritmo de la dosis y las unidades probit, muestra que las repuestas favorables en unidades probit (mayores a cinco) se presentan a partir del quinto día, utilizando una concentración de 5×10^7 PIB (Anexo 5), debido a que la cantidad de larvas muertas es superior al 50 por ciento (Figura 1).

También se puede mencionar con un 95% de confianza que la dosis media efectiva (DE₅₀) para el quinto día es de $8,29 \times 10^7$ PIB (Anexo 6), si se desea alcanzar una mortalidad de 90% para el mismo periodo de tiempo sería necesario incrementar la dosis a $7,33 \times 10^{14}$ PIB, lo que además incrementa la probabilidad de controlar mayor número de insectos, Robertson y Preisler (1992) mencionan que esto se debe a que la mortalidad es afectada por la actividad biológica del virus, y esto se muestra al reducir a cuatro días el periodo en que muere el 50% de los individuos, para lo que se necesita incrementar la dosis a $2,08 \times 10^{12}$ PIB, y si de igual manera extendemos el periodo de tiempo a seis días se necesita una concentración de $1,16 \times 10^3$ PIB. El análisis de potencia relativa ayuda a entender mejor la relación de la actividad biológica del virus a través del tiempo, utilizando como comparador la dosis media efectiva ($8,29 \times 10^7$ PIB) al cuarto día, se concluye ($p > 0.05$) que el virus es 4.39 veces menos activo que el quinto día (Anexo 7).

Cuadro 2. Ecuaciones para las respuestas en unidades probit de *Spodoptera exigua* a AcVPN. Zamorano, Honduras, 2002.

Día	Ecuación
4	$Y = -2,2722097 + 0,184498X$
5	$Y = -1,4610149 + 0,184498X$
6	$Y = -0,5659599 + 0,184498X$
7	$Y = 0,2910644 + 0,184498X$
8	$Y = 0,8300216 + 0,184498X$

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

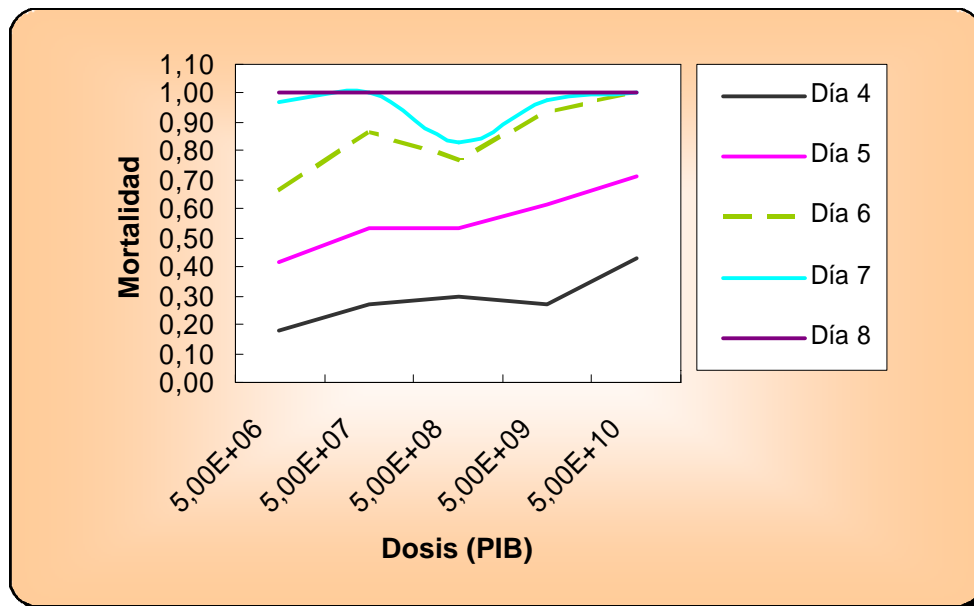


Figura 1. Relación de la concentración de PIB de AcVPN versus proporción de respuesta en *Spodoptera exigua*. Zamorano, Honduras, 2002.

4.2 Estimación de DL_{50} y DL_{90} en *Helicoverpa zea*

Para producir VPN *Autographa californica* utilizando como hospedero larvas de *Helicoverpa zea* en el tercer estadio, es necesario utilizar concentraciones de virus mayores a 5×10^{10} PIB para que mueran más del 50 % de las larvas en el octavo día (Grafica 2). Con el análisis estadístico se observa que no existe diferencia estadística significativa entre lo esperado y lo observado, por lo que los datos se ajustan al modelo Probit ($p > 0.05$), mostrando homogeneidad y paralelismo (Anexo 8) entre la proporción de respuesta y las diferentes concentraciones ajustándose a las ecuaciones estimadas para cada día (Cuadro 3).

Con la relación dosis-respuesta en unidades probit (Anexo 9) se determinó que con 5×10^{10} PIB en el octavo día murió el 50% de los individuos. En la estimación de la dosis efectiva (DE) para el mismo periodo de tiempo se obtuvo que la DE_{50} es de 7×10^{10} PIB, y se necesita de una dosis de 3×10^{15} PIB para que muera el 90% de los individuos (DE_{90}) en el mismo periodo de tiempo (Anexo 10).

El análisis de potencia relativa, usando como comparador la dosis efectiva media, muestra en su análisis asintótico de varianza, que al octavo día es cuando se da la mejor actividad biológica del virus, siendo 3.85 veces más activo que el día siete, pero es cinco veces menos activo que el día nueve (Anexo 11).

Cuadro 3. Ecuaciones para las respuestas en unidades probit de *Helicoverpa zea* a AcVPN. Zamorano, Honduras, 2002.

Día	Ecuación
6	$Y = - 2,7268422 + 0,165698X$
7	$Y = - 2,5236479 + 0,165698X$
8	$Y = - 2,2213549 + 0,165698X$
9	$Y = - 1,5621281 + 0,165698X$
10	$Y = - 1,0545879 + 0,165698X$

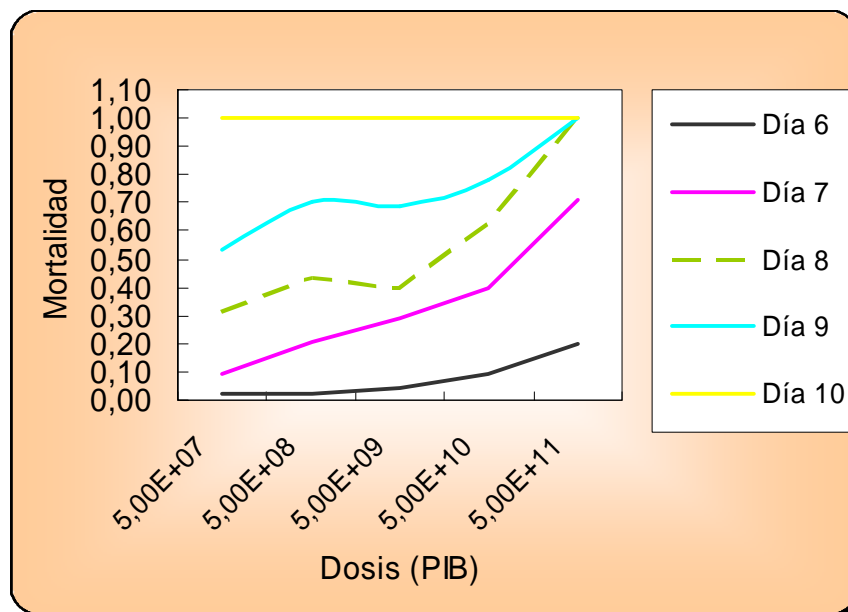


Figura 2. Relación concentración de PIB de AcVPN versus proporción de respuesta en *Helicoverpa zea*. Zamorano, Honduras, 2002.

4.3 Estimación de TL_{50} para *Spodoptera exigua* y *Helicoverpa zea*.

En la estimación del tiempo letal medio (TL_{50}) se observó (Figura 3) que para *Spodoptera exigua* este se da el día cinco después de inoculado (120 horas), mientras que para *Helicoverpa zea* se da hasta el octavo día (192 horas), la diferencia puede estar altamente influenciada por la cantidad de alimento ingerido por las larvas, como también que de forma natural exista un mecanismo de detoxificación bioquímica que retrase la tasa de replicación del virus (Robertson y Preisler, 1992), estadísticamente esto se muestra con la estimación de la potencia relativa la cual esta poco influenciada por la correlación entre las variables (Throne, 1996), en el presente estudio se observó que la actividad del virus incremento de forma más rápida en *Spodoptera exigua* que en *Helicoverpa zea*.

El análisis asintótico de varianza (Anexo 7) muestra que al comparar DL_{50} (5×10^7 PIB) del quinto día, en *Spodoptera exigua*, contra la actividad del virus en los demás días se observa que ésta aumenta de forma paulatina siendo el día cinco 4.39 veces más activo que el día cuatro, de igual forma es 4.85 veces menos activo que el día seis. Este análisis también muestra que en *Helicoverpa zea* al usar como comparador la DL_{50} (5×10^{10} PIB) del octavo día (Anexo 11) la actividad del virus aumenta 5.02 veces para el día nueve y 8.52 veces para el día diez.

También se puede observar la actividad biológica del virus al comparar la pendiente de las ecuaciones obtenidas para ambas especies (Cuadro 2 y 3).

Al utilizar las ecuaciones obtenidas para cada día en ambas especies (Cuadro 2 y 3), y utilizando como constante las DL_{50} obtenidas del análisis probit se puede estimar el TL_{50} que es de 120 horas post infección para *S. exigua* y 192 horas para *H. zea*.

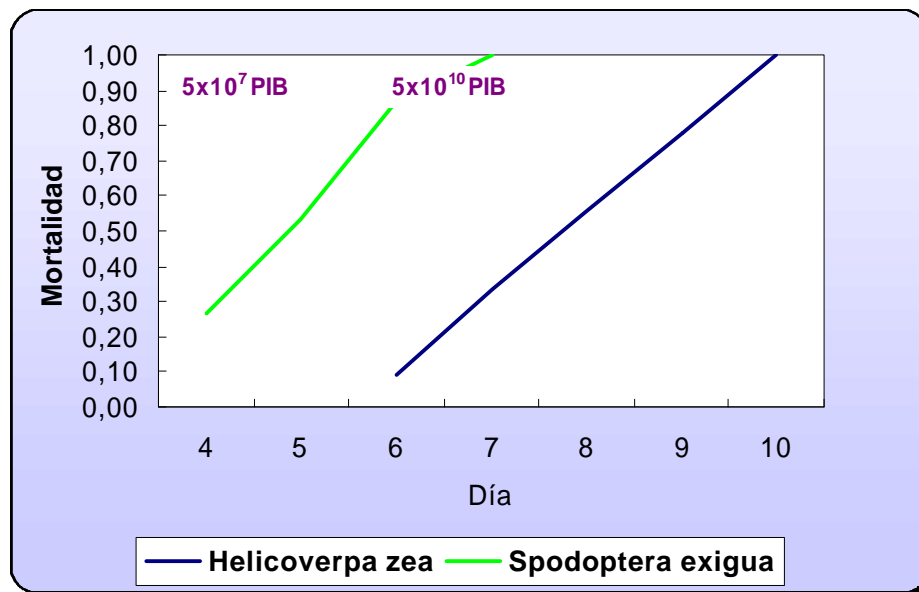


Figura 3. Determinación de TL_{50} para *Helicoverpa zea* y *Spodoptera exigua* con el uso de VPNAc. Zamorano, Honduras, 2002.

5. CONCLUSIONES

En el estudio se estimaron los siguientes parámetros:

Para *Spodoptera exigua*:

1. $DL_{50} = 5 \times 10^7$ PIB
2. $DL_{90} = 7 \times 10^{14}$ PIB
3. $TL_{50} = 5$ días
4. Una larva equivalente (5×10^9 PIB/ml) = 3.5 larvas vivas

Para *Helicoverpa zea*:

1. $DL_{50} = 5 \times 10^{10}$ PIB
2. $DL_{90} = 3 \times 10^{14}$ PIB
3. $TL_{50} = 8$ días
4. Una larva equivalente (5×10^9 PIB/ml) = 3.2 larvas vivas

6. RECOMENDACIONES

Probar VPN *Autographa californica* en otras plagas de importancia en la zona.

Para producción de VPNAc en el laboratorio se recomienda usar 5×10^7 PIB, y si desea utilizar en el campo la dosis a probar es de 5×10^{10} PIB, ya que se observarían mortalidades altas en especies como *H. zea* la cual necesita mayor cantidad de virus.

Utilizar este virus en programas de Manejo Integrado de Cultivos (MIC).

7. LITERATURA CITADA

- Alves, S. B. 1986. Controle microbiano de insetos. Editora Manole. Sao Paulo, Bra. 176- 178 p
- Caballero, R.; Habeck, D.; Andrews, K. 1994. Clave ilustrada para larvas de Noctúidos de importancia económica de El Salvador, Honduras y Nicaragua. Revista CEIBA, Zamorano Academic press. Zamorano, Honduras. 35(2): 225-237
- Capinera, J. 1999. Beet Armyworm (en línea). Consultado 10 Sept. 2002. Disponible en: http://creatures.ifas.ufl.edu/veg/leaf/beet_armyworm.htm
- Castaño-Zapata, J. 1994. Principios básicos de fitopatología. 2da. Edición. Zamorano Academic press. Zamorano, Honduras. 538p
- Castillo, P.; Acosta, N.; Ciliézar, A. 1995. Control microbiológico de plagas artrópodos. *In*: Manual para la Enseñanza del Control Biológico en América Latina. Ed. by Cave, R. D. El Zamorano, Hond. Zamorano Academic Press, 13 p
- Cave, R. 1995. Manual para la enseñanza del control biológico en América Latina. Escuela Agricola Panamericana. Zamorano, Honduras. 187 p.
- DEFRA (Department for Environment, Food and Rural Affairs) 2000. *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (en línea). Consultado 19 Sept. 2002. Disponible en: <http://www.defra.gov.uk/planth/pestnote/helicov.htm>
- D'amico, V. 2000. Baculovirus (en línea). Consultado 1 Nov. 2001. Disponible en: <http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/baculovirus.html>
- Estrada, R. 1992. Producción masiva de *Spodoptera sunia* y *S. exigua*. Revista Ceiba. Zamorano Academic press. Zamorano, Honduras. 33(1): 161-173
- Estrada, R. 1994. Producción y uso de los virus VPN 80 y VPN 82 para el control de *Spodoptera sunia* y *S. exigua* en Guatemala. *In*: Anales del curso y foro subregional Centroamericano y del Caribe de Control Biológico de Plagas. Mario A. Vaughan (ed.). Compu-Vaughan, Managua, Nicaragua. 7: 32-40.
- Estrada, R. 2002. Productos Agricola el Sol (en línea). Consultado 24 Abr. 2002. Disponible en: www.agricolaelsol.com
- Francki, R.; Fauquet, C.; Knudson, D.; Brown, F. 1991. Classification and Nomenclature of Viruses. Fifth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, USA. 123p

Hostetter, D. L. 1985. Natural dispersal of baculovirus in the environment. *In: Viral Insecticides for Biological Control*. Ed. by Maramorosch, K. y Sherman, K. Orlando, Fla., Academic Press. 255p.

INFOAGRO, 2002. Manejo de lepidópteros plaga (en línea). Consultado 29 Abr. 2002. Disponible en:
http://www.infoagro.com/hortalizas/lepidopteros_plaga.asp#2.%20CICLO%20DE%20VIDA%20Y%20MORFOLOGÍA

Jones, K. 2000. Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes. CAB International, Bet Dagan, Israel 336p

Kaya, H. 1977. Transmission of a Nuclear Polyedrosis Virus isolated from *Autographa californica* to *Alsophila pometaria*, *Hyphantria cunea*, and other forest defoliators. *J. Econ. Entomol.* 70: 9-11

LeOra Software, 1987. POLO-PC a user's guide to Probit or Logit. LeOra Software. California, United State of America. 22p

Marcus, R.; Eaves, D. 2000. Statistical and computational analysis of bioassay data. CAB International, Bet Dagan, Israel 290p

Metcalf, R. L.; Luckmann, W.H. 1994. Introducción al manejo de plagas de insectos. Editorial Limusa, México D.F., México. 124p

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2002. Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving baculovirus. Head of Publications Service. Paris, Francia. 89p

Rizo, C; Narváez, C. 2001. Uso y producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear en Nicaragua. *Revista Manejo Integrado de Plagas.* 61: 90-96

Robertson, J.; Preisler, H. 1992. Pesticide bioassays with arthropods. CRC, Boca Ratón, FL 121p

Román, D. X. 1998. Bioensayos de campo y análisis económico de la producción del Virus de la Poliedrosis Nuclear *Spodoptera frugiperda*. Tesis Ing. Agr. Escuela Agrícola Panamericana, Honduras. 89p

Sakuma, M.; Throne, J. 2000. The instructions for PriProbit ver. 1.63. Kyoto University, Kyoto, Japan. 26p

SANINET, 2002. Virus Entomopatógenos (en línea). Consultado 20 feb. 2002. Disponible en:
<http://www.iicasaninet.net/pub/sanveg/html/biocontrol/patogenos/virus.html>

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

Throne, J. 1995. Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol.* 88(5): 1510-1512

Throne, J. 1996. PriProbit Program (en línea). Consultado 12 Abr. 2002. Disponible en: <http://bru.gmprc.ksu.edu/sci/throne/index.asp>

Trabanino, R. 2001. Guía para la producción de Virus de la Poliedrosis Nuclear, *Telenomus remus* y *Cephalonomia stephanoderis*. Manual de Laboratorio del Centro de Control Biológico de Centroamérica. Zamorano, Honduras. 8p

8. ANEXOS

Anexo 1. Dietas para la cría de Lepidópteros en el laboratorio. Zamorano, Honduras, 2002.

INGREDIENTES PARA DIETAS

Ingrediente	Cantidad
Agar.....	80 g
Frijoles	250 g
Germen de trigo	200 g
Proteína de soya	200 g
Caseína	140 g
Levadura	200 g

Mezclar con agua hasta completar 6 litros, luego se hierven durante 15 minutos. Esperar que la temperatura baje a 65°C y agregar los siguientes preservantes y vitaminas y mezclarlos por 3 minutos.

Ácido ascórbico	18 g
Ácido sórbico	9 g
Vitaminas*	30 g
Tetraciclina o aureomicina.....	250 mg
Formalina al 4%	10 ml
Metil-parabenceno	15 g

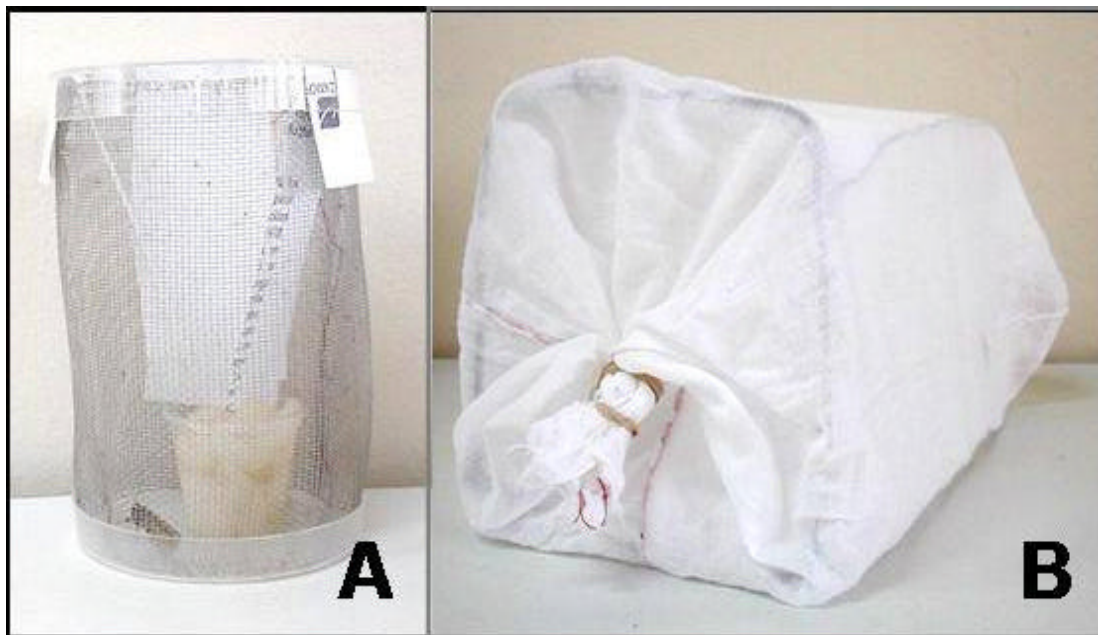
Licuar y colocar las raciones en los depósitos individuales antes que se endurezca (más o menos 15 minutos)

*Son un complejo específico de vitaminas distribuido por SERVIAGRO, bajo el nombre comercial VITAMIN MIX, VANDERZANT.

Este volumen de dieta alcanza para 30 bandejas de 30 raciones cada una en promedio, es decir, para alimentar a 900 larvas en promedio.

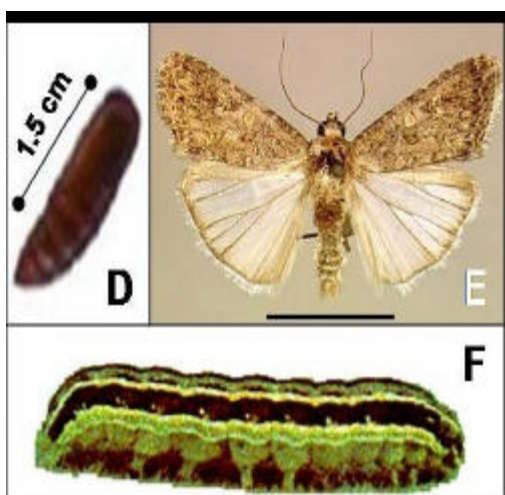
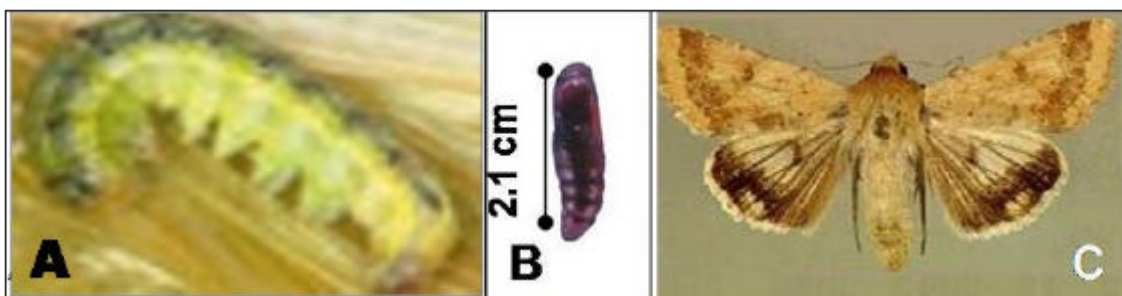
Fuente: Laboratorio de Control Biológico. Escuela Agrícola Panamericana- El Zamorano- Honduras

Anexo 2. Fotografía de las jaulas utilizadas para la cría de (A) *Spodoptera exigua* y (B) *Helicoverpa zea*. Zamorano, Honduras, 2002.



Las jaulas para la producción de huevos *Spodoptera exigua* (A) miden 10 cm de diámetro por 14 cm de alto, siendo de forma cilíndrica, llevando en los extremos dos platos petri de igual dimensión, el cilindro es de maya metálica. Mientras que las de producción de huevos de *Helicoverpa zea* (B) mide 20 cm de alto, 20 cm de ancho y 35 cm de largo. El marco es de alambre liso (calibre # 12) y la cubierta es una bolsa o funda de tela de manta.

Anexo 3. Especies del estudio: *Helicoverpa zea* larva (A), pupa (B) y adulto (C), *Spodoptera exigua* larva (F), pupa (D) y adulto (E). Zamorano, Honduras, 2002.



Créditos de fotografías:

- Fotografía A, E y F: John L. Capinera, Universidad de Florida.
- Fotografía B y D: Ever Cruz, Zamorano.
- Fotografía C: Claudia Kuniyoshi, Zamorano.

Anexo 4. Separación de medias y varianza para *Spodoptera exigua*, en la estimación del paralelismo y la homogeneidad entre los datos. Zamorano, Honduras, 2002.

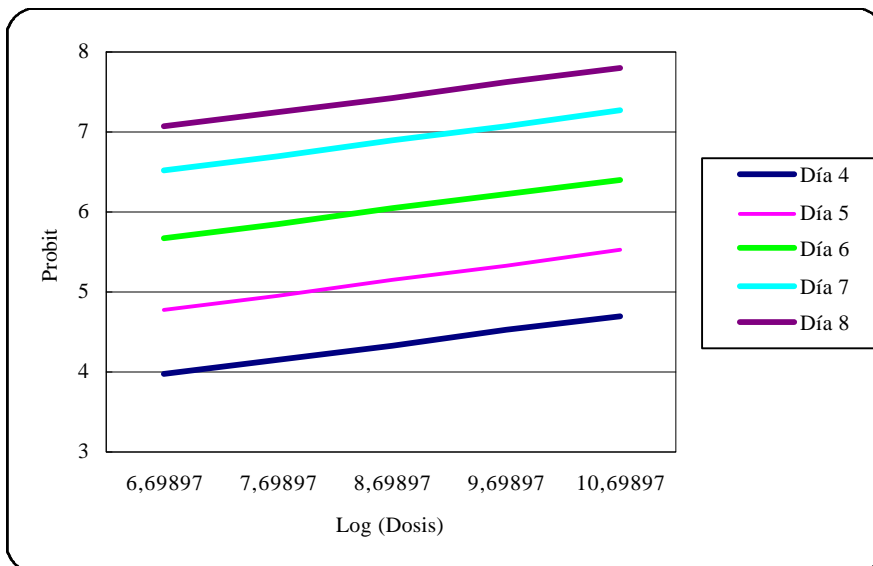
Chi-cuadrado de Pearson (Suma de Cuadrados)

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	$P(>0.05)$
Paralelismo	4	2,9	0,73	0,57
Heterogeneidad	15	21	1,42	0,13
Total	19	23,9	1,25	0,20

Razón de Probabilidad con la Prueba de Chi cuadrado

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	$P(>0.05)$
Paralelismo	4	3.01	0,75	0,56
Heterogeneidad	15	22,20	1,48	0,10
Total	19	25,23	1,32	0,15

Anexo 5. Relación del logaritmo de la dosis y proporción de respuestas en unidades probit, para *Spodoptera exigua*. Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 6. Estimación de Dosis Efectiva (DE) para *Spodoptera exigua*. Zamorano, Honduras, 2002.

Día	DE ₅₀ (95% Limites)	DE ₉₀ (95% Limites)
4	$2,08 \times 10^{12}$ ($8,17 \times 10^{10}$, $1,34 \times 10^{15}$)	$1,82 \times 10^{19}$ ($1,23 \times 10^{16}$, $3,22 \times 10^{26}$)
5	$8,29 \times 10^7$ ($5,5 \times 10^6$, $8,19 \times 10^8$)	$7,33 \times 10^{14}$ ($6,86 \times 10^{12}$, $14,86 \times 10^{19}$)
6	$1,16 \times 10^3$ ($2,47 \times 10^1$, $6,58 \times 10^4$)	$1,03 \times 10^{10}$ ($6,53 \times 10^8$, $8,94 \times 10^{11}$)

Anexo 7. Análisis asintótico de varianza para *Spodoptera exigua*. Zamorano, Honduras, 2002.

Día	Log(Potencia relativa)	Varianza	SE
4	-4,39	1,26	1,12
5	0,00	0,49	0,70
6	4,85	1,47	1,21
7	9,49	4,48	2,11
8	12,41	8,15	2,85

Anexo 8. Separación de medias y varianza para *Helicoverpa zea*, en la estimación del paralelismo y la homogeneidad entre los datos. Zamorano, Honduras, 2002.

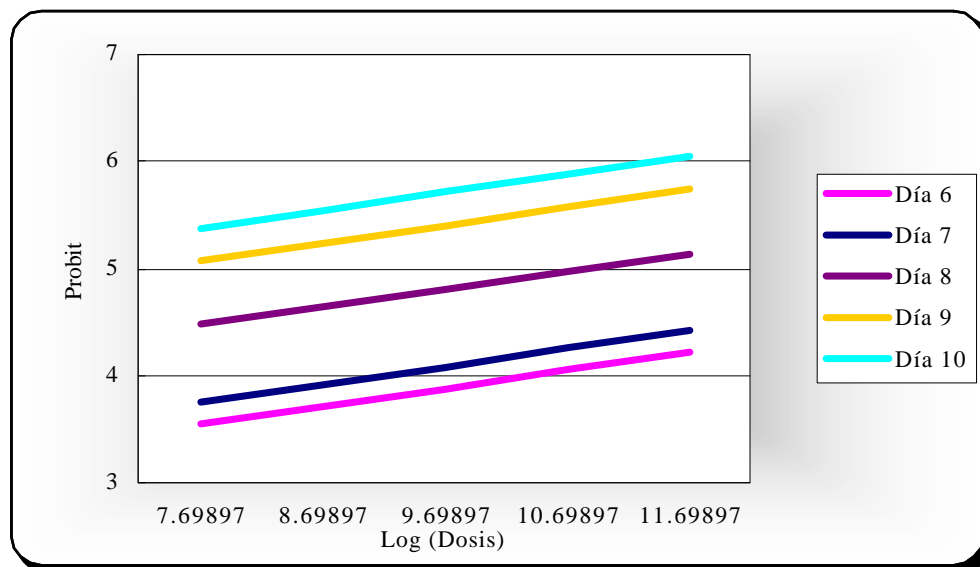
Chi-cuadrado de Pearson (Suma de Cuadrados)

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	$P(>0.05)$
Paralelismo	6	3.2	0.53	0,42
Heterogeneidad	16	24	1.51	0,20
Total	22	27.2	1,24	0,25

Razón de Probabilidad con la Prueba de Chi cuadrado

	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	$P(>0.05)$
Paralelismo	6	5	0,83	0,55
Heterogeneidad	16	24.1	1,50	0,14
Total	22	29.1	1,32	0,15

Anexo 9. Relación logaritmo de la dosis y proporción de respuestas en unidades probit, para *Helicoverpa zea*. Zamorano, Honduras, 2002.



Anexo 10. Estimación de Dosis Efectiva (ED) para *Helicoverpa zea*. Zamorano, Honduras, 2002.

Día	DE ₅₀ (95% Limites)	DE ₉₀ (95% Limites)
7	$6,83 \times 10^{13}$ ($5,61 \times 10^{14}$, $3,41 \times 10^{16}$)	$7,75 \times 10^{20}$ ($2,86 \times 10^{17}$, $2,87 \times 10^{21}$)
8	$7,19 \times 10^{10}$ ($5,5 \times 10^8$, $1,23 \times 10^{12}$)	$3,18 \times 10^{15}$ ($5,98 \times 10^{11}$, $4,68 \times 10^{17}$)

21

9 $7,01 \times 10^5 (1,58 \times 10^3, 3,76 \times 10^8)$ $0,37 \times 10^{12} (3,89 \times 10^9, 1,59 \times 10^{13})$

Anexo 11. Análisis asintótico de varianza para *Helicoverpa zea*. Zamorano, Honduras, 2002.

Día	Log(Potencia relativa)	Varianza	SE
6	-5,21	1,12	1,06
7	-3,85	0,72	0,85
8	0,00	1,68	1,15
9	5,02	3,98	2,08
10	8,52	8,06	3,26