

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



**“SELECCIÓN ARTIFICIAL PARA EL GUSANO
COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) CON EL
VIRUS *SjNPV* Y EFECTIVIDAD BIOLÓGICA EN CAMPO EN
COMBINACIÓN CON UN ABRILLANTADOR ÓPTICO”**

JOSE TRINIDAD LÓPEZ PÉREZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

Doctor en Ciencias Agrícolas y Forestales

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., JULIO DE 2008

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
COORDINACIÓN DE POSGRADO



La tesis "Selección artificial para el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) con el virus SfNPV y efectividad biológica en campo en combinación con un abrillantador óptico" del M.C. José Trinidad López Pérez, se realizó bajo la dirección del Consejo Particular que se indica, fue aprobada por el mismo y se aceptó como requisito parcial para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

Consejo Particular

Tutor: _____

Dr. Gil Virgen Calleros

Asesor: _____

Dr. Jaime Eduardo Reyes Hernández

Asesor: _____

Dr. Pedro Posos Ponce

Asesor: _____

Dr. Salvador Mena Munguía

Asesor: _____

Dr. Norberto Carrizales Mejía

Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio de 2008

AGRADECIMIENTOS:

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, por fomentar la responsabilidad ante la sociedad para afrontar el futuro sin miedo a seguir.

Laboratorio de Entomología, por el apoyo en las gestiones con diversos organismos e instituciones, obteniendo así facilidades para el desarrollo del presente trabajo de investigación doctoral.

La empresa EMBRAPA soja, de Londrina, Parana, Brasil; en especial al Dr. Flavio Moscardi.

Dr. Gil Virgen Calleros, por las experiencias que me brindo, su entusiasmo y acertadas sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

Dr. Jaime Eduardo Reyes Hernández, por su amistad y sus atinadas aportaciones a este trabajo.

Dr. Salvador Mena Munguia, por su amistad, confianza y constante motivación para seguir adelante.

Dr. Pedro Posos Ponce, por su amistad incondicional.

DEDICATORIAS:

DIOS NUESTRO SEÑOR:

Por permitirme nuevamente culminar una etapa en mi vida, porque en ti deposito mis esperanzas y deseos para lograr cada vez más anhelos.

MIS TIAS:

CARMEN, GRACIELA, MARGARITA LOPEZ

Quienes siempre me han apoyado incondicionalmente con su entusiasmo y oraciones, para culminar los proyectos, objetivos y metas que me he trazado.

MIS PADRES:

LORENZO LOPEZ TRUJILLO

MARIA ESTELA PEREZ DE LOPEZ

Quienes con su labor callada, además de brindarme su paciencia y entusiasmo ayudaron con esta nueva etapa, para no desfallecer.

MIS HERMANOS:

MARCELA, PAULINA, LUIS, que de alguna manera contribuyeron para que concluyera esta nueva etapa y de quienes me siento orgulloso.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos obtenidos de las parcelas en porcentaje de daños antes de la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco en el mes septiembre, 2007.	44
Tabla 2. Datos obtenidos en las parcelas en porcentaje de daños siete días después la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco septiembre, 2007.	45
Tabla 3. Datos obtenidos en las parcelas en porcentaje de daños quince días después la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco septiembre, 2007.	46
Tabla 4. Datos obtenidos en las parcelas en porcentaje de daños veintiun días después la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco septiembre, 2007.	46
Tabla 5. Número acumulado de plantas dañadas (transformación arc sen) en los diferentes tratamientos en diferentes tiempos de evaluación en campo.	48

INDICE DE GRAFICAS

Gráfica 1. Línea del tiempo e incremento de la resistencia de insectos a plaguicidas documentadas a nivel mundial (Whalon *et al.*, 2001)

29

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Blanqueadores ópticos con actividad potenciadora de los baculovirus evaluados en laboratorio (Williams <i>et al.</i> , 2001).	23
Cuadro 2. Contenido de nutrientes para la elaboración de la dieta para los insectos.	31
Cuadro 3. Mortalidad de larvas de 3er estadio de <i>Spodoptera frugiperda</i> infectadas con diferentes concentraciones del <i>SfNPV</i> , en condiciones de laboratorio.	39
Cuadro 4. Resultado de análisis probit determinando CL_{50} y CL_{95} de la cepa <i>SfNPV</i> de EMBRAPA, con el número de poliedros sobre hojas de <i>Ricinus communis</i> L.	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la parcela para la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco, septiembre, 2007.	37
Figura 2. Línea de regresión concentración-mortalidad para larvas de gusano cogollero infectadas con <i>SfNPV</i> .	40
Figura 3. Incremento de la resistencia de <i>SfNPV</i> hasta la F4	41
Figura 4. Larva muerta de <i>Spodoptera frugiperda</i> , iniciando ruptura de tegumento para la liberación de líquido lechoso.	42
Figura 5. Hemolinfa de una larva muerta por acción del <i>SfNPV</i> observada al virus microscopiofotónico con 400X de aumento. Se observa millares de cuerpos de inclusión del virus (Vázquez, J. et al. 2002).	43
Figura 6. Resultados en porcentaje de daños producidos por <i>Spodoptera frugiperda</i> durante el tiempo de la evaluación en campo.	47
Figura 7. Incremento expresado en porcentaje de daños por <i>Spodoptera</i> antes de la aplicación (ADA) y 21 días después de la aplicación (DDP).	48

RESUMEN

Para México el cultivo de maíz es uno de los más importantes, hablando de manera particular el estado de Jalisco, es considerado como el más relevante productor de este cereal, sin embargo en los últimos años la intensidad y número de plagas, se ha incrementado considerablemente, destacando entre ellas el “gusano cogollero” *Spodoptera frugiperda*.

Muchos han sido los mecanismos de lucha contra este insecto; se ha comprobado que los insecticidas sintéticos ocupan un lugar muy importante en el control del mismo. Actualmente es el medio más efectivo e inmediato para reducir poblaciones que significan un riesgo en el cultivo, pero el empleo consecutivo de estos productos ha traído una serie de consecuencias que limitan su utilización, como el desarrollo de la resistencia y problemas por su toxicidad, además de contaminar el ambiente.

Con la mira de encontrar una alternativa al combate del cogollero, mediante el control biológico basados en virus, concretamente nucleopolyhedrovirus (NPV) o baculovirus, se realizó este trabajo para probar el potencial del virus de poliedrosis nuclear de *Spodoptera frugiperda* (*SfVPN*) en laboratorio y campo.

También es importante mencionar que las formulaciones de NPV con abrillantador óptico parecen ser otra opción atractiva basada en conclusiones de laboratorio, es por eso que el presente, expone resultados de experimentos dirigidos a la formulación del baculovirus (*SfVPN*) como base para la implementación de un sistema de control sostenible del gusano cogollero del maíz, sin embargo, se requiere de más pruebas en campo, por lo anterior y luego de obtener la CL_{50} en laboratorio procedimos a realizar evaluaciones con 5 tratamientos 1.83×10^9 *SfNPV* Ha^{-1} + 1% abrillantador, 1.83×10^9 *SfNPV* Ha^{-1} , 1% abrillantador, cipermetrina 1.5 L/Ha y un testigo absoluto, en el campo experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias entre los meses de julio a septiembre de 2007 en los cuales se constato que no existen diferencias significativas entre el utilizarlo y no en campo, además el virus por si solo puede competir con los insecticidas químicos ya que presentó la misma efectividad en el control de *S. frugiperda*; dirigiendo así el trabajo a la eficacia del baculovirus como una alternativa de control y el costo del control

biológico al compararlo con el control químico convencional.

Sin embargo falta realizar más investigaciones en diferentes localidades de nuestro País para así establecer si es efectivo en las diferentes condiciones de campo que nuestra Nación cuenta.

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE GRAFICAS	iv
INDICE DE CUADROS	v
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- OBJETIVOS	3
III.- HIPÓTESIS	4
IV.- REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1. Distribución	5
4.2. Características generales de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith)	6
4.3. Daños ocasionados por el gusano cogollero	9
4.4. Métodos de control del cogollero	11
4.4.1. Control químico	12
4.4.2. Control biológico	13
4.5. Nucleopolyhedrovirus	14
4.6. Baculoviridae	15
4.7. Modo de transmisión e infección	15
4.8. Producción de nucleopolyhedrovirus	17
4.9. Conservación de los baculovirus	18
4.10. Abrillantadores ópticos	20
4.11. Bioensayo	23
4.12. Experimentos en campo	24
4.13. Resistencia de insectos a insecticidas químicos y biológicos	26
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	30
5.1. Primera etapa (evaluación en laboratorio)	30
5.1.1. Material biológico	30
5.1.2. Bioensayo	31
5.2. Segunda etapa (evaluación en campo)	32
5.2.1. Multiplicación y crianza del gusano cogollero	32

5.2.2. Multiplicación del baculovirus (<i>Sf</i> NPV)	34
5.2.3. Aislamiento y obtención de los cuerpos de inclusión (CI)	35
5.2.4. Aplicación en campo (inoculación)	36
VI.- RESULTADOS	39
6.1. Evaluación en laboratorio	39
6.1.1. Bioensayo	39
6.1.2. Obtención de la CL ₅₀	40
6.2. Evaluación en campo	41
6.2.1. Reproducción artificial del gusano cogollero	41
6.2.2. Sintomatología de <i>Sf</i> NPV	41
6.2.3. Obtención de cuerpos de inclusión (CI)	43
6.2.4. Muestreo y toma de datos	43
VII.- DISCUSIÓN	49
VIII.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
BIBLIOGRAFIA	54

1. INTRODUCCION

En el cultivo de maíz, el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) es la plaga más importante de gran parte de los países de América; en forma especial, en México, donde cada año 3.2 millones de agricultores producen 18.2 millones de toneladas en 8.5 millones de hectáreas (Diawara *et al.*, 1992). En Jalisco se siembra, año con año, una superficie que va de 750 mil a poco más de 920 mil hectáreas y su región central es considerada la más relevante productora de este cereal. No obstante, en los últimos seis años la intensidad y número de plagas se ha incrementado de manera importante, y se considera uno de los principales factores que limitan el rendimiento de este cultivo junto con el temporal errático (Yela, A., 1991).

Bastantes han sido los mecanismos de lucha contra los insectos, pero se ha comprobado que los insecticidas sintéticos ocupan un lugar muy importante en el control de plagas. Actualmente es el medio más efectivo e inmediato para reducir poblaciones que significan un riesgo en el cultivo, pero el empleo consecutivo de estos productos ha traído una serie de consecuencias negativas que limitan su utilización, como el desarrollo de las cepas de insectos resistentes y problemas por su toxicidad, además de contaminar el ambiente y los alimentos.

La búsqueda de alternativas para el control de plagas agrícolas que no dependan del uso de los plaguicidas químicos, ha obtenido logros importantes, como es el caso del control microbiano de insectos plaga usando virus, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos entomopatógenos. Por lo tanto, se consideran una alternativa más en el control, ya que la *S. frugiperda* es afectada por alrededor de veinte especies de entomopatógenos (Gardner *et al.*, 1984), de los cuales, los baculovirus se consideran una opción eficiente como control microbiano de plagas. Es importante destacar que los virus de polihedrosis nuclear (NPV) ó baculovirus, han sido utilizados como bioinsecticidas con éxito principalmente en el control de plagas de Lepidóptera (Granados y Federici, 1986). Entre los más estudiados por su efectividad en campo se encuentran el virus de la palomilla gitana *Lymantria dispar* (Linnaeus) y el virus del gusano terciopelo de la soya *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Moscardi, 1999; Granados, 2000). En este último se ha reportado que con una presión de selección (CL₈₀) en laboratorio, el insecto comienza a exhibir una

aparente resistencia en la progenie F4 (Moscardi, 2003). Para el caso de Nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfNPV) en México no hay antecedentes sobre estudios de resistencia tanto en laboratorio como en campo, por ello se considera que es importante investigar y documentar este fenómeno.

Una de las grandes ventajas de utilizar a los virus entomopatógenos como bioinsecticidas en campo, es que la metodología que se utiliza para su aplicación es básicamente la misma que se emplea al usar insecticidas químicos. El método más adecuado será aquel que cumple con los objetivos que se desean alcanzar, también es importante comentar que las limitaciones del empleo de bioinsecticidas incluyen los gastos de producción y su lenta velocidad de acción para aniquilar a los individuos, aunque esto no es preocupante para un cultivo como el maíz, que puede soportar una moderada defoliación sin pérdidas significativas en la producción (Hruska y Gould, 1997).

Además, es trascendental analizar la respuesta al combinarlos con otros elementos que hacen más efectivo su acción como lo son los abrillantadores ópticos. Estos tienen la capacidad de incrementar de manera importante la efectividad de los baculovirus porque inhiben la cutícula celular del intestino medio del insecto haciendo más efectiva la porosidad de la membrana peritrófica (Washburn *et al.*, 1998; Wang y Granados, 2000). En estudios recientes ha quedado demostrado que los abrillantadores ópticos pueden actuar como refuerzo de la actividad del baculovirus en condiciones de campo, esto por elevar la mortalidad de plagas con el tratamiento con el virus (Hamm *et al.*, 1994; Li y Otvos, 1999; Vail *et al.*, 1999).

2. OBJETIVOS

2.1.- Determinar los niveles de susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* a SfNPV por medio de bioensayos en laboratorio para la obtención de la CL₅₀ y CL₉₅.

2.2.- Evaluar en campo diferentes formulaciones del baculovirus de SfNPV en comparación con un insecticida químico.

2.3.- Determinar el efecto de brillantadores ópticos fluorescentes en las formulaciones con SfNPV.

3. HIPÓTESIS

La combinación de un abrillantador óptico con el baculovirus de *SyNPV* para la aplicación en campo presenta la misma efectividad en el control del gusano cogollero, en el cultivo de maíz igual que un insecticida químico.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Distribución

A nivel mundial, el maíz se siembra en una superficie de aproximada de 121 millones de hectáreas, con una producción de 344 millones de toneladas de grano (Yela A., 1991). Cada año en México 3.2 millones de agricultores producen 18.2 millones de toneladas en 8.5 millones de hectáreas (Diawara *et al.*, 1992). Esto representa más del 40% de la superficie agrícola Nacional; este cultivo en Jalisco constituye la más importante actividad agrícola de interés económico y tan solo en esta entidad federativa, se cultivan 750 mil hectáreas aproximadamente, de un total de 1'334,603 has. dedicadas a la agricultura, representando el 54.39% de la superficie agrícola (Yela, A., 1991). Sin embargo, existen varios factores que no permiten mostrar su máximo potencial de rendimiento, entre los que destacan el deficiente control del complejo de plagas, las cuales pueden ocasionar pérdidas de hasta un 80% del rendimiento si no se combaten eficiente y oportunamente (Yela, A., 1991).

Es importante mencionar que en nuestro país se reportan 56 especies de insectos y ácaros que atacan al maíz; desde la siembra, durante el desarrollo de la planta, en la cosecha y en grano almacenado. Las pérdidas causadas por las plagas en el campo son difíciles de cuantificar ya que varían según la localidad, variedad y condiciones ecológicas (Yela, A., 1991). El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* es la plaga más importante en el cultivo del maíz en México, encontrándose sobre todo en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Nayarit, San Luis Potosí, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Morelos, Estado de México, Guerrero, Veracruz, Yucatán y Oaxaca. Este orden es por el grado de aparición de la plaga, y como es posible apreciar, abarca la totalidad del territorio mexicano, lo que supone su existencia en todos los demás estados de la República (Osorio, 1949 citado por Ramírez (1991)). Los daños más fuertes se presentan en alturas menores a 1600 msnm, en condiciones de escasa precipitación pluvial (Diawara *et al.*, 1992) debido a que los niveles de infestación mayores al 55% en una superficie sembrada con maíz pueden ocasionar una reducción del 15 al 73% en la cosecha (Hruska y Gould, 1997).

4.2 Características generales de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith)

Este insecto pertenece a la familia Noctuidae, la cual, es la más numerosa del orden Lepidoptera con más de 3 500 especies en América del Norte. La mayoría de las palomillas miden entre 25 y 50 mm de expansión alar y tienen el cuerpo corpulento, y cubierto de escamas, particularmente en el tórax.

Pacheco (1994), indica que los miembros de esta familia presentan coloraciones sombrías en tonos café o gris; las palomillas tienen hábitos nocturnos y son atraídas fuertemente por la luz. Los huevecillos son ovipositados uno a uno, o en grupos compactos sobre el follaje. Las larvas son de cutícula lisa, aunque con cerdas primarias de colores opacos; realiza daño físico a las plantas desde su desarrollo fisiológico temprano hasta la presencia del elote. En su fase de larva, es conocido como "gusano cogollero del maíz" o simplemente *Spodoptera*, como también se le denomina comúnmente. Actúa como gusano trozador o gusano ejército, también como cogollero que es su hábito más característico en el maíz. Y por el menos utilizado actualmente de "gusano San Juan", dada la antigua creencia popular de que desaparecía al enterrarse para pupar el 24 de junio, día del mencionado santo.

Otros nombres científicos que le han dado al gusano cogollero son: *Laphygma frugiperda* Gene (1852); *Phalaena frugiperda* Smith & Abbot (1797); *Trigonophora frugiperda* Geyer (1832); *Laphygma macra* Guenee (1852); *Laphygma inepta* Walker (1856); *Prodenia signifera* Walker (1856); *Prodenia plagiata* Walker (1856); *Prodenia autumnalis* Riley (1870); *Noctua frugiperda* J.E. Smith Pacheco (1994).

Sin embargo, desde 1958 es reconocido por su nombre científico como *Spodoptera frugiperda*, (J.E. Smith) encontrándose su clasificación taxonómica de la siguiente forma:

Clase	Insecta
Orden	Lepidóptera
Suborden	Frenate
Familia	Noctuidae
Género	<i>Spodoptera</i>
Especie	<i>frugiperda</i>
Nombre científico	<i>Spodoptera frugiperda</i>

De acuerdo con Posada (1989 citado por Polanía *et al.*, (2007)), las larvas o gusanos pueden alimentarse de 28 especies vegetales cultivadas, entre las cuales se destacan el maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum spp.*), algodónero (*Gossypium hirsutum L.*), soya (*Glycine max*), higuierilla (*Ricinus comunis L.*), tomate (*Solanum lycopersicum L.*), caña de azúcar (*Saccharum arundinaceum*), ajonjolí (*Sesamum indicum*), arroz (*Oryza sativa*), cacahuete (*Arachis hipogea*), melón (*Cucumis melo*) y girasol (*Helianthus annuus*). No obstante, prefiere para su alimentación a las gramíneas, principalmente maíz y sorgo. La presencia de la plaga se considera endémica, es decir siempre existen poblaciones que causan daño en mayor o menor proporción dentro del cultivo. En las otras plantas el ataque se observa de manera impredecible, existen temporadas donde las poblaciones del insecto se consideran de poca importancia, mientras que en otras se requieren controles continuos, algunos de ellos sin éxito por la presencia de altas poblaciones y tolerancia o resistencia del insecto a los productos químicos empleados (Borrero, 1994, citado por Polanía *et al.*, (2007)).

Durante su vida, el gusano cogollero pasa por diferentes etapas. Estas etapas son:

- Huevecillo o postura
- Larva o gusano
- Pupa
- Adulto o mariposa

Los **huevecillos** son de forma globosa, con estrías radiales, de color rosa pálido que se torna gris a medida que se aproxima la eclosión. Las hembras depositan los huevos continuamente durante las primeras horas de la noche, tanto en el haz como en el envés de las hojas. Estos son puestos en varios grupos o masas cubiertas por segregaciones del aparato bucal y escamas de su cuerpo que sirven como protección contra algunos enemigos naturales o factores ambientales adversos.

Las **larvas** al nacer se alimentan del *coreon* (cubierta protectora del huevecillo) más tarde se trasladan a diferentes partes de la planta o a las vecinas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo. Pasa normalmente por seis instares, independientemente de la temperatura, pudiéndose observar con frecuencia individuos que completan dicha fase en cinco o siete instares, y en menor proporción, con números más extremos (4 u 8 instares) en la medida que la temperatura se hace menos adecuada. Los dos

primeros instares son los de mayor importancia para la toma de medidas de control; en el primero las larvas miden de 2 hasta 3 milímetros y la cabeza es negra completamente, el segundo mide de 4-10 milímetros y la cabeza es carmelita claro (color rosa claro); las larvas pueden alcanzar hasta 35 milímetros en su último estadio. A partir del tercero se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciadas cuando la hoja se abre o desenvuelve, sin embargo, la duración de estas y del resto de las fases, depende directamente de la temperatura y se puede esperar que en la mayoría de las condiciones en las que se siembra el maíz, las larvas completen su ciclo en unos 14 días.

Su color varía según el alimento pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en el dorso se distingue una banda negruzca más ancha hacia el costado y otra parecida pero amarillenta más abajo, en la frente de la cabeza se distingue una "Y" blanca invertida. Por otra parte, los pináculos setíferos del octavo segmento abdominal se alinean como cuatro puntos negros que forman un cuadrado, en vista dorsal.

Las pupas obtecta, desnuda mide, 15 mm de largo y cinco mm en su parte más ancha. Tegumento liso. El color por lo general es castaño, algo oscuro; ápice de las pterotecas alcanza hasta el tercio posterior del cuarto segmento abdominal, ápice de la probóscide un poco antes del término de las pterotecas, quedando un techo en el cual se distingue parte de las podotecas mesotorácicas ubicados un poco antes de la probóscide. Los espiráculos se ubican en el ápice de una proyección del tegumento que se recurva hacia el extremo posterior, se encuentran desde el segundo al séptimo segmento abdominal, el octavo es apenas visible.

Borde anterior del cuarto al séptimo segmento abdominal con circulares sencillas, borde posterior del cuarto segmento abdominal con una serie de estrías transversales paralelas. La hembra con los segmentos (10-11) y octavo en contacto, cremáster formando dos espinas rectas y delgadas (Angulo y Weigert, 1975).

Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto está en reposo hasta (8 -10) días en que emerge el adulto o mariposa (Negrete F. y Morales J., 2005).

Los adultos presentan una coloración gris oscura, las hembras tienen alas traseras de color blancuzco, mientras que los machos tienen figuras irregulares llamativas en las alas delanteras, las traseras son blancas. En reposo doblan sus alas sobre el cuerpo, formando un ángulo agudo que permite la observación de una prominencia ubicada en el tórax.

Permanecen escondidas dentro de las hojarascas, entre las malezas, o en otros sitios sombreados durante el día y son activas al atardecer o durante la noche cuando son capaces de desplazarse a varios kilómetros de distancia, especialmente cuando soplan vientos fuertes.

Uno de sus hábitos más importantes es la capacidad que tiene para migrar, la mayoría de los autores están de acuerdo con este punto, ya que se han reportado vuelos migratorios desde Florida hasta Carolina del Sur en Los Estados Unidos (Vickery, 1929 citado por Ramírez (1991)). También menciona Poster (1950) el hombre puede contribuir a su dispersión de un modo por demás peligroso, ya que de ésta forma el insecto es capaz de franquear barreras naturales, que por si solo le sería imposible lograrlo, esto fue confirmado cuando el mismo Poster documentó que aviones provenientes de América del sur y del Caribe, transportaron en su fuselaje hasta Florida, masas de huevecillos de varios insectos noctúidos, pudiendo variar el número de ellos de 1 a 1000 de las masas recolectadas, en donde varias pertenecían a hembras del gusano cogollero. Otro comportamiento que se ha observado y que no se tiene bien claro cuáles son los factores que los promueven, es que en altas densidades puede actuar como gusano soldado (de allí su nombre en inglés fall armyworm) en condiciones de altas densidades y de otros factores que no están bien claros. Así adquieren un color más oscuro.

Este insecto puede sobrevivir todo el año en áreas tropicales, aunque su densidad fluctúa, debido principalmente a la presencia de lluvias (Ortega, 1987)

4.3 Daños ocasionados por el gusano cogollero

De manera general, el daño puede manifestarse en la forma de raspado e ingestión de la epidermis superior y del mesófilo de las hojas, muy evidente cuando se presenta en plantas jóvenes, y es ocasionado por larvas pequeñas, dejando sólo la epidermis inferior, la cual, mientras permanece, le confiere una apariencia translúcida y que al caerse, deja en la superficie de las hojas unas pequeñas "ventanas" de forma irregular. Es un daño visualmente impactante, sobre todo en el caso de ataques por parte de poblaciones altas del insecto, pero de escasa o ninguna significación económica.

Otro tipo de daño lo representa el corte de plantas jóvenes a nivel de la base del tallo, generando la pérdida irremediable de la planta. La importancia económica del daño tiene relación directa con la población del insecto presente y tendría que ser inusualmente alta para representar alguna significación (Clavijo, 2000).

En algunas circunstancias, inducidas por factores aún desconocidos, el insecto adquiere un comportamiento gregario, que lo impulsa a desplazarse en grandes grupos de larvas, las cuales, dotadas de una gran voracidad, consumen a su paso casi todo tipo de vegetación, por lo que se le da a esta fase la denominación de "barredor" y que al encontrarse una siembra de maíz, pueden llegar a causarle serios destrozos. La magnitud del daño dependerá de cuan "solos" estén las plantas de maíz en el campo y del desarrollo alcanzado por dichas plantas en el momento del ataque.

De manera general, se puede afirmar que un maíz pequeño, ante la presencia del "barredor", sufrirá las consecuencias de un ataque masivo de cortadores que "talarán" las plantas o en el mejor de los casos, las defoliarán totalmente. Si las plantas están más grandes, y no pueden ser cortadas, la defoliación puede llegar a ser soportada, hasta el extremo de permanecer sólo la nervadura central, y sin embargo, aún así es posible que la planta se reponga y llegue a producir (Clavijo, 2000). Un ataque como el descrito puede ser mejor asimilado por el maíz si se encuentra acompañado por malezas en el campo, las cuales, por ser usualmente más jóvenes que el cultivo, tienden a ser preferidas por el insecto.

La forma de daño más tradicional, tiene que ver con la migración de las larvas desde el lugar donde ocurrió la ovoposición hacia la zona de la yema apical o "cogollo". En ese lugar se aloja usualmente más de una larva, de diferente tamaño, conviviendo, sin encontrarse, una o dos de dimensiones medianas a grandes, e inclusive varias pequeñas, escondidas entre los pliegues de las hojas que están por brotar, alimentándose de ellas, incluso de la panoja antes que ésta emerja. Esa acción de alimentación sobre hojas que están enrolladas sobre sí mismas genera un daño simultáneo sobre varios de los pliegues, confiriéndole a la planta una apariencia muy peculiar, ya que al desplegarse, como consecuencia de su emergencia y crecimiento, las hojas muestran un conjunto bastante

simétrico de "ventanas". En presencia de más de una larva grande, la zona del cogollo de la planta se muestra con una apariencia sucia, con excrementos, y las hojas que emergen lo hacen ya no con las ventanas señaladas, sino desgarradas y en algunos casos, llegan a presentar trozos de tejidos colgantes.

Algunas veces, las larvas se alimentan de las panojas tiernas recién salidas, sin que este daño pueda calificarse de importancia económica; no obstante, se ha observado que en ambiente de laboratorio, se presenta una mortalidad muy alta en larvas de primer instar al alimentarlas con las hojas de plantas de más de 45 días de edad, que recubren la panoja antes de su emergencia, así como al proporcionárseles como alimento la panoja misma (Clavijo, 2000).

Un ejemplo de la importancia de este insecto es lo que se observó en la región conocida como La Ciénega, ubicada entre los estados de Jalisco y Michoacán, cuyo principal cultivo es maíz, con alrededor de 240 000 has. Allí, a inicios de junio de 2005 se observaron fuertes daños por gusano cogollero barrenando la base del tallo de pequeñas plantas de maíz. En alrededor del 70%. En dicho periodo se presentaron nulas precipitaciones y temperaturas superiores a 30 °C (Bautista y Morales, 2005).

4.4 Métodos de control

Al inicio del siglo XX, de acuerdo con Flint y Van den Bosch (1981), había cinco enfoques del control de plagas de uso común: 1) control biológico, 2) control mecánico y físico, 3) control cultural, 4) control químico, y 5) uso de variedades resistentes. Para controlar las plagas, casi siempre en conjunto con los insecticidas, se usaban muy diversas prácticas agrícolas, tales como la rotación de cultivos, la elección de la fecha de siembra para evitar el momento culminante de las plagas, la destrucción de las malezas y las plantas espontáneas unido a una correcta fertilización, a una labranza oportuna para exponer los insectos encontrados en el suelo a la acción del clima, a la destrucción de los residuos de los cultivos para privar a los insectos como el barrenador del tallo del maíz, el gorgojo de la pera del algodón, las chinches y otros insectos, de lugares para sobrevivir en el invierno, además de la siembra de cultivos-trampa para atraer las plagas de los cultivos económicamente importantes.

4.4.1 Control químico

Durante muchos años, para reducir los efectos nocivos del cogollero se ha dependido del uso de insecticidas químicos, existiendo actualmente una mayor cantidad de información al respecto. Sin embargo, en algunas ocasiones la efectividad de estos insecticidas ha sido baja debido a que su aplicación se realiza después de que ha pasado el estado ideal. Además, el uso indiscriminado de insecticidas químicos ocasiona altos costos, contaminación ambiental y la resistencia de la plaga a estos productos (Negrete F. y Morales J., 2005). A pesar de esto, debemos reconocer que son una herramienta muy poderosa para el control de los insectos plaga; son muchos los beneficios económicos que con frecuencia sustentan el uso de plaguicidas, esto al margen de desastres ecológicos, la mala calidad de las plantas y la salud de los animales y el hombre.

Al mismo tiempo, debemos reconocer que presentan muchas ventajas y que si se usan correctamente pueden marcar la diferencia entre un buen cultivo o el fracaso total del mismo (Negrete F. y Morales J., 2005).

Para capitalizar las ventajas de los insecticidas en el control de insectos plaga, además de prevenir o minimizar su impacto negativo en los ecosistemas e incorporar su uso en un programa integrado de manejo de plagas, hay varios conceptos básicos que deben ser tomados en consideración. Estos conceptos incluyen: la caracterización de las plagas, la determinación de la relación plaga/daño de la planta hospedante y la utilización de insecticidas selectivos, como pueden ser piretroides sintéticos, entre los que destacan la permetrina, la cipermetrina y el ferrenalato (King y Saunders, 1984 citado por Granados (2001)).

En particular, la cipermetrina es un insecticida piretroide que controla un amplio espectro de insectos en los cultivos, principalmente lepidópteros y actúa por contacto e ingestión. Su uso se extiende a nivel mundial en un gran número de cultivos debido a su control efectivo y baja toxicidad para los mamíferos (Posos P., 2003).

4.4.2. Control biológico

Este término fue usado por primera vez por H.S. Smith en 1919, para referirse al uso de enemigos naturales (introducidos o manipulados) para el control de insectos plaga. Su alcance se ha extendido con el tiempo, a tal grado que ahora se presentan problemas para definirlo adecuadamente, en particular porque el término implica aspectos académicos y aplicados (Wilson y Huffaker, 1976; García *et al.*, 1988; Eilenberg *et al.*, 2001).

Para este trabajo se entenderá como control biológico, el “uso de organismos vivos como agentes para el control de plagas” (Greathead y Waage, 1983). También nos acogemos a la postura de Eilenberg *et al.*, (2001), quienes indican que “organismos vivos” incluye a los virus, pero se excluyen los genes o fragmentos de genes y los metabolitos obtenidos sin los organismos que los producen. De acuerdo con Huffaker (1985), la premisa del control biológico descansa en que bajo ciertas circunstancias, muchas poblaciones son llevadas a bajas densidades por sus enemigos naturales.

El control biológico puede ser realizado en forma natural y/o inducido y consiste en el manejo de las poblaciones de la plaga utilizada y sus enemigos naturales. Uno de los principales componentes del mismo es el Manejo Integrado de Plagas, el cual es definido como la suma de acciones emprendidas para favorecer la acción de parásitos, depredadores y patógenos en el control de un insecto plaga, e incluye toda una estrategia del manejo racional de insecticidas donde los productos biológicos son parte importante.

Del Rincón (2003), señaló a los bioinsecticidas virales como muy exitosos en los países desarrollados, no obstante su utilización es poco extendida al resto del mundo salvo algunas excepciones; indicó que algunos de estos han sido utilizados en forma exitosa en el control de plagas forestales y agrícolas. Por otra parte, uno de los ejemplos más exitosos de control microbiano con virus en un sistema agrícola, es el que se obtuvo con el gusano de la soya, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidóptera: Noctuidae), durante más de 15 años. En Brasil, esta plaga se ha mantenido por debajo de los umbrales económicos con un control exclusivo del NPV aislado de este mismo insecto. Se han asperjado alrededor de 1'000,000 de ha de soya anualmente con este NPV, durante el periodo que ha comprendido este programa (Del Rincón, 2003).

Existe poca o nula información sobre los efectos de la susceptibilidad de *S. frugiperda* a *SyNPV*. Por otra parte, se cuenta con relativamente pocos estudios que han examinado la virulencia en términos de sensibilidad y de tiempo letal para mejor respuesta en una serie de estadios larvales (Smits y Vlak, 1988).

4.5 Nucleopolyhedrovirus

Los virus son el segundo agente microbiano más utilizado en el mundo, antecedido solo por las bacterias. Constituyen una alternativa importante dentro del manejo integrado de plagas y sobre todo, en aquellos sistemas donde las poblaciones de insectos plaga no se pueden controlar mediante insecticidas químicos o más aún, donde éste es el único método de control de plagas de gran importancia. Asimismo, en algunos sistemas agrícolas, hortícolas y frutícolas, los virus entomopatógenos han demostrado rotundamente su eficacia, debido a que son muy específicos, biodegradables, de fácil aplicación y altamente seguros para el medio ambiente (Cristina del Rincón, 2003).

Los nucleopolyhedrovirus han mostrado una considerable promesa de ser un buen bioinsecticida, en pequeña escala particularmente, esto debido a situaciones de baja tecnología (Caballero *et al.*, 2001). Estos tienen varias ventajas sobre los pesticidas convencionales, una de las cuales es que son específicos para un tipo de hospedero, además de ser seguros para las personas (Hunter-Fujita *et al.*, 1998).

Los virus entomopatógenos, al igual que cualquier otro virus, se clasifican y categorizan taxonómicamente por el comité internacional de taxonomía viral (ICTV). Para realizar esta clasificación, se utilizan diversos criterios, dentro de los cuales podemos mencionar a la naturaleza del material genético, el tamaño de este, la morfología de la partícula, la presencia o ausencia de una envoltura viral, el tamaño del virión, y la presencia o no, de un cuerpo de oclusión (CO). Los virus entomopatógenos se clasifican de acuerdo al insecto del que se aíslan y la nomenclatura que se utiliza para identificar a un virus entomopatógeno, son las dos primeras siglas del género del insecto huésped, seguidas de las dos primeras siglas de la especie de dicho insecto, y finalmente las siglas del grupo de virus del que se trate. De esta forma se utilizan las siglas NPV, para los nucleopolyhedrovirus; GV, para los granulovirus; EPV, para los entomopoxvirus; IV para

los iridovirus y; VPC para los virus de poliedrosis citoplásmica. La variedad de virus entomopatógenos es muy amplia, pero los virus con mayor potencial para utilizarse como bioinsecticidas sin duda, los baculovirus (Cristina del Rincón, 2003).

4.6 Baculoviridae

La mayoría de los 300 baculovirus aislados en diversos órdenes de insectos y otros artrópodos pertenecen al subgrupo "A" de la familia Baculoviridae y son conocidos genéricamente como NPV. Los baculovirus contienen DNA de doble cadena que varía de 80 a 130 kb y una partícula viral con forma de bastón. Los viriones se ocluyen en cuerpos de oclusión CO que se conocen como poliedros (Tinsley y Kelly, 1985). Dentro de esta familia se han reconocido básicamente dos géneros: el género *Nucleopolyhedrovirus* a los cuales se les conoce comúnmente como nucleopolihedrovirus (NPV); y el segundo género es el de los *Granulovirus*, conocidos como los granulovirus (GV). Dentro de los NPV existen dos subgrupos: los nucleopoliedrovirus simples (NPVS), los cuales poseen una nucleocápside por envoltura viral y los nucleopoliedrovirus múltiples (NPVM) los cuales pueden tener más de una nucleocápside por envoltura.

Los poliedros pueden ser observados por microscopía de fase o campo oscuro donde las partículas o cuerpos de inclusión (OB; occlusion bodies), altamente refractarias, brillan de forma característica hasta 100 OBs, pueden ser encontrados en el núcleo celular, el cual es hipertrofiado.

Las limitaciones del empleo de baculovirus incluyen los gastos de producción y su lenta velocidad de acción para aniquilar a los individuos, aunque esto no sea una cuestión de preocupación para un cultivo como el maíz, que puede soportar una moderada defoliación sin pérdidas significativas en la producción (Hruska y Gould, 1997).

4.7 Modo de transmisión e infección

La mayoría de los baculovirus deben ser ingeridos por su hospedero para producir una infección, una vez que el virus entra al insecto, llega primeramente al lumen del intestino medio. Dentro de éste, debido al alto pH de los jugos intestinales (de 9.5 a 11.5) y

posiblemente a la acción de algunas enzimas hidrolíticas, se degradan los CO's y se liberan los viriones envueltos (Granados, 1980). Estos, se fusionan a las microvellosidades de las células epiteliales y posteriormente las nucleocápsides desnudas se dirigen hacia al núcleo celular, en el cual se replica el virus (Granados y Williams, 1986).

Los virus entomopatógenos infectan a una gran diversidad de tejidos dentro del insecto. Dependiendo del virus del que se trate, algunos son monoorganotrópicos, es decir, la infección viral se restringe a un solo tipo de tejido; por otro lado, existen los virus poliorganotrópicos, como los baculovirus e iridovirus, los cuales pueden causar infecciones sistémicas en el insecto infectado, dañando prácticamente a todos los tejidos. Como se mencionó anteriormente, los baculovirus atacan diversos tejidos del insecto, como tejido graso, epidermis, matriz traqueal, hemocitos, etc.

Es interesante notar que la mayoría de baculovirus, al contrario de otros muchos virus, pueden ser vistos con un microscopio de luz. La poliedra se puede ver claramente.

En la sintomatología de las infecciones causadas por baculovirus, las larvas afectadas no presentan síntomas durante los primeros días después de la infección, sino a partir del tercero o cuarto día, observándose un cambio en el comportamiento del insecto, ya que sus movimientos son más lentos, deja de comer y el crecimiento se detiene (Granados y Williams, 1986). También se observa un cambio de color del integumento y el reblandecimiento del mismo, este se torna blanquecino, se rompe, y se libera un fluido blanco-grisáceo, el cual contiene CO's en grandes concentraciones. Finalmente, la larva muerta queda colgando generalmente de las propatas en una posición de V invertida, lo cual es un comportamiento que favorece la dispersión del virus en el medio ambiente. La tendencia del huésped de permanecer colgado en el follaje y su rompimiento es un aspecto importante en el ciclo del virus.

La mortalidad varía según las especies y cepas consideradas. En general, los valores de LT_{50} oscilan entre siete a 11 días. Así, según Moscardi (1983 citado por Lobo de Souza (1996)) y Livingston *et al.*, (1980 citado por Lobo de Souza (1996)), el 50% de la población de *Anticarsia gemmatalis* y de *Pseudoplusia includens* (Wlk.) muere a causa de sus NPV entre los siete y 7.5 días; estos valores pueden ser mayores especialmente en plagas forestales. Sin embargo, la relación entre el LT_{50} con los daños es relativa ya que, la disminución del consumo foliar de las larvas infectadas que comienza a los tres o cuatro

días de la inoculación, es un síntoma muy importante a tener en cuenta en la determinación de los niveles de daño económico mucho más tal vez que la propia mortalidad.

En el caso de los adultos provenientes de larvas que sobrevivieron a una infección de baculovirus, las alteraciones en la reproducción, reducción de la fecundidad o viabilidad de los desoves o ambos parámetros, se observan principalmente cuando la infección larval tiene lugar en los últimos estadios. Sin embargo, los machos de *Spodoptera littoralis* (Boisd) provenientes de larvas que sobrevivieron a una infección de NPV, no tiene alterada su capacidad de copula, por lo que no presentan cambios en la competencia sexual con respecto a los machos normales (Vargas-Osuna, 1985 citado por Lobo de Souza (1996)). Estos datos son importantes para futuros manejos de los baculovirus.

4.8 Producción de nucleopolyhedrovirus

Según Alicia Sciocco (1996), existen dos metodologías básicas para producir a los virus entomopatógenos: en los individuos susceptibles (*in vivo*), o en cultivos *in vitro* de células de insectos. El uso de insectos susceptibles es, sin duda, el sistema más utilizado, ya que hasta el momento, ha resultado ser el medio de producción más económico. No obstante, dicho sistema a pesar de su bajo costo, involucra una labor intensiva debido a que se requiere manipular grandes cantidades de insectos vivos bajo condiciones de insectario. Asimismo, se deben optimizar una serie de factores como: el insecto hospedero, las condiciones ambientales de su crecimiento, el inóculo viral y los métodos de producción empleados, por mencionar algunos. Sin duda, el insecto empleado es uno de los factores más importantes, ya que su origen (colectado en el campo o establecido en una colonia de insectario) determinará la calidad del producto viral obtenido. Por otro lado, la biología y hábitos alimenticios del mismo son fundamentales para conocer el estadio de desarrollo más susceptible para la infección, así como el método de aplicación más viable del inóculo viral en la fuente de alimentación. Finalmente, para la producción *in larva*, el inóculo viral constituye un factor importante debido a que la pureza, la actividad biológica, y la dosis empleada del virus de interés, serán determinantes en la obtención y calidad del producto final (Sciocco, A. 1996).

Los productos formulados cuyo ingrediente activo son virus entomopatógenos, incluyen algunos acarreadores inertes como aceites, emulsificantes, diluyentes, etc. Asimismo, al momento de aplicar dichos productos en el campo, se les puede adicionar a la formulación de aditivos como agentes dispersantes, protectores de la luz ultravioleta, humectantes, etc. para incrementar su eficiencia (Tanada y Kaya, 1993). En general, las formulaciones para baculovirus son polvos humectables, los cuales se pueden aplicar fácilmente en el campo con el equipo tradicional que se utiliza para la liberación de los insecticidas químicos, y la aplicación por aspersión es de las más utilizadas. Sin embargo, se han realizado algunas pruebas de formulaciones en encapsulados con diversos granos, cuyo éxito depende del insecto al cual se quiere combatir.

La variabilidad genética en poblaciones de virus en campo puede ser traducida en grandes variaciones de la virulencia a su hospedante. De esta forma, en el proceso de desarrollo de un virus como insecticida microbiano, la primera etapa de cualquier programa, con vistas a su utilización de campo, es seleccionar aislamientos naturales basándose en su virulencia (mortalidad y tiempo de acción) para el insecto plaga. El aislamiento considerado como más virulento debe ser además adecuado para su producción masiva, multiplicándolo inicialmente en cantidades suficientes para que sirva como inóculo de referencia en producciones futuras. Este procedimiento reduce las posibilidades de alteraciones genéticas del agente que pueden traducirse en pérdida de la virulencia, generalmente resultante de pasajes sucesivos por el hospedante, recomendado por Ignoffo y Couch (1981 citados por Moscardi y Sosa-Gomez (1996)) para el virus de poliedrosis nuclear de *Heliothis* spp.

4.9 Conservación de los baculovirus

En general, la temperatura y la acción de los rayos ultravioleta (UV) son factores que influyen en mayor medida la estabilidad de los virus entomopatógenos. A su vez, las partículas no incluidas pierden su actividad más rápidamente que las incluidas debido a que la matriz proteica que rodea a estas últimas, posee un importante efecto sobre la estabilidad del virus. Así, los cuerpos de inclusión retienen su actividad por varios años (hasta 20) de almacenamiento a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ en la oscuridad (Steinhaus, 1960 citado por Alicia Sciocco (1996)).

A temperatura ambiente, aproximadamente $\pm 25^{\circ}\text{C}$ los virus incluso pueden retener su actividad por meses, pero al elevarse la misma, la pérdida es significativa, produciéndose su inactivación a temperaturas mayores de $\pm 60^{\circ}\text{C}$ (Jaques, 1977 citado por Alicia Sciocco (1996)). Es por esto que su eficacia en campo, al igual que su desarrollo comercial, ha sido influida negativamente por la radiación UV y el tiempo requerido para causar la muerte del insecto plaga (Jaques, 1985; Ignoffo, 1992 citados por Williams *et al.*, (2001)). La radiación solar, especialmente la radiación ultravioleta con espectro de actividad de 290 a 400 nm, es el factor más destructivo o limitante que afecta la persistencia y/o actividad de los baculovirus (Ignoffo *et al.*, 1977 citados por Williams *et al.*, (2001)), por lo tanto, el principal objetivo de utilizar sustancias fotoprotectoras en la formulación de los entomopatógenos es maximizar la persistencia ambiental de los mismos.

Durante varias décadas, diversos compuestos naturales y sintéticos han sido evaluados como protectores solares para entomopatógenos y por su modo de acción pueden ser divididos en sustancias reflejantes, absorbentes, colorantes, cromatóforos, captadores de radicales libres y más recientemente los blanqueadores ópticos (Williams *et al.*, 2001).

La conservación de baculovirus depende del destino que se le dará a los mismos ya que estos están considerados entre los mejores entomopatógenos (Sciocco *et al.*, 1996) porque se pueden procesar en forma de polvo, secados al aire o liofilizados y empaquetados en recipientes no porosos para prevenir la acumulación de humedad y evitar contaminaciones posteriores almacenándolos a $\pm 20^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, también se pueden conservar en suspensiones acuosas de solución tampón (Tris-EDTA, pH 7,6) o agua desionizada a -20°C . Si se llegaran a utilizar con frecuencia las suspensiones se pueden mantener a $\pm 4^{\circ}\text{C}$, con el fin de evitar el congelamiento y descongelamiento sucesivos y en el caso de que se observara pérdida de virulencia, un pasaje sobre el hospedero original o especie susceptible es suficiente para restablecer su actividad (Sciocco *et al.*, 1996)

Es importante comentar que entre la producción del formulado y el momento de aplicación hay un periodo durante el cual el producto no debe experimentar pérdida significativa en la viabilidad del virus, descomposición de otros componentes de la formulación ni cambios importantes en la composición física del mismo como por ejemplo, sedimentación o agregación de virus en suspensiones o endurecimiento de polvos. Para un producto comercial, este lapso de tiempo puede ser de meses o años; la vida de

almacenamiento de los insecticidas químicos es casi siempre entre dos y cuatro años (Rhodes, 1993 citado por Williams *et al.*, (2001)).

Las evidencias en relación con el efecto de la temperatura sobre la eficiencia de los virus, es un aspecto que aún necesita ser esclarecido, especialmente cuando se considera a la aplicación de estos agentes en condiciones de campo. Debido a la íntima relación fisiológica entre el virus y las células del hospedante, es difícil distinguir el efecto de la temperatura sobre el insecto o sobre el virus (Benz, 1987 citado por Moscardi y Sosa-Gomez (1996)). Según Tanada (1963 citado por Moscardi y Sosa-Gomez (1996)), la inhibición viral a temperaturas bajas ($\pm 10^{\circ}\text{C}$) y altas ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) puede estar relacionada con el efecto sobre la tasa de alimentación del insecto y/o la influencia sobre el mecanismo de invasión del virus en el hospedante, bien como a un aumento de las inmunidades celulares y hormonales en respuesta a bajas o altas tasas metabólicas del insecto en estas condiciones.

4.10 Abrillantadores ópticos

Los abrillantadores ópticos son sustancias con reconocida actividad sinérgica a los baculovirus debido a su capacidad para absorber la radiación UV y emitir luz en la región azul del espectro visible. Provocan una serie de importantes efectos fisiológicos en el tubo digestivo del insecto que están directamente relacionados con sus propiedades, tal es el caso del calcoflúor M2R, este se fija fuertemente a los β -glucanos, como la quitina que afecta a la biosíntesis de quitina (Elorza *et al.*, 1983; Roncero *et al.*, 1988; Bartnicki-García *et al.*, 1994). Estos compuestos pueden solubilizar proteínas de la quitina, estructura de la membrana peritrófica, presente en larvas de lepidóptero que protege al insecto de las células químicas, físicas y agentes microbianos intestinales ingeridas durante la alimentación (Wang & Granados, 1998 y 2000).

La degradación de la membrana peritrófica afecta la alimentación de las larvas y la tasa de desarrollo de supervivencia. Sin embargo, si no se aplicara abrillantador óptico, la degradación de las proteínas en la membrana puede regenerarse completamente en pocas horas (Wang & Granados, 2000).

Por otro lado, los abrillantadores ópticos forman parte del grupo químico de los estilbenes, utilizados comúnmente en muchos procesos industriales para dar mayor brillo a

pinturas, fibras, ropas, además de utilizarse en la producción de detergentes fluorescentes donde su actividad hace aparecer la ropa más blanca y brillante.

La tecnología en protectores UV e incremento de infectividad de los baculovirus ocasionado por algunos blanqueadores ópticos, así como su inclusión como coadyuvantes en formulados de patógenos de insectos, es un área en desarrollo y motivo de actuales investigaciones de campo. Hamm y colaboradores (1994) observaron una potenciación del NPV de *S. frugiperda* aplicado en cultivos de maíz cuando se añade el blanqueador Tinopal LPW, sin embargo, en este mismo estudio la variable: volumen de agua aplicada, también tuvo un efecto potenciador en la mortalidad por virus de magnitud similar.

Shapiro y Robertson en 1992 efectuaron investigaciones con abrillantadores ópticos como posibles protectores UV para su inclusión en las fórmulas de nucleopolyhedrovirus de la polilla gitana (*LdNPV*). Posteriormente, se constató que no sólo estos compuestos ofrecen protección contra la luz ultravioleta, también se observó que inducía mayor mortalidad a las larvas de la polilla gitana *Lymantria dispar* L., además, de mejorar en gran medida la actividad de *LdNPV* en los diferentes estadios de las larvas (Webb *et al.*, 1994a). Desde entonces los estudios en una amplia gama de baculovirus de los hospederos han mostrado que los abrillantadores ópticos funcionan como potenciadores de la actividad viral (Hamm y Shapiro, 1992; Farrar *et al.*, 1995; Vail *et al.*, 1996; Zou y Young 1996; Argauer y Shapiro 1997; Li y Otvos 1999), aunque la mayoría de ellos se han practicado sobre los primeros estadios larvales, excepto en el caso de la polilla gitana, *Lymantria dispar* (L.) (Shapiro y Robertson 1992; Webb *et al.*, 1994b) y de la soya, *Pseudoplusia includens* (Walter) (Zou y Young 1996).

En los estudios que se han realizado ha quedado demostrado que los abrillantadores ópticos pueden actuar como reforzadores de la actividad del baculovirus en condiciones de laboratorio (Hamm *et al.*, 1994; Li y Otvos 1999; Vail *et al.*, 1999). Sin embargo, su capacidad UV-protectora y potenciadora de la efectividad en campo ha sido relativamente poco investigada (Cuadro. 1). Es importante señalar que no todos los abrillantadores ópticos funcionan como potenciadores de baculovirus ya que, según Hamm (1999), la literatura publicada por varios autores no muestra dicho efecto, asimismo, en los últimos años se a emitido diferentes hipótesis sobre el modo de acción de blanqueadores ópticos, las cuales se dirigen hacia el intestino medio. En estudios con el NPV de *L. dispar* se

encontró que 48 hr después del consumo de virus más Tinopal LPW (hecho por larvas de *L. dispar*) se ocasionó perturbaciones fisiológicas tales como: disminución en alimentación y reducida ganancia de peso (Sheppard 1994 y Sheppard et. al. 1994). En larvas de *Trichoplusia ni* Hübner inoculadas con NPV de (*A. californica*) se observó un desprendimiento menor de células infectadas del intestino en presencia de Calcoflúor M2R (producto comercial de Tinopal LPW), lo cual aumentó la probabilidad de infección (Washburn et. al., 1998).

Hoy en día el modo de acción de estas sustancias parece ser resuelto. Se ha observado que la quitina en la membrana peritrófica actúa como un andamio para las demás proteínas de la membrana. El bloqueador Calcoflúor M2R se liga a la quitina y se liberan las proteínas de la membrana, esto provoca la inhibición de la formación de la membrana peritrófica en el intestino del insecto correlacionado con un incremento simultáneo en la susceptibilidad del insecto a la infección por baculovirus. También se observó la degradación de la mucina del intestino en la presencia de Calcoflúor M2R (Wang y Granados, 2000).

Por otra parte, entre las limitaciones que existen en el uso de los mismos se incluyen el aumento de los costos como coadyuvantes (Martínez *et al.*, 2000) otros han informado de efectos secundarios en los insectos polinizadores (Goulson *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Blanqueadores ópticos con actividad potenciada de los baculovirus evaluados en laboratorio (Williams *et al.*, 2001).

Blanqueador	Factor de potenciación	Huésped, virus	Referencia
Phorwite AR	1225	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Shapiro y Robertson (1992)
Phorwite RKH	1837	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Leucophor BS	967	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Leucophor BSB	417	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Tinopal LPW	1670	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Blankophor BBH	42-214 ^a	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Farrar <i>et al.</i> (1995)
Blankophor RKH	1032	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Blankophor BBH	832	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Argauer y Shapiro (1997)
Blankophor P167	410	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Blankophor HRS	92	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Tinopal LPW	1290	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Tinopal LPW	214	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Dougherty <i>et al.</i> (1996)
	41	<i>T. ni</i> , AcMNPV	
	15 - 1600 ^b	<i>P. includens</i> , PiNPV	Dougherty <i>et al.</i> (1996)
	164-303000	<i>S. frugiperda</i> , SiMNPV	Zou y Young (1996)
	115	<i>S. frugiperda</i> , SiMNPV	Hamm y Shapiro (1992)
	24-58 ^c	<i>A. gemmatalis</i> , AgMNPV	Martínez <i>et al.</i> (2000)
	12,5	Ag MNPV	Fuxa y Richter (1997)
		<i>S. exigua</i> , SeMNPV	Hamm y Chandler (1996)
Tinopal LPW	13,1	<i>H. zea</i> , AfMNPV	Shapiro y Vaughn (1995)
[Calcofluor M2R]	25,3	<i>H. zea</i> , HaMNPV	
	2,1	<i>H. zea</i> , GmMNPV	
	50	<i>H. zea</i> , AcMNPV	
	8,7	<i>H. zea</i> , HzSNPV	
Tinopal LPW	4,3	<i>H. virescens</i> , AfMNPV	Vail <i>et al.</i> (1996)
	2,9	<i>H. zea</i> , AfMNPV	
	13,6	<i>S. exigua</i> , AfMNPV	
	7,8	<i>T. ni</i> , AfMNPV	
Blankophor RKH	1,7	<i>C. occidentalis</i> ,	Li y Otvos (1999b)
Blankophor BBH	2,8	CiMNPV	
Blankophor P167	3,1	CiMNPV	
Blankophor HRS	3,6	CiMNPV	
Tinopal LPW	2,1	CiMNPV	

^a depende del estadio de la larva; ^b depende de la formulación; ^c depende del grado de resistencia de la cepa del insecto.

4.11 Bioensayo

El bioensayo, según Sciocco y colaboradores (1996), puede ser cualquier método que mida alguna propiedad de un factor, en términos de respuesta biológica. Es decir, que el bioensayo toma a los organismos vivos como aparatos de medición, y establece el parámetro biológico que utilizará (mortalidad, longevidad, fertilidad, crecimiento, atracción, etc.) para relacionar el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo

(Busvine, 1971). En el aspecto toxicológico, el factor causal es siempre un agente deletéreo y el efecto normalmente es la mortalidad o algún otro daño biológico.

Si se presentaran dos o más aislamientos o preparaciones, estas pueden ser medidas a través de los siguientes parámetros:

a) Dosis letal media (DL_{50}): es la cantidad de virus (cuerpos de inclusión, partículas virales) capaz de provocar el 50% de la mortalidad en una población.

b) Concentración letal media (CL_{50}): es el dopaje aplicado (generalmente por unidad de superficie) que produce el 50% de mortalidad en una población.

En etapas de comercialización es la única forma disponible para establecer la virulencia de una preparación y realizar controles para mantener constante su calidad (Hughes y Word, 1986). Sin embargo, la metodología a seguir para la evaluación de virus en insectos no se encuentra estandarizada y dentro de un mismo grupo, más aún en un mismo género o aislamiento, varía según los diferentes autores. La elección del tipo de bioensayo depende entonces de los objetivos, la sencillez del método, el grado de precisión deseado y la disponibilidad de materiales, entre otras cosas (Sciocco *et al.*, 1996).

En patología, por ejemplo, el fenómeno causal es siempre un patógeno y el efecto normalmente se mide en términos de mortalidad o de algún otro daño fisiológico. En los bioensayos donde se prueban los efectos de diversas cepas de baculovirus sobre determinadas especies de insectos, el efecto se mide normalmente en términos de mortalidad, como si fuera un insecticida químico (Sciocco *et al.*, 1996).

4.12 Experimentos en campo

Moscardi y Sosa-Gomez (1996), mencionaron que la utilización de virus entomopatógenos en campo representa un componente importante en los programas de manejo integrado de Plagas (MIP), principalmente debido a su especificidad y a su compatibilidad con otras tácticas de control. El uso de los mismos en campo data de varias décadas. Una de las primeras tentativas de utilización de un virus para el control de insectos fue la introducción, en 1982, de un VPN en poblaciones de palomilla nun, *Lymantria monacha* L. en bosques de *Pinus* alemanes (Moscardi y Sosa-Gomez, 1996). En 1944, Balch y Bird relataron la importancia del control natural ejercido por un virus de

polihedrosis nuclear (VPN) de *Gilpinea hercyniae*, el cual fue introducido accidentalmente en Canadá junto con parasitoides importados de Europa.

La aplicación de los virus en campo puede ser de diferentes formas, dependiendo de los objetivos del programa, del insecto plaga en consideración o del sistema de cultivo donde se pretende aplicar el entomopatógeno.

Una de estas formas sería la de introducir el agente biológico en áreas donde no está presente naturalmente, con el objetivo de establecerlo en la población del hospedante y gradualmente incrementar la mortalidad natural de la plaga. Otra manera consiste en producir el entomopatógeno para realizar introducciones inoculativas y periódicas, para su rápido aumento y diseminación en el ambiente colonizado por la plaga. Una tercera forma es la de inoculaciones inundativas que se asemejan a la utilización de los insecticidas convencionales donde el patógeno es producido en gran escala y aplicado sobre los cultivos para controlar rápidamente las poblaciones del hospedante, evitando que este alcance los niveles de daño económico para el cultivo (Rodríguez, 1991).

En cualquiera de los casos y especialmente en aquel que se refiera a la utilización como insecticida biológico, el éxito de la aplicación de virus a campo dependerá de varios factores bióticos y abióticos que actúan en la relación virus-hospedante-planta. Un adecuado conocimiento de estos factores es de fundamental importancia antes que el virus entomopatógeno sea utilizado en grandes áreas.

La evaluación de un producto a base de una cepa de baculovirus bajo condiciones de campo, al igual que las evaluaciones en el laboratorio, es muy similar a las técnicas utilizadas para evaluar la eficiencia de los insecticidas químicos. Las diferencias entre estas evaluaciones y las llevadas a cabo en el laboratorio son evidentes: 1) casi un nulo control de las condiciones ambientales del experimento; 2) mayor variabilidad de los individuos sujetos al experimento; 3) menor control de los factores bióticos que inciden sobre las plagas; 4) diferentes parámetros para medir la efectividad del insecticida; 5) diferencia en las técnicas estadísticas para analizar los datos experimentales; entre otras (Ibarra *et al.*, 2001).

Las evaluaciones bajo condiciones de campo pueden llevarse a cabo en lotes pequeños del cultivo, cuando se trata de pruebas preliminares o se requiere llevar a cabo un control más eficiente de las condiciones del experimento. Por otro lado, cuando se pretende

la validación de un producto de insecticida, se requiere de áreas más extensas de prueba (Ibarra *et al.*, 2001).

4.13 Resistencia de insectos a insecticidas químicos y biológicos

Lagunas (1983), consideró que los insecticidas químicos son productos que en la práctica comúnmente eliminan a los individuos susceptibles y favorecen el incremento de los individuos resistentes.

La presencia de poblaciones resistentes en el campo es una consecuencia del fenómeno de evolución al que están expuestos todos los organismos en la naturaleza. La FAO (1979) define la resistencia como “La capacidad desarrollada por una población determinada de insectos a no ser afectada por la aplicación de insecticidas”. Asimismo, Hoskins y Gordon (1965), consideran que la resistencia es “La capacidad adicional de un insecto para soportar la exposición a un producto tóxico que fue insuficiente para matar a la totalidad de una población, esta resistencia frecuentemente no es específica para el tóxico usado sino que generalmente se extiende en cierto grado a compuestos tóxicos relacionados”. La capacidad de las poblaciones de insectos para volverse resistentes a los insecticidas es solamente un caso especial de la adaptabilidad de las poblaciones a los cambios del medio (Rudd, 1955).

De la misma manera, Rodríguez (1983) distinguió dos clases de resistencia: la fisiológica y la de comportamiento. La primera implica la presencia de uno o varios mecanismos específicos metabólicos (enzimáticos) y no metabólicos (morfológicos) según sea el estímulo ejercido. La segunda incluye todo aquel hábito que adopta determinada especie en respuesta a estímulos previos al medio ambiente por lo cual evade el tóxico aplicado o solo recibe dosis subletales.

Por su parte, Looockwood (1984), mencionó que estas dos clases de resistencia frecuentemente coexisten en las poblaciones de insectos y reconoce la gran continuidad fundamental de comportamiento y fisiología en los insectos. Además propuso que el grado de exclusividad de cualquier mecanismo de resistencia es proporcional a su habilidad de persistir, manifestando divergencia evolucionaria solo bajo condiciones específicas, en las cuales suele esperarse la coevolución de algunas formas de resistencia fisiológica.

De esta manera se conocen dos tipos de resistencia según sea el número de mecanismos y plaguicidas involucrados: 1) La cruzada y 2) la múltiple. Georghiou (1965), define resistencia cruzada como el fenómeno presente cuando una población de organismos expuestos a presión de selección con algún insecticida, adquiere resistencia a este y simultáneamente a otros productos relacionados toxicológicamente y que, aunque nunca han estado en contacto con el insecto, comparten los mismos mecanismos de resistencia.

Según Metcalf (1983), la resistencia múltiple resulta de coexistir varios alelos génicos independientes, los cuales inducen mecanismos de resistencia contra insecticidas no relacionados con los diferentes modos de acción y vías de desintoxicación.

La Academia Nacional de las Ciencias (NAS) en 1972, consideró la resistencia como un proceso bioquímico-genético en el cual algunos individuos toleran dosis de insecticidas que son letales para la mayoría la población normal de una misma especie, y se considera un caso especial de su adaptabilidad a los cambios del medio ambiente, de esta manera la velocidad con que la manifiestan depende del grado de selección de la población que resulte del uso de altas dosis y aplicaciones continuas, así como el resto de la población que no ha sido sometida a aplicaciones, que por medio de migraciones y combinación genética, permite la restauración de los genes que le dan la característica de susceptibilidad. Por tal motivo, se asume que la relación cuantitativa entre la intensidad de selección y velocidad del progreso evolutivo del desarrollo de la resistencia, depende además de los factores anteriores, de la dominancia y frecuencia de los alelos que la confieren (Hoskins y Gordon, 1965; Gunther y Jeppson, 1962).

Por su parte Plapp (1976) y Cremllyn (1989), consideraron la resistencia como una característica hereditaria que se manifiesta en poblaciones que poseen los factores para tal resistencia y no siendo posible inducirla por hábito durante la vida del insecto ya que esta está presente en su contenido genético y que por medio del uso de insecticidas, se van seleccionando los genes mutantes con reducida susceptibilidad a estos tóxicos, dando como resultado cepas tolerantes que sobreviven y que al reproducirse heredan la resistencia a generaciones subsecuentes.

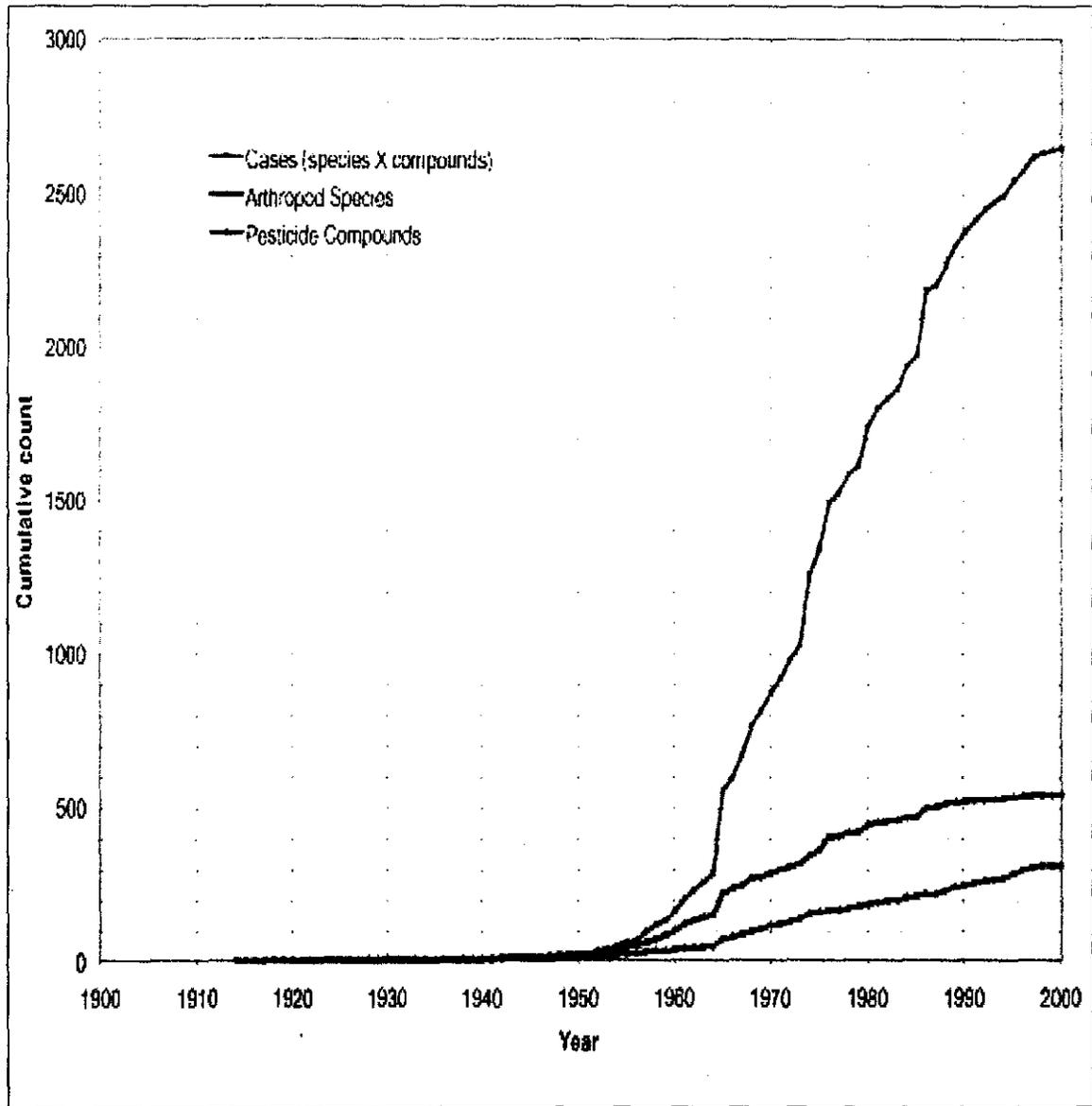
Mediante sus investigaciones, Georghiou y Taylor (1977) (a y b), demostraron por medio de simulaciones en computadora que la regulación de cualquiera de los factores

mencionados, por sí solo, no es suficiente para contrarrestar la resistencia indefinidamente, pero hay algunas combinaciones que son más claramente influenciadas que otras.

Hay que señalar que Whalon y colaboradores (2001), consideraron la resistencia como un fenómeno que se incrementa con el transcurso de los años, debido principalmente al aumento severo de insectos resistentes a diferentes compuestos. Ver Gráfica 1.

La definición clásica de resistencia propuesta por la Organización Mundial de la Salud debería ser ligeramente modificada en los sistemas que involucraran patógenos e insectos, ya que el insecticida no es un agente químico, sino biológico. En este caso, la resistencia a patógenos puede definirse como el desarrollo de la habilidad para tolerar dosis del inóculo que habitualmente provocarían la enfermedad o la muerte en la mayor parte de los individuos en una población normal de la misma especie (World Health Organization, 1957; Omoto y Alves, 1998). En esta definición de tipo operacional, se comparan la población de estudio con una población de referencia, en condiciones iguales. Los aspectos relacionados con las diferencias de susceptibilidad entre estudios larvarios, así como las diferencias de susceptibilidad debido a factores nutricionales o del ambiente no entran, por consiguiente, en el campo de la resistencia y serán considerados en segundo plano.

Moscardi y Sosa-Gomez (1996), consideraron que la resistencia cuenta con un punto de vista analítico, en donde se define de forma absoluta y no por comparación.



Gráfica 1. Línea del tiempo e incremento de la resistencia de insectos a Plaguicidas documentadas a nivel mundial (Whalon *et al.*, 2001)

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio consistió de dos partes esenciales y se llevó a cabo de septiembre de 2004 a octubre de 2007. La primera parte se realizó en el laboratorio de Entomología perteneciente a la Universidad de Guadalajara: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) – División de Ciencias Agronómicas - Departamento de Producción Agrícola. La segunda parte se realizó durante los meses de septiembre a octubre de 2007, en el Campo Experimental del CUCBA, ubicado en el predio Las Agujas, Municipio de Zapopan, Jalisco, a cien metros de distancia en dirección sur oriente de la entrada principal al inmueble.

5.1 Primera etapa (evaluación en laboratorio)

5.1.1 Material biológico

La población de *Spodoptera frugiperda* se obtuvo de una colecta realizada al interior del estado de Jalisco durante los meses de julio a septiembre de 2004, tiempo ideal de aparición de la plaga en los cultivos de maíz, logrando la captura de 500 larvas en sus diferentes instares, las cuales se trasladaron en pequeños vasos de plástico. Cabe señalar que se introdujo una larva por vaso debido a sus hábitos caníbales. La reproducción de la colonia se hizo en el Laboratorio de Entomología del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de La Universidad de Guadalajara, en una cámara de cría destinada para esta investigación bajo condiciones de temperatura promedio de $\pm 28^{\circ}$ C y $\pm 86\%$ de humedad relativa, durante 5 generaciones sin ser sometida a presión de selección por insecticidas; fueron alimentadas con una dieta rica en vitaminas y fibras (Mihm, 1984).

Cuadro 2. Contenido de nutrientes para la elaboración de la dieta para los insectos (Mihm, 1984).

Agua destilada	1 litro
Maíz opaco molido	100 gramos
Germen de trigo	6 gramos
Soya	50 gramos
Levadura de cerveza	40 gramos
Vitamina C	6 gramos
MPH	2.5 gramos
Teragran	10 mililitros
Alcohol	7 mililitros
Formaldehído	2.5 gramos
Colina	2 gramos
Acido Sórbico	1.3 gramos
Carragenina	15 gramos
Antibiótico	7 gotas

Es importante señalar que las cantidades que se presentan en el cuadro 2, son para preparar un kilogramo de alimento.

5.1.2 Bioensayo

Se utilizó una suspensión purificada de *S/NPV* procedente de la empresa denominada EMBRAPA, ubicada en la ciudad de Londrina, Paraná en Brasil, por medio del Dr. Flavio Moscardi. De dicha suspensión se contabilizaron los cuerpos de inclusión con el empleo una cámara "Neubauer", se contaron los polihedros presentes con ayuda de un microscopio óptico (1000X) en sólo cinco cuadrados secundarios de los 25 que contiene el cuadrado primario central (CPC). Se sumaron los polihedros de los cinco cuadrados y se multiplicó por 50,000 para obtener el total de cuerpos de inclusión por centímetro cúbico, realizándose en dos repeticiones.

Los datos fueron transformados para el cálculo del número de polihedros en volumen, proporcionado a cada larva sometida a tratamiento, por lo que la dosificación se expresó en números de cuerpos de inclusión por hoja (CI/hoja). Con el número de cuerpos de

inclusión, determinado en la suspensión, se procedió a establecer la CL_{50} para la población de larvas colectadas; después de establecida, se aumentó la dosis hasta determinar la CL_{95} .

Tanto para el testigo como para las concentraciones equivalentes a la CL_{75} , CL_{85} y CL_{95} se utilizaron 40 larvas sanas del 3er instar por ser de fácil manipulación y mayor actividad, lo cuál aseguró una buena infección (Valicente y Cruz, 1991; Vázquez *et al.*, 2002), además de que en cada una de las concentraciones se realizaron cuatro repeticiones.

La aplicación de baculovirus se hizo en cajas petri, en forma individual. Se prepararon pequeños discos de 5 cm de diámetro de hojas frescas de higuera *Ricinus comunis* L., desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%. En un tubo de ensaye se colocaron 2 ml de la suspensión con la concentración de poliedros a evaluar, se introdujeron los trozos con unas pinzas de laboratorio y agitándose constantemente por medio de un vortex, se retiraron dejándolas secar a temperatura ambiente. Se colocaron las larvas sobre las hojas tratadas y se taparon las cajas petri por un espacio de 24 horas. Transcurrido este tiempo, las larvas se alimentaron diariamente con hojas frescas. Se realizaron conteos de larvas muertas después de tres días, luego diariamente por un período de 15 días después de la exposición. Con los datos de mortalidad se calcularon las CL_{50} y CL_{95} de acuerdo al análisis Probit, usando en los programas MSTATC, versión 4.3 y para el análisis estadístico de la mortalidad corregida se utilizó la fórmula de Abbott (Who, 1975).

5.2 Segunda etapa (evaluación en campo)

5.2.1. Multiplicación y crianza del gusano cogollero

La reproducción de la colonia se hizo en el Laboratorio de Entomología del Departamento de Producción Agrícola del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de La Universidad de Guadalajara, en una cámara de cría destinada para esta investigación bajo condiciones de temperatura promedio de $\pm 28^{\circ}$ C y $\pm 86\%$ de humedad relativa, siguiendo el método de crianza masiva de insectos del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Este centro cuenta con un campo experimental ubicado en la ciudad de Texcoco, Estado de México. Se realizó entonces la reproducción basados en el manual publicado por Mihm (1984).

Se fabricaron 30 cajas para la crianza de los individuos, estas contenían módulos de celda partida que fueron hechos de celosías para una mejor difusión de luz y contruidos con poliestireno disponible en México. Los módulos partidos ayudaron durante la extracción de las pupas. Las cajas (29 x 29 x 4 cm) se hicieron con Plexiglás de tres y seis mm, se taparon con una capa de toallas de papel, una lamina de cedazo de cobre de 50 mallas por pulgada y una sección de rejilla de poliestireno sujeta en su lugar con ligas grandes de hule.

Para minimizar la contaminación microbiana, las unidades se esterilizaron remojándolas por 24 horas en una solución al (10%) de hipoclorito de sodio. Las cajas y los bloques de rejillas se trataron superficialmente asperjándolos con una solución al (5%) de acido sórbico y (5%) de metil paraben en alcohol. Este tratamiento no afectó el crecimiento de los insectos y ayudó a confinar cualquier contaminación casual, a unas pocas celdas dentro de la caja.

La dieta fresca se vertió en los recipientes y las rejillas fueron profusas en la dieta manualmente. La unidad se expuso a radiación ultravioleta para proveer más descontaminación.

El manejo de los adultos se realizó mediante la utilización de bolsas de papel enceradas, en las cuales, con la ayuda de una espátula o raspador, las masas de huevecillos fueron removidas de la bolsa de papel.

Como las mariposas del gusano cogollero son voladoras activas, los adultos recién emergidos fueron inactivados enfriéndolos en un refrigerador de la marca General Electric que se encontraba en el laboratorio, específicamente, exponiéndolos a una temperatura de 3 minutos aproximadamente. Luego se seleccionaron machos y hembras para colocar veinte parejas de mariposas en cada bolsa (10 x 20 x 40 cm), la cual se cerró doblando el extremo abierto y sellándolo con un pedazo de cinta adhesiva. Se les colocó además dentro de las bolsas una caja pequeña de plástico con un pedazo de algodón humedecido con agua azucarada al (5 %) como alimento.

Las bolsas se conservaron en un cuarto destinado para la crianza dentro del laboratorio a ± 28 grados y $\pm 80\%$ de humedad relativa hasta que fueron ovipositadas las primeras masas (2-3 días), luego se cambiaron diariamente por 5 a 7 días. El cambio de las bolsas consistió en que una bolsa nueva se insertó en la que contenía los adultos, luego se pasaron de bolsa

los individuos; se les introducía una nueva caja con solución azucarada, posteriormente se cerró la bolsa. Estas, a su vez, quedaban cargadas de huevos, los cuales se cortaron con unas tijeras, abriéndose por completo y se rasparon las masas de huevos con la ayuda de una espátula. En este proceso se dañaron algunos huevos (menos de 10%) pero como la producción normal es de 3000 huevos por hembra, esta pérdida no tuvo importancia. Después de coleccionar las masas de huevos se colocaron en recipientes de plástico cilíndricos y se les incubó hasta que nacieron las larvas (2 días a ± 30 grados a 5 días a ± 20 grados). Una vez que eclosionaron los huevos se realizó la infestación de las cajas de crianza, la cual se llevó a cabo incorporándole 100 a 200 cc de gránulos de olote de maíz esterilizado, se colocó en el recipiente que contenía las larvas; este se rotó suavemente para mezclarlo uniformemente. Inmediatamente después, la mezcla se transfirió a un frasco, tipo salero de mesa con los orificios agrandados para facilitar la salida de los gránulos de olote, al momento de agitar y sacudir cayeran de manera homogénea las partículas con las pequeñas larvas sobre la caja que contenía la dieta y la parrilla de celdas. Mediante una lupa de laboratorio se observaron que se hallaban entre dos y cinco larvas por celda. Después de cerrarlas, las cajas de crianza se llevaron a estantes en el cuarto de crianza con ± 70 a $\pm 80\%$ de humedad relativa y temperaturas que varían entre ± 20 y ± 32 grados. Las cajas no se abrieron sino hasta el estado de pupa, momento en el cual solamente una larva se encontraba por celda.

En este momento casi todas las pupas se encontraron debajo de la superficie de la dieta en las cajas. Al remover parte de la capa de dieta y las celdas de conversión en pupa, estas pudieron ser suavemente extraídas del recipiente. Las pocas pupas que quedaron sobre el tapón de dieta, lograron ser depuestas con la mano y en algunos casos descartadas.

5.2.2 Multiplicación del baculovirus (*Sf*NPV)

Para multiplicar el baculovirus se empleó la suspensión de *Sf*NPV de EMBRAPA soja; cabe destacar que en los bioensayos anteriores se coleccionaron los insectos que se infectaron y se colocaron en tubos de ensayo para su almacenamiento en un refrigerador a temperatura de ± 4 a $\pm 10^{\circ}\text{C}$. Para la obtención de más material biológico se procedió a preparar soluciones sin una dosis establecida o cuantificada en la que se sumergieron hojas

de higuerrilla previamente desinfectadas, este método es también conocido como “Deep leaf”, para dejarse secar a temperatura ambiente luego de la aplicación. Ya secas se introdujeron en cajas rectangulares de plástico las cuales miden 28 centímetros de largo por 15 centímetros de ancho por diez centímetros de alto, donde se colocaron entre 30 y 50 larvas del segundo y tercer instar también, las cuales se alimentaron con las hojas portadoras del virus por espacio de 24 horas. Luego se alimentaron diariamente con hojas frescas sin infectar y se esperó de cinco a ocho días más para la recolección de las larvas muertas, mismas que se colocaron en tubos de ensayo para, de igual manera, ser almacenadas a temperatura de ± 4 a $\pm 10^{\circ}\text{C}$.

5.2.3 Aislamiento y obtención de los cuerpos de inclusión (CI)

El aislamiento de los CI se realizó a partir de las larvas concentradas en los tubos de ensayo, con el método descrito por Sciocco (1996). Se procedió a macerarlas con la ayuda de un mortero, además de agregar agua destilada estéril durante un periodo de tres a diez días a temperatura ambiente, con la finalidad de agilizar el proceso de putrefacción de los tejidos y la liberación de los cuerpos de inclusión minimizando las pérdidas en la posterior purificación.

Una vez transcurrido los diez días, el macerado se filtró a través de varias capas de gasa o muselina y se sometió a una centrifugación diferencial, esto es 1,500 rpm, por dos minutos y lavados sucesivos con el objetivo de eliminar los restos de tejidos, lípidos, bacterias u otros contaminantes. Luego de esto se diluyó la suspensión con una solución de Tween al (0.1%). Posteriormente se centrifugó nuevamente a 1,500 rpm por dos minutos, después el sobrenadante se transfirió a otro tubo retirando primero los restos de tejidos para centrifugar a 7,000 rpm por espacio de 20 minutos, donde luego de transcurrido el tiempo se retiró de nuevo el sobrenadante y el pellet que resultó fue resuspendido en agua destilada desionizada estéril, después se procedió a revisarlo bajo el microscopio para observar la calidad de pureza que se obtuvo.

Posteriormente se empleó la cámara de Neubauer para contabilizar los poliedros y saber con cuantos contaba la solución que se obtuvo de la purificación, realizando la misma metodología de conteo que realizamos en la primera parte, esto es que solo se

contabilizaron los cuerpos de inclusión presentes en cinco cuadrados secundarios de los 25 que contiene el cuadrado primario central (CPC). Se sumó los poliedros de los 5 cuadrados y se multiplico por 50,000 para obtener el resultado del número de cuerpos de inclusión por centímetro cúbico. Es importante mencionar que lo realizamos en dos repeticiones con la finalidad de obtener un resultado óptimo.

5.2.4 Aplicación en campo (inoculación)

Se evaluó la actividad insecticida de las formulaciones a base de baculovirus en un terreno ubicado a 100 metros de distancia orientado hacia el poniente del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de La Universidad de Guadalajara, el predio es conocido como las Agujas, dentro del municipio de Zapopan, Jalisco. Luego de examinar el insecticida y comprobar que existía una buena infestación de individuos, procedimos a realizar la evaluación del nucleopolyhedrovirus.

Para la realización del experimento se utilizó el diseño experimental denominado: "bloques al azar" ya que este método cuenta con una característica que permite asumir o no que las parcelas sean homogéneas, siempre y cuando el terreno sea homogéneo, además de que los tratamientos se asignan al azar dentro de cada parcela, por lo que se procedió con la aplicación de cinco tratamientos con cuatro repeticiones.

Las unidades experimentales consistieron en parcelas distribuidas por tres surcos de cinco metros de largo por 1.40 metros de ancho.

El terreno se delimitó, y dividiéndose en parcelas con la ayuda de estacas altas y pequeñas, las cuales se trazaron con rafia, representando cada parcela un área de (7m²) y los bloques con los diferentes tratamientos, separados entre si por un metro, lo que dio como resultando una superficie rectangular total de 23 metros de largo por diez metros de ancho, como se muestra en la figura 1.

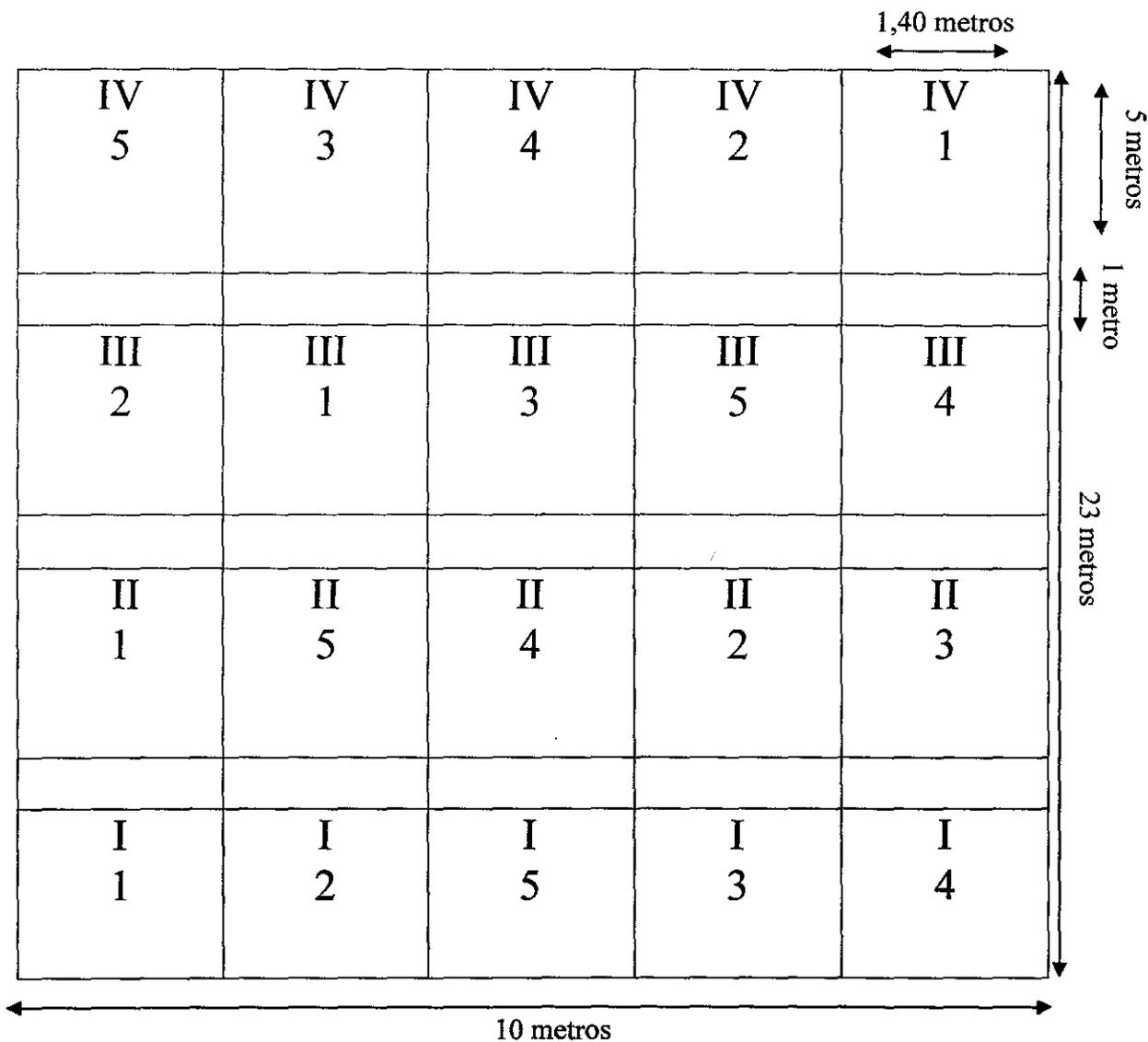


Figura. 1. Diagrama de la parcela para la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, en Zapopan, Jalisco, en el mes de septiembre de 2007.

Se contabilizó el número de plantas, por parcela, dañadas por cogollero; antes de empezar a establecer los cinco tratamientos, los cuales fueron:

- 1) $1.83 \times 10^9 \mu\text{L/ml SfNPV Ha}^{-1}$ + 1% abrillantador.
- 2) $1.83 \times 10^9 \mu\text{L/ml SfNPV Ha}^{-1}$ $\mu\text{L/ml de SfNPV}$.
- 3) Abrillantador al uno por ciento.

- 4) Mustang MAX (Zeta-cipermetrina α -ciano-(3-fenoxifenil) metil (+) cis/trans-3-(2,2-dicloroeteno) 2,2-dimetil-ciclopropano-carboxilato, no menos de 12% (Equivalente a 109g i.a/L)) en dosis de 1.5 l Ha⁻¹
- 5) Un testigo absoluto.

Cabe destacar que las pruebas de las formulaciones a base de NPV se mezclaron con Tinopal LPW, sustancia con reconocida actividad sinérgica a los baculovirus (Martínez *et al.*, 2003), además, de su potenciación para los insecticidas a base de baculovirus (Hamm, 1999; Shapiro y Argauer, 2001), siendo, las formulaciones un factor importante en la investigación, para el desarrollo de un insecticida biológico para el control del gusano cogollero en campo (Cisneros *et al.*, 2003).

Los tratamientos se aplicaron de las 08 a las 09 horas del día diez y ocho de septiembre de 2007; cabe destacar que no se realizaron infestaciones artificiales con larvas, sólo la infestación natural que se encontró en el terreno de prueba. También se tomaron datos antes de realizar la aplicación de los tratamientos. Luego de la aspersión de las soluciones se procedió a evaluar siete días después, siendo el día veinticinco de septiembre, que se contabilizaron las larvas presentes en cuatro plantas seleccionadas al azar por repetición por tratamiento, registrando los datos encontrados esa fecha. Posteriormente se tomaron datos realizando el mismo procedimiento el día dos de octubre, a los quince días después de la aplicación y al día veintiuno después de la aplicación de los tratamientos es decir, el nueve de octubre.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación en laboratorio

6.1.1 Bioensayo

El cuadro 3, muestra las diferentes cantidades de cuerpos de inclusión de *SfNPV* utilizados en cada dosis, la mortalidad observada en las larvas tratadas, al igual que en el testigo para calcular, utilizando la fórmula de Abbott para el cálculo de la mortalidad corregida. Se observa que a medida que aumenta la concentración de polihedros las mortalidades también se incrementan en cada concentración evaluada, alcanzándose en la sexta (7'000 000) un 100% de mortalidad.

Cuadro 3. Mortalidad de larvas de 3er estadio de *Spodoptera frugiperda* infectadas con diferentes concentraciones del *SfNPV*, en condiciones de laboratorio.

Concentraciones de CI de <i>SfNPV</i>	Nº de Larvas Evaluadas	Nº de Larvas muertas con <i>SfNPV</i>	Mortalidad en el Testigo	% de Mortalidad Corregida
70	40	4	0	12
700	40	5	3	8
7000	40	6	4	10
70000	40	10	3	27
700000	40	36	4	85
7000000	40	40	5	100

El programa Probit no considera los ensayos con 0 ó 100% de mortalidad, por lo que sólo se consideran cinco ensayos en la regresión lineal Concentración-Mortalidad (Figura 2). La ecuación $Y = 5.43 + .43 (x - 13.9)$, se usa para determinar una CL_{50} de 874 (Cuadro 4).

6.1.2 Obtención de la CL₅₀

La mortalidad de las larvas en cualquiera de las concentraciones evaluadas ocurrió entre el 5° y 7° día después de la exposición al tratamiento, al cabo de los cuales ya no se observaron larvas muertas, tal como lo reportan Valicente y Cruz (1991) y Vázquez *et al.*, (2002). La CL₅₀ fue de 874 poliedros/hoja entre los límites 182 y 2,662 polihedros y la CL₉₅ fue de 735,968 entre los límites 1.8×10^5 y 7.2×10^6 (Cuadro 4). Estos resultados indican un amplio rango de respuesta que abarca 5 ciclos logarítmicos de las dosis.

Cuadro 4. Resultado de análisis probit determinando CL₅₀ y CL₉₅ de la cepa S_{YNPV} de EMBRAPA, septiembre 2006 con el número de poliedros sobre hojas de *Ricinus Communis* (L.)

	No poliedros	Límites Fiduciales	Ecuación
CL 50	874	182 – 2,662	$Y = 5.43 + .43 (x - 13.9)$
CL 95	735,968	181,755 – 7'223,208	

Chi cuadrada = 1.43

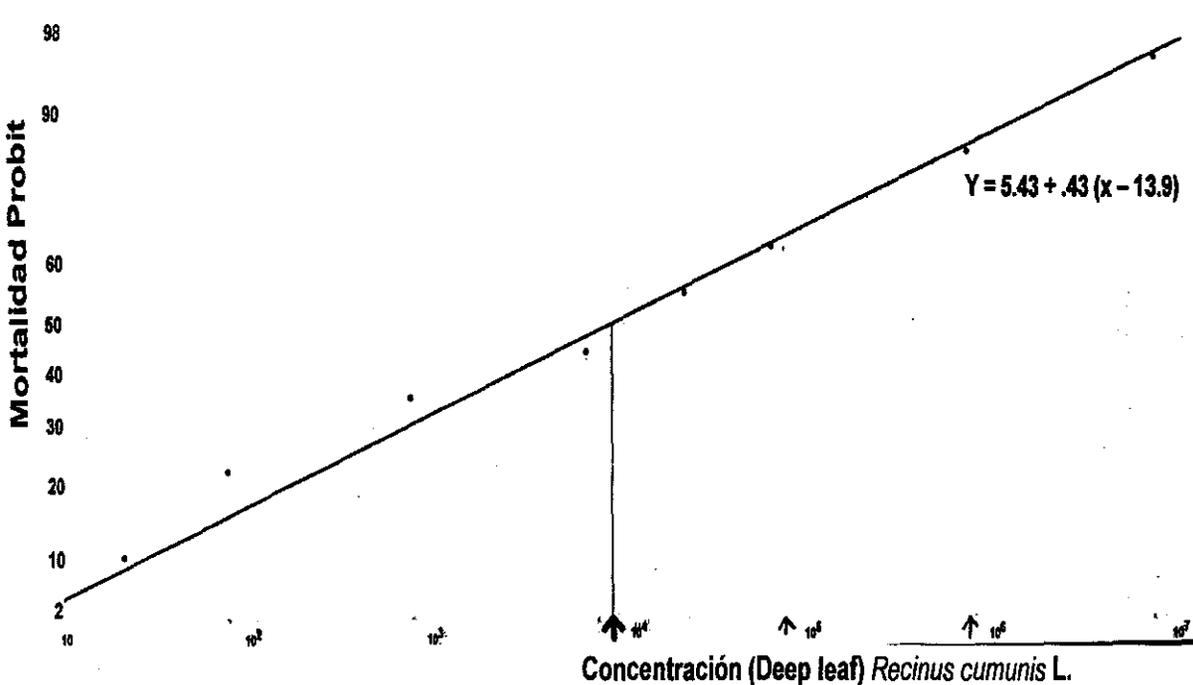


Figura 2. Línea de regresión concentración-mortalidad para larvas de gusano cogollero infectadas con S_{YNPV}.

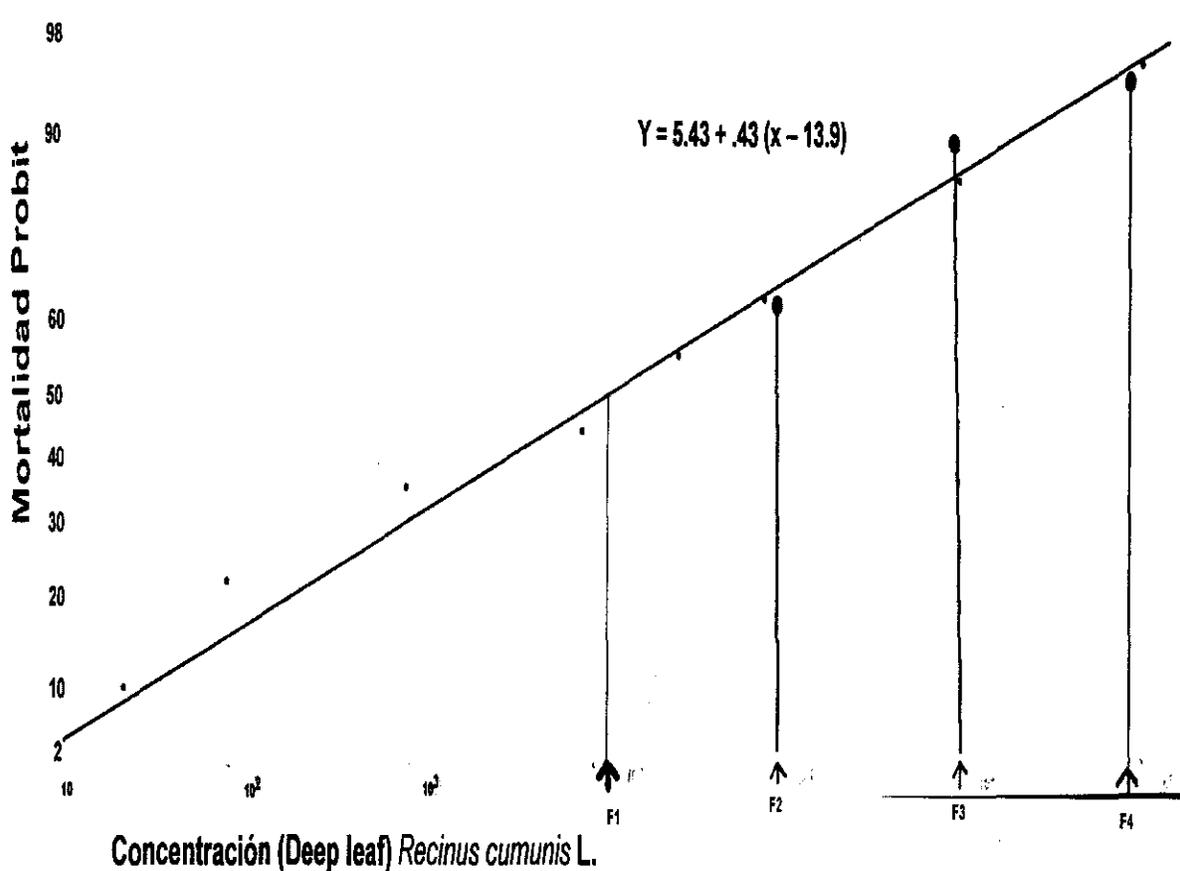


Figura 3. Incremento de la resistencia de *SyNPV* hasta la F4.

En la figura 3, se muestran los resultados de la presión de selección a que fue sometida la población de *Spodoptera frugiperda* durante cuatro generaciones, destacando la resistencia que puede obtener en pocas generaciones en laboratorio, cabe destacar que esto se logró dejando descansar la población colectada en campo una generación.

6.2 Evaluación en campo

6.2.1. Reproducción artificial del gusano cogollero

El método de crianza utilizado en el CIMMYT resultó ser eficiente, ya que permitió reproducir con mayor facilidad la población en laboratorio, además de obtener un número mayor de individuos por generación, lo que permitía la realización de las diferentes

evaluaciones llevadas a cabo en el mismo, para lo cual fue necesario dividir las larvas en dos grupos, el primero se destinaba al reciclaje de la población, el segundo para la multiplicación del virus.

6.2.2 Sintomatología del S/NPV

Se observaron síntomas de la enfermedad en las larvas, tal como: inapetencia a partir del tercer día de la infección; pérdida del movimiento; y coloración más clara, adquiriendo un color marrón oscuro al final de la enfermedad. También, las larvas muertas quedaron adheridas con sus pseudopatas a las hojas de higuera y las que murieron en la parte superior del envase se adherían a la tapa del recipiente con su cabeza inclinada hacia abajo formando la V invertida tal como lo reportan diferentes autores, su epitelio se tornaba frágil y se rompía con facilidad, liberando un líquido lechoso (Figura 4), siendo difícil recolectarlas completas. Al observar este líquido lechoso (hemolinfa) al microscopio fotónico se comprobó la presencia de millares de cuerpos de inclusión de los virus (Figura 5).

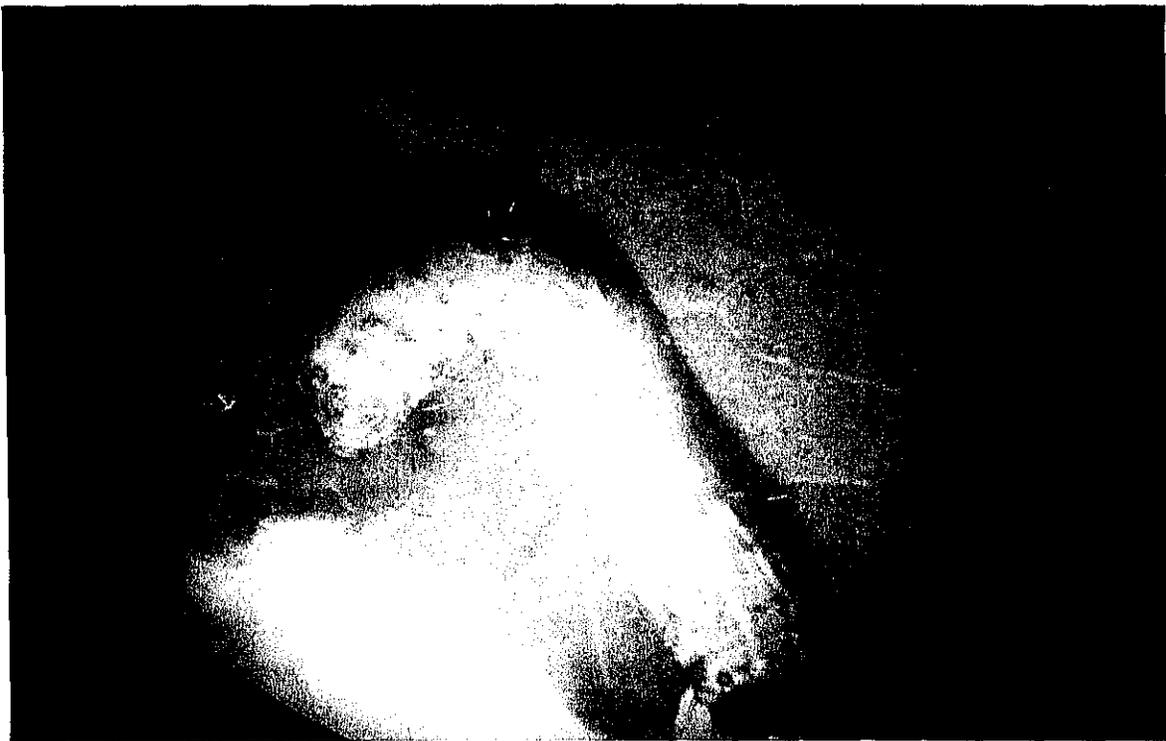


Figura 4. Larva muerta de *Spodoptera frugiperda*, iniciando ruptura de tegumento para la liberación de líquido lechoso.



Figura 5. Vista de la hemolinfa de una larva a través del microscopio fotónico a 400X de aumento, observándose millares de cuerpos de inclusión del virus SYNPV.

6.2.3. Obtención de cuerpos de inclusión (CI)

Fueron obtenidos siguiendo el método descrito por Sciocco (1996), el cual resulto ser sencillo y rápido para la obtención de CI de las larvas colectadas en las diferentes pruebas realizadas en laboratorio, procediendo además, con el conteo de los poliedros mediante la cámara Neubauer resultando la cantidad de 823'500,000.

6.2.4. Muestreo y toma de datos

Se inició con la observación de daños causados por el gusano cogollero en cada una de las parcelas dentro de la superficie seleccionada, con el fin de evaluar los daños antes de hacer las aplicaciones de las formulaciones. Luego de contar las plantas que contenían las parcelas se calculó el porcentaje de daño en cada parcela, donde se aplicaron los tratamientos. La Tabla 1. contiene la sumatoria y media de los mismos.

Tabla 1. Datos obtenidos de las parcelas en porcentaje de daños antes de la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco en el mes de septiembre, 2007.

Plantas dañadas						
Bloques	I	II	III	IV	Σ	MEDIA
Parcelas	32 TP – 7 PD	35 TP –10 PD	40 TP – 8 PD	38 TP –11 PD	145TP 36PD	9
%	21.87	28.57	20	28.94		24.82
Parcelas	41 TP – 11 PD	47 TP – 13 PD	38 TP – 9 PD	40 TP – 10 PD	166TP 43PD	10.75
%	26.82	27.65	23.68	25		25.9
Parcelas	38 TP –11PD	30 TP – 8 PD	35 TP –16PD	37 TP –10PD	141TP 43PD	10.75
%	28.94	26.66	45.71	27.02		30.49
Parcelas	49 TP – 7 PD	39 TP –11PD	44 TP – 8 PD	43 TP –12PD	175TP 38PD	9.5
%	14.28	28.2	18.18	27.9		21.71
Parcelas	50 TP –10PD	52 TP –11PD	49 TP –14PD	54 TP –19PD	205TP 54PD	13.5
%	22.22	21.15	28.57	35.18		26.34

TP.- Total de Plantas

PD.- Plantas Dañadas

Siete días después de hacer la aplicación de los tratamientos se hizo el segundo conteo (toma de datos), parcela por parcela. La revisión fue planta por planta con el fin de observar el incremento del daño ó si en alguna otra planta se inició el ataque de gusano cogollero (Tabla 2). El tratamiento 1 (baculovirus + abrillantador), incrementó en 1% su daño y el tratamiento 2 (baculovirus sin abrillantador) no presentó incremento alguno en daño por cogollero. El tratamiento donde se aplicó abrillantador (3) presentó un incremento de diez por ciento del daño, sin embargo, en el que se utilizó cipermetrina (tratamiento 4) no presentó incremento alguno, no siendo así, en las parcelas destinadas al testigo (tratamiento 5), al cual presentó un incremento significativo de tres por ciento.

Quince días después de aplicar las formulaciones se procedió a la tercera toma de datos en campo. El tratamiento 1 (baculovirus + abrillantador) presentó, nuevamente, un incremento de daño del 1 %, en comparación al tratamiento 2 (baculovirus sin abrillantador); el porcentaje se mantuvo sin cambio, en el tratamiento 4 (cipermetrina) donde el incremento fue poco significativo (0.25%) en comparación al tratamiento 3 cuyo incremento fue de 9 %. El tratamiento 5 presentó 3.5 % de incremento. Ver Tabla 3.

Tabla 2. Datos obtenidos en las parcelas en porcentaje de daños siete días después la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco en el mes septiembre, 2007.

Plantas dañadas						
Bloques	I	II	III	IV	Σ	MEDIA
1.83 x 10 ⁹ + Abrillantador (Tratamiento 1)	32 PT – 8 PD	35 PT – 10 PD	40 PT – 8 PD	38 PT – 11 PD	145PT 37PD	9.25
%	25	28.57	20	28.94		21.51
1.83 x 10 ⁹ (Tratamiento 2)	41 PT – 11 PD	47 PT – 13 PD	38 PT – 9 PD	40 PT – 10 PD	166PT 43PD	10.75
%	26.82	27.65	23.68	25		25.90
Abrillantador (Tratamiento 3)	38 PT – 14PD	30 PT – 10 PD	35 PT – 19PD	37 PT – 14PD	141PT 53PD	13.25
%	36.84	33.33	54.28	37.83		40.42
Cipermetrina (Mustang) (Tratamiento 4)	49 PT – 7 PD	39 PT – 11PD	44 PT – 8 PD	43 PT – 12PD	175PT 38PD	9.5
%	14.28	28.2	18.18	27.9		21.71
Testigo (Tratamiento 5)	50 PT – 13PD	52 PT – 15PD	49 PT – 16PD	54 PT – 21PD	205PT 65PD	16.25
%	26	28.84	32.65	38.88		37.1

PT.- Plantas Tratadas

PD.- Plantas Dañada

La tercera y última toma de datos presentó al tratamiento 1 (baculovirus + abrillantador) con un incremento de 1.38 % de daño, en comparación al tratamiento dos (baculovirus sin abrillantador) con un % igual al registrado en la primera toma de datos; de igual forma, el tratamiento 4 (cipermetrina) presentó un porcentaje igual al que obtuvo en la segunda toma de datos, sin embargo, el tratamiento 3 (abrillantador) incrementó 10 %, en comparación al anterior muestreo, y el tratamiento 5 mostró un incremento de 6 % en relación a la segunda captura de datos. Ver Tabla 4.

Tabla 3. Datos obtenidos en las parcelas en porcentaje de daños quince días después la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco en el mes septiembre, 2007.

Plantas dañadas						
Bloques	I	II	III	IV	Σ	MEDIA
1.83 x 10 ⁹ + Abrillantador (Tratamiento 1)	32 PT - 8 PD	35 PT - 10 PD	40 PT - 9 PD	38 PT - 12 PD	145PT 39PD	9.75
%	25	28.57	22.5	31.57		26.89
1.83 x 10 ⁹ (Tratamiento 2)	41 PT - 11 PD	47 PT - 13 PD	38 PT - 9 PD	40 PT - 10 PD	166PT 43PD	10.75
%	26.82	27.65	23.68	25		25.9
Abrillantador (Tratamiento 3)	38 PT - 16PD	30 PT - 13 PD	35 PT - 23PD	37 PT - 17PD	141PT 69PD	17.25
%	42.1	43.33	65.71	45.94		48.93
Cipermetrina (Mustang) (Tratamiento 4)	49 PT - 7 PD	39 PT - 11PD	44 PT - 9 PD	43 PT - 12PD	175PT 39PD	9.75
%	14.28	28.2	20.45	27.9		22.28
Testigo (Tratamiento 5)	50 PT - 16PD	52 PT - 20PD	49 PT - 19PD	54 PT - 24PD	205PT 79PD	19.75
%	32	38.46	38.77	44.44		38.53

PT.- Plantas Tratadas

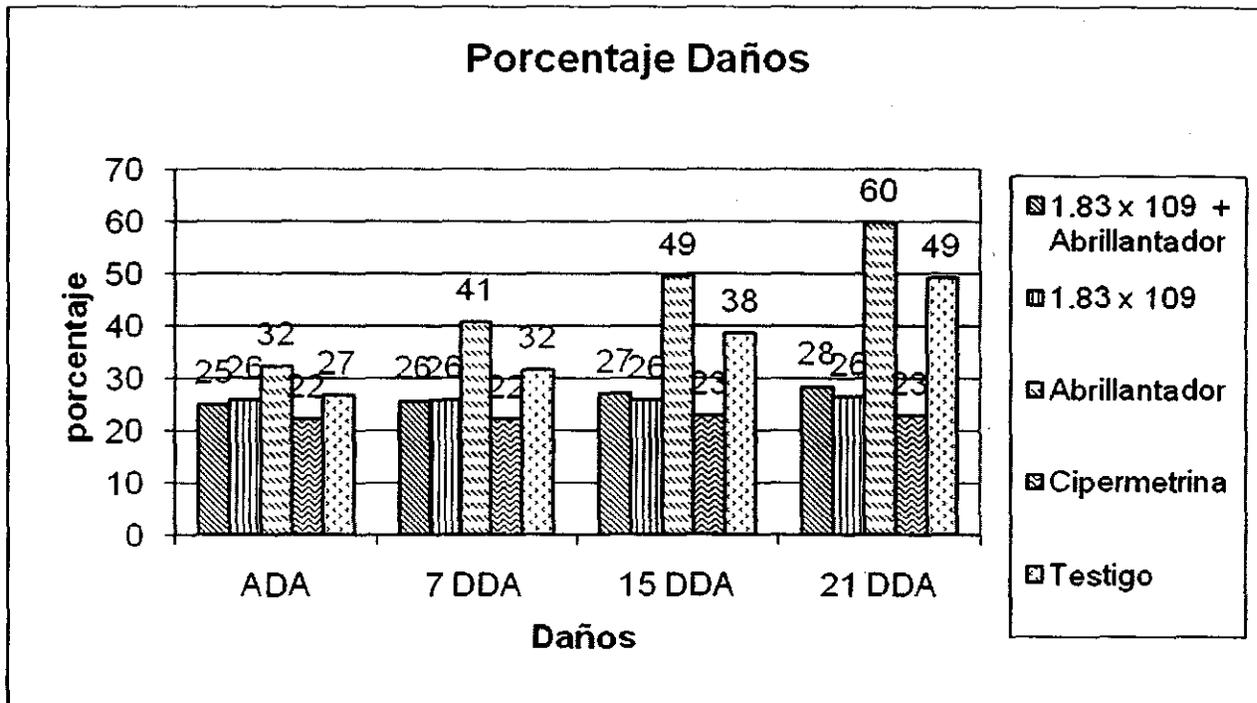
PD.- Plantas Dañadas

Tabla 4. Datos obtenidos en las parcelas en porcentaje de daños veintiún días después la aplicación de los tratamientos en el campo experimental del CUCBA, Zapopan, Jalisco en el mes septiembre, 2007.

Plantas dañadas						
Bloques	I	II	III	IV	Σ	MEDIA
1.83 x 10 ⁹ + Abrillantador (Tratamiento 1)	32 PT - 8 PD	35 PT - 12 PD	40 PT - 9 PD	38 PT - 12 PD	145PT 41PD	10.25
%	25	34.28	22.5	31.57		28.27
1.83 x 10 ⁹ (Tratamiento 2)	41 PT - 12 PD	47 PT - 13 PD	38 PT - 9 PD	40 PT - 10 PD	166PT 44PD	11
%	29.26	27.65	23.68	25		26.5
Abrillantador (Tratamiento 3)	38 PT - 19PD	30 PT - 18 PD	35 PT - 27PD	37 PT - 19PD	141PT 83PD	20.75
%	50	60	77.14	51.35		58.86
Cipermetrina (Mustang) (Tratamiento 4)	49 PT - 7 PD	39 PT - 11PD	44 PT - 9 PD	43 PT - 12PD	175PT 39PD	9.75
%	14.28	28.2	20.45	27.9		22.28
Testigo (Tratamiento 5)	50 PT - 21PD	52 PT - 26PD	49 PT - 23PD	54 PT - 31PD	205PT 101PD	25.25
%	42	50	46.93	57.4		49.26

PT.- Plantas Tratadas

PD.- Plantas Dañadas



ADA: Antes de la Aplicación

DDA: Días después de la Aplicación

Figura 6. Resultados en porcentaje de daños producidos por *Spodoptera frugiperda* durante el tiempo de la evaluación en campo.

La evaluación en campo de los tratamientos 1 (Abrillantador) 2 (Testigo) 3 (1.83×10^9) 4 (1.83×10^9 + abrillantador) como se observa en la tabla 5, el número acumulado de plantas dañadas para cada tratamiento se compara con una prueba de medias tuckey en tres diferentes tiempos (7, 15 y 21 días) A los 7 días el menor número de plantas dañadas se obtuvo con el tratamiento 5 (cipermetrina) aunque estadísticamente no presenta diferencias significativas con los tratamientos 2 (Testigo) 3 (1.83×10^9) y 4 (1.83×10^9 + abrillantador) El tratamiento 1 (Abrillantador) parece ser el peor. Para la evaluación a los 15 días se observó que el menor número de plantas dañadas fue para el tratamiento 5 (cipermetrina) sin embargo no se presentó diferencias significativas estadísticamente con los tratamientos 2 (Testigo) 3 (1.83×10^9) y 4 (1.83×10^9 + abrillantador) y el tratamiento 1 (Abrillantador) continuo siendo el malo.

Al final de la evaluación (21 días) es cuando se observó diferencias significativas entre los tratamientos 3 (1.83×10^9) 4 (1.83×10^9 + abrillantador) y 5 (cipermetrina) del 2 (Testigo) y 1 (Abrillantador).

Tabla 5. Número acumulado de plantas dañadas (transformación arc sen) en los diferentes tratamientos en diferentes tiempos de evaluación en campo.

7DDA			15DDA			21DDA		
TRATAMIENTOS	MEDIA	TUKEY		MEDIA	TUKEY		MEDIA	TUKEY
Abrillantador	40.57	A	Abrillantador	49.27	A	Abrillantador	59.62	A
Testigo	31.59	AB	Testigo	38.41	AB	Testigo	49.08	A
1.83×10^9	25.78	B	1.83×10^9 + Abrillantador	26.91	BC	1.83×10^9 + Abrillantador	28.37	B
1.83×10^9 + Abrillantador	25.62	B	1.83×10^9	25.78	BC	1.83×10^9	26.39	B
Cipermetrina (Mustang)	22.14	B	Cipermetrina (Mustang)	22.7	C	Cipermetrina (Mustang)	22.7	B

DDA.- Días Después de la Aplicación

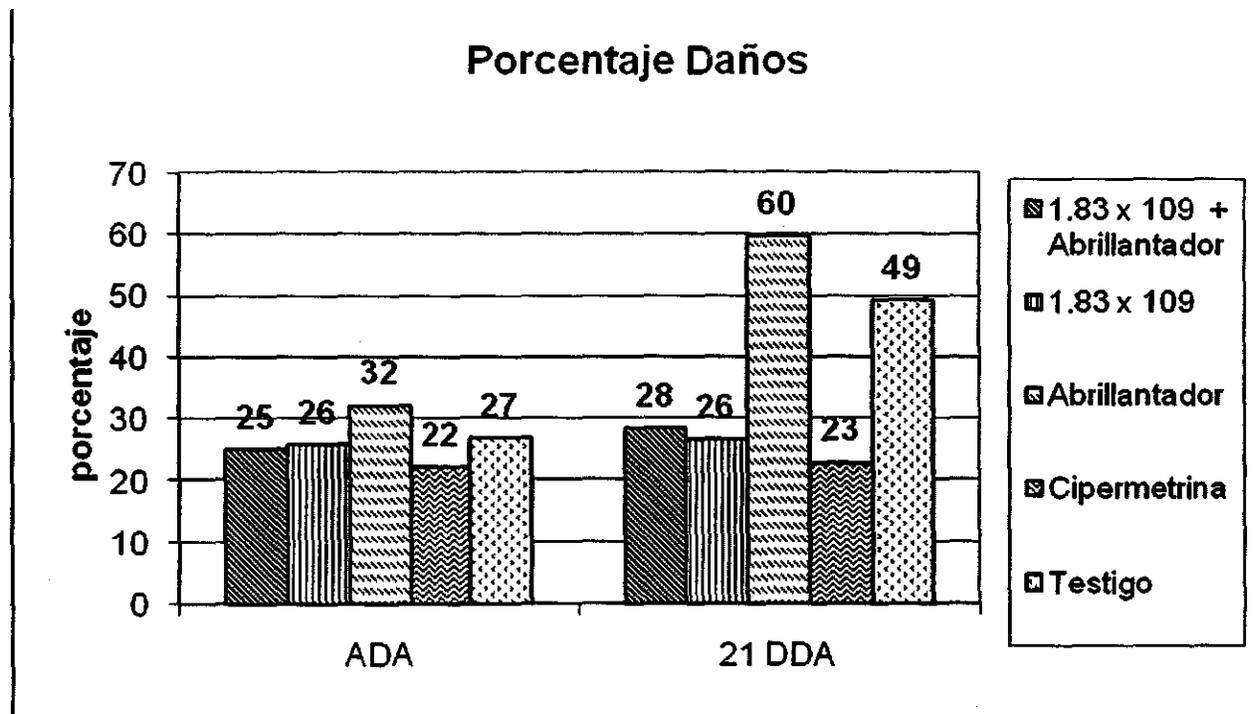


Figura 7. Incremento expresado en porcentaje de daños por *S. frugiperda* antes de la aplicación (ADA) y 21 días después de la aplicación (DDP).

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la CL_{50} son menos elevados que los encontrados por Klein y Podoler (1978) y por Vásquez *et al.*, (2002), que indican una CL_{50} de 25,800 CI/larva, para larvas de 3er estadio del “gusano ejército”, siendo la dosis empleada más elevada en comparación con la utilizada por Valicente y Cruz (1991), sólo que la especie del insecto es diferente al del presente trabajo. Con el cogollero del maíz obtuvieron una mortalidad de 96% en larvas de 6 días de edad (3er estadio) del “cogollero del maíz” con una dosificación de 4×10^5 CI/larva. Incluso los reportados por Vásquez *et al.*, (2002) para la misma especie de cogollero en Iquitos, Perú, en los cuales detalla que la CL_{50} encontrada fue más elevada debido al sustrato usado para su alimentación, ya que podría existir una variabilidad significativa con el alimento que comían las larvas durante los experimentos, tal como lo señalan Keating *et al.*, (1988) y Vásquez *et al.*, (2002), los cuales precisan que el contenido de taninos hidrolizables y el pH de los tejidos de la hojas de la planta hospedera tienen mucha influencia sobre la mortalidad. Sin embargo en nuestro trabajo no se evaluó este efecto pero está abierta la posibilidad de realizar pruebas para evaluar el alimento sobre la patogenicidad del virus.

El resultado obtenido de la CL_{50} sugiere una amplia posibilidad de que a través de pocas selecciones sucesivas de la población se pueda producir también una colonia de gusano cogollero resistente al $S\gamma$ NPV, tal como lo reportó Moscardi (2003) con *Anticarsia gemmatalis* para el Ag NPV.

La obtención de $S\gamma$ NPV derivados de larvas de cogollero del maíz del estado de Jalisco tratadas con el aislado de Brasil, demostraron eficiencia para provocar una alta mortalidad en las poblaciones larvales de este insecto. En todas las infecciones realizadas para su multiplicación se obtuvo una mortalidad similar a los resultados obtenidos en el primer bioensayo de este trabajo, coincidiendo además con los reportados por Vásquez, *et al.*, (2002). Y, Luna (1996) estudió un VPN del “gusano soldado” *Spodoptera eridania* obteniendo también resultados parecidos a los encontrados por Valicente y Cruz (1991),

quienes estudiaron un VPN del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda*, con una mortalidad mayor de 96%.

La infección se realizó en larvas del 3er estadio, que es un método estandarizado que permite comparaciones con los trabajos de otros autores como los de Valicente y Cruz (1991). Las larvas en esta edad son lo suficientemente grandes como para ser manipuladas, sin implicar significativo riesgo de mortalidad por esta causa y el virus podrá actuar antes de la pupación del insecto como lo expreso Luna (1996).

Los bioensayos realizados en este trabajo fueron diferentes a los reportados por Cisneros *et al.*, (2003) en donde la infección la realiza en la dieta artificial del insecto a diferencia del presente trabajo, se realizó la infección en hojas de higuierilla mostrando los mismos resultados en el decremento de tiempo letal, además de una mejor facilidad para la inoculación de las larvas, como lo reportan Vásquez *et al.*, (2002).

Para la evaluación en campo, coincidimos con lo reportado por Tanada y Kaya (1993), de que las formulaciones si son de fácil aplicación en campo, sin embargo, los resultados reportados por Cisneros *et al.*, (2003) hablan de que después de 9 días la presencia de larvas muertas decrecía, cosa contraria a lo que se presentó en esta investigación, por otro lado, los resultados arrojados para la comprobación del efecto sinérgico del abrillantador óptico en la formulación para una mayor eficacia fueron: que la magnitud de la potencialización no se diferenció considerablemente entre utilizarlo y no, coincidiendo con lo publicado por Martínez *et al.*, (2000) y Cisneros *et al.*, (2003), añadiendo además, la difícil obtención del abrillantador para la formulación, la cual, sería una limitación importante en la incorporación a la misma, así como su elevado costo.

En los tratamientos en los cuales se mezcló o se aplicó solamente el abrillantador óptico se observó que se incrementaba el daño que ocasiona el gusano cogollero, de significativo a elevado durante el tiempo de conteo de los daños, esto hace suponer que al asperjarlo sobre las hojas de maíz funge como un atrayente por el color que se presenta.

Por lo que se refiere al tiempo de persistencia en campo, se presentó diferencias significativas en comparación a lo publicado por Cisneros *et al.*, (2003), donde reporta un

tiempo de 9 días de persistencia, luego de su aplicación en campo, para este trabajo se obtuvo una persistencia de más de 15 días.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Para alcanzar la CL_{50} fue necesario la concentración de 874 cuerpos de inclusión y para la CL_{95} fueron 735, 968 cuerpos de inclusión.

La población de *S. frugiperda* mostró alta susceptibilidad al virus *SfNPV* del aislado de Brasil.

El abrillantador óptico funge como atrayente de insectos debido al color que manifiesta, ya que no se observó diferencia entre su uso.

Tinopal LPW no mejora el nivel de mortalidad en campo, dado que no mostró diferencia significativa con el resto de los tratamientos que utilizaron el virus.

Los resultados obtenidos con la aplicación del baculovirus *SfNPV* presentan un control similar al insecticida químico para el control del gusano cogollero en campo.

Para el caso de los productores de maíz de bajos recursos, nunca adoptarán un insecticida biológico si el costo excede a los de productos químicos comerciales, es por esto que debemos realizar más estudios para el mejoramiento de las formulaciones en campo; el precio de control biológico, por lo tanto, tiene la importancia clave, ya que reduce a la mitad los gastos de producción por hectárea. También es importante implementar técnicas de producción de virus a escala comercial, ya que en la actualidad el virus es producido en los laboratorios mexicanos y hondureños en una pequeña o muy pequeña escala, esencialmente sólo para objetivos experimentales (Martínez *et al.*, 2003).

Se recomienda, además, que de forma posterior se estudie la selección de la población del insecto con concentraciones crecientes desde la CL_{50} a la CL_{90} por lo menos en tres generaciones sucesivas, para inferir sobre el potencial del cogollero para desarrollar resistencia al virus.

También que se extienda la aplicación del baculovirus a campos experimentales del interior del Estado, así como de la República Mexicana para comprobar que no solo funciona en una localidad.

BIBLIOGRAFIA

- Angulo O. A. y G. T. Weigert. 1975. Estados inmaduros de lepidópteros noctuidos, de importancia económica en Chile y claves para su determinación (Lepidoptera: Noctuidae). 153 p.
- Argauer, R. and M. Shapiro. 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus. *J. Econ. Entomol.* 90: 416-420.
- Bartnicki-Garcia S.; J. Persson & H. Chanzy. 1994. An electron microscope and electron diffraction study of the effect of calcofluor and Congo red on the biosynthesis of chitin *in vitro*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 310: 6-15.
- Bautista M. N. y G. O. Morales. El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda*. Una plaga de gran importancia en La Ciénega, Jalisco. Agrosíntesis Agosto, 2005.
- Busvine, J. R. 1971. A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides. 2nd. ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. England. 345 pp.
- Caballero, P., M. López-Ferber and T. Williams 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma S.A., Valencia, Spain. Pp. 15-46.
- Cisneros, J.; Penagos, D.I.; Williams, T. 2003. XXVI Congreso Nacional de Control Biológico, memorias pags. 315-318.
- Clavijo, S. 2000. Maíz en Venezuela, [ed] Humberto Fontana H. y González C. Fundación Polar. pp. 45-56.
- Cremllyn, R. 1989. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Edit. LIMUSA. México. 356 p.
- Del Rincón, C. 2003. XIV Curso Nacional de Control Biológico, memorias pags. 165-174.
- Diawara, M.M.; B. R. Wiseman and D.J. Isenhour. 1992. *Spodoptera frugiperda* resistance in developing panicles of sorghum accessions. *Insect Sci. Applic.* 13(6): 793-799.
- Eilenberg, J.; A. Hajek and C. Lomer. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl* 46:387-400.
- Elorza, M.V.; H. Rico & R. Sentandreu. 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *Journal of General Microbiology* 129: 1577-1582.
- FAO. 1979. Resistencia de las plagas a los plaguicidas y evaluación de pérdidas agrícolas. In: FAO Informe de la Segunda Reunión de Expertos. Roma, Italia. 125 p.
- Farrar, R.R., Jr.; R.L. Ridgway; S.P. Cook; K.W. Thorpe and R.E. Webb. 1995. Nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Potency and effects of selected adjuvants on insect feeding behavior. *J. Entomol. Sci.* 30:417-428
- Flint, M.L. & R. Van den Bosch. 1981. Introduction to integrated pest management. New York, NY, USA, Plenum Press. 240 pp.
- García, R.; L.E. Caltagirone and A. P. Gutierrez. 1988. Comments on a redefinition of biological control. *BioScience* 38: 692-694.
- Gardner, W. A.; R. Noblet and R.D. Shwehr. 1984. The potential of microbial agents in managing populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla. Entomol.* 67(3): 325-332.
- Georghiou, G. P. 1965. Genetics studies on insecticides resistance. *Adv. Pest Control Rev.* 6(17):251-256.

- Georghiou, G. P. and C.E. Taylor. 1977a. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 319-323.
- Georghiou, G. P. and C.E. Taylor. 1977b. Operational influences in the evolution of the insecticides resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 653-658.
- Granados, G., 2001. El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Roma, 2001
- Granados, R. R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotech. And Bioengineering.* XXII:1377-1405.
- Granados, R.R. and K.A. Williams. 1986. *In Vivo* infection and replication of baculoviruses. In: R.R. Granados y B.A. Federici (Eds.). *The biology of baculoviruses. Vol.I.* CRC Press. Boca Raton, Florida. pp.89-108.
- Granados, R.R. and B.A. Federici. 1986. *The biology of baculoviruses. Vol. I, Practical Application for Insect Control.* CRC. Press, Boca Raton, Fl. 276. pp.
- Granados, R.R. 2000. Baculovirus patogénesis: Viral and Insect transgenes with implication for insect control. Conferencia Magistral. In: *Memorias XXIII Congreso Nacional de Control Biológico.* Nov. 16-18, Guanajuato, Mex. Desplegable.
- Greathead, D.J. and J.K. Waage. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. *The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11, 44 p.*
- Goulson D.; A.M. Martínez; O.H. Hughes & T. Williams. 2000. Effects of optical brighteners used in biopesticide formulations on the behavior of pollinators. *Biological Control* 19: 232–236.
- Gunther, F.A. y L. Jeppson. 1962. *Insecticidas modernos y la producción mundial de alimentos.* 3ª. Ed. CECSA. México. 293 p.
- Hamm, J.J. and M. Shapiro. 1992. Infectivity of fall armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) nuclear polyhedrosis virus enhanced by a fluorescent brightener. *J. Econ. Entomol.* 85: 2149-2152.
- Hamm, J.J., L.D. Chandler and H.R. Summer. 1994. Field test with a fluorescent brightener to enhance infectivity of fall armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) nuclear polyhedrosis virus. *Fla. Entomol.* 77: 425-437.
- Hamm, J.J. 1999. Interactions in entomology: enhanced infectivity of entomopathogenic viruses by fluorescent brighteners. *J. Entomol. Sci.* 34: 8-16.
- Hoskins and Gordon. 1965. Arthropod resistance to chemicals. *Ann Rev. Entomol.* 1(89):122-127.
- Hruska, A. J. & F. Gould. 1997. Fall armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) and *Diatraea lineolata* (*Lepodoptera: Pyralidae*): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *J. Econ. Entomol.* 90, 611-622.
- Huffaker, C.B. 1985. Biological control in integrated pest management: an entomological perspective. *En: M.A.Hoy y D.C.Herzog (eds.), Biological control in agriculture IPM systems.* Academic Press, N.Y., p. 13-23.
- Hughes, P.R. and H.A. Wood. 1986. In vivo and in vitro bioassay methods for Baculoviruses. In GRANADOS, R.R. and FEDERICI, B.A. eds. *The Biology of Baculoviruses,* Boca Raton, Florida, CRC Press, V.II. pp. 1-30.
- Hunter-Fujita, F.R.; P.F. Entwistle; H.F. Evans and N.E. Crook. 1998. *Insect viruses and Ibarra, J. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.* Phytoma S.A., Valencia, Spain. Pp. 203-220. pest management. Wiley, Chichester, Uk.

- Keating, S.; W. Yendal and J. C. Schultz. 1988. Relationship between susceptibility of gypsy moth larvae (Lep.: Lymantriidae) to a baculovirus and host plant foliage constituents. *Environm. Entomol.* 17 (6): 952 – 958.
- Klein, M. and H. Podoler. 1978. Studies on the application of a nuclear polyhedrosis virus to control populations of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis*. *J. Invertebr.Pathol.* 32: 244 – 248.
- Lagunes, T.A. 1983. Resistencia a insecticidas en diferentes poblaciones de *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). In: *Revista Agrocencia, Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.* 24:435-442.
- Li, S.Y. and I. S. Otvos. 1999. Optical brighteners enhanced infectivity of a nuclear polyhedrosis against westernspruce budworm (Lepidoptera: Noctuidae) *J. Econ. Entomol.* 92: 335-339.
- Lobo de Souza. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos plaga. [ed.] Lecuona R.E. Argentina. Pp. 73-86.
- Lookwood, J.A.; T.C. Sparks and R.N. Story. 1984. Evolution of insect resistance to insecticides: A reevaluations of the roles of physiology and behavior. *Bull. Entomology Soc. American* 30 (4):42-43.
- Luna, J. 1996. Caracterización de un virus de poliedrosis nuclear (VPN) sobre larvas de *Spodoptera eridanea* Cramer y *Spodoptera ochrea* Hampson, en camote, tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Lima - La Molina. 120 pp.
- Martínez, A.M.; D. Goulson; J.W. Chapman.; P. Caballero; R.D. Cave and T. Williams. 2000. Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus bioinsecticide for resource poor maize farmers in Mesoamerica. *Biol. Contr.* 17, 174-181.
- Martínez, A.M.; O. Simón; T. Williams & P. Caballero. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda* The Netherlands Entomological Society *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109: 139–146, 2003.
- Metcalf, R.L. 1983. Application and prognosis of resistance to insecticides In: Georgiou G, P, and T. Saito. *Pest Resistance to Pesticides.* Plenum Press. New York. USA. Pp 703-733.
- Mihm, J.A. 1984. Técnicas eficientes para la crianza masiva e infestación de insectos, en la seleccion de las plantas hospederas para resistencia al gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda*. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, CIMMYT, El Batán, México.
- Moscardi, F. y D.R. Sosa-Gómez. 1993. A case study in biological control: soybean defoliating caterpillars in Brazil. En: I. Buxton, D.R. Shibles, R.A. Forsberg, B.L. Blad, K.H. Asay, G.M. Paulsen y R.F. Wilson (Eds.). *International Crop Science.* Crop Science Society of America, Inc. Madison, Wisconsin. . pp. 115-119.
- Moscardi, F. y D.R. Sosa-Gómez. 1996. Utilización de virus a campo. [ed.] Lecuona R.E. Argentina. Pp. 261-276.
- Moscardi, F. 1999. Assessment of application of Baculoviruses for control of lepidoptera. *Ann. Rev. Entomol.* 44: 257-259.
- Moscardi, F. 2003. Selection for Resistance in the Laboratory to the Nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (AgMNPV). *Memorias XXVI Congreso Nacional de Control Biológico.* Nov. 6-8, Guadalajara, México.

- National Academy of Sciences (NAS). 1972. Manejo y control de Plagas de Insectos. ED. Limusa. México D.F. 514 p.
- Negrete, F. y J. Morales. 2005. Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas. www.turipana.org.co/gusano_cogollero.htm. Verificado el 08 de febrero 2007.
- Omoto, C. y S.B. Alves. 1998. Mecanismos de defensa de insectos contra entomopatógenos, p. 55-73. En: S.B. Alves (ed.) Controle microbiano de insetos. Piracicaba: FEALQ, Brasil.
- Ortega, C. A. 1987. Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo. México, D. F. CIMMYT.
- Pacheco, M. F. 1994. Plagas de los cultivos oleaginosos en México. CIRNO- INIFAP. 600 p. 32-50.
- Plapp, F.W. 1976. Biochemical genetics of insecticide resistance. Ann. Rev. Entomol. 21: 176-197.
- Polanía, *et al.*, 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. REVISTA Colombiana de Ciencias Hortícolas - Vol. 1 - No.1 - pp. 103-113.
- Posos, P. 2003. Vías de detoxificación de *Cyclocephala comata* Bates (Coleoptera: Scarabaeidae) a insecticidas de diferentes grupos toxicológicos. Tesis Doctoral. Instituto Tecnológico Agropecuario. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.
- Ramírez, G. 1991. Evaluación de insecticidas granulados para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) Autlan, Jalisco. Tesis. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- Rodríguez, M.J. 1983. División de los insecticidas y acaricidas de acuerdo a grupos toxicológicos una base para su manejo nacional. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 174 p.
- Rodríguez, R. 1991. Dinámica poblacional, Daños y Factibilidad económica de las plagas del Maíz en la Zona Centro de Jalisco. Tesis. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- Roncero, C.; M.H. Valdivieso; J.C. Ribas & A. Duran. 1988. Effect of Calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology 170: 1945-1949.
- Rudd, R.L. 1955. Pesticide and living landscape. University of Wisconsin Press. Madison, Wisc. pp 141-148.
- Sciocco, A. 1996. Microorganismos Patógenos Empleados en el Control Microbiano de Insectos plaga. [ed.] Lecuona R.E. Argentina. Pp. 159-168.
- Shapiro, M., and J.L. Robertson. 1992. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus activity by optical brighteners. J. Econ. Entomol. 85: 1120-1124.
- Shapiro, M., and R. Argauer. 2001. Relative effectiveness of selected stilbene optical brighteners as enhancers of the beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. 94: 339-343.
- Sheppard, C.A. and M. Shapiro. 1994. Physiological and nutritional effects of a fluorescent brighteners on nuclear polyhedrosis virus-infected *Lymantria dispar* (L.) larvae (Lepidoptera: Lymantriidae) Biol. Contr. 4: 404-412.

- Sheppard, C.A., M. Shapiro and J.L. Vaughn. 1994. Reduction of midgut luminal pH in gypsy moth larvae (*Lymantria dispar* L.) following ingestion of nuclear or cytoplasmic polyhedrosis virus/fluorescent brighteners on natural and artificial diets. *Biol. Contr.*4: 412-420.
- Smits, P.H., and J.M. Vlak. 1988. Biological activity of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus against *S. exigua* larvae. *J. Invert. Phatol.* 51: 107-114.
- Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1993. *Insect pathology*. Academic Press. San Diego, California. 666 p.
- Tinsley, T.W. y D.C. Kelly. 1985. Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. En: K. Maramorosh y K.E. Sherman (Eds.). *Viral insecticides for biological control*. Academic Press. Orlando, Florida. pp.3-25.
- Vail, P.V., D.F. Hoffmann and J.S. Tebbets 1996. Effect of a fluorescent brightener on the activity of *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus to four noctuid pests. *Biol. Control* 7: 121-125.
- Vail, P.V., D.F. Hoffmann and J.S. Tebbets 1999. Influence of fluorescent brighteners on the field activity of the celery looper nucleopolyhedrovirus. *Southwest. Entomol.* 24: 87-97.
- Valicente, F. and I. Cruz. 1991. Controle Biológico da Lagarta do Cartucho, *Spodoptera frugiperda*, como Baculovirus. Circular Circular Técnica No. 15. EMBRAPA. 20 pp.
- Vázquez, J.; J. L. Zeddám y A.A. Tresierra. 2002. Control Biológico del "cogollero del maíz" *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera; Noctuidae) con el baculovirus SfVPN, en Iquitos-Perú. *Folia Amazónica* Vol. 13 pag. 25-35.
- Whalon, M.; S.D. Mota, and F. Patrick. 2001. Pesticide Resistant Management. Michigan State University. http://whalonlab.msu.edu/rpmnews/general/rpm_submission.htm. Verificado el 20 de Mayo 2005.
- Who. 1975. *Manual on practical entomology in malaria. Parte II*. Genova. 191 pp.
- Wang, P. & R.R. Granados. 1998. Observations on the presence of the peritrophic membrane in larval *Trichoplusia ni* and its role in limiting baculovirus infection. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 57-62.
- Wang, P. y R.R. Granados. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system of Insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 135-143.
- Washburn, J.O.; B.A. Kirkparick; E. Haas-Stapelton. and L.E. Volkman. 1998. Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances *Autographa californica* M Nucleopolyedrovirus infection of *Trichoplusia ni* and *Heliothis virescens* by Preventing sloughing of infected midgut epithelial cells. *Biol. Contr.* 11, 58-69.
- Webb, R.E.; N. H. Dill; J.D. Podgwaite; M. Shapiro; R.L. Ridgway; L. Venables; J.L. Vaughn and R.J. Argauer. 1994a. Control of third-and fourth- instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) with Gypchek combine with a stilbene disulfonic acid additive on individe shade trees. *J. Entomol. Sci.* 29: 82-91.
- Webb, R.E.; M. Shapiro; J.D. Podgwaite; R.L. Ridgway; L. Venables; G.B. White; R.J. Argauer; D.L. Cohen; J. Witcosky; K.M. Kester and K.W. Thorpe. 1994b. Effect of optical brighteners on the efficacy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus in forest plots with high and low levels of natural virus. *J. Econ. Entomol.* 87: 134-143.
- Williams T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma S.A., Valencia, Spain. Pp. 313-352.

- Wilson, F. and C.B. Huffaker. 1976. The philosophy, scope, and importance of biological control. En: C.B. Huffaker y P.S. Messenger (eds.), Theory and practice of biological control. Academic Press, N.Y., p. 3-15.
- World Health Organization. 1957. Expert committee on insecticides. W.H.O. Technical report series No. 125.
- Yela, A. 1991. Dinámica Poblacional Daños y Factibilidad económica de las plagas del Maíz en la zona central de Jalisco. Tesis. Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jalisco, México.
- Zou, Y. and S.Y. Young. 1996. Use of fluorescent brightener to improve *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus activity in the laboratory and field. J. Econ. Entomol. 89: 92-96.