



UN PRODUCTO

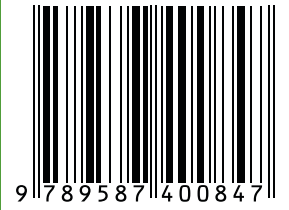


www.corpoica.org.co



DESARROLLO DE UN BIOPLAGUICIDA A BASE DE NUCLEOPOLIEDROVIRUS PARA EL CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO DE MAÍZ *Spodoptera frugiperda*

ISBN: 978-958-740-084-7





Ministerio de Agricultura
y Desarrollo Rural

LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO

DESARROLLO DE UN BIOPLAGUICIDA A BASE DE NUCLEOPOLIEDROVIRUS PARA EL CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO DEL MAÍZ *Spodoptera frugiperda*

Proyecto

Búsqueda de aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* y desarrollo de un bioplaguicida para el control del gusano cogollero de maíz



Villamizar, L.; Guevara, J.; Espinel, C.; Gómez, M.; Gómez, J.; Cuartas, Paola.; Barrera, G.; Cruz, M.; Santos, A.; Uribe, L.; Ruiz, C.; Castro, O.; López-Ferber, M.; Valicente, F.; Caballero, P.; Simón, O.; López Ávila, A.; Marínez, F.; Cotes, A. M. / Desarrollo de un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera Frugiperda*. Bogotá: Corpoica, 2012. 100 p.

Palabras clave: MAIZ, ZEA MAYS, SPODOPTERA FRUGIPERDA, CONTROL BIOLÓGICO, BIOPLAGUICIDAS, BACULOVIRUS



LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO

Líder proyecto: Laura Villamizar Ph.D.

EQUIPO TÉCNICO

INVESTIGADORES: Laura Villamizar Ph.D., Judith Guevara cPh.D., Carlos Espinel Ph.D., Martha Gómez Ph.D., Juliana Gómez cPh.D., Paola Cuartas cPh.D., Gloria Barrera cPh.D., Mauricio Cruz cM.Sc., Adriana Santos cM.Sc., Liz Uribe B.Sc., Carolina Ruiz B.Sc., Omar Castro I.A., Miguel López-Ferber Ph.D., Fernando Valicente Ph.D., Primitivo Caballero Ph.D., Ohiane Simón Ph.D., Aristóbulo López Ph.D., Fleming Martínez Ph.D., Alba Marina Cotes Ph.D.

AUXILIARES: Claudia Mesa, Javier Benito, Juan Carlos Campos, Javier Pulido, Jhon Vargas, Consuelo Rojas y Gabriela Perdomo

ESTUDIANTE: Lizeth Tabima, Microbióloga Industrial

AGRADECIMIENTOS A: Carlos Molina, Jesús Villamizar y Alberto Botero



© Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, CORPOICA
Laboratorio de Control Biológico, CI, Tibaitatá

ISBN: 978-958-740-084-7

CA: 1476

CUI: 1323

Primera edición: Febrero de 2012

Tiraje: 150 ejemplares

Línea de atención al cliente: 018000121515

atencionalcliente@corpoica.org.co

www.corpoica.org.co

Producción editorial:

Diagramación, impresión y encuadernación



www.produmédios.org

Diseño gráfico: aanhitte

Impreso en Colombia

Printed in Colombia

CONTENIDO

CONTENIDO	3
INTRODUCCIÓN	5
Bibliografía	8
CAPÍTULO 1.	
Reconocimiento de aislamientos nativos del nucleopoliedrovirus de <i>Spodoptera frugiperda</i> en Colombia	11
INTRODUCCIÓN	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
CONCLUSIÓN	18
Bibliografía	18
CAPÍTULO 2.	
Caracterización morfológica, genética y biológica de tres aislamientos colombianos de nucleopoliedrovirus de <i>Spodoptera frugiperda</i>	21
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
CONCLUSIÓN	34
Bibliografía	34
CAPÍTULO 3.	
Desarrollo de un prototipo de formulación del virus que brinde eficiente protección frente a la radiación ultravioleta	37
INTRODUCCIÓN	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIÓN	55
Bibliografía	56
CAPÍTULO 4.	
Caracterización y estabilidad en condiciones de almacenamiento de un bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de <i>Spodoptera frugiperda</i> (NPV003)	59
INTRODUCCIÓN	59
MATERIALES Y MÉTODOS	60



RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
CONCLUSIÓN	68
Bibliografía	69
CAPÍTULO 5.	
Selección de dosis y frecuencias de aplicación del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de <i>Spodoptera frugiperda</i> (NPV003)	71
INTRODUCCIÓN	71
MATERIALES Y MÉTODOS	72
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	75
CONCLUSIÓN	85
Bibliografía	85
CAPÍTULO 6.	
Validación del uso del bioplaguicida en un cultivo semicomercial de maíz	87
INTRODUCCIÓN	87
MATERIALES Y MÉTODOS	87
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
CONCLUSIÓN	97
Bibliografía	98

INTRODUCCIÓN

El maíz es el principal cereal y está considerado como el tercer producto agrícola en importancia en todo el mundo (Luckmann & Metcalf, 1990). En Colombia su cultivo ocupa las mayores extensiones –equivalentes a 547.290 hectáreas por año aproximadamente, con una producción cercana a los 1,44 millones de toneladas al año, la cual se discrimina entre el maíz blanco y el maíz amarillo, el primero dedicado al consumo humano y el segundo primordialmente al consumo animal, en forma directa o como insumo para la fabricación de alimentos balanceados, aunque también es empleado para la elaboración de harinas precocidas y para la industria cervecera, entre otras. En el país predomina el cultivo tradicional con el 75% del área y un rendimiento promedio de 1,7 toneladas por hectárea, el cual se dedica en su mayoría al autoconsumo (Fenalce, 2010).

La producción nacional de maíz en el año 2007 fue de 1.661.292 toneladas y para el año 2008 de 1.614.757 toneladas, la cual se redujo un poco en el año 2009 a pesar de que la producción interna no suplía los requerimientos nacionales, porque durante este año Colombia importó 240.206 toneladas de maíz blanco y 2.966.203 toneladas de maíz amarillo (Fenalce, 2010).

A pesar del elevado potencial de productividad y utilidades del maíz este cereal es afectado por diferentes problemas fitosanitarios, dentro de los que se destacan los insectos plaga, que generan pérdidas considerables a los agricultores quienes no cuentan con alternativas eficientes de manejo (Luckmann & Metcalf, 1990).

El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es la plaga más importante de este cultivo; las pérdidas que ocasiona son cuantiosas, considerando que se encuentra ampliamente distribuido y reduce los rendimientos hasta en un 35%. En el control químico de la plaga a nivel mundial se gastan aproximadamente 4,2 millones de dólares en plaguicidas químicos por año, lo que incide negativamente en los costos de producción (Fernández, 2002). Para reducir los efectos nocivos de *S. frugiperda* se ha dependido del uso de insecticidas químicos de amplio espectro, muchos de ellos de categorías toxicológicas I y II como fosforados, piretroides y carbamatos, utilizando el doble o el triple de las dosis recomendadas (García & del Pozo, 1999), sin considerarse el negativo impacto ambiental de dicha medida de control.

Así, la creciente necesidad de reducir el uso y dependencia de agroquímicos para el control fitosanitario de los cultivos hace imperioso desarrollar tecnologías que permitan de forma fácil, económica y efectiva obtener productos biológicos a partir de microorganismos, insectos o nematodos con alta calidad y en cantidades suficientes para su aplicación masiva en las zonas cultivadas y afectadas por la plaga (Ferrer, 2001).



Por tales razones, el control biológico mediante el uso de virus entomopatógenos como componentes de una estrategia de manejo integrado de plagas se acerca más a una solución duradera y efectiva, ya que brinda protección al medio ambiente por causar un menor impacto sobre insectos benéficos y vertebrados, incluyendo al hombre.

La familia Baculoviridae es la más numerosa y ampliamente estudiada de todos los grupos de virus patógenos de insectos, los cuales han sido exitosamente utilizados para el control de insectos de importancia agrícola (Moscardi, 1999).

Según la forma y estructura de los cuerpos de inclusión (CI) se clasifican en nucleopoliedrovirus (NPV) y granulovirus (GV). Los NPV se caracterizan por su forma poliedral y por tener múltiples viriones por cuerpo de inclusión (CI), que a su vez pueden tener una o varias nucleocápsides, por lo que se clasifican en SNPV (simples) o MNPV (múltiples) (Caballero *et al.*, 2001). Estos virus se replican en el núcleo de las células de varios tejidos (poliorganotrópicos), incluida la epidermis de las larvas infectadas, en donde se producen millones de partículas virales que son diseminadas al ambiente después de la muerte del insecto. Por su parte, los GV se caracterizan por su forma granular y por tener viriones de tipo simple, los cuales están incluidos individualmente en los CI y su patología es muy similar a la ocasionada por los NPV de acuerdo con el tipo de aislamiento (Possee *et al.*, 2010).

Además, estos virus tienen una molécula de ADN circular superenrollado envuelto por proteínas compuestas de subunidades denominadas capsómeros, que forman una capa denominada cápside. Una o más nucleocápsides están envueltas por una membrana que normalmente está constituida de material celular del hospedero. El conjunto compuesto por la envoltura y la nucleocápside se conoce como virión, y es la unidad infectiva del virus. Los viriones tienen forma baciliforme y están envueltos en una matriz protéica; a todo este conjunto se le conoce como cuerpo de inclusión (Caballero y Williams, 2008).

Los baculovirus se dividen en cuatro grupos filogenéticos: los Alphabaculovirus o NPV que infectan insectos del orden Lepidoptera, los Betabaculovirus o GV que infectan insectos del orden Lepidoptera, los Gammabaculovirus o NPV que infectan insectos del orden Hymenoptera y los Deltabaculovirus o NPV que infectan insectos del orden Diptera (Rohrmann 2008); estos virus contaminan a los insectos por vía oral.

Después de la ingestión, los cuerpos de inclusión que contienen los viriones se disuelven en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 7,5$) del intestino medio y liberan los viriones. Los viriones infectan a las células epiteliales del intestino y posteriormente otros tejidos susceptibles del hospedero, donde el virus continúa su reproducción y multiplicación (Figura 1). Los tejidos del cuerpo graso, epidermis del intestino, hemocitos, tráqueas y glándulas de seda, también son afectados. Las larvas infectadas se tornan lentas en sus movimientos, dejan de alimentarse y se paralizan. Cuando la enfermedad viral muestra sus efectos se pueden observar las larvas en las partes superiores de las plantas pendiendo con la parte cefálica hacia abajo y adheridas de las pseudopatas anales, el integumento se vuelve blando y de color pardo o negro, y los tejidos internos se licúan, quedando la larva como una bolsa líquida (Ibarra y Del Rincón, 1998).

Actualmente en varios países se están utilizando virus de la poliedrosis para el control de diferentes plagas de importancia agrícola, como *Spodoptera* sp. Tal es el caso de Brasil, en donde se emplea un virus de *Anticarsia gemmatalis* para el control de este insecto en

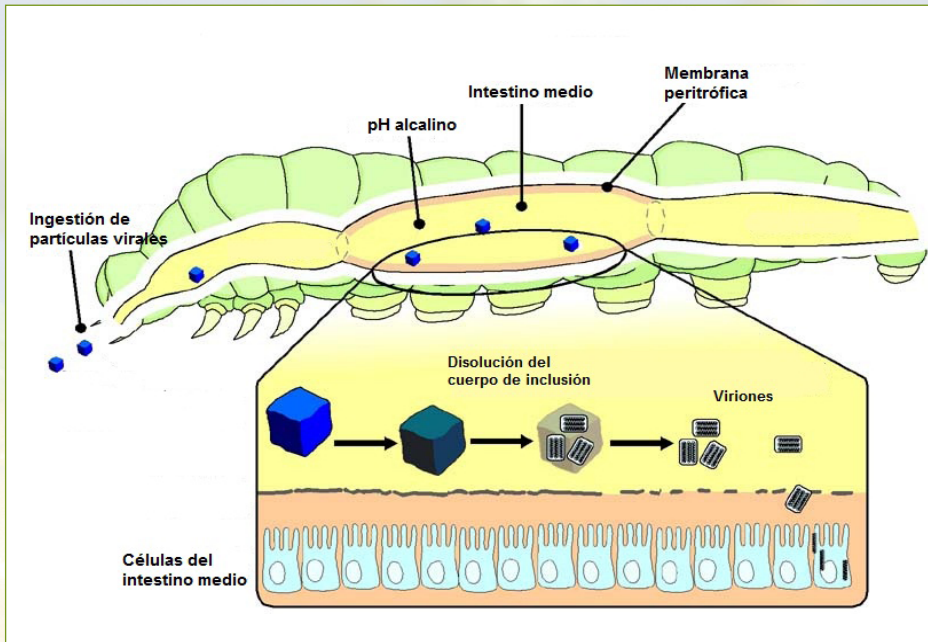


Figura 1. Mecanismo de infección de los baculovirus.

(<http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/baculo.html>)

cultivos de soya, tanto así que el virus se aplica en aproximadamente 1,5 millones de hectáreas (Rohrmann 2008). Asimismo, en dicho país se utilizan aislamientos nativos del virus de la poliedrosis nuclear (NPV) con alta actividad biocontroladora de *Spodoptera frugiperda*, obteniendo mortalidades del insecto entre el 89% y el 90% en campo (Valicente y Da Costa, 1995). Otro ejemplo está en Tanzania, donde se aplicaron 150 hectáreas con un bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control de *Spodoptera exigua* con resultados promisorios durante el año 2000 (Gryzwacz, 2005). Sin embargo, a pesar del uso masivo de estos virus en el mundo, Colombia no cuenta con ningún bioinsumo registrado a base de este virus para el control de *S. frugiperda* (ICA, 2011).

La efectividad y alto potencial de los baculovirus para el control de diferentes insectos plaga han sido demostrados en muchos trabajos (Valicente y Da Costa, 1995; Batista *et al.*, 2001; Guimarães *et al.*, 2005; Gryzwacz, 2005; Espinel *et al.*, 2010, Barreto *et al.*, 2005). No obstante, y pese a que estos virus son una herramienta eficiente para el control de diferentes insectos plaga, su evaluación a nivel de condiciones de campo ha presentado resultados inconsistentes (Mascarenhas *et al.*, 1996), posiblemente por el efecto deletéreo de condiciones ambientales como la temperatura y la radiación solar sobre las partículas virales (Ignoffo *et al.*, 1977) así como el escaso desarrollo en las tecnologías de formulación de muchos productos.

La inactivación causada por la radiación solar bajo condiciones de campo, la baja estabilidad en almacenamiento y los problemas para escalar la producción, son los principales problemas que limitan el uso masivo de estos agentes de biocontrol (Villamizar *et al.*, 2009).



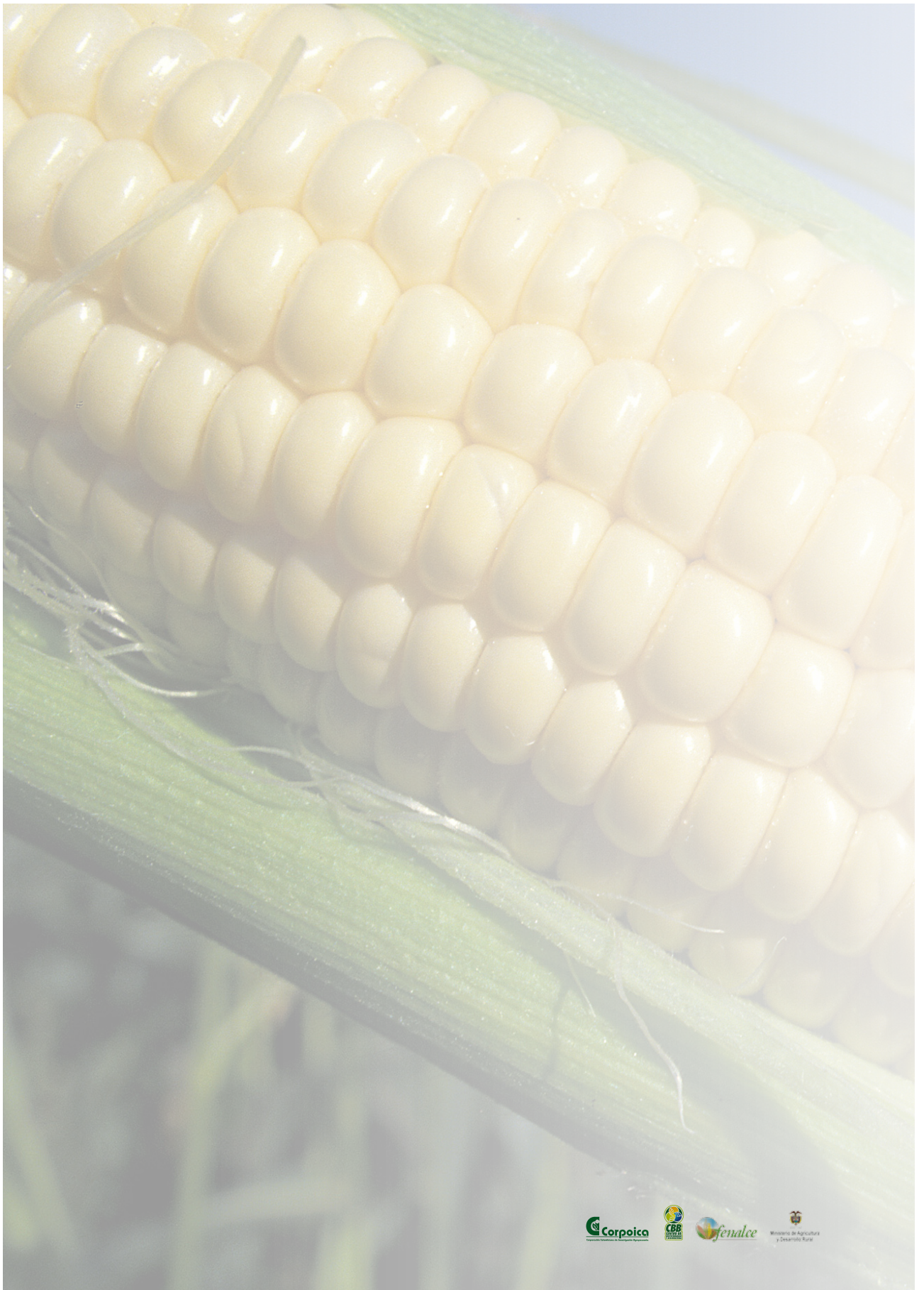
Bibliografía

- BARRETO, M.; GUIMARAES, C. T.; TEIXEIRA, F.; PAIVA, E.; VALICENTE, F.** (2005). Effect of Baculovirus spodoptera isolates in *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. *Neotropical Entomology* 34: 67-75.
- BATISTA, A.** (2001). Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology*. 30(3): 411-416.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. España. 517 p.
- CABALLERO, P.; WILLIAMS, T.** (2008). Virus entomopatógenos. En: JACAS, J.; URBANEJA, A. (ed.). *Control Biológico de Plagas Agrícolas*. Phytoma. España. 121-132.
- ESPINEL, C., LERY, X., VILLAMIZAR, L., GÓMEZ, J., ZEDDAM, J. L., COTES, A. M., LÓPEZ-FERBER, M.** (2010). Genetic and Biological Analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* Granulovirus (PhopGV) Isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (22): 7617 - 7625.
- FENALCE.** (2010). Indicadores cerealistas a 2009. En: <http://www.fenalce.org/archivos/Indicadores.pdf>. (Consulta: marzo de 2010).
- FERNÁNDEZ, J.** (2002). Estimación de umbrales económicos para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep.: Noctuidae) en el cultivo del maíz. *Investigaciones Agrarias: Producción y Protección Vegetales* 17(3): 467-474.
- FERRER, F.** (2001). Biological Control of Agricultural Insect Pests in Venezuela; Advances, Achievements and Future Perspectives. *Biocontrol News and Information*. 22(3): 67-74.
- GARCÍA, I.; DEL POZO, E.** (1999). Aislamiento y producción de conidios de *Nomuraea rileyi* (FARLOW) SAMSON y su virulencia en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH). *Revista protección vegetal*. 14 (2): 95 - 100.
- GRYZWACZ, D.** (2005). Entomopathogenic Baculoviruses for control of the African Armyworm, *Spodoptera exempta*, in Tanzania. En: http://www.researchintouse.com/nrk/RIUinfo/outputs/R6746_FTR.pdf. (Consulta: enero de 2010).
- GUIMARÃES, F.; BESERRA, E.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; VARGAS-OSUNA, E.** (2005). Patogenicidade do nucleopolyhedrovirus (NPV) (Baculoviridae) isolados em larvas de *Spodoptera exigua* e *S. littoralis* sobre larvas de *S. frugiperda*. En: (<http://webbeta.catie.ac.cr/bancoconocimiento/R/RevistasMIPA70Articulo8/RevistasMIPA70Articulo8.asp?CodSeccion=48>) (Consulta: enero de 2010).
- IBARRA, J.; DEL RINCÓN, M.** (1998). Virus entomopatógenos. En: *Curso Nacional de Control Biológico*. Río Bravo, Tamaulipas, México: Sociedad Mexicana de Control Biológico. p. 90-103.
- ICA, INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO.** (2011). En: <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/>

Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agrícolas-(1)/Bioinsumos-Registrados.aspx.
(Consulta: octubre de 2011).

- LUCKMANN, R.; METCALF, W.** (1990). Introducción al Manejo Integrado de Plagas de Insectos. Editorial Limusa S.A. México. Primera edición. 185 p.
- MASCARENHAS, V.; LEONARD, B.; BURRIS, E.; GRAVES, J.** (1996). Beet armyworm control on cotton in Louisiana. *Florida Entomologist*. 79(3): 336-342.
- MOSCARDI, F.** (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. 44: 257-289.
- POSSEE, R.; GRIFFITHS, C.; HITCHMAN, R.; CHAMBERS, A.; MURGUIA-MECA, F.; DANQUAH, J.; JESHTADI, A.; KING, L.** (2010). Baculoviruses: Biology, replication and exploitation. In: *Insect virology*. Caister Academic Press. Gran Bretaña. 35-57.
- ROHRMANN, G.** (2008). Baculoviruses as insecticides: Three examples. An NPV of the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*: Application in Brazil. En: *Baculovirus Molecular Biology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir>. (Consulta: abril de 2010).
- VALICENTE, F.; DA COSTA, E.** (1995). Controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), como Baculovirus *spodoptera*, aplicado via água de irrigação. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 24(1): 61-67.
- VILLAMIZAR, L.; BARRERA, G.; COTES, A.; MARTÍNEZ, F.** (2010). Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in Vitro virus release. *Journal of Microencapsulation*. 27 (4):314-324.
- VILLAMIZAR, L.; COTES, A.; GRIJALBA, E.; TORRES, L.; ESPINEL, C.; GÓMEZ, J.** (2005). Reconocimiento de aislamientos nativos del virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. En: *Resúmenes XXXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología*: 84.





CAPÍTULO 1.

Reconocimiento de aislamientos nativos del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* en Colombia

JULIANA GÓMEZ cPh.D., GLORIA BARRERA cPh.D.,
JUDITH GUEVARA cPh.D., LAURA VILLAMIZAR Ph.D.

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de alternativas para la implementación de programas de manejo integrado de plagas, los entomopatógenos y especialmente el grupo de los baculovirus, juegan un rol importante. En este sentido, un requisito fundamental es aislar las cepas patógenas candidatas con miras a seleccionar la más promisoría. En referencia a los nucleopoliedrovirus, está comprobado que su actividad insecticida varía dependiendo de su ubicación geográfica, sus características genéticas y el hospedero del cual fue aislado, entre otros (Lobo de Souza y Lecuona, 1996).

El nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (SfMNPV) ha sido aislado de poblaciones del insecto a lo largo del continente americano (Loh *et al.*, 1982; Shapiro *et al.*, 1991; Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999) y varios de estos virus han demostrado un alto potencial para ser usados como bioplaguicidas en programas de control del gusano cogollero (Williams *et al.*, 1999; Armenta *et al.*, 2003). En Brasil se evaluaron aislamientos de NPV para el control tanto de *S. frugiperda* como de *Spodoptera exigua* y se obtuvieron mortalidades de las dos especies del insecto, significativamente superiores que las obtenidas con los productos químicos (Guimarães *et al.*, 2003). Igualmente, se han adelantado trabajos en el desarrollo de formulaciones, como lo hizo Embrapa (Empresa Brasileira de Investigación Agropecuaria), que desarrolló un producto formulado como un polvo mojable a base de un aislamiento de este virus y estandarizó un sistema de producción a escala (Valicente y Da Costa, 1995).

En cuanto a productos registrados en el mundo, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) reporta actualmente cinco nucleopoliedrovirus para su venta como bioplaguicidas, de los cuales ninguno se recomienda para el control de *S. frugiperda* (EPA, 2010).



En Colombia, el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica no contaba con aislamientos nativos del virus, pero realizó algunos trabajos evaluando aislamientos foráneos de SfNPV alcanzando mortalidades de larvas de *S. frugiperda* superiores al 90% bajo condiciones de laboratorio (Villamizar *et al.*, 2009), lo que motivó la idea de buscar aislamientos colombianos que pudieran estar mejor adaptados a las condiciones agroclimáticas del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del insecto

Los insectos utilizados para la presente investigación fueron obtenidos a partir de la cría de *S. frugiperda* ubicada en el Centro de Biotecnología y Bioindustria de Corpoica (Mosquera, Cundinamarca) y establecida a partir de larvas colectadas en cultivos de maíz en el municipio de El Espinal (Tolima). Los insectos se mantuvieron en un cuarto a 26 ± 2 °C y 60% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 horas. Las larvas fueron manejadas de manera individual en recipientes plásticos de 25 mL, que contenían 15 mL de dieta artificial (Gómez *et al.*, 2010).

Colecta de larvas

La búsqueda de aislamientos de NPV se realizó durante el año 2008 en los departamentos de Córdoba, Tolima y Meta (Colombia) (Figura 2). En dichos departamentos se seleccionaron fincas con cultivos de maíz, sorgo, algodón y otros en los que se hubiera detectado la presencia de la plaga. En cada cultivo se observaron las plantas, las hojas y los cogollos en busca de las larvas de *S. frugiperda*, las cuales se ubicaron individualmente en vasos con dieta artificial. Las larvas muertas o que presentaban algún síntoma de infección viral se recogieron individualmente en tubos Eppendorf con 1 mL de solución salina estéril (Gómez *et al.*, 2010).

Las muestras se transportaron al Laboratorio de Control Biológico de Corpoica para su análisis y se mantuvieron en cuarentena en un

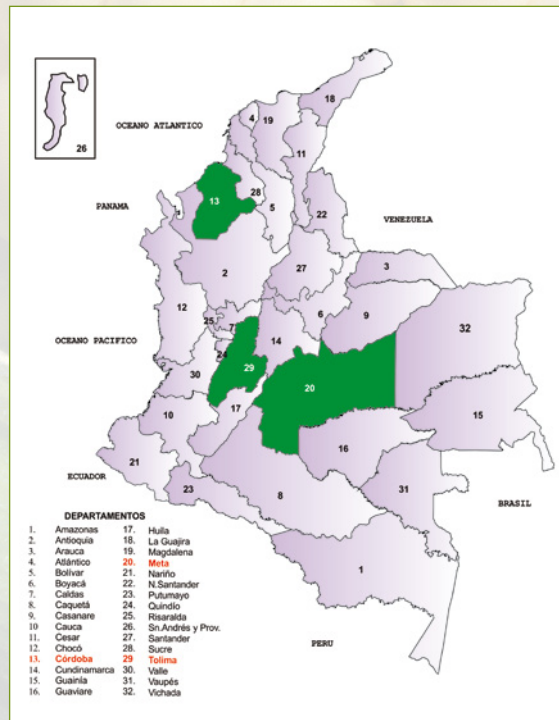


Figura 2. Departamentos de Colombia donde se realizaron los muestreos de larvas de *S. frugiperda* para búsqueda de aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus.

cuarto de bioensayos con las condiciones de temperatura y humedad mencionadas anteriormente. Los vasos con dieta y con los insectos se rotularon con los datos de los sitios de recolección (Gómez *et al.*, 2010).

Búsqueda de virus en las larvas colectadas

Las larvas se mantuvieron en cuarentena y se revisaron diariamente registrando todo cambio en su comportamiento o características morfológicas. Cada larva muerta o con síntoma de infección viral se maceró en solución salina y la suspensión obtenida se observó en el microscopio óptico (400x) para la búsqueda de los cuerpos de inclusión del virus, los cuales tienen una forma poliédrica característica (Gómez *et al.*, 2010).

Las muestras que presentaron posibles cuerpos de inclusión o sintomatología de infección viral se utilizaron para reproducir los síntomas de la enfermedad. Para ello se tomaron 100 µL de la muestra y se mezclaron con 100 µL de una solución que contenía sacarosa al 4% y un colorante azul de alimentos Tuska® al 1%. Dicha suspensión fue suministrada por vía oral a un grupo de larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio que sometido previamente a 24 horas de ayuno, empleando el método de la gota descrito por Hughes y Wood (1981).

Las larvas inoculadas fueron ubicadas individualmente en vasos con dieta artificial e incubadas en un cuarto de bioensayos a 26 ± 2 °C. A partir del quinto día de incubación se realizó una revisión diaria y se separaron aquellas larvas que presentaron sintomatología típica de la infección viral (coloración blanca lechosa a café clara, pérdida de turgencia y fragilidad del tegumento). Los aislamientos de nucleopoliedrovirus recuperados y multiplicados en las larvas de *S. frugiperda* se conservaron en solución salina estéril a -70 °C y fueron ingresados al Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Corpoica (Gómez *et al.*, 2010).

Producción y purificación viral

La producción de los virus a ser empleados en los bioensayos se realizó mediante la inoculación de larvas de *S. frugiperda* de tercer estadio, con suspensiones de cada uno de los aislamientos, empleando la misma metodología descrita anteriormente (Gómez *et al.*, 2010).

Para la purificación viral se empleó el método descrito por Valicente *et al.* (1989) modificado. Las larvas infectadas de cada aislamiento fueron homogeneizadas en un mortero estéril de porcelana con solución de sodio-dodecil-sulfóxido (SDS) al 0,1% estéril y posteriormente se filtraron por tres capas de velo suizo para retirar el tejido del insecto. El líquido se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 minuto y se recogió el sobrenadante, el cual se centrifugó a 15.000 rpm por 30 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 1 mL de tampón Tris HCl 0,1 M pH 6,0 y se ubicó sobre un gradiente de sacarosa del 40% y 60%. Luego se centrifugó a 15.000 rpm durante 30 minutos, se retiró la banda correspondiente al virus y se realizaron dos lavados con el mismo tampón. La suspensión purificada obtenida se guardó en congelación a -20 °C (Gómez *et al.*, 2010).



Estudio de la diversidad genética de los aislamientos

Con el propósito de determinar la diversidad genética de los aislamientos de NPV en Colombia se realizó un análisis mediante perfiles de restricción (REN). Para tal fin, se tomaron las muestras de los aislamientos de NPV nativos encontrados en el departamento de Córdoba (por ser el departamento en el que se encontró la mayor cantidad de larvas de *S. frugiperda* infectadas) y se realizó su purificación ajustando a una concentración de 1×10^8 CI/mL. A 100 μ L de suspensión viral se le adicionaron 100 μ L de carbonato de sodio (0,5 M), 50 μ L de SDS (10%) y 250 μ L de agua ultrapura. Las muestras se incubaron a 60 °C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 5.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue digerido con 50 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) a 50 °C por una hora. Para la extracción del ADN se realizaron dos pases por fenol equilibrado y un pase con cloroformo, utilizando centrifugaciones intermedias a 13.000 rpm. La precipitación del ADN se realizó con etanol absoluto frío y acetato de sodio 3 M. El ADN fue resuspendido en tampón TE (0,1%).

Para la comparación de los aislamientos se realizaron digestiones de ADN utilizando las enzimas de restricción *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Nde*I, *Bgl*II, *Sma*I, *Kpn*I. Una muestra de 2 μ g de ADN viral se mezcló con 10 U de cada una de las enzimas por 6 a 12 horas a 37 °C. Las reacciones de digestión se detuvieron con 4 μ l de solución tampón (azul de bromofenol 0,25% w/v, sacarosa 40% w/v) y se cargaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA; pH 8,0). Los fragmentos de ADN se separaron a 20 V por 10 a 24 horas. El ADN se visualizó bajo luz UV por tinción con bromuro de etidio (Chemi-Doc, BioRad, California, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se realizaron cinco muestreos de larvas de *S. frugiperda* para la búsqueda de aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus en los departamentos de Córdoba, Meta y Tolima (Colombia) durante los meses de enero a octubre de 2008. Se recolectaron en total 2.140 larvas en los tres departamentos a partir de diferentes cultivos (Tabla 1) (Gómez *et al.*, 2010).

Tabla 1. Número total de larvas colectadas en cada departamento y número de larvas según su causa de mortalidad (Gómez *et al.*, 2010).

Depto.	Larvas sanas	Larvas muertas				Total
		Hongos y parasitoides	Nucleo-poliedrovirus (NPV)	Granulovirus (GV)	Infección mixta (NPV y GV)	
CÓRDOBA	555	32	38 (Cultivo: Pastos)	15 (Cultivo: Pastos)	9 (Cultivo: Pastos)	649
TOLIMA	401	12	1 (Cultivo: Maíz)	0	0	414
META	758	315	4 (Cultivo: Sorgo)	0	0	1.077
TOTAL	1.714	359	43	15	9	2.140

Las larvas que murieron durante la cuarentena se analizaron mediante microscopía de luz, encontrando 43 muestras (2%) con cuerpos de inclusión poliédricos característicos de los NPV (Figura 3). El departamento con mayor incidencia viral fue Córdoba con 38 muestras positivas, seguido de Meta con cuatro y por último Tolima donde se encontró una sola muestra positiva. Sin embargo, las larvas se colectaron en el mismo sitio de muestreo en cada departamento, razón por la cual se seleccionó una sola muestra de cada sitio y se consideró como un aislamiento viral (Gómez *et al.*, 2010).

En total se aislaron tres nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* en Colombia, lo que corresponde a un 0,14% de ocurrencia de este entomopatógeno. Resultados similares fueron encontrados en Brasil, en donde se realizó un muestreo de larvas de *S. frugiperda* para la búsqueda de diferentes enemigos naturales del insecto y a partir de 14.000 larvas recolectadas se encontraron 21 aislamientos de nucleopoliedrovirus (0,15% de ocurrencia) (Valicente, 1989; Valicente y Barreto, 1999), lo cual sugiere que probablemente en poblaciones de campo del insecto en Colombia y Brasil hay una incidencia de nucleopoliedrovirus promedio de 0,14% (Gómez *et al.*, 2010).

Los tres aislamientos encontrados fueron codificados como NPV003 (Córdoba), NPV009 (Meta) y NPV011 (Tolima) (Figura 3).

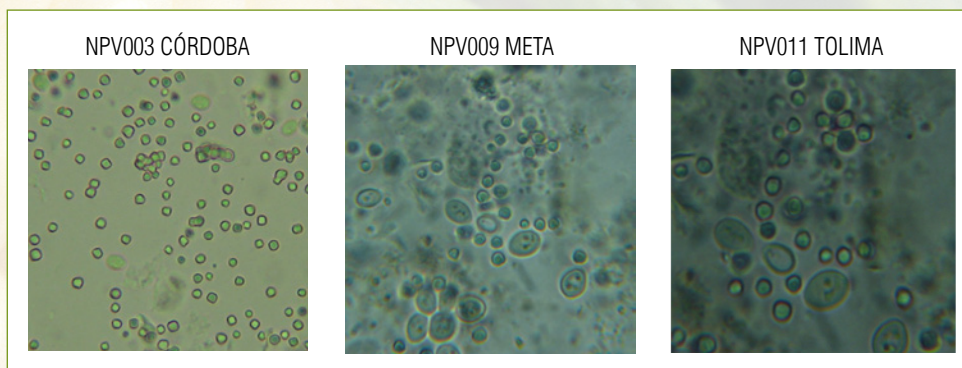


Figura 3. Cuerpos de inclusión de los aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* detectados en la hemolinfa de larvas infectadas por microscopía de luz (400X) (Gómez *et al.*, 2010).

Los síntomas característicos de las larvas infectadas por NPV fueron: pérdida de apetito y movilidad, cambio en la coloración desde blanco hasta café, fragilidad y ruptura del tegumento (Figura 4), síntomas descritos para este tipo de virus (Caballero *et al.*, 2001; Vásquez *et al.*, 2002). No obstante, dicha sintomatología solo fue evidente en las larvas mantenidas bajo condiciones de laboratorio, ya que en campo únicamente una larva colectada en el departamento de Córdoba presentó sintomatología típica de infección (Gómez *et al.*, 2010). Esta dificultad para encontrar larvas sintomáticas en campo fue mencionada por Laarif *et al.* (2003), quienes estudiaron la epidemiología de un baculovirus de *P. operculella* en Túnez concluyendo que los síntomas de infección exhibidos en campo son difíciles de encontrar y algunas larvas infectadas pueden ser completamente asintomáticas.



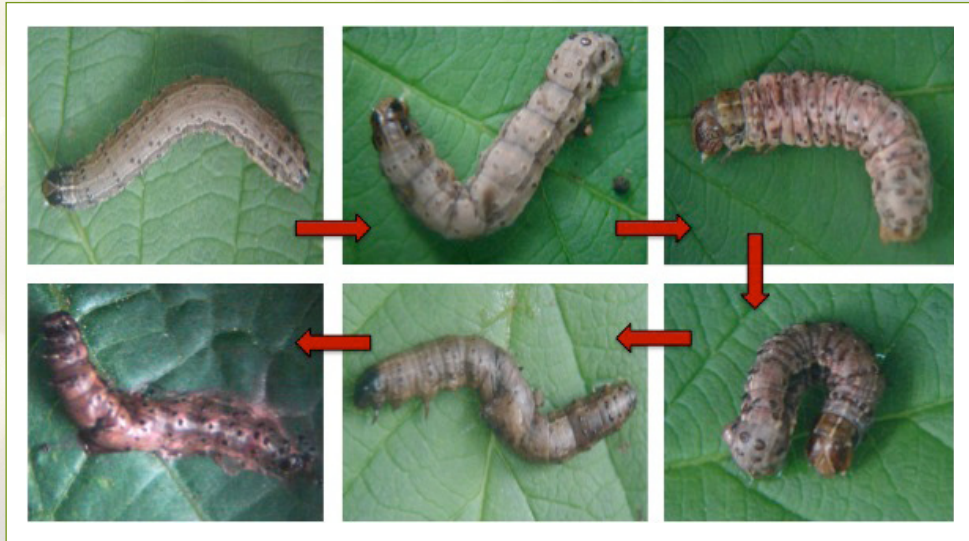


Figura 4. Sintomatología y progreso de la infección por nucleopoliedrovirus en larvas de *S. frugiperda*.

Por otra parte, y aunque no era el propósito del muestreo, en el departamento de Córdoba se encontraron larvas afectadas por un virus del género granulovirus (Tabla 1), lo cual se evidenció por la presencia de un color blanco lechoso y flacidez sin ruptura del tegumento. Al observar la hemolinfa en microscopio de luz se observaron pequeñas partículas con movimiento browniano que fueron confirmadas como granulovirus al observarlas en mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 5). En total se halló una incidencia de este agente viral de 0,04% (Gómez *et al.*, 2010).

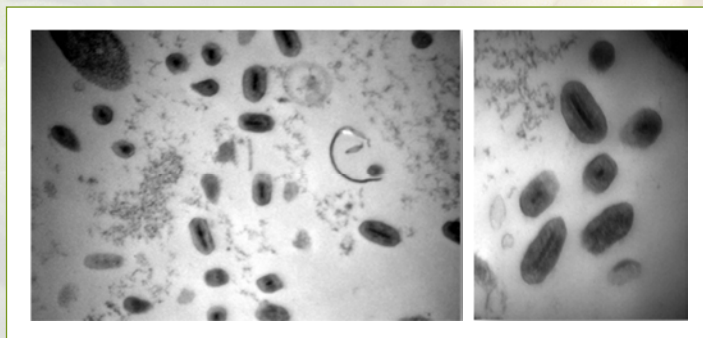


Figura 5. Micrografía de transmisión de los granulovirus encontrados en las muestras de *S. frugiperda*.

Adicionalmente, de las 24 larvas que presentaron infección por granulovirus nueve de ellas presentaron también infección con nucleopoliedrovirus, lo que sugiere una coinfección de estas muestras con los dos agentes virales (Tabla 1) (Gómez *et al.*, 2010). La presencia de dos especies virales puede resultar en cambios en el desarrollo normal

de la enfermedad, en algunos casos aumenta la mortalidad (efecto aditivo o sinérgico) y en otros se reduce (inhibición virus-virus) (Hackett *et al.*, 2000). El efecto sinérgico normalmente se debe a la expresión por parte del GV de una proteína de la familia de las metaloproteasas denominada ‘enhancin’, que aumenta la permeabilidad de la membrana peritrófica del insecto facilitando la entrada de los viriones en las células intestinales (Hoover *et al.*, 2010; Peng *et al.*, 1999).

Por último, con respecto al análisis de la diversidad, los perfiles REN demostraron la existencia de cuatro perfiles con diferencias en el número y el tamaño de las bandas generadas a partir de los 38 aislamientos evaluados (Figura 6).

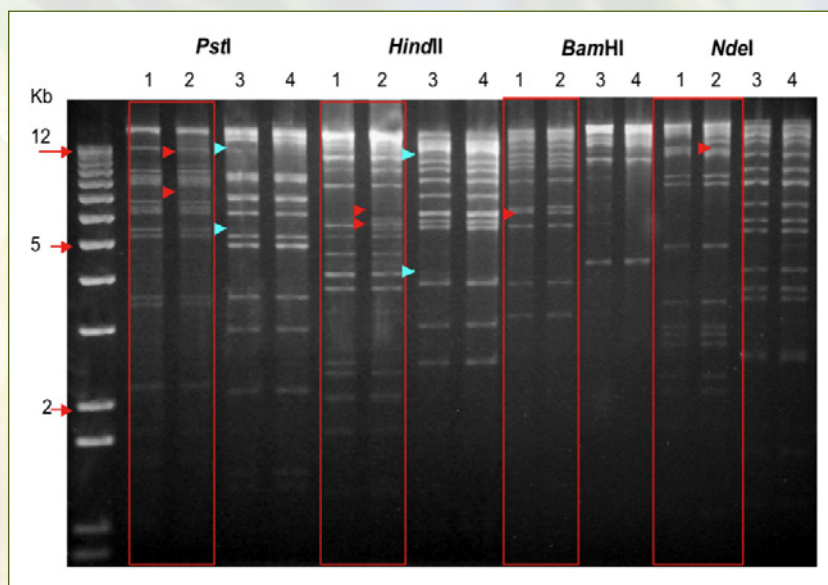


Figura 6. Perfiles de restricción con las enzimas *PstI*, *HindIII*, *BamHI* y *NdeI* de cuatro aislamientos colombianos de NPV de *S. frugiperda*. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular.

Los carriles 1 y 2 correspondieron al SfNPV, el cual se encontraba mezclado con el granulovirus, como se mencionó anteriormente, mientras que los carriles 3 y 4 correspondieron al SfNPV puro.

Las frecuencias de cada perfil fueron las siguientes: Perfil 1: 5,4%; Perfil 2: 2,7%; Perfil 3: 5,4%; Perfil 4: 86%. Esto indica que de las 38 muestras positivas para NPV colectadas en Córdoba 35 mostraron un perfil REN idéntico con las seis enzimas evaluadas (Perfil 4), sugiriendo que los 35 aislamientos son la misma cepa viral y demostrando que los virus aislados en un mismo sitio geográfico presentan una baja diversidad genética. Las diferencias con el otro perfil puro encontrado (Perfil 3) fueron muy pocas, lo cual es común entre estos aislamientos virales debido a mutaciones puntuales y deleciones e inserciones pequeñas (Chen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

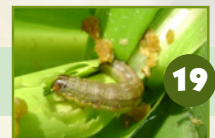
CONCLUSIÓN

Se encontraron tres aislamientos nativos de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* en Colombia y un aislamiento de granulovirus. Los SfNPV encontrados mostraron forma poliédrica característica y causaron infección sobre larvas de *S. frugiperda*. Dichos aislamientos representan la base para el desarrollo de un bioplaguicida para el control de esta plaga.

Bibliografía

- ARMENTA, R.; MARTÍNEZ, A.; CHAPMAN, J.; MAGALLANES, R.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CAVE, R.; CISNEROS, J.; VALLE, J., CASTILLEJOS, V.; PENAGOS, D.; GARCÍA, L. F.; WILLIAMS, T.** (2003). Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 96: 649-661.
- BERRETTA, M.; RÍOS, M.; SCIOCCO DE CAP, A.** (1998). Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 280-282.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. España. 517 p.
- CABALLERO, P.; WILLIAMS, T.** (2008). Virus Entomopatógenos. En: Control Biológico de Plagas Agrícolas. Eds. J. A. Jacas y A. Urbaneja. Fascículo número 04. Phytoma, España. Noviembre - diciembre de 2008. pp. 121-136.
- CHEN, X.; ZHANG, W.; WONG, J.; LU, A.; MCCUTCHEN, B.; PRESNAIL, J.; HERRMANN, R.; DOLAN, M.; TINGEY, S.; HU, Z.; VLAK, J.** (2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 83, 673-684.
- DAUTHUILLE, D.; CROIZIER, G.; FERRÓN, P.** (1988). A Newly isolated Granulosis Virus from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in French Guiana. *L'Agromonie tropicale* 43 (1): 64-76
- DIEZ, S.; LORENZATTI, D.** (1986). Presencia de virus de Poliedrosis Nuclear y de Granulosis en poblaciones de *Spodoptera frugiperda* atacando soja en el área de la EEA Ol. IX Reunión Técnica Nacional de Soja. Resistencia, Chaco. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Oliveros. República Argentina.
- EPA.** (2010). Pesticides: Regulating Pesticides. Disponible en: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>. (Consulta: marzo 21 de 2010).
- ESCRIBANO, A.; WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CAVE, R.; CHAPMAN, J. W.; CABALLERO, P.** (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): estructural, genetic and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology*. 92: 1079-1085.

- FUXA, J.** (1982). Prevalence of viral infections in populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in southeastern Louisiana. *Environmental Entomology* 11: 239-242.
- GÓMEZ, J.; GUEVARA, J.; BARRERA, G.; COTES, A.; VILLAMIZAR, L.** (2010). Aislamiento, identificación y caracterización de nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín* 63(2): 5511-5520.
- GUIMARÃES, F.; BESERRA, E.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; VARGAS-OSUNA, E.** (2003). Patogenicidade do nucleopolyhedrovirus (NPV) (Baculoviridae) isolados em larvas de *Spodoptera exigua* e *S. littoralis* sobre larvas de *S. frugiperda*. *Revista Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (CATIE - Costa Rica)*. 70: 74-77.
- HACKETT, K.; BOORE, A.; DEMING, C.; BUCKLEY, E.; CAMP, M.; SHAPIRO, M.** (2000). *Helicoverpa armigera* granulovirus interference with progression of *H. zea* nucleopolyhedrovirus disease in *H. zea* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. 75 (2): 99-106.
- HOOVER, K.; HUMPHRIES, M.; GENDRON, A.; SLAVICEK, J.** (2010). Impact of viral enhancer genes on potency of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic matrix. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104 (2): 150-152.
- HUGHES, P.; WOOD, H. A.** (1981). A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 154-159.
- LAARIF, A.; FATTOUCH, S.; ESSID, W.; MARZOUKI, N.; BEN SALAH, H.; BEN HAMMOUDA, M.** (2003). Epidemiological survey of *Phthorimaea operculella* granulosis virus in Tunisia. *Bulletin OEPP/EPPO* 37: 335-338.
- LAU, W. H.; SAJAP, A. S.; SAMAD, N.** (2006). A pathogenic insect virus, *Spodoptera litura* granulovirus, to the armyworm, *Spodoptera litura*. *Agro-Search* 11(1):35-41.
- LOBODESOUZA, M.; LECUONA, R.** (1996). Virus entomopatógenos. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de plagas. *Talleres Gráficos Mariano Mas*. Buenos Aires, Argentina. pp. 73-86.
- LOH, L.; HAMM, J.; KAWANISHI, C.; HUANG, E.** (1982). Analysis of the *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome by restriction endonucleases and electron microscopy. *Journal of Virology* 44: 747-751.
- NARAYANAN, K.** (2002). Occurrence of granulosis virus of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological control of lepidopteran pests. Proceedings of the Symposium of Biological Control of Lepidopteran Pests, Bangalore – India.*
- PENG, J.; ZHONG, J.; GRANADOS, R.** (1999). A baculovirus enhancing alters the permeability of a mucosal midgut peritrophic matrix from lepidopteran larvae. *Journal of Insect Physiology*. 45 (2): 159-166.
- SHAPIRO, D.; FUXA, J.; BRAYMER, H.; PASHLEY, D.** (1991). DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 58, 96-105.
- TANADA, Y.** (1959). Synergism between two viruses of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Pathology*. 1: 215-231.
- VALICENTE, F.** (1989). Levantamento dos inimigos naturais de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. *Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*. 18: 119-130.
- VALICENTE, F.; BARRETO, M.** (1999). Levantamento dos inimigos naturais da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na região de Cascavel, PR. *Anais da Sociedade Entomológica Brasileira*. 28: 333-337.
- VALICENTE, F.; DA COSTA, E.** (1995). Controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), com o *Baculovirus spodoptera* aplicado via água de irrigação. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*. 24(1): 61-67.



- VALICENTE, F.; PEIXOTO, M.; PAIVA, E.; KITAJIMA, E.** (1989). Identificação e purificação de um vírus de poliedrose nuclear da-lagarta-de-cartucho *Spodoptera frugiperda*. Anais da Sociedade Entomológica Brasileira. 18: 71-82.
- VÁSQUEZ, J.; ZEDDAM, J.; TRESIERRA, A.** (2002). Control biológico del “Cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SFVPN, en Iquitos-Perú. Folia Amazónica. 13: (1-2) 25-39.
- VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; COTES, A.** (2009). Efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad insecticida de un nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Colombiana de Entomología 35 (2): 116-121.
- WANG, Y.; CHII, J.; ROH, J.; WOO, S.; JIN, B.; JE, Y.** (2008). Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura* granulovirus. Journal of Microbiology (Seoul, Korea) 46(6): 704 – 708.
- WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CISNEROS, J.; MARTÍNEZ, A. M.; CHAPMAN, J. W.; ROMAN, D. X. AND CAVE, R.** (1999). Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. Biological Control 14: 67-75.
- ZHANG, C.; MA, X.; GUO, Z.** (2005). Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. Virology 333, 190–199.

CAPÍTULO 2.

Caracterización morfológica, genética y biológica de tres aislamientos colombianos de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*

GLORIA BARRERA cPh.D., OIHANE SIMÓN Ph.D., PRIMITIVO CABALLERO Ph.D.,
PAOLA CUARTAS cPh.D., JULIANA GÓMEZ cPh.D., LAURA VILLAMIZAR Ph.D.

INTRODUCCIÓN

El nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* (SfMNPV) se ha encontrado en poblaciones de este insecto a nivel mundial (Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999). Algunos de los aislamientos se han evaluado en condiciones de campo como potenciales agentes bioplaguicidas para el control de *S. frugiperda* (Moscardi, 1999; Williams *et al.*, 1999; Cisneros *et al.*, 2002; Armenta *et al.*, 2003) con niveles significativos de mortalidad en larvas del insecto en cultivos de maíz (Williams *et al.*, 1999; Armenta *et al.*, 2003). Son diversos los estudios que describen el genoma y la actividad biológica de diferentes aislamientos de SfMNPV; tres de ellos presentan la secuencia completa de sus genomas (Harrison *et al.*, 2008; Simón *et al.*, 2011; Wolff *et al.*, 2008). Parte de la caracterización genética incluye perfiles obtenidos con enzimas de restricción (REN), ampliamente utilizados para la caracterización de baculovirus. Este tipo de trabajos demuestran que los aislamientos pueden ser variantes de un mismo virus, con diferencias menores en su genoma y sus características biológicas.

En la búsqueda de nuevos aislamientos virales para el desarrollo de bioplaguicidas se han comparado aislamientos de SfMNPV provenientes de regiones geográficamente distantes (Estados Unidos, Nicaragua y Argentina). La caracterización de estos aislamientos se realizó mediante comparación de sus perfiles REN y de su actividad biológica (Escribano *et al.*, 1999). Lo anterior permitió seleccionar el aislamiento de SfMNPV de Nicaragua (SfNIC) para el desarrollo de una formulación de bioplaguicida para el control de la plaga en México (Williams *et al.*, 1999).

La estructura genética de la población viral y la organización genómica de SfNIC han sido ampliamente estudiadas; es así que, el mapa físico genético basado en perfiles REN se encuentra publicado y su genoma está completamente secuenciado (Simón *et al.*, 2005a;



Simón *et al.*, 2011). Mediante ensayos de clonación en placa, se han purificado nueve genotipos a partir de SfNIC, los cuales poseen diferencias genéticas observables por sus perfiles REN, que se traducen en diferencias en la patogenicidad y la virulencia (Simón *et al.*, 2004). La diversidad genética de cada clon se localizó en una única región del genoma, la que incluye 3 fragmentos obtenidos por la digestión con la enzima *PstI* (*PstI*-F, *PstI*-L y *PstI*-K) (Simón *et al.*, 2004; Simón *et al.*, 2005b).

A pesar de la amplia caracterización de aislamientos de SfMNPV, este es el primer informe acerca de una caracterización similar en aislamientos colombianos de SfMNPV para el control de *S. frugiperda* en el país. El objetivo de este trabajo fue seleccionar un aislamiento de SfMNPV para ser utilizado en el control de *S. frugiperda* en Colombia. Para el logro de dicho objetivo, se estudió la diversidad natural de tres aislamientos de SfMNPV mediante la caracterización molecular y biológica, y la comparación con un aislamiento de SfMNPV de Nicaragua caracterizado previamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron tres aislamientos virales de SfNPV obtenidos en tres departamentos de Colombia: Córdoba, Tolima y Meta (NPV003, NPV009 y NPV011, respectivamente), y un aislamiento de SfMNPV de Nicaragua, suministrado por el Dr. Primitivo Caballero de la Universidad Pública de Navarra.

Para la propagación viral, la superficie de la dieta artificial dispensada en recipientes plásticos de 2 onzas fue inoculada con 100 microlitros de cada suspensión viral. En cada recipiente se ubicó una larva de tercer estadio de *S. frugiperda*, sometida a ayuno. Los recipientes plásticos con las larvas inoculadas fueron mantenidos en un cuarto de incubación a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir del quinto día se revisaron las larvas y aquellas que presentaron la sintomatología típica de infección (tegumento frágil, coloración parda y poca movilidad) fueron recolectadas y almacenadas en congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se purificaron los cuerpos de inclusión, de la manera anteriormente mencionada.

Caracterización física y morfológica

El tamaño de los cuerpos de inclusión virales se determinó mediante microscopía óptica, midiendo el diámetro de 200 partículas utilizando el programa NIS-elements (Nikon). Para la observación de los poliedros por microscopía electrónica se mezclaron 100 μl de una suspensión viral con un igual volumen de fijador (4% formaldehído y 1% glutaraldehído en 0,1 M de tampón fosfato, pH 7,4). Para microscopía electrónica de transmisión se realizó una fijación adicional con tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en tampón fosfato 0,1 M. Las muestras se deshidrataron parcialmente con etanol al 70% y se infiltraron con resina hidrofílica (LR White). Se realizaron cortes ultrafinos (40-60 nm), los cuales se contrastaron con uranil acetato y citrato de plomo. Las muestras se observaron en un microscopio Philips CM10. Para la microscopía electrónica de barrido, después de la fijación, las muestras fueron parcialmente deshidratadas y recubiertas con oro para su observación bajo un microscopio Phillips 510.

Caracterización molecular

Extracción de ADN

Para el desarrollo de la caracterización molecular se tomaron muestras de los tres aislamientos de NPV nativos purificados (NPV003, NPV009 y NPV011), con una concentración ajustada a 1×10^8 CI/mL. A 100 μ L de suspensión viral se le adicionaron 100 μ L de carbonato de sodio (0,5 M), 50 μ L de SDS (10%) y 250 μ L de agua ultrapura. Las muestras se incubaron a 60 °C por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 5.000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue digerido con 50 μ L de proteinasa K (10 mg/mL) a 50 °C por una hora. Para la extracción del ADN se realizaron dos pases con fenol equilibrado y un pase con cloroformo, utilizando centrifugaciones intermedias a 13.000 rpm. La precipitación del ADN se realizó con etanol absoluto frío y acetato de sodio 3 M. El ADN fue resuspendido en tampón TE (0,1%) (Barrera *et al.*, 2011).

Análisis de perfiles de restricción

Los ADN genómicos de tres aislamientos colombianos (NPV003, NPV009 y NPV011) se compararon con un aislamiento de NPV de *S. frugiperda* de Nicaragua (SfNIC), mediante perfiles de restricción. Para la comparación de los aislamientos se realizaron digestiones de ADN utilizando las enzimas de restricción *Pst*I, *Bam*HI, *Bgl*II, *Sma*I, *Hind*III y *Eco*RI. Una muestra de 2 μ g de ADN viral se mezcló con 10 U de cada una de las enzimas por 6 a 12 horas a 37 °C. Las reacciones de digestión se detuvieron con 4 μ l de solución tampón (azul de bromofenol 0,25% w/v, sacarosa 40% w/v) y se cargaron en geles de agarosa al 1% en tampón TAE (0,04 M Tris-acetato; 0,001 M EDTA; pH 8,0). Los fragmentos de ADN se separaron a 20 V por 10 a 24 horas. El ADN se visualizó bajo luz UV por tinción con bromuro de etidio (Chemi-Doc, BioRad, California, USA) (Barrera *et al.* 2011).

Clonaje y secuenciación de fragmentos *Pst*I

Dos fragmentos obtenidos por la digestión con *Pst*I, característicos de los aislamientos SfNPV colombianos, fueron clonados y secuenciados. Las bandas *Pst*I-K (4,8 kb) y *Pst*I-M (3,5 kb) se obtuvieron del aislamiento NPV003, el cual fue seleccionado como representativo de los aislamientos colombianos. Después de la digestión del ADN genómico con la enzima *Pst*I los fragmentos se clonaron en el plásmido pUC19, utilizando un protocolo de ligación en agarosa de bajo punto de fusión. La reacción de ligación se incubó a 16 °C por 12 horas y se utilizó para transformar células quimiocompetentes de *Escherichia coli* (One Shot Invitrogen). Las bacterias se crecieron en agar LB (Luria Bertani) con ampicilina (100 mg/mL) y X-gal (40 μ g/mL). Las colonias blancas se multiplicaron en medio líquido LB con ampicilina a 37 °C. El ADN plasmídico se extrajo por lisis alcalina y se realizó la digestión con *Pst*I para confirmar la identidad de los insertos clonados (Barrera *et al.*, 2011).

Los fragmentos se secuenciaron completamente mediante el método de “primer walking”. La secuencia se analizó para la presencia de marcos abiertos de lectura (ORF)



con el programa Open Reading Frame Finder del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Todos los ORFs encontrados se compararon con bases de datos de GenBank/EMBL, SWISS PROT y PIR para la búsqueda de homologías mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (Barrera *et al.*, 2011).

Caracterización biológica

La patogenicidad de tres aislamientos colombianos de NPV de *S. frugiperda* (NPV003, NPV009 y NPV011) y de SfNIC se determinó calculando la concentración letal media (CL_{50}) mediante bioensayos con larvas de *S. frugiperda* provenientes de la unidad de crías del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica. Para la inoculación se utilizó el método de la gota (Hughes y Wood, 1981) en larvas de segundo estadio (L2) mantenidas en ayuno a 25 °C durante 12 horas previas a la infección. Las suspensiones de inoculación contenían 10% de sacarosa, 0,001% de Fluorella Blue y CI en 5 concentraciones diferentes ($1,2 \times 10^6$; $2,4 \times 10^5$; $4,8 \times 10^4$; $9,6 \times 10^3$ y $1,9 \times 10^3$ CI/mL). Previamente se determinó que este rango de concentraciones causa mortalidad entre el 5% y 95% de la población experimental (Simón *et al.*, 2004). Las larvas infectadas se ubicaron en vasos de plástico de 2 onzas individuales que contenían dieta artificial y se incubaron a temperatura constante de 25 ± 2 °C y 60% de humedad relativa (Figura 7) (Barrera *et al.*, 2011).

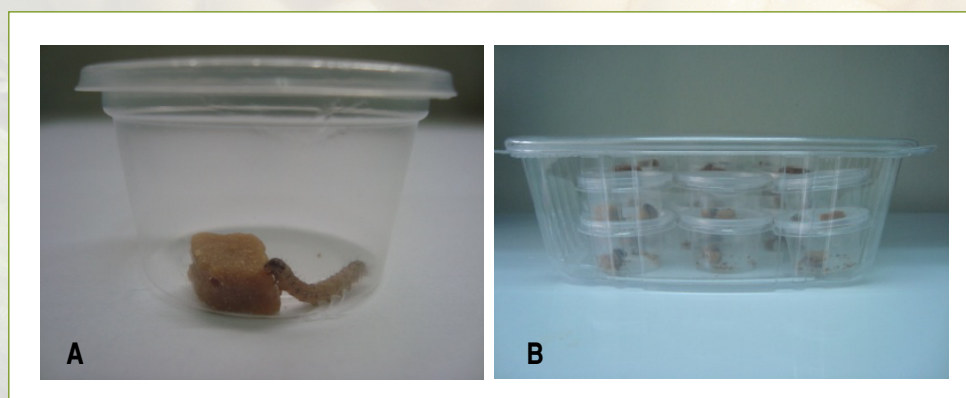


Figura 7. A. Larva de *S. frugiperda* en dieta artificial después de su infección con virus. B. Disposición de la unidad experimental de 25 individuos infectados con la misma concentración viral.

Se llevaron a cabo tres repeticiones independientes del bioensayo empleando un total de 25 larvas por repetición para cada dosis. Un grupo de 25 larvas se alimentó con una suspensión libre de CI y se utilizó como testigo negativo. Los registros de mortalidad se realizaron cada 24 horas comprobando la causa de la muerte de las larvas por la sintomatología típica de la enfermedad. Los datos se analizaron con el programa POLO Plus (LeOra-Software, 1987) mediante un análisis Logit.

La virulencia de los aislamientos se determinó estimando el tiempo medio de mortalidad (TMM) con el método de la gota de Hughes y Wood (1981), como se describió

anteriormente. Para inocular las larvas (L2) se utilizó la concentración letal 90 (CL_{90}) ($2,2 \times 10^6$; $1,5 \times 10^6$ y $4,3 \times 10^6$ CI/mL para NPV003, NPV009 y NPV011, respectivamente) determinada en el ensayo anterior. La unidad experimental fue de 25 larvas y se utilizaron tres unidades por tratamiento. Se contó con un testigo negativo inoculado con agua. La mortalidad se registró cada 8 horas comprobando la causa de la muerte de las larvas por la sintomatología típica de la enfermedad (Barrera *et al.*, 2011). Para la determinación del tiempo de mortalidad se realizó un análisis de Weibull usando el programa Generalized Linear Interactive Modeling (GLIM) (Crawley, 1993).

La producción de cuerpos de inclusión de los aislamientos nativos fue determinada empleando la CL_{90} en larvas de *S. frugiperda* de segundo estadio, las cuales fueron inoculadas según la metodología descrita. Las larvas muertas por infección viral (mínimo 20 por réplica, 60 por tratamiento) fueron homogeneizadas individualmente en 100 μ L de agua destilada. El número de CI producido por cada larva fue estimado por triplicado mediante conteo en cámara de Neubauer; los resultados obtenidos fueron analizados mediante pruebas de Kruskal Wallis y Mann Whitney (95%), utilizando el programa SPSS v12 (Barrera *et al.*, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La identificación inicial de los baculovirus se basa en su morfología. La estructura poliedral de los cuerpos de inclusión es considerada una característica distintiva de los NPV (Rohrman, 2008). El tamaño de los cuerpos de inclusión de los tres aislamientos colombianos (NPV003, NPV009 y NPV011) varió entre 1 y 2,49 μ m con un valor promedio de 1,5 μ m, con una mayor frecuencia de tamaño (60%) en el rango entre 1,5 y 1,99 μ m (Figura 8). No se observaron diferencias significativas en el tamaño de los tres aislamientos ($\chi^2=2,0$; $gl=3$; $P > 0,05$).

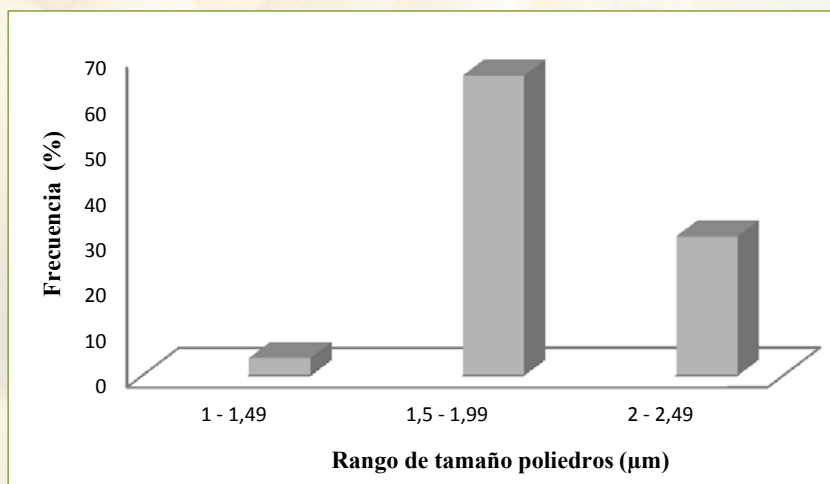


Figura 8. Frecuencia de tamaño de poliedros de tres aislamientos colombianos de NPV de *S. frugiperda*.



Las micrografías de microscopía de barrido mostraron que los cuerpos de inclusión poseen formas poliedrales irregulares, con un amplio rango de tamaños (Figura 9A), similares a los observados en el microscopio de luz. Los cortes ultrafinos demostraron numerosos viriones por cuerpo de inclusión, al igual que se observaron varias nucleocápsides (entre 1 y 9) por cada virión (Figura 9B). Estas observaciones confirman que estos aislamientos corresponden a nucleopoliedrovirus de tipo múltiple (MNPV).

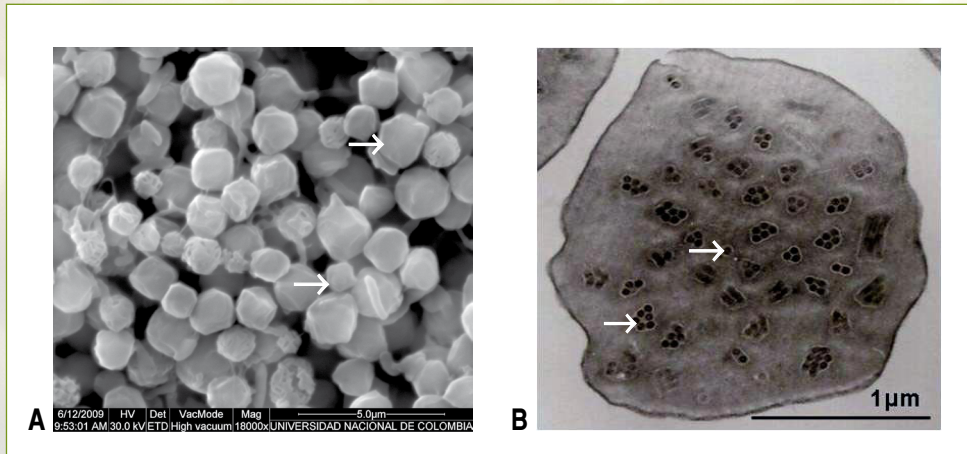


Figura 9. A. Micrografía de barrido mostrando cuerpos de inclusión (CI) de diferentes tamaños **B.** Micrografía de transmisión de un CI. Se observan entre una o varias nucleocápsides por virión.

Caracterización molecular

Perfiles de restricción y tamaño de los genomas

En este trabajo se encontró que los ADN genómicos de los tres aislamientos colombianos de NPV de *S. frugiperda* se clivaron en 28, 17, 16 y 7 fragmentos visibles por las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* y *BamHI*, respectivamente (Figura 10). No se observaron diferencias entre los perfiles obtenidos de los tres aislamientos colombianos, inclusive con otras enzimas utilizadas como *BglII* y *SmaI* (datos no mostrados). Estos datos sugieren que los tres aislamientos (NPV003, NPV009 y NPV011) pertenecen a una misma cepa, por lo cual en los análisis moleculares posteriores se utilizó el aislamiento colombiano NPV003 (Barrera *et al.*, 2011). Los perfiles de NPV003 y SfNIC presentaron diferencias mínimas utilizando diferentes enzimas, una característica común en aislamientos de regiones geográficas distantes debidos a mutaciones puntuales, inserciones o deleciones en el genoma (Chen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005).

Los fragmentos REN generados después de la digestión de NPV003 con las enzimas *PstI*, *BamHI* y *HindIII* se designaron alfabéticamente desde la letra A para el fragmento más grande hasta Q para el fragmento más pequeño (Figura 10). Se detectaron fragmentos

co-migrantes en la digestión con la enzima *PstI* (A-B, I-J y K-L), *BamHI* (A-B) y *HindIII* (H-I y M-N) (Barrera *et al.*, 2011).

Los fragmentos *PstI*-K (4,9 kb) y *PstI*-M (3,6 kb) de NPV003 no se presentaron en SfNIC; de igual forma, NPV003 no presentó un fragmento *PstI* de 7,5 kb presente en SfNIC. El perfil con la enzima *BamHI* de NPV003 fue similar a SfNIC, excepto por la ausencia de un fragmento de 5,1 kb en el genoma de NPV003. Por su parte, en el perfil con la enzima *HindIII* se observó ausencia de las bandas de 14,8 y 13,1 kb en NPV003, las cuales estuvieron presentes en SfNIC; sin embargo, NPV003 presentó una banda adicional de 28,8 kb con la misma enzima. Los tamaños de los fragmentos de los perfiles REN de NPV003 se estimaron por comparación con los tamaños previamente descritos para SfNIC (Simón *et al.*, 2005a, 2011) (Tabla 2). El tamaño del genoma de NPV003 se estimó por la suma de los fragmentos de restricción y fue similar a SfNIC (133.899 kb y 132.954 kb respectivamente) (Barrera *et al.*, 2011).

La suma de los fragmentos de NPV003 *PstI*-K (4,9 kb) y *PstI*-M (3,6 kb) sugiere que el genoma de NPV003 presenta una inserción de aproximadamente 1 kb en la correspondiente región *PstI*-F (7,5 kb) de SfNIC. Los dos fragmentos mencionados presentan un sitio de reconocimiento adicional para la enzima *PstI*, no presente en el fragmento *PstI*-F de Sonic (Barrera *et al.*, 2011).

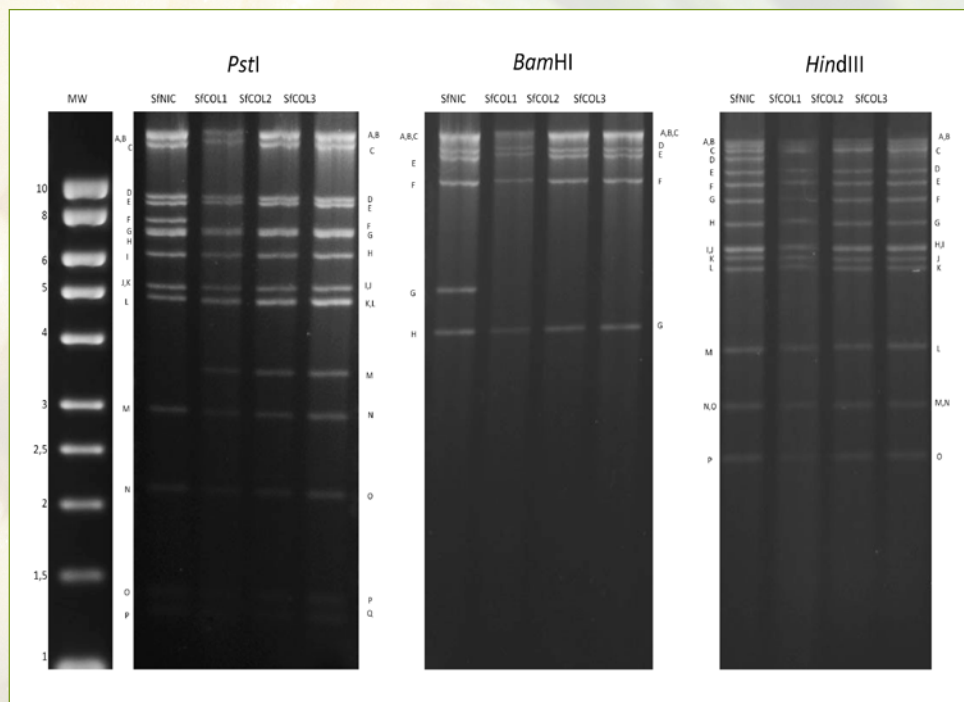


Figura 10. Perfiles de restricción con las enzimas *PstI*, *BamHI* y *HindIII* de tres aislamientos colombianos de NPV de *S. frugiperda* (NPV003, NPV009 y NPV011) y un aislamiento de Nicaragua (SfNIC). En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular.

Tabla 2. Tamaños de los fragmentos de restricción de dos aislamientos de NPV de *S. frugiperda* (NPV003 y SfNIC) generados con las enzimas *Pst*I, *Bam*HI y *Hind*III. En la última fila se observan los tamaños estimados de los genomas completos (Barrera *et al.*, 2011).

Fragmento	Tamaño de los fragmentos de restricción (pb)					
	<i>Pst</i> I		<i>Bam</i> HI		<i>Hind</i> III	
	NPV003	SfNIC	NPV003	SfNIC	NPV003	SfNIC
A	28.084	28.084	54.655	53.872	28.843	17.385
B	24.926	24.926	28.992	28.992	17.385	16.151
C	12.465	12.465	19.460	16.158	16.151	14.826
D	8.864	8.864	16.158	14.179	11.008	13.072
E	8.481	8.481	10.260	10.260	8.452	11.008
F	7.079	7.517	4.216	5.119	7.498	8.452
G	6.932	7.079	158	4.216	7.182	7.498
H	6.124	6.932		158	6.231	7.182
I	5.182	6.124			6.175	6.231
J	4.899	5.182			5.886	6.175
K	4.887	4.899			5.552	5.886
L	4.769	4.769			3.775	5.552
M	3.575	2.953			2.988	3.775
N	2.953	2.112			2.428	2.988
O	2.112	1.339			2.131	2.428
P	1.339	1.228			930	2.131
Q	1.228				676	930
R					608	676
S						608
Total	133.899	132.954	133.899	132.954	133.899	132.954

Para la confirmación de los datos anteriores y la construcción del mapa físico del genoma de NPV003, los dos fragmentos diferenciales *Pst*I de NPV003 fueron clonados y secuenciados. El fragmento secuenciado presentó una longitud de 8.642 pb, correspondiente a la suma de *Pst*I-K (4.887 pb) y *Pst*I-M (3.575 pb) que corresponden a la región genómica entre 13,9 y 20,0 unidades de NPV003 (Figura 11A) (Barrera *et al.*, 2011). Esta región fue homóloga y colineal con SfNIC *Pst*I-F entre los nucleótidos 18.515 y 26.031 del genoma de SfNIC (Simón *et al.*, 2005a, 2011). La región secuenciada ha sido descrita previamente como zona de variabilidad en diferentes genotipos de SeMNPV, la cual también es colineal con el genoma de SfMNPV (Muñoz *et al.*, 1998; Simón *et al.*, 2005a).

En la zona secuenciada se identificaron 7 ORF completos y dos ORF parciales localizados en los extremos 5' de *Pst*I-K y 3' de *Pst*I-M, que corresponden con los extremos 5' y 3' de *Pst*I-F de SfNIC (Figura 11B). El primer ORF de NPV003 presentó homología con *catepsina*, el ORF 2 con *factor de expresión tardío 7 (lef 7)*, el ORF 3 con *quitinasa*, el ORF4 y el ORF5 con proteínas de función desconocida, el ORF 6 con *gp37*, el ORF 7

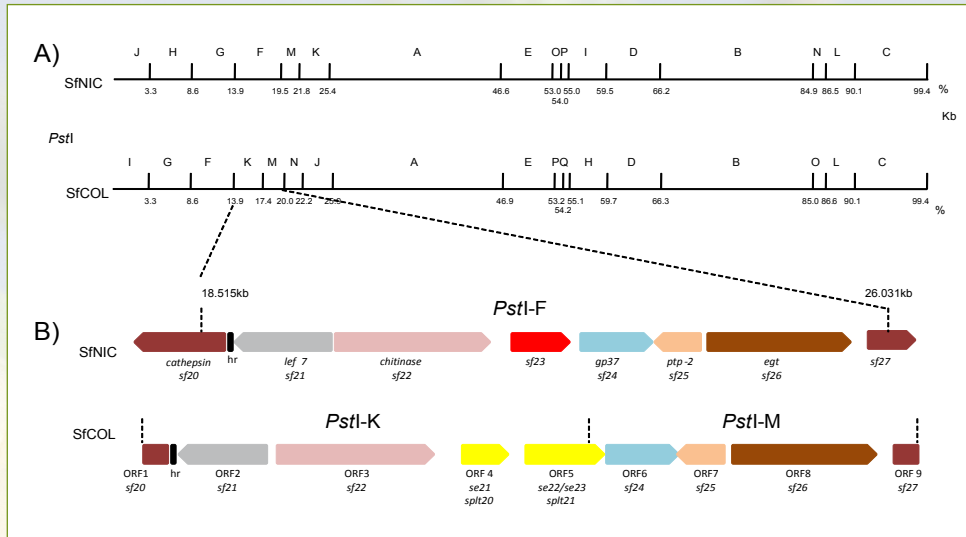


Figura 11. A. Comparación de mapas físicos *PstI* de SfNIC y NPV003. **B.** ORF presentes en el fragmento *PstI*-F de SfNIC y fragmentos *PstI*-K y *PstI*-M de NPV003. Los genes homólogos entre los dos genomas virales se señalan con el mismo color y se indican debajo de cada ORF (Barrera *et al.*, 2011).

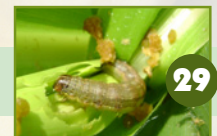
con la *proteína tirosin fosfatasa 2* (*ptp2*), el ORF 8 con *ecdysteroid UDP- glucosyltransferase* (*egt*) y el ORF 9 con una proteína de función desconocida homóloga con *Sf27* (Barrera *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que aislamientos de NPV de *Autographa californica* (AcMNPV) o SeMNPV difieren en regiones genómicas específicas que comprometen en alta prevalencia genes auxiliares (Dai *et al.*, 2000; Erlandson *et al.*, 2007), como es el caso de *catepsina* y *egt* encontrados en este trabajo.

Entre el ORF 1 y el ORF 2 se identificó una región *hr* (*homologous repeat*) de 44 pb palíndromo imperfecta, la cual ha sido relacionada con orígenes de replicación de ADN y con incremento de la transcripción (Pearson y Rohrmann, 1995), además de que se ha descrito en zonas de variabilidad de otros baculovirus (de Jong *et al.*, 2005; Hayakawa *et al.*, 2000 y Li *et al.*, 2002).

La secuencia de aminoácidos de NPV003 se comparó con los genomas de SfNIC (Simón *et al.*, 2011), SfMNPV de Estados Unidos (Sf3AP2) (Harrison *et al.*, 2008), MNPV de *S. exigua* (SeMNPV) (Ijkel *et al.*, 1999) y con NPV de *S. litura* (SpltNPV) (Pang *et al.*, 2001) (Figura 12). La región NPV003 secuenciada presentó colinealidad con los genomas comparados.

Cinco ORF completos (2, 3, 6, 7 y 8) y dos parciales (1 y 9) presentaron homología con los genomas de SfMNPV (entre el 94-100% de identidad y entre 96-100% de similaridad); sin embargo, el ORF 4 y el ORF5 no presentaron homología con estos genomas. La homología de estos dos ORF se presentó con *splt20* y *splt21* de *S. litura* MNPV (Id 96-98%; Sim 98%) y con *se21* y *se22 + se23* (Id 70-79%; Sim 79-86%) de *S. exigua* (Tabla 3) (Barrera *et al.*, 2011).



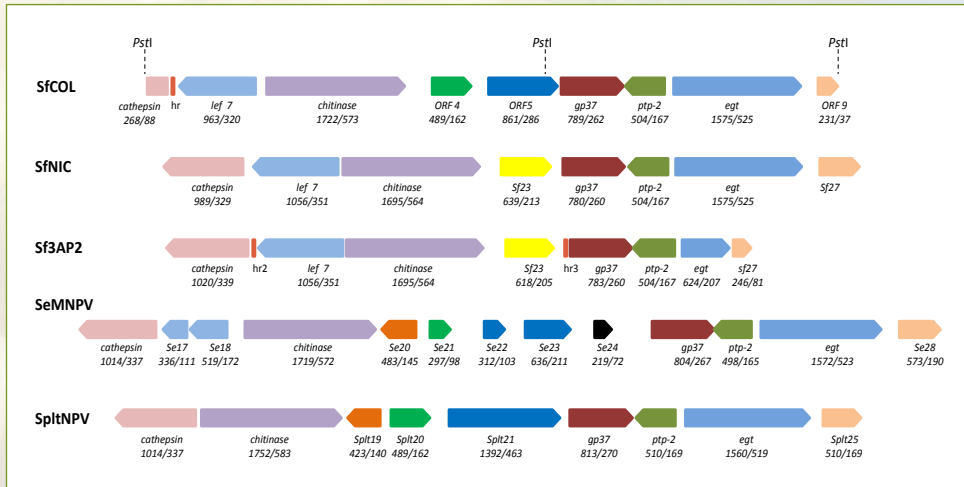


Figura 12. Representación esquemática de la colinealidad de una región entre los genomas de NPV003, SfNIC, Sf3AP2, SeMNPV y SpltNPV. Las flechas con igual color representan los ORF homólogos. El nombre del gen o su número están indicados, como su longitud en pb y aa debajo de cada flecha.

Tabla 3. Porcentaje de identidad y similitud en la secuencia de aminoácidos (aa) de las proteínas codificadas por NPV003 y sus homólogos en los genomas de SfNIC, Sf3AP2, SeMNPV y SpltMNPV. *No se presenta homología (Barrera *et al.*, 2011).

NPV003 ORF	Gen	aa	ORF % Identidad (Similitud)			
			SfNIC	Sf3AP2	SeMNPV	SpltMNPV
1	cathepsina	85	sf20/97(97)	sf20/97(97)	se16/90(91)	splt17/90(98)
2	lef-7	320	sf21/98(98)	sf21/98(98)	se17+se18/56(67)	*
3	quitinasa	573	sf22/98(99)	sf22/99(99)	se19/85(90)	splt18/83(90)
4	Desconocido	162	*	*	se21/70(79)	splt20/96(98)
5	Desconocido	286	*	*	se22+se23/78(86)	splt21/98(98)
6	gp37	262	sf24/94(96)	sf24/94(96)	se25/83(88)	splt22/88(94)
7	ptp-2	167	sf25/99(100)	sf25/99(100)	se26/68(83)	splt23/63(83)
8	egt	525	sf26/99(100)	sf26/96(96)	se27/76(91)	splt24/78(91)
9	Desconocido	77	sf27/100(100)	sf27/100(100)	se28/64(71)	splt25/82(89)
TOTAL	% Ident (Sim)		98(99)	98(98)	74(83)	85(93)

La heterogeneidad encontrada a nivel genómico entre NPV003 y los demás NPV comparados puede ser atribuible a intercambios de material genético. Se ha demostrado que existe recombinación heteróloga en cultivo celular (Hajós *et al.*, 2000) y se ha observado entre poblaciones naturales de NPV de *Rachiplusia ou* (RoMNPV) y AcMNPV (Croizier *et al.*, 1988). Por otra parte, dos baculovirus cercanamente relacionados que normalmente infectan hospederos diferentes pueden coinfectar la misma célula (Herniou

et al., 2003). En este caso, la distribución geográfica de los hospederos naturales de SfMNPV y SpltNPV no se sobrelapa, mientras que *S. frugiperda* se encuentra en las áreas tropicales y subtropicales de América, y *S. litura* se localiza en Asia y Oceanía (Takatsuka et al., 2003). Sin embargo, es posible que existiera un evento de recombinación entre SfMNPV y SpltNPV en alguna zona en que se encontraron los dos virus. Otra posibilidad es que exista desactualización en la descripción de las zonas en donde se presentan estos insectos, y se desconoce una posible migración de *S. litura* a una zona de influencia de *S. frugiperda* (Barrera et al., 2011).

La información generada por la secuenciación de los fragmentos de NPV003 *PstI*-K y *PstI*-M permitió comprobar la ausencia de sitios de reconocimiento para las enzimas *Hind*III y *Bam*HI, con lo cual se construyó el mapa físico de NPV003 basado en tres enzimas y en la comparación con el mapa físico de SfNIC (Figura 13).

La zona de variabilidad se determinó entre las unidades del mapa 9,1 y 30,5, similar a lo hallado en zonas de variabilidad descritas en otros baculovirus (Simón et al., 2004; Erlandson et al., 2007).

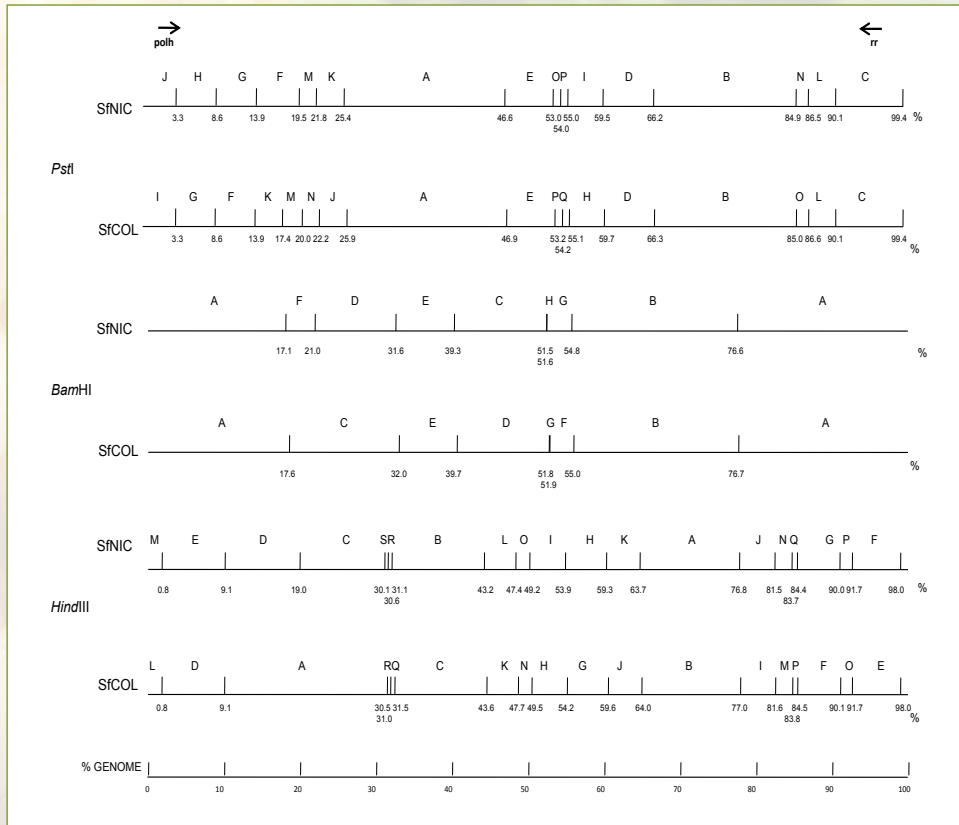
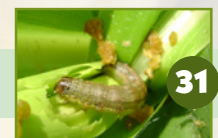


Figura 13. Mapas físicos del genoma de NPV003 comparado con SfNIC con las enzimas *PstI*, *Bam*HI y *Hind*III. El genoma circular se representa de manera lineal. El primer gen corresponde a *polyedrina*. Las unidades del mapa se indican en la línea inferior (Barrera et al., 2011).



Caracterización biológica

Los baculovirus aislados de las mismas especies en diferentes sitios geográficos frecuentemente varían en su patogenicidad y virulencia (Muñoz *et al.*, 1998; Simón *et al.*, 2004; Rorhman, 2008). Es común encontrar diferencias en la actividad biológica entre aislamientos de diferentes zonas geográficas (Caballero *et al.*, 1992; Escribano *et al.*, 1999) o inclusive entre variantes derivadas de un aislamiento salvaje obtenidas por clonaje *in vitro* (Lynn *et al.*, 1993; Simón *et al.*, 2005b). De igual forma, existen diferencias en la actividad biológica de los baculovirus, según la población de insectos a la cual son enfrentados (Escribano *et al.*, 1999; Erlandson *et al.*, 2007). Por lo anterior, la selección de un agente de biocontrol requiere que los aislamientos virales sean probados contra la población de insectos en la cual se aplicará el bioplaguicida.

Las diferencias genéticas entre los aislamientos colombianos de NPV de *S. frugiperda* y el aislamiento SfNIC tienen un efecto en las características fenotípicas de los virus, por lo que se estimó su actividad biológica en términos de patogenicidad y virulencia frente a una cría de insectos colombianos.

La patogenicidad expresada en concentración letal cincuenta no mostró diferencias significativas entre aislamientos, confirmando los resultados moleculares. Los valores obtenidos presentaron un rango entre $4,28 \times 10^4$ (NPV011) a $4,96 \times 10^4$ CI/mL (NPV009) (Tabla 4). Sin embargo, SfNIC presentó un valor de CL_{50} significativamente más alto que los aislamientos nativos, indicando menor patogenicidad de este aislamiento sobre la población de insectos colombianos. Los tres aislamientos colombianos presentaron potencias relativas 18 veces superiores al aislamiento de Nicaragua (Barrera *et al.*, 2011). Este resultado es similar al encontrado por Escribano (1999), en el cual las poblaciones de *S. frugiperda* fueron más susceptibles a aislamientos nativos. Resultados parecidos se encontraron en SNPV de *Trichoplusia ni* (TnSNPV) o AcNPV, en los cuales los aislamientos nativos fueron más infectivos y virulentos que los aislamientos virales foráneos (Erlandson *et al.*, 2007). Lo anterior sugiere la existencia de una fuerte presión de selección sobre los virus para retener alta infectividad frente a la población local, presumiblemente por un proceso de co-evolución hospedero-patógeno.

Tabla 4. Valores de CL_{50} y TMM para NPV de *Spodoptera frugiperda* (SfNIC, NPV003, NPV009 y NPV011) sobre larvas de *S. frugiperda* de segundo instar.

Virus	CL_{50} (CI/mL)	Potencia Relativa	95% Límites Fiduciales		TMM (h)	95% Límites Fiduciales	
			Inferior	Superior		Inferior	Superior
SfNIC	$8,34 \times 10^5$	1	0,07	0,46	169	164	174
NPV003	$4,84 \times 10^4$	17	1,77	5,55	161	156	165
NPV009	$4,96 \times 10^4$	16	1,76	5,3	172	167	177
NPV011	$4,28 \times 10^4$	19	1,89	6,64	163	158	168

Para determinar la virulencia se estimó el tiempo medio de mortalidad (TMM) en larvas (L2) de *S. frugiperda* con concentraciones virales con letalidad del 90%. Todos los aislamientos presentaron un TMM sobre larvas de *S. frugiperda* en un rango entre 161 y 172 horas post infección (hpi), sin diferencias significativas entre los aislamientos (Tabla 4).

Las regresiones Logit se realizaron en el programa PoloPlus, con una pendiente común de $0,863 \pm 0,087$ (media \pm error estándar). La prueba de no paralelismo no fue significativa ($\chi^2=8,374$, $df = 7$, $P > 0,05$). Las potencias relativas se calcularon como el ratio de las concentraciones referentes al aislamiento SfNIC. El TMM se estimó mediante análisis de Weibull.

No se presentaron diferencias significativas entre la producción de CI de los diferentes aislamientos (Figura 14).

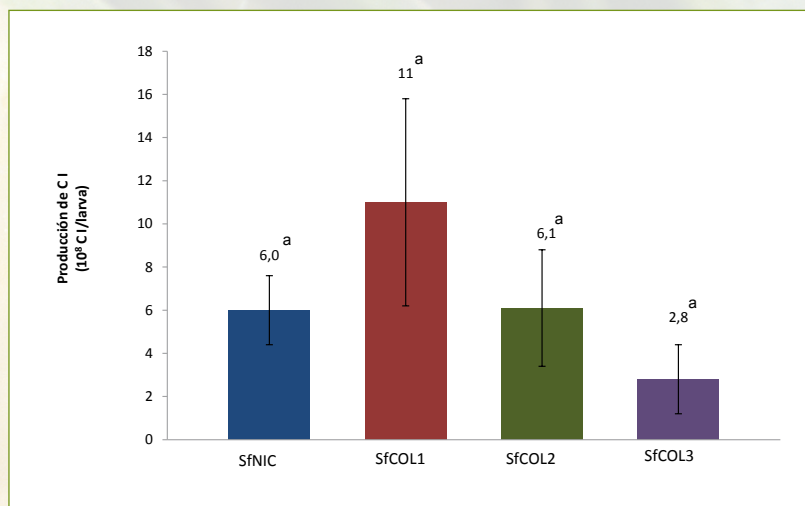


Figura 14. Producción de CI de los aislamientos SfNIC, NPV003, NPV009 y NPV011 en larvas de segundo instar de *S. frugiperda*. Los valores encima de las barras indican las medias. No se presentaron diferencias significativas (Mann-Whitney, $P > 0,05$)

En términos biológicos, un mayor tiempo letal permitiría obtener mayor cantidad de tejido larval infectado y por ende una mayor producción de cuerpos de inclusión. Esto representa una ventaja tecnológica para la producción a escala de un bioplaguicida pero una desventaja en cuanto a la protección de la planta proporcionada por los aislamientos nativos, ya que por permitir un mayor desarrollo de las larvas estas consumen mayores cantidades de alimento y generan mayores daños.

El equilibrio entre el tiempo letal y la producción total de CI de los baculovirus se encuentra ampliamente referenciado (Hernández-Crespo *et al.*, 2001; Hodgson *et al.*, 2001). Una ventaja de presentar una mayor productividad es la relación positiva que existe entre la densidad de cuerpos de inclusión y la transmisión viral en campo (D'Amico *et al.*, 2005) lo que probablemente permitirá una mayor diseminación de la enfermedad bajo estas condiciones.



CONCLUSIÓN

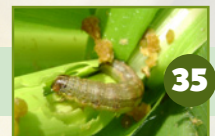
Según los resultados obtenidos después de la caracterización genómica y biológica de los aislamientos nativos se puede concluir que los tres virus colombianos analizados corresponden a cepas del mismo virus, diferentes a otros aislamientos de SfNPV como el de Nicaragua. Dada la alta actividad de los aislamientos colombianos (patogenicidad, virulencia y productividad) frente a la población de insectos locales, NPV003 es una alternativa para el desarrollo de un insecticida biológico para el control del gusano cogollero en Colombia.

Se generó una caracterización completa (morfológica, genética y biológica) con los aislamientos colombianos de SfMNPV.

Bibliografía

- ARMENTA, R.; MARTÍNEZ, A. M.; CHAPMAN, J. W.; MAGALLANES, R.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CAVE, R. D.; CISNEROS, J.; VALLE, J.; CASTILLEJOS, V.; PENAGOS, D. I.; GARCÍA, L. F.; WILLIAMS, T. (2003). Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 96: 649-661.
- BARRERA, G.; SIMÓN, O.; VILLAMIZAR, L.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. (2011). *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control* 58: 113-120.
- BERRETTA, M. F.; RÍOS, M. L.; SCIOCCO DE CAP, A. (1998). Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 280-282.
- CABALLERO, P.; ZUIDEMA, D.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C.; VLAK, J. M. (1992). Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology* 2: 145-157.
- CHEN, X. W.; ZHANG, W. J.; WONG, J.; CHUN, G.; LU, A.; MCCUTCHEN, B. F.; PRESNAIL, J. K.; HERRMANN, R.; DOLAN, M.; TINGEY, S.; HU, Z. H.; VLAK, J. M. (2002). Comparative analysis of the complete genome sequences of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 83: 673-684.
- CISNEROS, J.; PÉREZ, J. A.; PENAGOS, D. I.; RUIZ, V. J.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CAVE, R. D.; WILLIAMS, T. (2002). Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control* 23: 87-95.
- CRAWLEY, M. J. (1993). *GLIM for ecologists*. Blackwell Scientific Publications, Oxford; Boston.
- CROIZIER, G.; CROIZIER, L.; QUIOT, J. M.; LERECLUS, D. (1988). Recombination of *Autographa californica* and *Rachiplusia ou* nuclear polyhedrosis viruses in *Galleria mellonella* L. *Journal of General Virology* 69: 177-185.

- DAI, X. J.; HAJÓS, J. P.; JOOSTEN, N. N.; VAN OERS, M. M.; IJKEL, W. F. J.; ZUIDEMA, D.; PANG, Y.; VLAK, J. M. (2000). Isolation of a *Spodoptera exigua* baculovirus recombinant with a 10,6 kbp genome deletion that retains biological activity. *Journal of General Virology* 81: 2545-2554.
- D'AMICO, V.; ELKINTON, J.; BUONACCORSI, J.; DWYER, G. (2005). Pathogen clumping: an explanation for non-linear transmission of an insect virus. *Ecological Entomology*. 30: 383-390.
- ERLANDSON, M.; NEWHOUSE, S.; MOORE, K.; JANMAAT, A.; MYERS, J.; THEILMANN, D. (2007). Characterization of baculovirus isolates from *Trichoplusia ni* populations from vegetable greenhouses. *Biological Control* 41: 256-263.
- ESCRIBANO, A.; WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CAVE, R. D.; CHAPMAN, J. W.; CABALLERO, P. (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology* 92: 1079-1085.
- HAJÓS, J. P.; PIJNENBURG, J.; USMANY, M.; ZUIDEMA, D.; ZÁVODSZKY, P.; VLAK, J. M. (2000). High frequency recombination between homologous baculoviruses in cell culture. *Archives of Virology* 145: 159-164.
- HARRISON, R. L.; PUTTLER, B.; POPHAM, H. J. (2008). Genomic sequence analysis of a fast-killing isolate of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* 89: 775-790.
- HAYAKAWA, T.; ROHRMANN, G. F.; HASHIMOTO, Y. (2000). Patterns of genome organization and content in lepidopteran baculoviruses. *Virology* 278: 1-12.
- HERNÁNDEZ-CRESPO, S.; SAIT, R.; HAIL, R.; CORY, J. (2001). Behavior of a recombinant baculovirus in lepidopteran hosts with different susceptibilities. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1140-1146.
- HERNIOU, E. A.; OLSZEWSKI, J. A.; CORY, J. S. AND O'REILLY, D. R. (2003). The genome sequence and evolution of baculoviruses. *Annu Rev Entomol* 48: 211-234.
- HODGSON, D.; VANBERGEN, A.; WAIT, A.; HAILS, R.; CORY, J. (2001). Phenotypic variation between coexisting genotypic strains of a Lepidopteran baculovirus, *Evolutionary Ecology Research*. 3: 687-701.
- HUGHES, P. R.; WOOD, H. A. (1981). A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses *Journal of Invertebrate Pathology* 37: 154-159.
- IJKEL, W. F. J.; VAN STRIEN, E. A.; HELDENS, J. G. M.; BROERC, R.; ZUIDEMA, D.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M. (1999). Sequence and organization of the *Spodoptera exigua* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology* 80: 3289-3304.
- LE ORA-SOFTWARE. (1987). POLO-PC a user's guide to Probit or Logit analysis. Berkeley, CA.
- LI, Q.; DONLY, C.; LI, L.; WILLIS, L. G.; THEILMANN, D. A.; ERLANDSON, M. (2002). Sequence and organization of the *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* 294: 106-121.
- LOH, L.C.; HAMM, J. J.; KAWANISHI, C.; HUANG, E. S. (1982). Analysis of the *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome by restriction endonucleases and electron microscopy. *Journal of Virology* 44: 747-751.
- LYNN, D. E.; SHAPIRO, M.; DOUGHERTY, E. M. (1993). Selection and screening of clonal isolates of the Abington strain of gypsy-moth nuclear polyhedrosis-virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 62: 191-195.
- MOSCARDI, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44: 257-289.
- MUÑOZ, D.; CASTILLEJO, J. I.; CABALLERO, P. (1998). Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 4372-4377.



- PANG, Y.; YU, J.; WANG, L.; HU, X.; BAO, W.; LI, G.; CHEN, C.; HAN, H.; HU, S. AND YANG, H.** (2001). Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. *Virology* 287: 391-404.
- PEARSON, M. N.; ROHRMANN, G. F.** (1995). *Lymantria dispar* nuclear polyhedrosis virus homologous regions: characterization of their ability to function as replication origins. *Journal of Virology* 97: 213-221.
- ROHRMANN, G.** (2008). Introduction to the baculoviruses and their taxonomy. In: *Baculovirus Molecular Biology*. Bethesda (MD): National Library of Medicine, NCBI, pp. 1-12.
- SHAPIRO, D. I.; FUXA, J. R.; BRAYMER, H. D.; PASHLEY, D. P.** (1991). DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 96-105.
- SIMÓN, O.; CHEVENET, F.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.** (2005a). Physical and partial genetic map of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) genome. *Virus Genes* 30: 403-417.
- SIMÓN, O.; PALMA, L.; BEPERET, L.; MUÑOZ, D.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.** (2011). Sequence comparison between three geographically distinct *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus isolates detecting positively selected genes. *Journal of Invertebrate Pathology* 107: 33-42.
- SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; LÓPEZ-FERBER, M.; CABALLERO, P.** (2005b). Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4254-4262.
- SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; LÓPEZ-FERBER, M.; CABALLERO, P.** (2004). Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: High prevalence of deletion genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5579-5588.
- TAKATSUKA, J.; OKUNO, S.; NAKAI, M. AND KUNIMI, Y.** (2003). Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* 26: 32-39.
- WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CISNEROS, J.; MARTÍNEZ, A. M.; CHAPMAN, J. W.; ROMAN, D. X.; CAVE, R. D.** (1999). Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. *Biological Control* 14: 67-75.
- WOLFF, J. L.; VALICENTE, F. H.; MARTINS, R.; OLIVEIRA, J. V.; ZANOTTO, P. M.** (2008). Analysis of the genome of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus (SfMNPV-19) and of the high genomic heterogeneity in group II nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 89: 1202-1211.
- ZHANG, C. X.; MA, X. C.; GUO, Z. J.** (2005). Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology* 333: 190-199.

CAPÍTULO 3.

Desarrollo de un prototipo de formulación del virus que brinde eficiente protección frente a la radiación ultravioleta

LAURA VILLAMIZAR Ph.D., MIGUEL LÓPEZ-FERBER Ph.D.,
ALBA MARINA COTES Ph.D., FLEMING MARTÍNEZ Ph.D.

INTRODUCCIÓN

La inactivación de los baculovirus por efecto de la radiación solar bajo condiciones de campo es el principal factor ambiental que limita el uso masivo de estos agentes de biocontrol (Ignoffo *et al.*, 1997). La luz solar afecta negativamente las partículas virales, particularmente la radiación comprendida en el espectro ultravioleta (Farrar *et al.*, 2000) y especialmente la radiación entre 280 nm y 310 nm (Asano, 2005). Algunos trabajos se han desarrollado en busca de protectores solares que eviten el deterioro de los baculovirus por causa de la luz mediante estrategias como el uso de derivados de la lignina, con los cuales se han alcanzado niveles de protección de 421 días bajo condiciones de campo (Hamed *et al.*, 2004). Otra alternativa para fotoestabilizar los agentes de biocontrol es el desarrollo de formulaciones utilizando tecnologías como la microencapsulación, que permite recubrir pequeñas partículas sólidas o gotas de líquidos con una capa delgada y uniforme del material de recubrimiento, formando cápsulas con tamaños que pueden oscilar entre 1 y 1.000 μm (Florence y Attwood, 1998).

A pesar de contar con un aislamiento de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* con alto potencial para el desarrollo de un bioplaguicida, cuando el virus sea aplicado bajo condiciones de campo, éste se verá expuesto a condiciones ambientales deletéreas, entre ellas la radiación ultravioleta del sol. Por tales razones, surgió la necesidad de evaluar el potencial de la microencapsulación con un polímero pH-dependiente como una estrategia para proteger las partículas virales de la inactivación causada por la radiación ultravioleta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación del efecto tóxico del polímero de recubrimiento sobre las larvas

Para determinar el posible efecto tóxico del polímero sobre las larvas de *S. frugiperda* se llevó a cabo un bioensayo bajo condiciones controladas de laboratorio. El polímero fue



disuelto en tampón fosfato (pH 8) a una concentración de 4 mg/mL (Asano, 2005), y a dicha dispersión se le adicionó colorante azul de alimentos Tuska® (1%) y sacarosa (4%). Con la dispersión polimérica se desarrolló un bioensayo siguiendo la metodología descrita en el Capítulo 1. Se contó con un testigo absoluto consistente en larvas neonatas sin tratamiento alguno.

El diseño experimental fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo. Los resultados de mortalidad fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA con una confiabilidad del 95%.

Determinación de efecto de diferentes solventes sobre la actividad biocontroladora de un aislamiento de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda*

Con miras a seleccionar solventes orgánicos que no afectaran la actividad del virus y que pudieran ser utilizados en el proceso de microencapsulación, se realizó un estudio de compatibilidad. Muestras de 0,01 g de virus purificado liofilizado fueron dispensadas en 16 tubos Eppendorf de 500 µL, y en cada tubo se adicionaron 20 µL de cada solvente (Tabla 5) agitándolos mediante inversiones manuales y centrifugados posteriormente a 14.000 rpm durante 30 minutos.

El sobrenadante se eliminó y el sedimento correspondiente a las partículas virales fue lavado dos veces con 500 µL de agua destilada estéril. El sedimento fue nuevamente resuspendido en 50 µL de agua y se preparó una suspensión ajustada a 1×10^{10} CI/mL. Se colocaron 10 µL de cada suspensión viral en un pozo de una microplaca de 96 pozos de fondo plano y se adicionaron 10 µL de una solución de sacarosa al 4% y colorante azul de alimentos al 1% a cada pozo. El contenido de cada pozo se utilizó para un bioensayo siguiendo la metodología previamente descrita. El tratamiento testigo positivo consistió en un virus purificado no expuesto a solvente alguno y se contó con un testigo absoluto en el que las larvas no recibieron tratamiento.

El diseño experimental fue completamente al azar. Los resultados de mortalidad al séptimo día fueron corregidos con respecto al testigo utilizando la fórmula de Schneider – Orelli (Zar, 1999) y fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA con una confiabilidad del 95%.

Tabla 5. Solventes utilizados para el estudio de compatibilidad con el virus

Solvente	Marca
Butanol	Sigma
Metanol	Mallinckrodt
Etanol	Merck
Cloroformo	Chemical
Benceno	RPE
n-Hexano	Merck
Acetona	J.T. Baker
Tolueno	Sigma
Heptano	Merck
n-Propanol	Fisher
Xileno	J.T. Baker
Dimetilsulfóxido	J.T. Baker
Alcohol isoamílico	J.T. Baker
Dietiléter	ProAnalysis
Etilenglicol	Merck
Cloruro de metileno	J.T. Baker

Selección de condiciones para el proceso de formación de micropartículas mediante la metodología de evaporación de solvente.

Concentración de tensioactivo: se disolvieron 0,20 g de polímero en 5 mL del solvente seleccionado (acetona) y la solución polimérica fue emulsificada con 20 mL de parafina líquida a la cual se le adicionó previamente como estabilizante Span 80, evaluando tres concentraciones: 1%, 2% y 3%. La emulsificación se llevó a cabo en un vaso de precipitados de 50 mL, homogeneizando la mezcla a 14.000 rpm durante 2 minutos. Las emulsiones se mantuvieron luego con un agitador vertical rotatorio de brazos con una velocidad de 2.400 rpm durante 2 horas para permitir la evaporación del solvente y la consecuente formación de las micropartículas. Para los tratamientos en los que se obtuvo la formación de micropartículas, estas se recuperaron mediante centrifugación a 15.000 rpm durante 10 minutos, se lavaron dos veces con n-Hexano y se dejaron secar toda la noche exponiéndolas al ambiente en una cabina extractora (modificado de Trapani *et al.*, 2007).

Las micropartículas obtenidas fueron observadas en un microscopio Olympus CH3ORF100 (Hirech *et al.*, 2003). También se determinó la morfología de su superficie por observación en microscopio de campo oscuro y con estos resultados se seleccionó la concentración de tensioactivo que produjo la mejor respuesta; es decir, la formación de esferas con la menor distribución de tamaños de partícula y el menor diámetro promedio.

Relación de fases y concentración de polímero: con miras a determinar un punto que permitiera la formación adecuada de micropartículas, el cual sería optimizado posteriormente utilizando un diseño factorial multinivel, una vez seleccionada la concentración de tensioactivo se procedió a evaluar las variables: (a) concentración de polímero y (b) relación de fases, siguiendo la metodología previamente descrita para la formación de las micropartículas.

Relaciones de fase acuosa: fase oleosa evaluadas fueron 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 y 1:6. Las concentraciones de polímero variaron según la cantidad de este, que se disolvió en un mismo volumen de solvente: 0,20 g; 0,25 g o 0,30 g en 5 mL (Tabla 6).

Tabla 6. Codificación de los tratamientos evaluados para la formación de micropartículas por el método de evaporación del solvente.

Fase acuosa (mL)	Fase oleosa (mL)	Polímero (g)		
		0,20	0,25	0,30
5	10	A	B	C
	15	D	E	F
	20	G	H	I
	25	J	K	L
	30	M	N	O

Ajuste de condiciones del proceso de formación de micropartículas: teniendo como base el tratamiento que presentó la respuesta más promisoría, se estudió la



influencia de dos parámetros en la formación de las micropartículas utilizando un diseño experimental de selección multinivel (Trapani *et al.*, 2007). Los tratamientos se definieron a partir de un punto central o punto 0, que correspondió a un tratamiento que produjo una respuesta positiva en los ensayos previos; es decir, aquel con el que se obtuvo la formación de micropartículas con características adecuadas. A partir de este punto se evaluaron las variables: (a) cantidad de núcleo (talco industrial malla 325) suspendido en los 5 mL de solución polimérica y (b) cantidad de polímero disuelto en los 5 mL de solvente. Se definieron dos puntos equidistantes del valor central, uno por encima y otro por debajo para cada variable, según se presenta en la Tabla 7. Además, se utilizó la concentración de tensioactivo y la relación de fases seleccionada previamente (Villamizar *et al.*, 2010).

El diseño requirió un total de nueve experimentos, cada uno de los cuales se realizó por triplicado. Las variables respuesta fueron el tamaño medio de partícula, que se evaluó mediante medición en microscopio Olympus CH3ORF100 (Hirech *et al.*, 2003), y el rendimiento, que se calculó pesando las microcápsulas obtenidas y aplicando la fórmula (Trapani *et al.*, 2007):

Tabla 7. Factores y niveles del diseño experimental para el método de evaporación de solvente utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
Núcleo (g)	0,050	0,075	0,100
Polímero (g)	0,100	0,150	0,200

$$\% \text{Rendimiento} = (PM / PT) \times 100$$

Donde:

PM: es el peso de las microcápsulas obtenidas

PT: es el peso esperado de las microcápsulas, o sea el peso del polímero más el de los materiales microencapsulados.

Para determinar las relaciones entre los factores y las variables evaluadas se realizó un análisis de superficies de respuesta con el programa Statgraphic 4.0 (Trapani *et al.*, 2007).

La morfología de las micropartículas obtenidas se determinó mediante microscopía electrónica de barrido –siguiendo la metodología descrita por Trapani *et al.* (2007)– en un microscopio Philips XL 20.

Para determinar las relaciones entre los factores y las variables evaluadas se realizó un análisis de superficies de respuesta (Trapani *et al.*, 2007).

Microencapsulación del virus

Una vez seleccionado el método de microencapsulación por evaporación de solvente y las condiciones más adecuadas para el mismo, se procedió a la microencapsulación del virus. Para tal fin, se utilizaron 0,0250 g de polímero disueltos en 5 mL de acetona y 0,050 g de virus purificado y liofilizado (núcleo). La velocidad de agitación se ajustó en 5.000 rpm (Villamizar *et al.*, 2010). El procedimiento seleccionado fue exitoso para la

microencapsulación del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* y, por tanto, se elaboraron tres lotes de micropartículas, que fueron caracterizadas como se describe a continuación:

- **Tamaño de partícula:** el tamaño de las microcápsulas formadas fue evaluado mediante microscopía óptica midiendo el diámetro de 300 partículas con un micrómetro adaptado al ocular del microscopio (Villamizar *et al.*, 2010).
- **Morfología de las microcápsulas – Microscopía electrónica de barrido:** las microcápsulas fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido. Las muestras fueron fijadas en un portamuestra con glutaraldehído al 2,5% por 24 horas y fijadas nuevamente con tetraóxido de osmio al 1% por 1 hora. El portamuestra se lavó con tampón de fosfato pH 6 y se sometió a un proceso de deshidratación con etanol al 50% por 15 minutos, seguido de etanol al 70% por 15 minutos, etanol al 80% por 15 minutos y etanol al 100% por 15 minutos 2 veces. La muestra fue cubierta con oro y se tomaron fotografías en un microscopio electrónico de barrido (Villamizar *et al.*, 2010).
- **Composición de la superficie:** la composición superficial de 10 micropartículas fue determinada en el microscopio electrónico, donde se introdujo una sonda (AXIS His-165 Ultra, Kratos Analytical, Shimadzu, Japan) que analizó la composición mediante espectroscopía fotoelectrónica de rayos X. Se utilizó el modo de transmisión fija con una energía de 80 eV y los datos se analizaron con el programa provisto por el fabricante (Villamizar *et al.*, 2010).
- **Eficiencia de microencapsulación y concentración de las micropartículas:** se preparó una suspensión de microcápsulas ajustada a una concentración de 10^9 microcápsulas por mililitro en agua destilada y se dispensó un mililitro en un tubo de ensayo. El pH se ajustó a 10 mediante la adición de NaOH 0,1N y se midió el volumen final de la muestra, la cual se agitó durante 30 minutos para permitir la disolución del polímero de las microcápsulas. Luego se cuantificó la concentración de partículas virales mediante recuento en cámara de Neubauer y se relacionó con la concentración inicial de microcápsulas, teniendo en cuenta el volumen inicial y final (Villamizar *et al.*, 2010).

Paralelamente se realizó el cálculo esperado de dicho contenido teniendo en cuenta el peso de polímero y de virus utilizados en el proceso, así como la concentración del virus puro y seco (principio activo) determinada previamente. Con dichos valores se aplicó la siguiente fórmula (Jain *et al.*, 2005):

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulación} = (\text{concentración real} / \text{concentración teórica}) \times 100$$

Contenido residual de solventes en las microcápsulas: el contenido residual de solvente en las microcápsulas fue evaluado mediante cromatografía de gases (Tuduri *et al.*, 2002). Se pesaron 20 mg de microcápsulas y se ubicaron en un vial de vidrio de 2 mL. El vial se tapó y se dejó en reposo durante 1 hora para permitir que la atmósfera interna alcanzara el equilibrio. Posteriormente, se introdujo por la tapa del vial la aguja de una jeringa y a través de esta se expuso una fibra de polidimetilsiloxano-carboxeno durante 10 minutos. La fibra fue previamente estabilizada en el cromatógrafo de gases



a 220 °C durante 5 horas. Terminado el tiempo de exposición de la fibra a la atmósfera interna del vial, esta fue recogida dentro de la aguja, retirada del vial e inyectada en un cromatógrafo de gases Termo Electrón – TRACE GC ULTRA con una columna HP-1 (100% polydimethylsiloxane), 60 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25 µm de espesor de la película. La inyección se aplicó utilizando una temperatura de 220 °C, la cual se mantuvo constante durante toda la evaluación. El gas de carga fue helio. La presencia de solventes fue establecida mediante un espectrómetro de masas DSQ (cuadripolo) adaptado al cromatógrafo como detector (Villamizar *et al.*, 2010).

Efecto de la microencapsulación del virus frente a la radiación ultravioleta

Para evaluar el efecto protector de la microencapsulación del virus frente a la radiación ultravioleta se realizó un bioensayo. Los tratamientos evaluados fueron el virus sin microencapsular, el virus microencapsulado y un testigo absoluto. Se prepararon suspensiones con el virus microencapsulado y sin microencapsular y se ajustaron a una concentración de 2×10^7 CI/mL o g, según fuera el caso. Se colocaron 200 µL de cada suspensión viral en 5 pozos de una fila de una microplacas de 96 pozos de fondo plano. La microplaca fue expuesta a una lámpara Repti Glo 8.0 que simula la radiación solar y emite un 33% de UVA y un 8% de UVB, ubicada a 10 cm de altura, de manera que las muestras se expusieran a la misma intensidad de radiación ultravioleta tipo B (250 W/cm²). Antes de iniciar la irradiación se cubrió la primera columna de pozos de la microplaca con papel aluminio (un pozo de cada tratamiento). Cada 15 minutos durante una hora y cada 3 horas hasta las seis se cubrió la columna siguiente de pozos, representando cada columna de la microplaca un tiempo diferente de exposición a la radiación ultravioleta. Luego se adicionaron a cada pozo 200 µL de una solución de sacarosa al 10% que contenía un colorante azul de alimentos al 1%. Con la muestra contenida en cada pozo se inocularon 30 larvas neonatas de *S. frugiperda* (Villamizar *et al.*, 2010).

Diariamente se llevó un registro de la mortalidad y las larvas muertas fueron recolectadas y almacenadas en congelador a -20 °C.

El experimento contó con dos repeticiones en el tiempo para confirmar la repetibilidad del mismo. Los resultados de mortalidad fueron corregidos con respecto al testigo para calcular el porcentaje de eficacia, utilizando la fórmula de Schneider - Orelli descrita por Zar (1999):

$$\% \text{ Eficacia} = ((A - B) / (100 - B)) \times 100$$

Donde:

A: Mortalidad en el tratamiento

B: Mortalidad en el testigo

Con los valores de eficacia se calculó el porcentaje de actividad original remanente utilizando la siguiente ecuación (Shapiro, 1989):

$$\% \text{ AOR} = (C / A) \times 100$$

Donde:

A: Eficacia del virus no expuesto

C: Eficacia del virus expuesto a la radiación UV

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey con una confiabilidad del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación del efecto tóxico del polímero de recubrimiento sobre las larvas

Como se observa en la Figura 15, las larvas que consumieron el polímero presentaron una mortalidad total del 23%, similar a la observada para las larvas del tratamiento testigo (no sometidas a ningún tratamiento) que alcanzaron el 20%. El análisis de varianza no detectó diferencias estadísticas entre las mortalidades de los dos tratamientos en cada día de evaluación, confirmando que el polímero no presentó un efecto tóxico sobre el insecto.

Este polímero utilizado es un excipiente calidad farmacéutica, empleado comúnmente como agente de recubrimiento de tabletas y en procesos de microencapsulación de fármacos. Es un polimetacrilato, es decir, un polímero sintético del ácido metacrílico y su éster, considerado como un material no tóxico y no irritante (Rowe *et al.*, 2006).

Considerando que el polímero no representa riesgo alguno de toxicidad para animales y humanos, y que no afectó a las larvas neonatas de *S. frugiperda*, este fue seleccionado para continuar con el desarrollo del bioplaguicida a base de un aislamiento nativo de nucleopoliedrovirus.

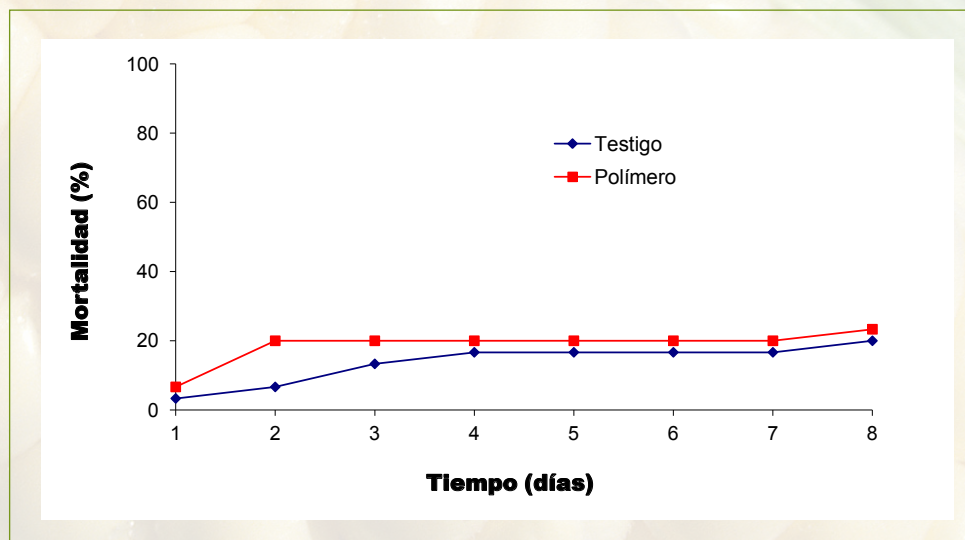


Figura 15. Mortalidad de larvas neonatas de *S. frugiperda* expuestas al polímero de recubrimiento



Determinación del efecto de diferentes solventes sobre la actividad biocontroladora del aislamiento de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*

La exposición de las partículas virales a los 16 solventes orgánicos evaluados no afectó su actividad biocontroladora sobre larvas neonatas de *S. frugiperda*. Tanto con el virus expuesto a los solventes como con el virus no expuesto, se alcanzó el 100% de mortalidad de las larvas a los 8 días post-inoculación, valores que al ser corregidos con respecto al testigo absoluto correspondieron a una eficacia del 100%.

Considerando que para todos los tratamientos y las réplicas de los mismos se obtuvo un 100% de eficacia, se puede sugerir que el virus es compatible con todos los solventes evaluados, los cuales podrían ser utilizados en el desarrollo de una técnica de microencapsulación. Dicha compatibilidad podría deberse a que los baculovirus son virus ocluidos que presentan viriones embebidos en una matriz cristalina proteica, 'poliedro', que constituye el conocido cuerpo de inclusión (CI). El CI posiblemente evitó el contacto directo de los viriones constituidos por la nucleocápside y el ADN con los solventes, protegiéndolos de cualquier efecto detrimental de estos sobre las unidades infectivas. Así como lo reportó Caballero *et al.* (2001), los cuerpos de inclusión brindan protección a los viriones debido a que son insolubles en agua, excepto bajo condiciones extremadamente alcalinas y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos y también a tratamientos físicos como la congelación, desecación o liofilización, características que les confieren persistencia en el medio.

Los baculovirus son muy estables desde el punto de vista fisicoquímico por la presencia y composición del CI. Otros virus también han demostrado ser estables frente a compuestos orgánicos, como es el caso de los rotavirus. Estos últimos son funcionales en un rango de pH de 3 a 9, y las partículas virales son estables por meses a 40 °C y aún a 200 °C bajo condiciones particulares. La partícula completa mantiene su integridad y su infectividad cuando es tratada con solventes orgánicos tales como éter, cloroformo o freón, lo que refleja la ausencia de lípidos en su estructura (Kurtz *et al.*, 1980; Vaughn *et al.*, 1986). Por el contrario, virus como el de la rabia que pertenece a la familia *Rhabdoviridae* son rápidamente inactivados por el calor, los rayos ultravioleta, la desecación, los solventes orgánicos y la tripsina (Montaño y Mata, 1996).

Selección de condiciones para el proceso de formación de micropartículas mediante la metodología de evaporación de solvente

El proceso de microencapsulación por el método de evaporación o extracción del solvente corresponde a un conjunto de procedimientos en los que se da como circunstancia común a todos la formación de una emulsión. La fase interna de la emulsión debe ser un disolvente orgánico que presente una solubilidad limitada en la fase externa de la emulsión, la cual puede ser agua o aceite. Para la formación de una emulsión estable y la consecuente formación de las micropartículas, es fundamental la incorporación de un agente tensioactivo en la fase externa. Una vez formada la emulsión se puede extraer el disolvente con otro líquido, el cual es soluble en el disolvente, o evaporar este último

para conseguir la precipitación gradual del polímero a medida que se va eliminando el disolvente, dando lugar a la formación de las microesferas (Chiappetta, 2006).

Concentración de tensioactivo: como se observa en la Figura 16, sólo cuando se utilizó la mayor concentración de tensioactivo, equivalente al 3%, se obtuvo la formación de micropartículas. Para el tratamiento en que se utilizó el tensioactivo al 2% se observó la formación de pequeñas masas de polímero, que no correspondieron a micropartículas sino a aglomerados de forma y tamaño variables que sugirieron la inestabilidad de la emulsión durante el proceso de evaporación del disolvente.

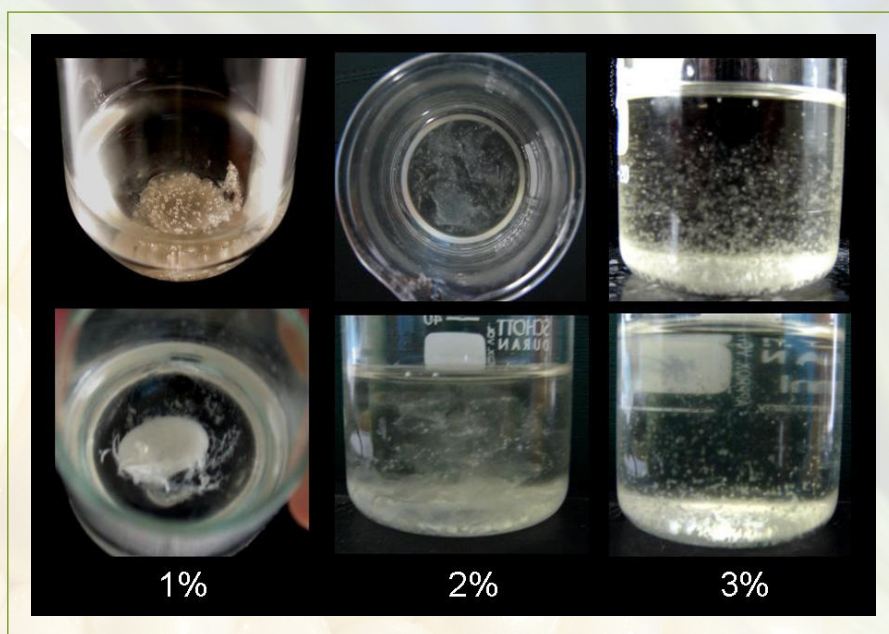


Figura 16. Efecto de la concentración de Span 80 en la formación de micropartículas de Eudragit® S100

Cuando el tensioactivo fue utilizado a la menor concentración (1%), se produjo la formación de un agregado de forma ovoide de aproximadamente 1 cm de diámetro, fenómeno que posiblemente se dio por la utilización de una baja concentración de tensioactivo, que no fue suficiente para estabilizar la emulsión. La inestabilidad de la fase dispersa (solución polimérica) favoreció la coalescencia de las gotas de dicha fase y la formación de una masa de polímero de forma ovoidal que concentró todo el Eudragit® S100.

Es posible que al utilizar la menor concentración de tensioactivo se haya presentado el fenómeno de coalescencia de gotas, obteniéndose al final del proceso la formación de una masa de polímero de gran tamaño. Dicho fenómeno probablemente se debió a que la baja concentración de polímero no fue suficiente para formar una capa continua y rígida alrededor de todas las microgotas (Aranberri *et al.*, 2006). Por el contrario, cuando la concentración de tensioactivo se incrementó al 3%, la emulsión fue estable y permitió

obtener microesferas. En un trabajo similar, Jain *et al.* (2005) seleccionaron esta misma concentración de tensioactivo como la más efectiva para formación de micropartículas de Eudragit® S100 para la liberación oral de insulina.

En la Figura 17 se presenta la morfología de la micropartículas obtenidas cuando se utilizó el tensioactivo al 3%. En esta fotografía se observa que las micropartículas son de forma esférica y superficie lisa. También es posible detectar que algunas partículas están adheridas con otras en un punto de contacto, lo que sugiere que estas se solidificaron en el momento en que se estaba produciendo su coalescencia. Este comportamiento indica que la emulsión no fue lo suficientemente estable, a pesar de usarse la mayor concentración de tensioactivo. El resultado obtenido también se puede atribuir a otras causas, como una deficiente agitación o una inadecuada relación de fases, factores que favorecen la coalescencia de las gotas (Eccleston, 2002).

Basados en los resultados, se seleccionó el tensioactivo a la concentración del 3% para continuar con el presente trabajo.

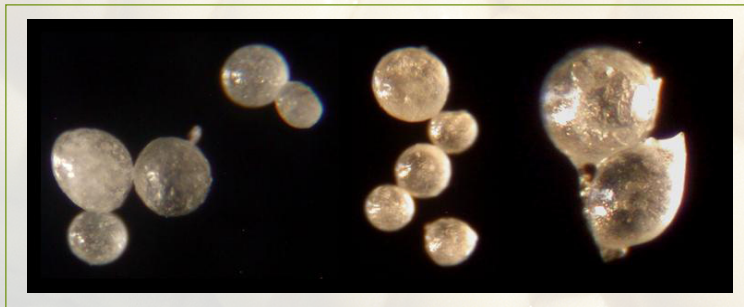


Figura 17. Micropartículas de Eudragit® S100 obtenidas mediante la técnica de evaporación de solvente (acetona) utilizando Span 80 al 3% como estabilizador de la emulsión

Relación de fases y concentración de polímero: una vez seleccionada la concentración de tensioactivo se procedió a evaluar el efecto de la relación de las fases en la emulsión y de la concentración del polímero. En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos con cada tratamiento.

Con los tratamientos en los que se utilizó la relación de fases 1:2 de la acuosa con respecto a la oleosa, no se obtuvieron micropartículas, sino la formación de un agregado de tamaño considerable para las tres concentraciones de polímero evaluadas. Este resultado sugiere que la relación de fases es inadecuada, lo que podría atribuirse a que la fase dispersa (solución del polímero en acetona) se encontraba en una alta proporción con respecto a la fase dispersante, lo que favorece la coalescencia de las gotas (Eccleston, 2002).

Cuando se redujo la cantidad de fase dispersa utilizando la relación 1:3 se obtuvo la respuesta esperada, únicamente con la concentración intermedia de polímero. Se observó la formación de micropartículas de tamaño medio $366 \pm 227 \mu\text{m}$ y el rendimiento del proceso fue del 78,9%.

Tabla 8. Efecto de la relación de fases y la concentración de polímero sobre la formación de micropartículas de Eudragit® S100. (W) fase acuosa, (O) fase oleosa

Tratamiento	W : O	Cantidad de polímero (g)	Tamaño (μm)	SD (μm)	Peso real (g)	Peso esperado (g)	Rendimiento (%)
A	1 : 2	0,20	-	-	-	-	-
B		0,25	-	-	-	-	-
C		0,30	-	-	-	-	-
D	1 : 3	0,20	-	-	-	-	-
E		0,25	367	227	0,276	0,350	78,9
F		0,30	-	-	-	-	-
G	1 : 4	0,20	285	189	0,269	0,300	89,7
H		0,25	448	198	0,277	0,350	79,1
I		0,30	-	-	-	-	-
J	1 : 5	0,20	470	404	0,265	0,300	88,3
K		0,25	856	393	0,292	0,350	83,4
L		0,30	-	-	-	-	-
M	1 : 6	0,20	812	390	0,231	0,300	77,0
N		0,25	422	142	0,269	0,350	76,9
O		0,30	-	-	-	-	-

Al reducir aún más la cantidad de fase dispersa con respecto a la fase dispersante (1:4; 1:5 y 1:6) se obtuvo formación de micropartículas para las dos menores concentraciones de polímero. En los tratamientos en que se utilizaron 0,20 g y 0,25 g de Eudragit® S100 disueltos en 5 mL de acetona se observó la formación de microesferas de tamaños diversos entre 285 μm y 856 μm. Los rendimientos en todos los casos oscilaron entre 76,9% y 89,7%.

Se puede apreciar que cuando se utilizó una relación de fases oleosa:acuosa 2:1 no se obtuvo la formación de esferas, posiblemente debido a que la baja proporción de fase oleosa aumentó la probabilidad de coalescencia de gotas de la fase dispersa y favoreció la formación de un aglomerado de tamaño considerable (Eccleston, 2002).

El comportamiento más adecuado se obtuvo con el tratamiento codificado como G, con el cual se obtuvieron microesferas con un tamaño promedio de 285 micrómetros y un rendimiento del 89,7%; por esto dicho tratamiento fue seleccionado como el punto cero para el diseño factorial multinivel.

Ajuste de condiciones del proceso de formación de micropartículas: utilizando la relación de fases y concentración de tensioactivo seleccionadas, se evaluaron las variables concentración de polímero y de núcleo, empleando el sistema de agitación mediante un agitador vertical rotatorio de brazos. Para tal fin se utilizó un diseño factorial multinivel con dos variables y tres niveles por variable. La codificación de los tratamientos se presenta en la Tabla 9.

Con todos los tratamientos y repeticiones de los mismos se obtuvo la formación de partículas de tamaño y forma variable. Por su parte, con los tratamientos A, B y C, en los que se utilizó la menor concentración de núcleo, se obtuvieron partículas de formas esféricas,



Tabla 9. Tratamientos del diseño factorial multi-nivel para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

Núcleo (g)	Polímero (g/5 mL)		
	0,150	0,200	0,250
0,050	A	B	C
0,075	D	E	F
0,100	G	H	I

ovaladas y similares a una gota. La mayoría presentó una superficie lisa y con algunos poros, como se puede observar en la Figura 18.

La morfología de las partículas cambió al aumentar la concentración de polímero al nivel más alto (+1), ya que se obtuvieron agregados de forma irregular y superficie rugosa. Para los tratamientos en los que se empleó el nivel intermedio de concentración de núcleo (nivel 0) la morfología de las partículas cambió a medida que aumentó la concentración de polímero evaluada. Las partículas obtenidas con la menor concentración de polímero (tratamiento D) fueron de forma irregular y superficie rugosa. Con el nivel intermedio de polímero (tratamiento E) se produjeron partículas con forma más regular (alargada, ovoide, forma de gota o algunas esféricas). Por último, con la mayor concentración de polímero (tratamiento F), todas las partículas obtenidas fueron esféricas y con irregularidades en la superficie (Villamizar *et al.*, 2010).

Para los tratamientos en los que se empleó la mayor concentración de núcleo (G, H e I), en todos los casos se produjeron partículas de tamaño variable y superficie irregular (Figura 18).

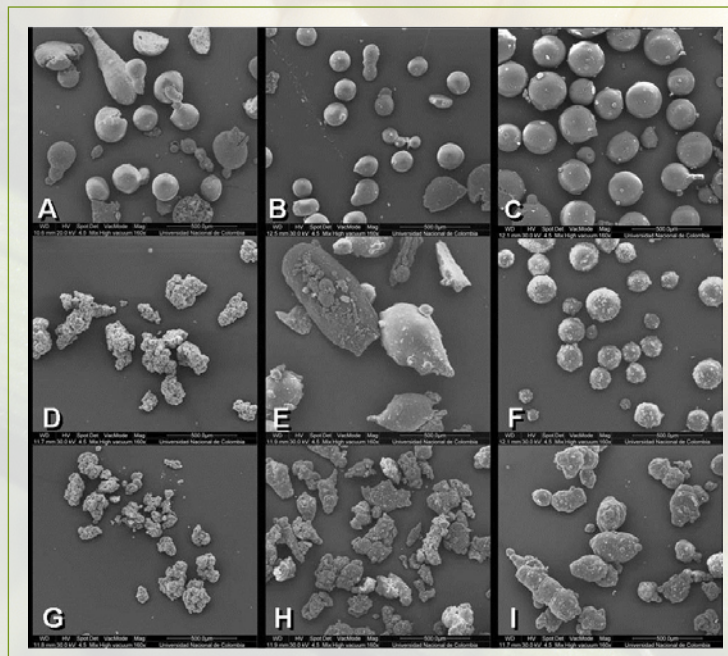


Figura 18. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las micropartículas de Eudragit® S100 elaboradas con el método de evaporación de solvente y agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

La morfología de las micropartículas se ve influenciada por las condiciones propias del proceso. La solubilidad del polímero en el solvente, su concentración y la volatilidad del solvente empleado, son probablemente los factores más influyentes (Raula *et al.*, 2004; Li, 2005).

En cuanto al tamaño, el diámetro medio de las partículas osciló entre 173 y 300 μm (Tabla 10). Los menores tamaños se obtuvieron con los tratamientos C, H e I, con diámetros de 173, 193 y 197 μm respectivamente.

Tabla 10. Tamaño medio de partícula de los tratamientos evaluados en el diseño factorial multinivel para la formación de micropartículas de Eudragit® S100, mediante el método de evaporación de solvente y utilizando agitación vertical rotatoria.

Tratamiento	Tamaño medio de partícula (μm)				SD
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	
A	273	298	264	278	18
B	331	276	291	300	28
C	188	170	163	173	13
D	288	248	254	263	21
E	210	291	267	256	42
F	210	224	220	218	8
G	291	287	298	292	5
H	194	179	205	193	13
I	209	199	181	197	14

En la Figura 19 se presenta la superficie de respuesta obtenida para la variable tamaño de partícula, donde se observa que la superficie del plano tiene una marcada pendiente negativa a medida que aumenta la concentración de polímero, sin observarse aparentemente un efecto significativo de la concentración de núcleo. La superficie de respuesta sugiere que con el tratamiento que involucra el mayor nivel de los dos factores se obtendría la mejor respuesta, correspondiente al menor diámetro de las partículas.

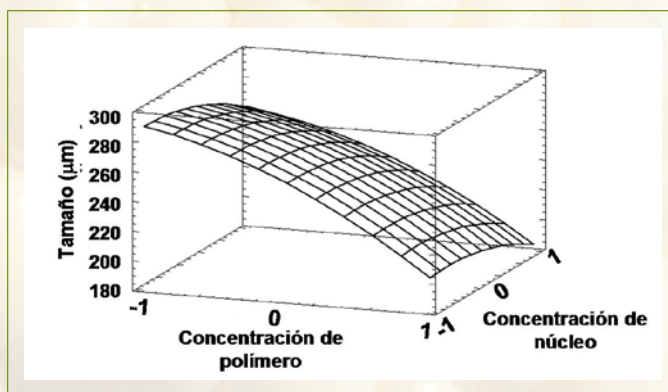


Figura 19. Superficie de respuesta de los diámetros medios de partícula en función de la concentración de polímero y de núcleo para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

En la Figura 20 se presenta el diagrama de Pareto, que muestra claramente la influencia de los factores evaluados y sus interacciones en la respuesta tamaño de partícula.

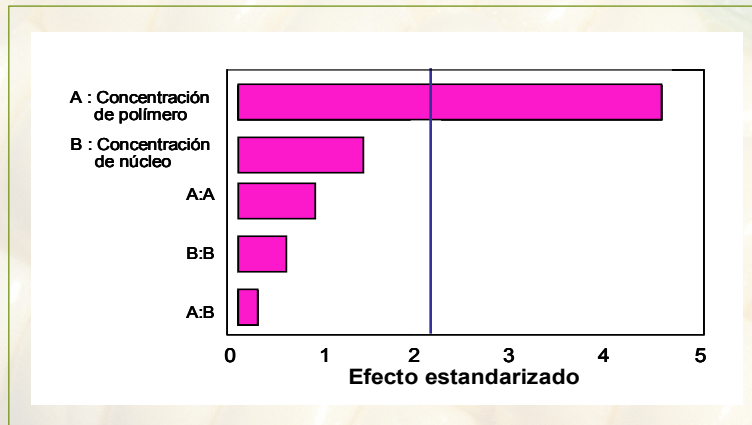


Figura 20. Diagrama de Pareto de la influencia de la concentración de polímero y de núcleo sobre los diámetros medios de partícula para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria.

Según el diagrama, el único factor que tuvo una influencia significativa en la respuesta fue el factor concentración de polímero (A), confirmando lo sugerido anteriormente con respecto a la influencia que tiene la viscosidad de la fase dispersa, tanto en el tamaño como en la morfología de las micropartículas (Raula *et al.*, 2004).

En cuanto al rendimiento, este osciló entre el 76,7% para el tratamiento A y el 89,6% obtenido con el tratamiento I (Tabla 11). Utilizando el sistema de agitación vertical, la mayoría de los tratamientos presentaron rendimientos adecuados, es decir, superiores al 80% (Amorim y Ferreira, 2001; Alavi *et al.*, 2002).

Tabla 11. Rendimiento de los tratamientos evaluados en el diseño factorial multinivel para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 mediante el método de evaporación de solvente y utilizando agitación vertical rotatoria.

Tratamiento	Rendimiento (%)			Promedio	SD
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
A	82,0	76,0	72,0	76,6	5,0
B	98,0	79,5	91,0	89,5	9,3
C	92,4	78,4	94,4	88,4	8,7
D	97,1	71,4	66,3	78,2	16,5
E	93,1	61,5	91,3	81,9	17,7
F	96,3	82,5	72,0	83,5	12,2
G	86,0	96,4	85,2	89,2	6,2
H	91,7	69,0	73,0	77,9	12,1
I	86,3	89,1	93,4	89,6	3,6

En la Figura 21 se observa la superficie de respuesta obtenida para la variable *Rendimiento*, donde se puede determinar un máximo en la respuesta cuando el factor concentración de polímero tiende al nivel +1 y el factor concentración de núcleo tiende al nivel -1. Sin embargo, cuando el polímero se utiliza a la mayor concentración se puede observar que la respuesta tiene un mínimo hacia el nivel 0 del factor concentración de núcleo y aumenta cuando dicho factor se incrementa al nivel +1, así como cuando se reduce al nivel -1.

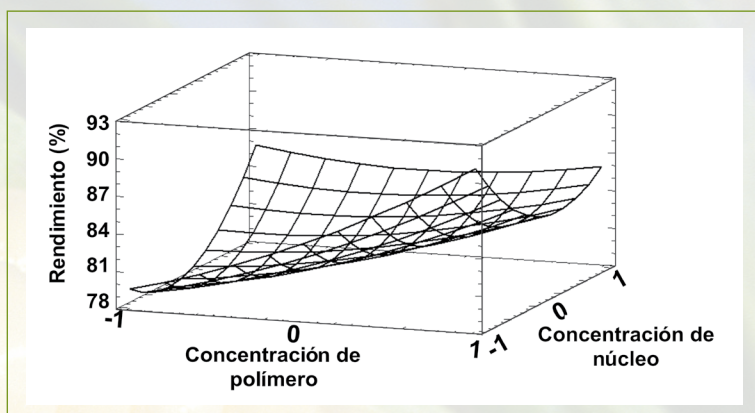


Figura 21. Superficie de respuesta de la variable *Rendimiento* en función de la concentración de polímero y de núcleo para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria (Villamizar *et al.*, 2010).

En el diagrama de Pareto para esta variable respuesta (Figura 22) se presenta la influencia de los factores sobre el rendimiento del proceso; se puede observar que ninguno de los factores de forma independiente o en interacción tuvo, desde el punto de vista estadístico, un efecto significativo (Villamizar *et al.*, 2010).

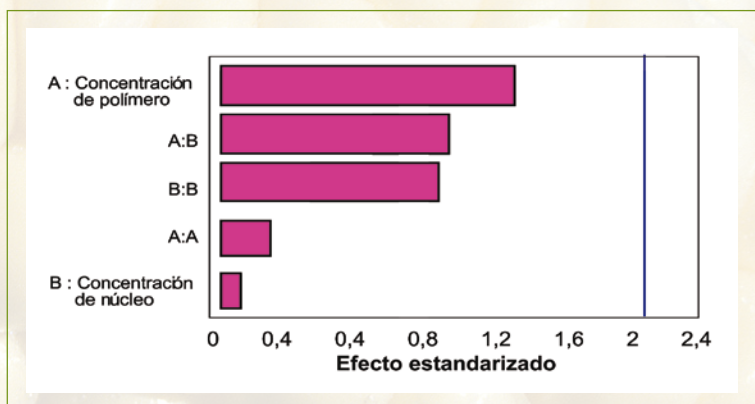


Figura 22. Diagrama de Pareto de la influencia de la concentración de polímero y de núcleo sobre el rendimiento, para la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria.

El programa Statgraphic 4.0 representó las interacciones y efectos de los factores y generó la superficie de respuesta que se observa en la Figura 23, en la cual se predice cómo se podría obtener la respuesta deseada expresada como deseabilidad teniendo en cuenta el efecto de la interacción de los factores.

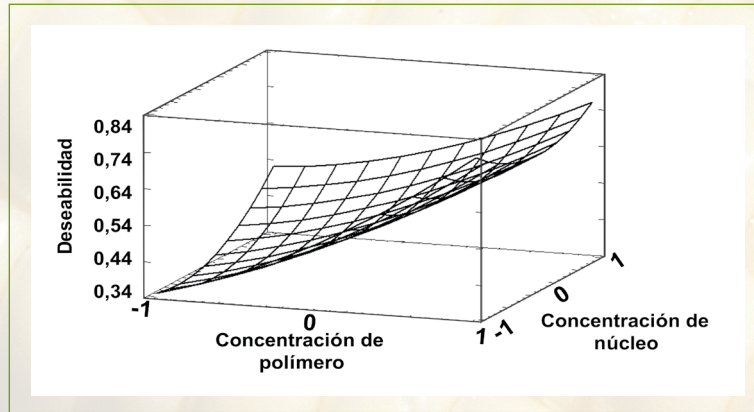


Figura 23. Superficie de respuesta para la deseabilidad de la respuesta durante la elaboración de micropartículas de Eudragit® S100 utilizando agitación vertical rotatoria.

Considerando que la deseabilidad óptima tiende hacia 1, se podría sugerir que para obtener el mayor rendimiento y el menor tamaño de partícula utilizando el método de evaporación de solvente con agitación vertical rotatoria la concentración de polímero debe tender hacia el nivel +1, independientemente de la concentración de núcleo utilizada.

El programa además estableció los valores óptimos para cada factor, que permitirían obtener la mejor respuesta para las dos variables (menor tamaño y mayor rendimiento). Los niveles óptimos según dicho modelo correspondieron al nivel +1 de concentración de polímero (0,200 g de polímero/5 mL de acetona) y al nivel -1 de concentración de núcleo (0,050 g de núcleo).

El punto óptimo correspondió al tratamiento C evaluado en el diseño factorial, y las respuestas obtenidas para este fueron un diámetro promedio de $173 \pm 13 \mu\text{m}$ y un rendimiento del $88,0 \pm 8,7\%$. El rendimiento no fue significativamente diferente del estimado en la predicción; no obstante, el diámetro de las partículas obtenido experimentalmente fue significativamente menor que el estimado por el modelo, razón por la que el tratamiento C fue seleccionado para llevar a cabo la microencapsulación de las partículas virales (Villamizar *et al.*, 2010).

Microencapsulación del virus

Tamaño de partícula: el tamaño medio de las microcápsulas fue de $198 \pm 62 \mu\text{m}$. Este valor no fue significativamente diferente del valor teórico y práctico determinado previamente para este tratamiento utilizando un núcleo trazador, lo cual sugiere repetibilidad en las características de las partículas elaboradas usando este procedimiento (Villamizar *et al.*, 2010).

Morfología de las microcápsulas – Microscopía electrónica de barrido: las microcápsulas obtenidas en los tres lotes fueron de forma esférica y superficie lisa, con algunas irregularidades y escasos poros. En la Figura 24 se presenta la microfotografía de una micropartícula donde se pueden observar dichas características (Villamizar *et al.*, 2010).

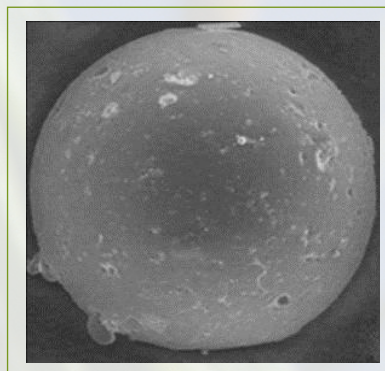


Figura 24. Morfología de las micropartículas obtenidas al encapsular el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003 con Eudragit® S100.

Composición de la superficie: la técnica de espectroscopía fotoelectrónica de rayos X permite determinar cualitativa y cuantitativamente todos los componentes superficiales de las partículas en una profundidad de 5 a 10 nm, a excepción del hidrógeno y el helio (Ramos *et al.*, 2007). Así, el espectro obtenido mostró la misma composición cualitativa en todas las muestras, observando que la superficie está compuesta principalmente por carbono y oxígeno. No se detectó señal para nitrógeno, lo que indicaría que las partículas virales se encuentran distribuidas en el interior de las micropartículas, ya que si estuvieran superficialmente, su composición proteica habría generado dicha señal (Villamizar *et al.*, 2010).

Eficiencia de microencapsulación y concentración de las micropartículas: se obtuvo para los tres lotes una concentración promedio de $2,62 \times 10^9$ CI/g, que presentó una desviación estándar (DS) del 19,42%. Teniendo en cuenta que la concentración del principio activo (virus liofilizado) era de $2,94 \times 10^{10}$ CI/g y que para cada lote se emplearon 0,050 g del mismo y 0,250 g del polímero (0,30 g de sólidos totales), la concentración teórica de las microcápsulas obtenidas debía ser de $4,9 \times 10^9$ CI/g. Con este valor teórico y la concentración experimental de cada lote de micropartículas se calcularon los porcentajes de eficiencia que se presentan en la Tabla 12 (Villamizar *et al.*, 2010).

Tabla 12. Eficiencia del proceso de microencapsulación (Villamizar *et al.*, 2010).

Lote	Concentración experimental (CI/g)	Eficiencia de microencapsulación (%)
1	$2,48 \times 10^9$	50,69
2	$3,18 \times 10^9$	64,90
3	$2,19 \times 10^9$	44,69
Promedio	$2,62 \times 10^9$	53,43
DS	$5,08 \times 10^8$	10,37

La eficiencia del proceso de microencapsulación fue del $53 \pm 10\%$. El proceso mostró una baja eficiencia, ya que se produjo una pérdida significativa del principio activo que osciló entre el 25,31% y el 35,10%. La eficiencia del proceso de encapsulación depende de



muchos factores como: los materiales utilizados, la solubilidad de los componentes y su coeficiente de reparto, entre otros (Kim *et al.*, 2002).

Contenido residual de solventes en las microcápsulas: el pico más alto del cromatograma, correspondiente al compuesto más abundante, presentó un tiempo de retención de 6,48 minutos y fue identificado principalmente como n-Hexano, solvente empleado para el lavado de las micropartículas. Este resultado indica que las partículas obtenidas presentan cierto contenido residual de este solvente, lo que podría sugerir que el tiempo de secado no fue suficiente para su completa eliminación, requiriéndose un mayor tiempo o la utilización de un proceso adicional como la extracción con vacío, que asegure la eliminación total del hexano de las microcápsulas (Villamizar *et al.*, 2010).

La mayoría de técnicas de microencapsulación emplean solventes orgánicos para disolver polímeros lipofílicos, razón por la cual es común que las micropartículas presenten residuos de los solventes empleados (Bitz y Doelker, 1996).

En ningún caso se detectó acetona, solvente utilizado para disolver el polímero, lo que indica que el tiempo de proceso fue suficiente para permitir la completa evaporación de dicho solvente.

Efecto de la microencapsulación del virus frente a la radiación ultravioleta

La eficacia del virus microencapsulado sin irradiar fue del 67%, mientras que la del virus sin microencapsular fue del 81,8% (Tabla 13). El análisis de varianza detectó diferencias estadísticas entre los dos tratamientos ($p < 0,05$), lo que sugiere que la microencapsulación de los cuerpos de inclusión afectó la eficacia del virus. Esto puede deberse a que la velocidad de liberación de las partículas virales se ve afectada por el polímero que lo recubre, en este caso el Eudragit® S100, pudiendo retrasar el proceso de infección viral. Por ejemplo, Lee *et al.* (2000) determinaron que para la liberación total del activo a partir de microesferas de Eudragit® S100 se requerían aproximadamente 10 horas.

Tabla 13. Porcentajes promedio de eficacia, actividad original remanente (AOR) e inactivación del virus microencapsulado y sin microencapsular, expuesto a la radiación ultravioleta tipo A y B durante 6 horas.

Tratamientos	Exposición UV (min)	Eficacia (%)	AOR (%)	Inactivación (%)
Virus microencapsulado	0	65 ± 7	---	---
	15	70 ± 4	100	0,0
	30	63 ± 4	96	3,6
	45	61 ± 8	93	7,1
	60	49 ± 8	75	25,0
	180	49 ± 11	75	25,0
	360	26 ± 4	39,3	60,7
Virus puro (sin microencapsular)	0	81 ± 8	---	---
	15	72 ± 7	88,6	11,4
	30	54 ± 8	65,7	34,3
	45	12 ± 4	14,3	85,7
	60	4 ± 5	4,8	95,2
	180	1 ± 1	1,0	99,0
	360	1 ± 1	1,0	99,0

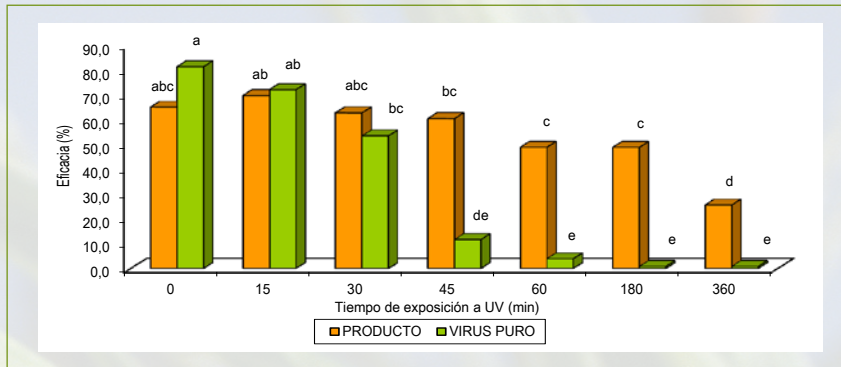


Figura 25. Eficacia de las microcápsulas del aislamiento NPV003 irradiadas con luz ultravioleta tipo A y B. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (95%)

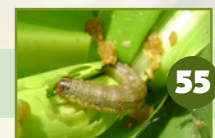
En la Tabla 13 y en la Figura 25 se presentan los resultados de actividad original remanente (AOR) obtenidos para cada tiempo de exposición evaluado. El virus sin formular mostró una actividad original remanente inferior al 5% después de 60 minutos de exposición, entretanto que el virus microencapsulado conservó una actividad del 75% después de los mismos 60 minutos de exposición a la radiación, la cual se redujo al 40% después de 6 horas.

La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas entre la actividad original remanente del virus microencapsulado y sin microencapsular después de 15 y 30 minutos de irradiación. Sin embargo, la eficacia del virus microencapsulado a partir de los 60 minutos y hasta las 6 horas de exposición a la radiación fue estadísticamente superior ($p < 0,05$) a la obtenida para el virus sin formular, lo que sugiere que el virus microencapsulado fue significativamente más fotoestable que el virus puro.

El virus puro fue inactivado a partir de los 30 minutos de exposición con respecto al virus sin irradiar, alcanzando una inactivación superior al 95% desde los 60 minutos. El virus microencapsulado perdió su actividad con respecto al virus sin irradiar a las 6 horas de exposición, con un 60% de inactivación, confirmando la protección brindada por el recubrimiento de las partículas con Eudragit® S100. Este resultado es muy interesante, considerando que el virus microencapsulado presentó una inactivación mucho menor que la del virus sin formular.

La fotoestabilidad ofrecida por la microencapsulación depende del polímero utilizado para la formación de la pared (Barbosa *et al.*, 2005). En el presente estudio se obtuvieron resultados promisorios con el Eudragit® S100, aunque en el estudio de Ignoffo y Batzer (1971) se demostró que la microencapsulación del nucleopoliedrovirus de *Heliothis zea* HzSNPV con etilcelulosa no fotoestabilizó el virus durante 4 horas de exposición a la radiación ultravioleta artificial.

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la microencapsulación tuvo un efecto fotoestabilizador de las partículas virales, si bien algunas alcanzaron a ser afectadas por la radiación UV, posiblemente aquellas que estaban ubicadas hacia la parte externa de las micropartículas. Este comportamiento lo sugirieron Barbosa *et al.* (2005), quienes evaluaron la estabilidad frente a la luz de microcápsulas que contenían un



carotenoide como principio activo. Estos autores encontraron dos cinéticas de degradación del carotenoide: una rápida, relacionada con la fotodegradación de la sustancia ubicada en la superficie de las microcápsulas, y una degradación lenta, que se atribuyó a la sustancia encapsulada en el interior de las partículas.

La fotoprotección ofrecida por la micropartícula podría ser incrementada mediante la inclusión de filtros ultravioleta, antioxidantes o de pigmentos que en diversos trabajos han demostrado su efectividad y podrían ser microencapsulados conjuntamente con el virus.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló un proceso de microencapsulación de las partículas virales con Eudragit® S100, que permitió fotoestabilizar el virus frente a los efectos deletéreos de la radiación ultravioleta. Sin embargo, el proceso debe ser optimizado para reducir el tamaño de las partículas y evitar la utilización de solventes orgánicos costosos y con problemas de toxicidad.

Bibliografía

- ALAVI, A.; SQUILLANTE, E.; MEHTA, K.** (2002). Formulation of enterosoluble microparticles for an acid labile protein. *Journal of Pharmaceutics and Pharmaceutical Science*. 5: 234-244.
- AMORIM, M.; FERREIRA, J.** (2001). Microparticles for delivering therapeutic peptides and proteins to the lumen of the small intestine. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 52: 39-44.
- ARANBERRI, I.; BINKS, B.; CLINT, J.; FLETCHER, P.** (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 7(3): 211-231.
- ASANO, S.** (2005). Ultraviolet protection of a granulovirus product using iron oxide. *Applied Entomology and Zoology*, 40 (2): 359-354.
- BARBOSA, M.; BORSARELLI, C.; MERCADANTE, A.** (2005). Light stability of spray-dried bixin encapsulated with different edible polysaccharide preparation. *Food Research International*. 38: 989-994
- BITZ, C.; DOELKER, E.** (1996). Influence of the preparation method on residual solvents in biodegradable microspheres. *International Journal of Pharmaceutics* 131: 171-181.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ- FERBER, M.; WILLIAMS, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. Navarra, España. 518 p.
- CHIAPPETTA, D.** (2006). Microencapsulación de medicamentos. URL: <http://www.fyb.uba.ar/farmacotecnia%20I/Microencapsulacion.htm>. (Consulta: agosto de 2009).
- ECCLESTON, G.** (2002). Emulsions and Microemulsions. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Marcel Dekker Inc. New York. Vol. 9. p. 1066-1085.
- FARRAR, R.; RIDGEWAY, R.** (2000). Laboratory evaluation of selected spray adjuvant as ultraviolet light protectants for the nuclear polyhedrosis virus of the celery looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Entomological Science* 35: 239-250.

- FLORENCE, A.; AITWOOD, D.** (1998). *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Mac Millan Press LTD. Third edition. Easton. p. 357-358.
- HIRECH, K.; PAYAN, S.; CARNELLE, G.; BRUJES, L.; LEGRAND, J.** (2003). Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerization. *Powder Technology*. 130: 324-330.
- IGNOFFO, C.; BATZER, O.** (1971). Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *Journal of Economic Entomology*. 64(4): 850-853.
- IGNOFFO, C.; GARCÍA, C.; SAATHOFF, S.** (1997). Sunlight stability and rain-fatness of formulations of Baculovirus *Heliothis*. *Environmental Entomology* 26 (6): 1470-1474.
- JAIN, D.; PANDA, A.; MAJUMDAR, D.** (2005). Eudragit® S100 entrapped insulin microspheres for oral delivery. *AAPS PharmSciTech*. 6(1): 100-107.
- KIM, B.; HWANG, S.; PARK, H.** (2002). Preparation and characterization of drug-loaded polymethacrylate microspheres by an emulsion solvent evaporation method. *Journal of Microencapsulation*. 19: 811-822.
- KURTZ, J.; LEE, T.; PARSONS, A.** (1980). The action of alcohols on rotavirus, astrovirus and enterovirus. *Journal of Hospital Infection* 1(4):321-325.
- LEE, J.; PARK, T.; CHHOI, H.** (2000). Effect of formulation and processing variables on the characteristics of microspheres for water-soluble drugs prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion. *International Journal of Pharmaceutics*. 196: 75-86.
- LI, D.** (2005). Microencapsulation of proteins with Eudragit S100 polymer. Thesis of Master of Applied Science Engineering. University of Adelaide.
- MONTAÑO, H.; MATA, A.** (1996). Estructura antigénica y mecanismos de infección del virus de la rabia. *Ciencia Veterinaria*. 7: 68-91.
- RAMOS, E.; SALLES, C.; BITTENCOURT, E.; ÁGUILA, Z.** (2007). Combinación de análisis de XPS y análisis goniométrico para el estudio de la remoción del aceite superficial en aluminio utilizando plasma frío. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*. 41: 108-119.
- RAULA, J.; EERIKAINEN, H.; KAUPINEN, E.** (2004). Influence of the solvent composition on the aerosol synthesis of pharmaceutical polymer nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 284: 13-21.
- ROWE, R.; SHESKRY, P.; OWEN, S.** (2006). Handbook of pharmaceutical excipients. 5th edition, Pharmaceutical Press. Gran Bretaña. p. 554.
- SHAPIRO, M.** (1989). Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economical Entomology*. 82: (2) 548-550.
- TRAPANI, A.; LAQUINTANA, V.; DENORA, N.; LOPEDOTA, A.; CUTIGNELLI, A.; FRANCO, M.; TRAPANI, G.; LISO, G.** (2007). Eudragit RS100 microparticles containing 2-hidroxypropyl- β -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 30: 64-74.
- TUDURI, L.; DESAUZIERS, V.; FANLO, J.** (2002). Dynamic versus static sampling for the quantitative analysis of volatile organic compounds in air with polydimethylsiloxane-Carboxen solid-phase microextraction fibers. *Journal of Chromatography A*. 963: (1-2) 49-56.
- VAUGHN, J.; CHEN, Y.; THOMAS, M.** (1986). **Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine.** *Applied Environmental Microbiology*. 51: 391-394.
- VILLAMIZAR, L.; BARRERA, G.; COTES, A.; MARTÍNEZ, F.** (2010). Eudragit® S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release. *Journal of Microencapsulation*, 27(4): 314-324.
- ZAR, J.** (1999). *Biostatistical Analysis*. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. p. 523.





CAPÍTULO 4.

Caracterización y estabilidad en condiciones de almacenamiento de un bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda*

ADRIANA SANTOS cM.Sc., LIZ URIBE B.Sc., LIZETH TABIMA B.Sc.,
JULIANA GÓMEZ cPh.D., LAURA VILLAMIZAR Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Una de las alternativas más promisorias para disminuir el impacto ambiental causado por el alto uso de productos químicos para el control de plagas, se centra en el uso de agentes de control biológico (ACB) (Boyetchko y Hynes, 2006). Dentro de estos agentes se destacan los baculovirus, los cuales dentro de una estrategia de manejo integrado de plagas y de cultivo son una solución duradera y efectiva; además, son amigables con el medio ambiente y son seguros para el ser humano.

Sin embargo, uno de los factores más limitantes para el uso y la aceptación de formulaciones a base de agentes de control biológico es su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento, ya que de esta depende la viabilidad y la actividad biocontroladora del principio activo durante la distribución del producto en el mercado (Boyetchko y Hynes, 2006). Dicha característica se ve influenciada directamente por factores propios del proceso de manufactura del bioplaguicida, como es el medio de producción, el proceso de secado y el proceso de formulación (Abadías *et al.*, 2001), así como por factores externos o ambientales, como es la temperatura y la humedad relativa de almacenamiento, variables que en condiciones adversas afectan negativamente la calidad del producto.

En el caso de los baculovirus, la estabilidad en condiciones de almacenamiento es influenciada por el sistema de producción del agente viral, ya que esta normalmente se realiza en el hospedero, lo que genera contaminación microbiana en la suspensión viral, proveniente de la microflora normal de los cadáveres de los insectos (Lasa *et al.*, 2008). La



contaminación puede afectar la actividad insecticida, e incluso representar riesgos para la salud humana si se presentan patógenos humanos en el producto (Grzywacz *et al.*, 1997).

A nivel mundial existen productos comerciales a base de nucleopoliedrovirus de *Spodoptera* sp. como SPOD-X, el cual contiene el virus de *Spodoptera exigua* y es recomendado para cultivos de hortalizas y flores, y Spodopterin que contiene el NPV de *Spodoptera littoralis* y se utiliza para proteger cultivos de algodón, maíz y tomate, aunque ninguno es recomendado para el control de *S. frugiperda* (EPA, 2010). Adicionalmente, en Colombia no existen productos registrados comercialmente a base de nucleopoliedrovirus (ICA, 2011).

Teniendo en cuenta que las características microbiológicas y biológicas de un bioplaguicida pueden afectarse de forma adversa durante el almacenamiento y considerando el alto potencial tecnológico que tiene la formulación a base del nucleopoliedrovirus (NPV003) de *Spodoptera frugiperda* desarrollada por Corpoica, el objetivo del siguiente trabajo fue caracterizar el bioplaguicida y estudiar su estabilidad durante 15 meses de almacenamiento a tres temperaturas diferentes para determinar la vida útil y las condiciones óptimas de manejo del producto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una vez desarrollado el producto microencapsulado a base del nucleopoliedrovirus NPV003 de *S. frugiperda* fue necesario realizar la caracterización fisicoquímica, biológica y microbiológica del bioplaguicida para establecer los límites de aceptación del producto. Esta caracterización se realizó con dos lotes de producto, con los siguientes parámetros de evaluación:

Concentración viral

Para la determinación de la concentración viral se tomó 0,1 g de producto, que se adicionó a 9,9 mL de tampón fosfato (pH 7), siendo esta la dilución 10^{-2} . A partir de esta dilución se preparó la dilución 10^{-3} y con dicha muestra se realizó un recuento de cuerpos de inclusión empleando una cámara de Neubauer. Con el recuento obtenido y la dilución empleada se calculó la concentración del producto expresada como cuerpos de inclusión por gramo de producto (CI/g). La determinación se realizó por triplicado para cada lote.

Porcentaje de humedad

Se determinó por la técnica de pérdida de peso por secado utilizando una balanza halógena de humedad OHAUS MB 45, para lo cual se colocaron 0,5 g de producto en el plato de la balanza y se secaron a 110 °C hasta peso constante. La determinación se realizó por triplicado para cada lote.

Determinación del pH

Se tomaron muestras de 0,1 g de cada lote de producto y se suspendieron en 10 mL de agua destilada desionizada estéril. La lectura del pH se realizó empleando un potenciómetro marca Hanna previamente calibrado. La determinación se realizó por triplicado para cada lote.

Determinación del tamaño de partícula

El tamaño medio de las partículas se determinó mediante microscopía óptica, midiendo el diámetro de 100 de estas en un microscopio NIKON con un micrómetro adaptado al ocular del objetivo 40X. Las imágenes fueron procesadas empleando un software de captura de imágenes NIS – Elements BR250 1991-200791.

Contenido de contaminantes

Se tomaron muestras de 0,1 g del producto de cada lote y se adicionaron a 9,9 mL de Tween 80 al 0,1% (v/v), siendo esta la dilución 10^{-2} . A partir de esta dilución se prepararon las diluciones seriadas 10^{-3} y 10^{-4} . Posteriormente se realizó una siembra en superficie en cajas de Petri con medio Agar PDA + Tritón para la evaluación de hongos en medio Agar Extracto de Levadura (YM) para la cuantificación de levaduras y en medio Agar Nutritivo para el recuento de bacterias contaminantes. Cada dilución se sembró por triplicado. El resultado se expresó como el recuento de unidades formadoras de colonia de contaminantes por gramo (UFC/g).

Actividad insecticida

Cada lote se reconstituyó a una concentración de 4×10^7 Cl/mL. Dichas suspensiones se mezclaron en una proporción 50:50 con una solución de sacarosa al 2% y azul de alimentos al 1% para obtener una concentración viral final de 2×10^7 Cl/mL. A partir de cada suspensión se dispensaron gotas de 3 μ l en forma circular en un disco plástico de color blanco, en cuyo interior se ubicaron 50 larvas neonatas de *S. frugiperda* sometidas a doce horas de ayuno. Por medio de un estereoscopio se seleccionaron 45 larvas que hubiesen ingerido la suspensión viral, lo cual se evidenció por la coloración azul en el cuerpo de la larva. Cada larva se ubicó individualmente en recipientes plásticos de 0,5 onzas que contenían un cubo de dieta artificial.

Además de la evaluación de los dos lotes de producto, se contó con un testigo absoluto que consistió en las larvas neonatas de *S. frugiperda* sometidas al ayuno. Siete días después de la inoculación se determinó la eficacia mediante la fórmula de Schneider – Orelli. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones y con 15 unidades experimentales por tratamiento.

Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento

Para determinar la vida útil del bioplaguicida bajo condiciones de almacenamiento se empaquetaron muestras de 0,5 gramos de producto en bolsas metalizadas selladas al vacío. Como tratamiento control se utilizó virus liofilizado sin formular. Treinta muestras de cada tratamiento se almacenaron durante 15 meses a 8 ± 2 °C, 18 ± 2 °C y 28 ± 2 °C.

La actividad insecticida y el contenido de contaminantes se determinaron durante los tres primeros meses del estudio mensualmente, y a partir del tercer mes de almacenamiento la evaluación se realizó cada seis meses.

El diseño del estudio de estabilidad fue completamente al azar con medidas repetitivas en el tiempo y tres repeticiones por tratamiento.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda*

El bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* aislamiento NPV003 se caracterizó físicoquímica, microbiológica y biológicamente. Para esto, se elaboraron dos lotes de producto y se determinó el pH, el porcentaje de humedad, el tamaño de partícula, la concentración viral, el contenido de contaminantes y la actividad insecticida.

Los resultados promedio de cada característica para cada lote de producción se presentan en la Tabla 14.

La concentración de partículas virales en el formulado es de gran importancia, ya que de este parámetro depende la dosis de aplicación. La concentración esperada para el prototipo de bioinsecticida objeto del presente trabajo era de mínimo $1,0 \times 10^9$ CI/g, y el valor promedio obtenido fue de $1,1 \times 10^9$ CI/g, cumpliendo con el límite establecido y mostrando un valor que se encuentra dentro del mismo orden de magnitud que el producto registrado en Europa Spod – X (Certis, 2010).

Considerando los resultados de concentración de los dos lotes, se propone como parámetro de aceptación para esta característica un valor superior a 1×10^9 CI/g de producto.

Con relación al porcentaje de humedad se obtuvieron valores menores al 2% (Tabla 14) en los dos lotes de producto. Este resultado se encuentra dentro del rango de aceptación que se utiliza en el control de calidad del producto registrado Baculovirus Corpoica, para el cual se acepta una humedad menor o igual al 5%. Este valor de humedad en el producto de NPV003 es adecuada, puesto que una cantidad mínima de agua asegura la estabilidad de las partículas virales durante el almacenamiento (Santos, 2008; Quiroga, 2009).

Tabla 14. Características físicoquímicas, microbiológicas y biológicas de dos lotes del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus NPV003.

CARACTERÍSTICAS	LOTE 1	SD	LOTE 2	SD	Promedio de los lotes
Concentración viral (CI/g)	$9,42 \times 10^8$	0,00	$1,25 \times 10^9$	0,07	$1,09 \times 10^9$
Porcentaje de humedad (%)	1,86	0,15	1,68	0,02	1,84
pH	7,07	0,10	7,22	0,01	7,14
Partículas con tamaño entre 1 y 10 μm (%)	99,34	—	96,45	—	97,89
Contenido de bacterias contaminantes (UFC/g)	$<10^4$	0,00	$3,25 \times 10^5$	0,07	$1,67 \times 10^5$
Contenido de hongos contaminantes (UFC/g)	$4,33 \times 10^4$	0,27	$3,67 \times 10^3$	0,12	$2,34 \times 10^4$
Contenido de levaduras contaminantes (UFC/g)	$2,00 \times 10^4$	2,45	$3,00 \times 10^3$	0,15	$1,15 \times 10^4$
Eficacia (%)	91,89	8,10	97,67	4,02	94,78

El bajo porcentaje de humedad obtenido para el producto de NPV003 puede disminuir los posibles cambios químicos en la formulación evitando interacciones que afecten el bioinsumo, como lo concluyó Santos (2008), quien obtuvo valores de humedad del $0,52 \pm 0,11\%$ para un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhoGV) y *Trichoderma koningiopsis*. Esta misma afirmación fue realizada por Quiroga *et al.* (2011), quienes obtuvieron una humedad del $4,00 \pm 0,11\%$ en un bioinsecticida a base de PhoGV, valores que favorecen la estabilidad de los productos.

Volúmenes de humedad altos en el producto pueden favorecer el desarrollo de contaminantes que deterioran la calidad del mismo, como lo determinaron Tamez *et al.* (2006), quienes evaluaron dos prototipos de bioinsecticidas a base del nucleopoliedrovirus de *Anagrapha falcifera* observando que humedades superiores al 10% afectaron la estabilidad del ingrediente activo durante el almacenamiento.

Teniendo en cuenta que los cuerpos de inclusión de los baculovirus se disuelven en valores de pH alcalinos (pH entre 9,5 y 11,5) (Szewczyk *et al.*, 2006), se recomienda que las formulaciones a base de estos virus tengan un pH cercano a la neutralidad para asegurar la estabilidad de la estructura cristalina que protege al virión (Caballero *et al.*, 2001). En el presente trabajo, los dos lotes del prototipo de bioinsecticida presentaron valores de pH entre 6,9 y 7,2 (Tabla 14), que son adecuados para asegurar la integridad del virus durante el almacenamiento. Caballero *et al.* (2001) establecieron que para bioinsecticidas a base de baculovirus, un pH superior a 9,0 y menor a 4,0 puede afectar drásticamente la integridad de los cuerpos de inclusión virales y por consiguiente disminuir su eficacia y actividad biocontroladora, es decir, que valores de pH neutros como los obtenidos en este trabajo son más recomendables que aquellos que se acercan a los límites de aceptación.

Los dos lotes de producto presentaron un tamaño de partícula que osciló entre 5,0-70,0 μm , encontrándose entre un 88% y un 90% de las partículas con un diámetro entre 10 y 40 μm . Teniendo en cuenta que la abertura bucal de una larva neonata de *S. frugiperda* es de aproximadamente 70 μm , el tamaño de partícula obtenido para el formulado es adecuado para permitir su consumo por el insecto y con base en este resultado se estableció como límite de aceptación para esta característica, que más del 80% de las partículas debe tener un tamaño entre 10 y 40 μm . La concentración de contaminantes en un bioinsecticida es de gran importancia debido a que un alto contenido de microorganismos afecta la viabilidad o integridad del principio activo y su actividad biológica, además de representar un riesgo para la salud humana y para el medio ambiente (Quiroga *et al.*, 2009). El contenido de contaminantes bacterianos del bioinsecticida evaluado osciló entre 10^3 y 10^5 UFC/g de producto para los dos lotes y el contenido de contaminantes fúngicos, incluyendo mohos y levaduras, mostró valores entre 10^3 y 10^4 UFC/g de producto (Tabla 14).

Al comparar los resultados con el contenido de contaminantes permitido para productos a base de virus en Estados Unidos para los que se acepta hasta 10^8 UFC/g (Lasa *et al.*, 2008) y para los productos elaborados en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, como Tricotec para el cual el límite máximo es 5×10^6 UFC/g, se considera que el bioplaguicida a base de NPV003 se encuentra dentro de límites aceptables. Cabe resaltar que si se presentan altos niveles de contaminantes en el producto, estos pueden ser indicativos de una alta carga microbiana presente en el inóculo utilizado como principio activo (larvas infectadas). Para esto se recomienda reducir el número de contaminantes mediante la utilización de insectos sanos y libres de microorganismos antes de ser infectados con el virus, trabajadores con una



higiene adecuada y la recolección de larvas antes de la lisis celular para evitar la contaminación por microorganismos saprófitos (Caballero *et al.*, 2001).

En cuanto a la evaluación de la actividad insecticida del bioplaguicida, los resultados de los dos lotes de producto oscilaron entre el 90% y el 95% de eficacia (Tabla 14), valores que no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$) de la eficacia obtenida con el virus sin formular (95,12%) cuando se utilizaron a una concentración de 2×10^7 CI/mL, correspondiente al doble de la CL_{90} de este aislamiento viral. Este resultado sugiere que la formulación no afectó la actividad insecticida del virus. Teniendo en cuenta que como parámetro de control de calidad para diversos bioplaguicidas se establece una eficacia en condiciones de laboratorio del 80% y que el producto Baculovirus Corpoica registrado ante el ICA tiene como límite inferior de aceptación dicho valor, se estableció como límite mínimo una eficacia en condiciones de laboratorio del 80%

Basado en los resultados obtenidos para cada parámetro, en este estudio se propusieron rangos o límites de aceptación para el prototipo de bioplaguicida a base de SfNPV aislamiento NPV003, los cuales serán utilizados como referencia para el control de calidad del bioplaguicida (Tabla 15).

Tabla 15. Límites de aceptación establecidos para las características del producto

CARACTERÍSTICAS	LÍMITES
Concentración Viral (CI/g)	$> 1 \times 10^9$
Humedad (%)	$< 5\%$
pH	6 – 8
Tamaño de partícula	70% ($< 10 \mu\text{m}$)
Contenido de bacterias contaminantes (UFC/g)	$< 10^6$
Contenido de hongos contaminantes (UFC/g)	$< 10^6$
Contenido de levaduras contaminantes (UFC/g)	$< 10^6$
Eficacia en laboratorio (%) (Dosis 2×10^7 CI/mL)	$> 80\%$

Estabilidad bajo condiciones de almacenamiento

Actividad insecticida

El bioplaguicida presentó una eficacia inicial del 91,89% y el virus puro liofilizado utilizado como control positivo inicialmente tuvo una eficacia del 95,12% (Figura 26). El comportamiento de la eficacia durante el tiempo de almacenamiento a 8 °C, 18 °C y 28 °C se presenta en las figuras 26a, 26b y 26c respectivamente, en las cuales se graficó la variable respuesta versus el tiempo en meses y con una línea violeta se señaló el límite mínimo de aceptación previamente establecido para la misma, correspondiente al 80%.

Se observó que cuando el bioplaguicida fue almacenado a 8 °C, 18 °C y 28 °C, la actividad insecticida se mantuvo por encima del límite de aceptación del 80% hasta el mes 15 del estudio. Esto en contraste con el virus liofilizado sin formular, el cual almacenado a

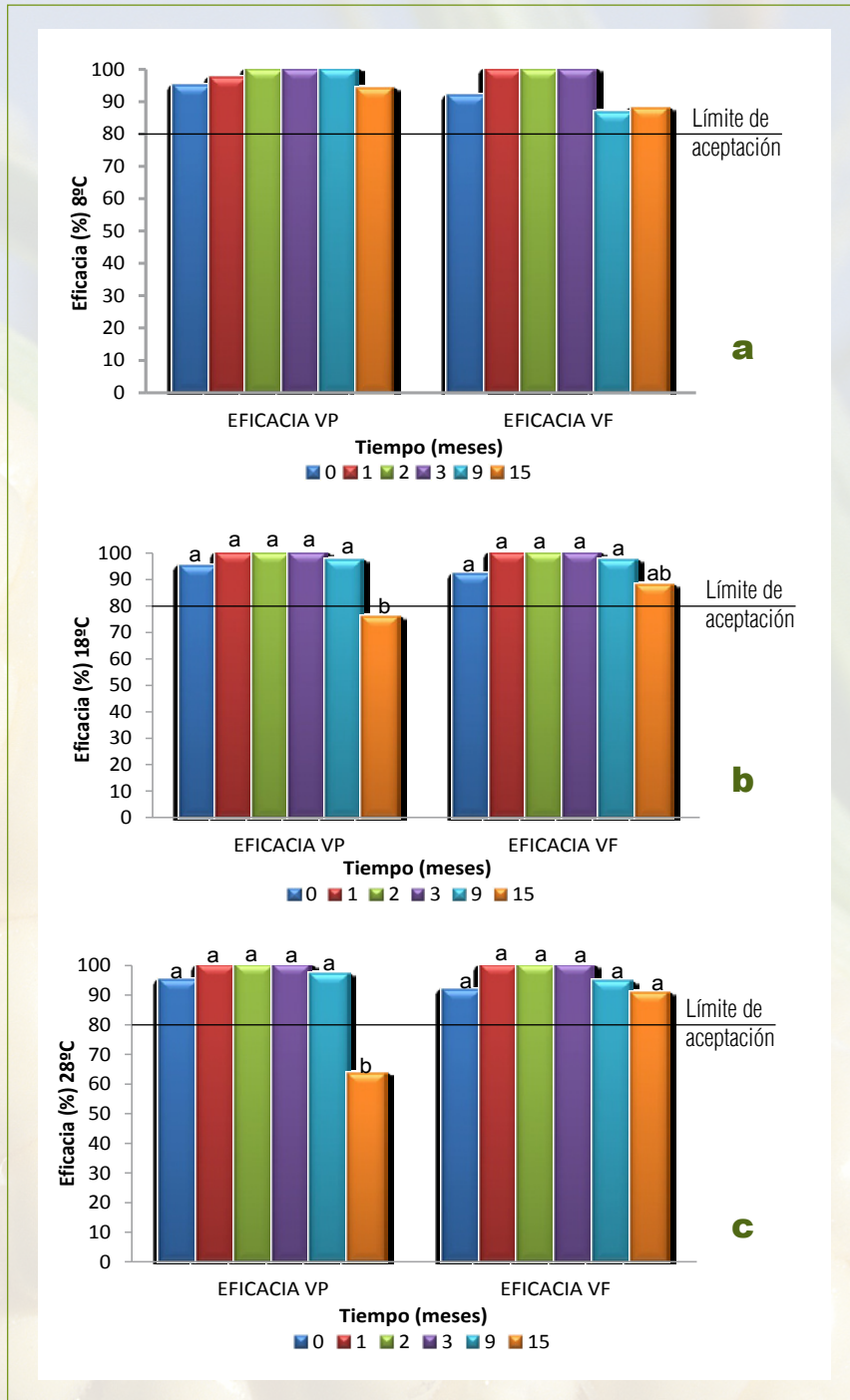


Figura 26. a. Eficacia del virus formulado (VF) y sin formular (VP) almacenado a 8 °C. **b.** 18 °C y **c.** 28 °C durante 15 meses de almacenamiento.



18 °C y 28 °C presentó una reducción en la eficacia en el mes 15 de almacenamiento con valores de 76% y 63% respectivamente.

La disminución en la eficacia durante el almacenamiento puede deberse a la hidrólisis y autooxidación resultante de la exposición al oxígeno de los derivados lipídicos que están presentes en los cadáveres de los insectos y que no fueron removidos por la filtración de la suspensión viral (Lasa *et al.*, 2008). Este fenómeno también fue observado por Ignoffo y García (1994), quienes determinaron que los superóxidos y radicales libres generados por la autooxidación fueron capaces de modificar la estructura de los ácidos nucleicos de los baculovirus y causar la pérdida de patogenicidad en almacenamiento. Esto también fue demostrado por Lasa y colaboradores (2008), quienes evidenciaron que la actividad insecticida de un bioplaguicida a base de NPV almacenado a 25 °C se redujo significativamente después de 6 meses de almacenamiento y presentó una inactivación total a los 18 meses del estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se evidenció que la temperatura y el tiempo de almacenamiento no influyeron negativamente sobre la estabilidad del bioplaguicida, siendo posible el almacenamiento del bioplaguicida durante 15 meses a cualquiera de las temperaturas evaluadas.

Contenido de contaminantes

El contenido de contaminantes en el prototipo de bioplaguicida se evaluó mediante la técnica de recuento en placa, analizando las muestras almacenadas a 8 °C, 18 °C y 28 °C. El contenido de contaminantes se expresó como Unidades Formadoras de Colonia por gramo de producto (UFC/g) y posteriormente estos valores fueron transformados determinando el logaritmo decimal de los mismos para normalizarlos y homogeneizar las varianzas, para de esta forma realizar el análisis estadístico utilizando las pruebas paramétricas de varianza y comparación de medias de Tukey (95%).

El contenido de bacterias en el bioplaguicida inicialmente fue de $1,00 \times 10^4$ UFC/g y después de 15 meses de almacenamiento a 8 °C; este valor se mantuvo constante (Figura 27). Al almacenar el bioplaguicida a 18 °C se presentaron valores de bacterias contaminantes que oscilaron entre $1,40 \times 10^4$ UFC/g y $2,10 \times 10^4$ UFC/g hasta el tercer mes de almacenamiento. A partir del noveno mes se presentó una disminución significativa en el contenido de bacterias contaminantes hasta un valor de $1,40 \times 10^3$ UFC/g (Figura 27). Un comportamiento similar se observó cuando se almacenó el producto a 28 °C, en donde el contenido de contaminantes bacterianos fue disminuyendo hasta alcanzar un valor de $1,23 \times 10^3$ UFC/g en el mes 15 de almacenamiento (Figura 27).

En general, se observa que el contenido de bacterias disminuyó a medida que avanzó el tiempo y aumentó la temperatura de almacenamiento. Esta disminución puede deberse a las condiciones adversas del medio, como la ausencia de nutrientes, la presencia de humedad y de oxígeno, y al mantenimiento activo del metabolismo de las bacterias (Costa *et al.*, 2002). A 8 °C se evidenció una menor disminución en el contenido de bacterias contaminantes en el producto, probablemente debido a que a bajas temperaturas (8 °C) los microorganismos experimentan periodos de latencia y

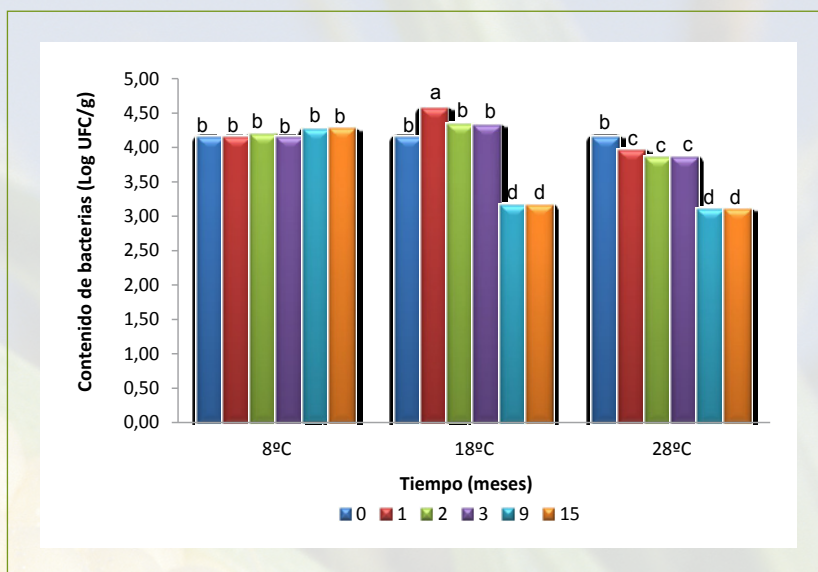


Figura 27. Comportamiento del contenido de contaminantes bacterianos en el bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* almacenado a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 15 meses.

el metabolismo tiende a ser lento y a disminuir. Por el contrario, Lasa *et al.* (2008) observaron que al almacenar una formulación a base del nucleopoliedrovirus de *S. exigua* a 4 °C se disminuía en una unidad logarítmica el contenido de contaminantes después de 6 meses de almacenamiento.

Resultados similares a los del presente estudio fueron obtenidos por Lasa *et al.* (2008) con una formulación a base del nucleopoliedrovirus de *S. exigua* almacenada a 25 °C, para la cual se evidenció una reducción en una unidad logarítmica en el contenido de bacterias, lo que atribuyeron a los adyuvantes usados en la formulación como el ácido sórbico, el cual inhibe el crecimiento de los microorganismos.

Con respecto al contenido de mohos contaminantes, el valor inicial fue de $4,00 \times 10^4$ UFC/g y después de 15 meses de almacenamiento la concentración final no fue significativamente diferente a la inicial, presentando valores finales de $3,30 \times 10^4$ UFC/g, $4,27 \times 10^3$ UFC/g y $5,03 \times 10^4$ UFC/g a 8 °C, 18 °C y 28 °C respectivamente (Figura 28). Además, la concentración de mohos obtenida durante todo el estudio se encontró dentro del rango de aceptación para este tipo de producto según los parámetros del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica de Corpoica, el cual acepta un máximo de 10^6 UFC/g.

En cuanto al contenido de levaduras contaminantes, inicialmente el recuento fue de $1,27 \times 10^4$ UFC/g, el cual se redujo significativamente a partir del tercer mes de almacenamiento (Figura 29), comportamiento evidenciado a las tres temperaturas evaluadas. Posteriormente, el contenido de levaduras se mantuvo en valores inferiores al valor del producto recién manufacturado, es decir que la concentración de estos microorganismos contaminantes se mantuvo estable.



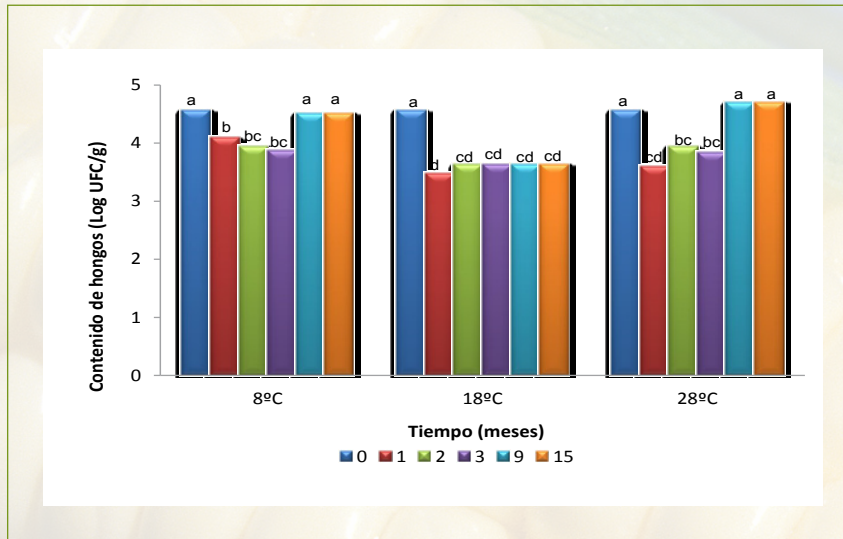


Figura 28. Comportamiento del contenido de mohos contaminantes en el bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* almacenado a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 15 meses.

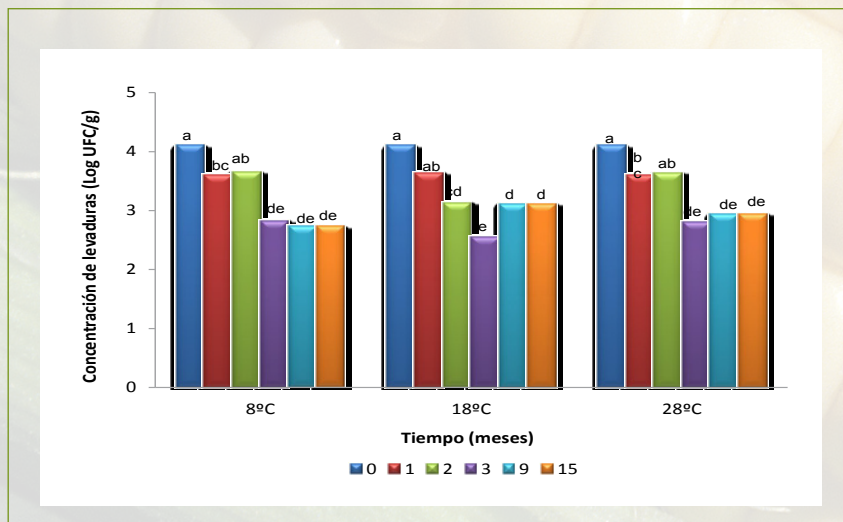


Figura 29. Comportamiento del contenido de levaduras contaminantes en el bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* almacenado a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 15 meses.

En general, los tres tipos de contaminantes cuantificados en el producto (bacterias, mohos y levaduras) se mantuvieron en valores inferiores al límite máximo de aceptación permitido (10^6 UFC/g) durante los 15 meses evaluados en cada temperatura, lo cual indica que la calidad del producto no se vio afectada por la presencia de microorganismos contaminantes.

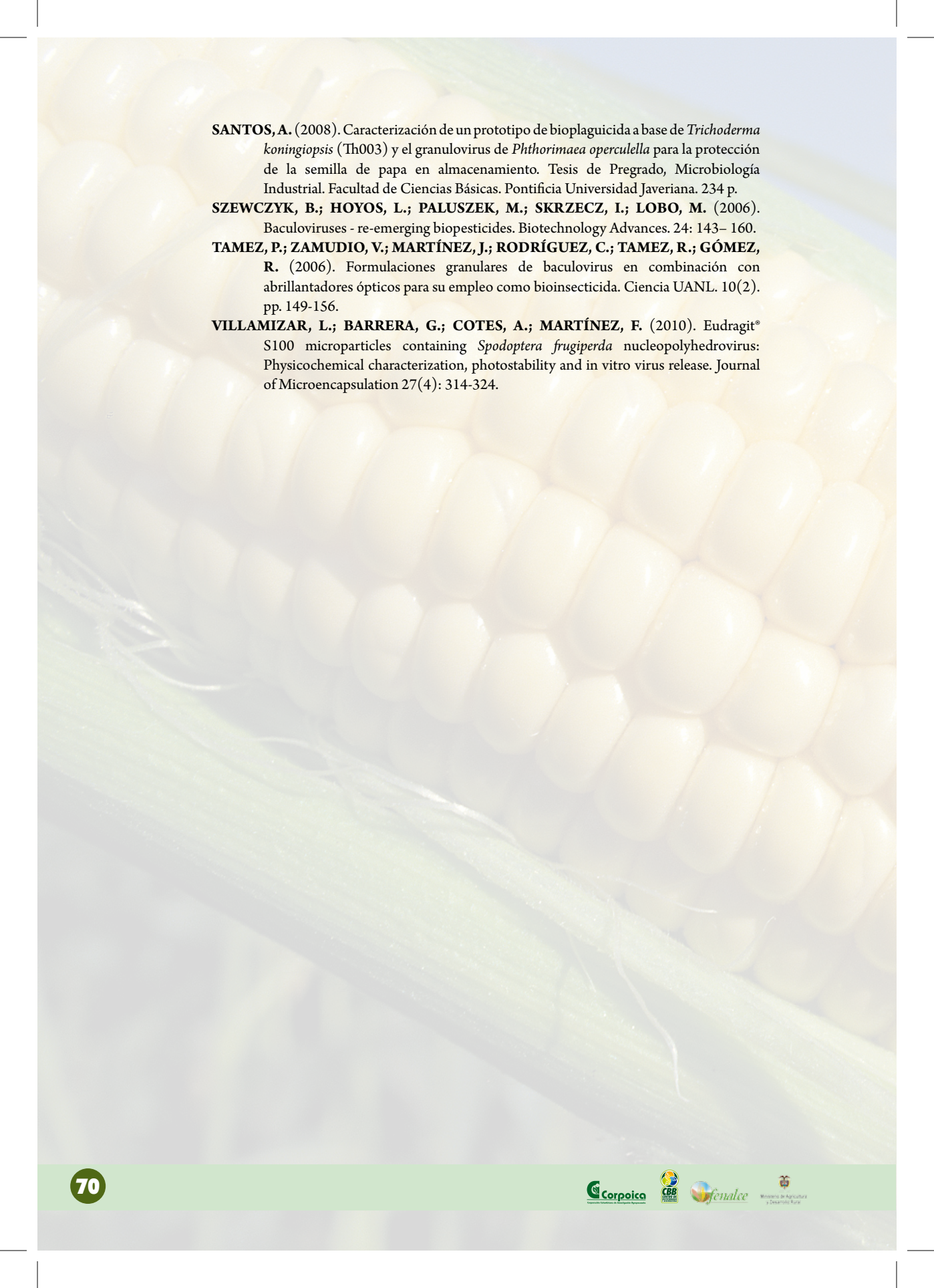
CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos para la estabilidad insecticida y microbiológica (contenido de contaminantes) se recomienda el almacenamiento del bioplaguicida a temperaturas inferiores de 28 °C durante un año, lo que garantiza su calidad y su actividad insecticida.

Bibliografía

- ABADÍAS, M.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; BENABARRE, A.; VIÑAS, I.** (2001). Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agente *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection*. 64(6):856-861.
- BOYETCHKO, S.; HYNES, R.** (2006). Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology & Biochemistry*. 38: 845-849.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ- FERBER, M.; WILLIAMS, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. Navarra, España. 518 p.
- CERTIS.** (2010). SPOD-X. Control de *Spodoptera exigua*. <http://www.certiseurope.es/binarydata.aspx?type=doc/SPODX%20ficha%20t%C3%A9cnica.pdf>. (Consulta: noviembre 1 de 2010).
- COSTA, J.; TEIXIDO, U.; TORRES, R.; VIÑAS, I.** (2002). Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal Applied Microbiology*. 92: 873-878.
- ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA).** (2011). Pesticides: Regulating pesticides. In: <http://www.epa.gov/pesticies/biopesticides>. (Consulta: septiembre 1 de 2011).
- GRZYWACZ, D; MCKINLEY, D; JONES, K; MOAWAD; G.** (1997). Microbial contamination in *Spodoptera littoralis* nuclearpolyhedrosis virus produced in Egypt. *Journal of Inverbrate Pathology*. 69: 151-156.
- ICA.** (2011). www.ica.gov.co. (Consulta: septiembre 1 de 2011).
- IGNOFFO, C.; GARCÍA, C.** (1994). Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the *Heliothis* baculovirus by simulated sunlight-UV. *Environmental Entomology*, 23: 1025 - 1029.
- LASA, R.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P.** (2008). Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. *Journal of Economic Entomology* 101: 42-49.
- QUIROGA, I.** (2009). Caracterización de prototipos de bioplaguicida a base de granulovirus para el control de *Tecia solanivora* en campo. Tesis de Pregrado, Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. 234 p.
- QUIROGA, I.; GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L.** (2011). Estabilidad de formulaciones a base de granulovirus para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología* 37 (1): 27-35.



- 
- SANTOS, A.** (2008). Caracterización de un prototipo de bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* (Th003) y el granulovirus de *Phthorimaea operculella* para la protección de la semilla de papa en almacenamiento. Tesis de Pregrado, Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. 234 p.
- SZEWCZYK, B.; HOYOS, L.; PALUSZEK, M.; SKRZECZ, I.; LOBO, M.** (2006). Baculoviruses - re-emerging biopesticides. *Biotechnology Advances*. 24: 143– 160.
- TAMEZ, P.; ZAMUDIO, V.; MARTÍNEZ, J.; RODRÍGUEZ, C.; TAMEZ, R.; GÓMEZ, R.** (2006). Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia UANL*. 10(2). pp. 149-156.
- VILLAMIZAR, L.; BARRERA, G.; COTES, A.; MARTÍNEZ, F.** (2010). Eudragit® S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release. *Journal of Microencapsulation* 27(4): 314-324.

CAPÍTULO 5.

Selección de dosis y frecuencias de aplicación del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (NPV003)

PAOLA CUARTAS cPh.D., JULIANA GÓMEZ cPh.D., LIZETH TABIMA B.Sc., JUDITH GUEVARA cPh.D., fernando valicente Ph.D., LAURA VILLAMIZAR Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Las características de patogenicidad y virulencia propias de muchos baculovirus hacen de ellos importantes agentes de control de plagas de importancia económica. En la actualidad, el uso de bioplaguicidas a base de estos virus ha comenzado a surgir como una alternativa más eficiente y ambientalmente segura (Caballero y Williams, 2008). Para garantizar su efectividad, dentro del desarrollo de dichos productos se deben establecer tanto su eficacia como los parámetros adecuados para su aplicación en campo. Entre estos parámetros, es de gran importancia determinar las dosis adecuadas para el uso del bioplaguicida y su frecuencia de aplicación (Caballero *et al.*, 2001).

Es necesario tener en cuenta que la dosis y la frecuencia de aplicación en este tipo de productos dependen directamente de la patogenicidad del virus, de la población de la plaga, de la fenología del cultivo y de los hábitos alimenticios del insecto plaga, entre otros factores. Es por esto que para definir los parámetros adecuados para su uso en cultivos comerciales es preciso evaluar el producto bajo condiciones de casa de malla y campo que simulen las condiciones reales a las que se expondrá, incluyendo las condiciones ambientales y las fluctuaciones poblacionales de la plaga (Prater *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2007; Grzywacz *et al.*, 2008).

Como la cantidad de cuerpos de inclusión utilizados en la aplicación de la dosis sugerida determina directamente los costos de producción del bioplaguicida, se busca establecer la menor dosis del producto que tenga alta eficacia para el control de la plaga. Así mismo, la frecuencia de aplicación dependerá de la persistencia de los cuerpos de inclusión en las hojas del cultivo, la eficiencia en la transmisión del virus de las larvas infectadas a las sanas y el ritmo de crecimiento del cultivo (Caballero y Williams, 2008). Por lo anterior, en el presente capítulo se busca evaluar la eficacia del bioplaguicida bajo condiciones de campo en parcelas pequeñas de agricultores, con el fin de seleccionar la dosis y la frecuencia de aplicación adecuadas para el uso del producto.



MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de la actividad biocontroladora del producto en casa de malla

En el Centro de Investigación La Libertad de Corpoica, ubicado en el kilómetro 21 vía Puerto López, departamento del Meta, se llevó a cabo un experimento para evaluación del bioplaguicida bajo condiciones de casa de malla (Figura 30).

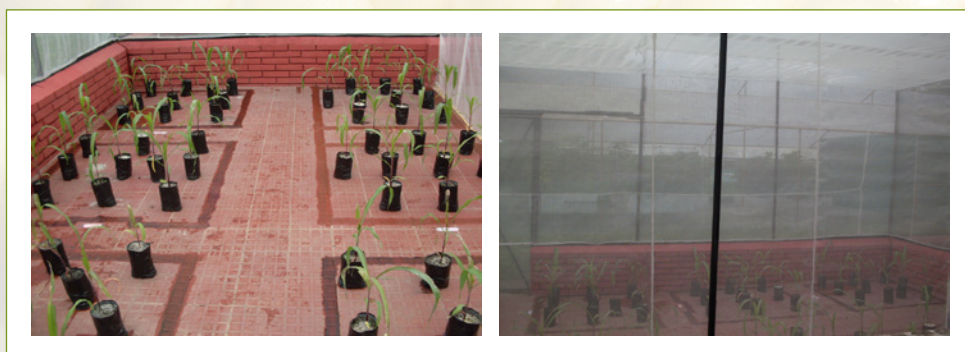


Figura 30. Ensayo en casa de malla para la evaluación del bioplaguicida a base de NPV en el C.I. La Libertad.

Los tratamientos consistieron en el producto reconstituido a diferentes concentraciones (5×10^6 , 1×10^7 y 5×10^7 CI/g), estas mismas concentraciones del virus sin formular y un testigo absoluto. La unidad experimental fue una bolsa plástica de 1 libra de capacidad, en la que se sembraron dos semillas de maíz para un total de 120 bolsas. Se utilizaron tres repeticiones, cada una de las cuales consistió en 10 unidades experimentales para un total de 30 plantas por tratamiento. Los grupos de 30 plantas por tratamiento se asperjaron con los tratamientos reconstituidos en agua mediante la atomización de 5 mL de suspensión por planta empleando un aerógrafo a una presión de 40 psi. Esta aplicación se realizó en un lugar aislado de la casa de malla con el fin de evitar contaminación cruzada. Inmediatamente después de la aplicación se ubicó en cada planta una larva de segundo instar de *S. frugiperda*.

Dentro de la casa de malla, las bolsas se organizaron utilizando un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Las evaluaciones se realizaron a los 7 y 14 días después de la aplicación. Para esto, se muestreó cada planta y se evaluó el daño fresco en la última hoja formada (Figura 31), determinando la presencia de manchas translúcidas en esta hoja, así como la presencia de daño en el cogollo y la presencia de larvas o de excrementos frescos. Con estos resultados se calculó el porcentaje de eficacia del bioplaguicida, expresado como la reducción en el daño fresco causado por *S. frugiperda*, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Eficacia (\%)} = a - b$$

En donde “a” es el porcentaje de plantas con daño fresco ocasionado por *S. frugiperda* en el testigo y “b” es el porcentaje de plantas con daño fresco ocasionado por *S. frugiperda* después del tratamiento.

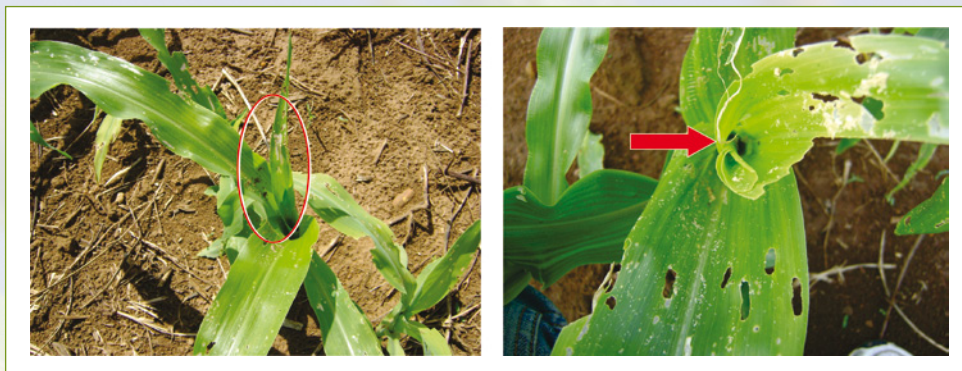


Figura 31. Daño fresco en plantas de maíz causado por larvas de *Spodoptera frugiperda*.

El ensayo contó con una repetición en el tiempo, utilizando únicamente la concentración intermedia de 1×10^7 CI/g tanto de producto como de virus. Se utilizó la misma metodología mencionada anteriormente, pero la casa de malla contó con algunas modificaciones. Los datos de porcentaje de daño y porcentaje de eficacia fueron sometidos a análisis de varianza (ANAVA) y los promedios fueron comparados mediante la prueba de Tukey con un nivel de confianza de 95% mediante el programa Statistix 8.1.1.0.

Determinación de la actividad biocontroladora del preformulado bajo condiciones de campo en fincas de agricultores

La evaluación del bioplaguicida se llevó a cabo en dos fincas de agricultores ubicadas en el municipio de Puerto Gaitán y en el municipio de Puerto López, departamento del Meta.

En la parcela de Puerto Gaitán (Ensayo 1) se sembraron plantas de maíz del híbrido 138 de Fenalce y en la parcela de Puerto López (Ensayo 2) se sembraron plantas variedad Pioneer K 33. El cultivo se revisó cada tercer día para determinar la germinación de las plantas y el momento adecuado de la aplicación de los tratamientos mediante muestreos de vigilancia.

Los tratamientos consistieron en el bioplaguicida utilizando la dosis seleccionada en el ensayo anterior que para un área de 50 m^2 , correspondió a 3,75 g por parcela o 750 g/ha. Se evaluó también una dosis inferior correspondiente a la mitad de la dosis (1,87 g/parcela o 375 g/ha) y otra superior consistente en el doble de la seleccionada (7,50 g/parcela o 1.500 g/ha). También se incluyó un testigo químico utilizando el producto Match® de Syngenta (Lufenuron), que cuenta con registro ICA y un testigo absoluto donde no se realizaron aplicaciones de productos biológicos ni químicos.

En cada uno de los muestreos se determinó el porcentaje de daño fresco causado por las larvas presentes naturalmente. Se partió de un umbral de acción del 15% de plantas con daño fresco para realizar la aplicación de las medidas de control. Con el fin de determinar el nivel de daño fresco, se realizó un seguimiento semanal del cultivo examinando 50 plantas al azar por parcela/repetición. Sobre cada planta se muestreó la última hoja formada determinando el porcentaje de plantas con daño fresco antes y después de la aplicación de



los tratamientos. La unidad de muestreo en cada planta fue la primera hoja formada del cogollo, como se mencionó en la metodología anterior (Figura 31).

En los dos experimentos se utilizó un diseño en bloques completos al azar, realizando tres repeticiones por tratamiento consistentes cada una en una parcela de 50 m² con 5 surcos de 10 m (Figura 32). En cada parcela se muestrearon 50 plantas al azar distribuidas en los tres surcos centrales. Todas las parcelas utilizadas tuvieron las prácticas agronómicas usadas comúnmente de riego, fertilización y control de malezas para este cultivo.

Sobre el total de plantas muestreadas y el número de plantas con daño fresco se determinó el porcentaje de plantas con daño fresco y el porcentaje de eficacia de los tratamientos evaluados mediante la fórmula de Abbot.

$$\% \text{ Eficacia} = ((a - b) / a) \times 100$$

En donde “a” es el porcentaje de plantas con daño fresco ocasionado por *S. frugiperda* en el testigo y “b” es el porcentaje de plantas con daño fresco ocasionado por *S. frugiperda* después del tratamiento. Las lecturas se realizaron siete días después de cada aplicación. Los datos obtenidos de porcentaje de daño y porcentaje de eficacia fueron sometidos a ANAVA para determinar efectos significativos de los tratamientos, y los promedios fueron comparados mediante la prueba de DMS con un nivel de confianza de 95% con el programa Statistix 8.1.1.0.

Los datos de producción de cosecha del cultivo ubicado en la finca de Puerto Gaitán se determinaron midiendo el rendimiento expresado como la cantidad de grano obtenido por área cultivada (kg/ha). Los resultados se sometieron a un análisis de varianza ($p > 0,05$) mediante el programa Statistix 8.1.1.0.

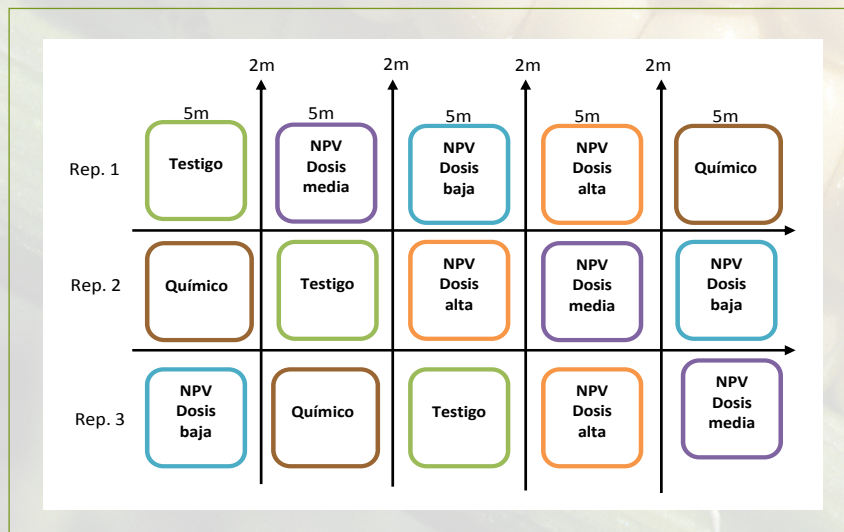


Figura 32. Distribución de las parcelas en campo para evaluación de la eficacia del bioplaguicida a base de NPV003 para el control de *S. frugiperda* en cultivos de maíz

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida en casa de malla

La eficacia del bioplaguicida en casa de malla se determinó mediante la evaluación del daño en la última hoja formada en plantas de maíz después de 7 y 14 días de la aplicación. Los tratamientos donde se aplicó el bioplaguicida y el virus sin formular presentaron valores de daño fresco que oscilaron entre el 30% y el 90%, mientras que en el control se obtuvieron valores de daño del 100% (Figura 33). El daño fresco en el tratamiento control donde no se aplicó virus fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que el de los tratamientos, a excepción del obtenido con la dosis más baja del virus formulado a los 7 días después de la aplicación. Este resultado sugiere que tanto el virus formulado como el virus sin formular ejercieron un control eficiente de la plaga.

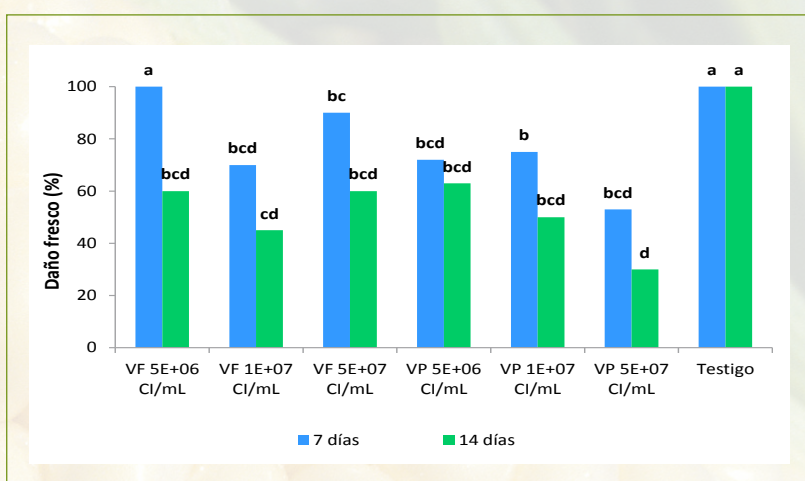


Figura 33. Efecto de la aplicación del virus formulado y sin formular sobre el nivel de daño fresco causado por *S. frugiperda* en plantas de maíz en casa de malla 7 y 14 días después de la aplicación. VF: virus formulado, VP: virus puro sin formular (Tukey 95%).

En las plantas del tratamiento testigo el daño causado por *S. frugiperda* fue evidente (Figura 34), entretanto que en los tratamientos con virus se obtuvieron plantas sanas y larvas muertas por el virus.

En cuanto a los valores de eficacia, estos oscilaron entre el 36% y el 76% (Figura 35), obteniéndose la mayor eficacia con el virus sin formular a la mayor concentración (5×10^7 CI/mL). La prueba de comparación de medias de Tukey detectó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de eficacia obtenidos con el virus sin formular a la mayor concentración (76,53%) y la eficacia del virus formulado y sin formular a la menor concentración (40,73%), lo que sugiere que la dosis sí ejerció un efecto directo sobre la variable respuesta. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre la eficacia del virus formulado y sin formular, lo que indica que la formulación no tuvo un efecto significativo sobre la eficacia del virus.



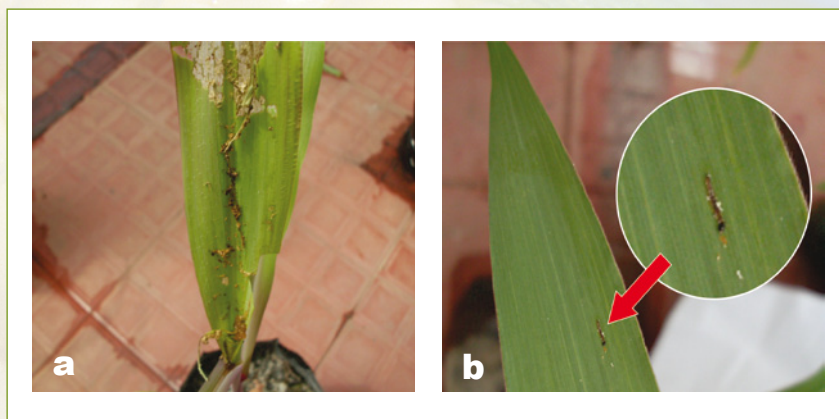


Figura 34. a. Daño causado por larvas de *S. frugiperda* en plantas de maíz del tratamiento testigo. b. Larva de *S. frugiperda* muerta por acción del virus en plantas que fueron aplicadas con el virus formulado.

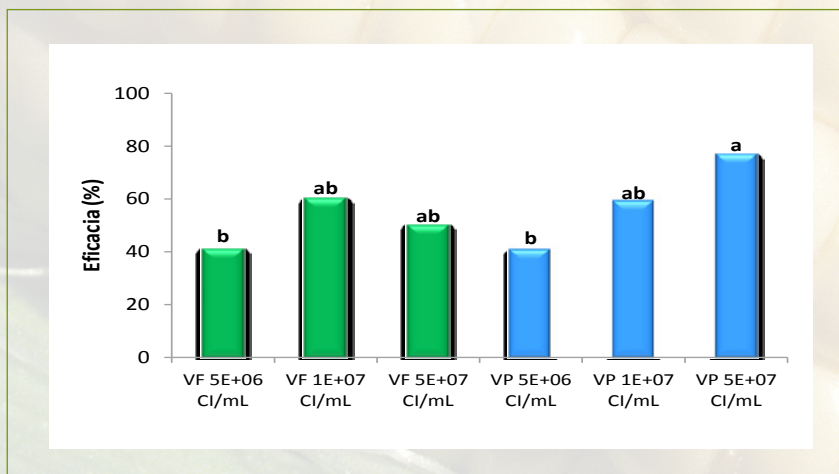


Figura 35. Eficacia del virus formulado y sin formular 14 días después de la aplicación en casa de malla. VF: virus formulado, VP: virus puro sin formular (Tukey 95%).

Con base en los resultados obtenidos se seleccionó la concentración 1×10^7 CI/mL como la más adecuada, ya que fue la dosis más baja que ejerció un control efectivo de la plaga en los dos días de evaluación; además, dicha concentración es viable desde el punto de vista económico y ecológico. Cabe resaltar que en este ensayo se observó una alta variabilidad de los datos, posiblemente debido al equipo de aspersión utilizado, el cual producía un cono de aspersión muy cerrado reduciendo el área de cubrimiento. Adicionalmente, la casa de malla se construyó dentro de un invernadero que tenía tejas blancas cubiertas con polisombra, evitando el paso directo de los rayos solares y reduciendo la temperatura, condiciones ambientales diferentes a las encontradas en campo.

Teniendo en cuenta lo anterior y con el fin de corroborar los resultados obtenidos, se estableció un nuevo ensayo empleando únicamente la concentración de 1×10^7 CI/g tanto de virus formulado como sin formular. La casa de malla se modificó cambiando las tejas blancas por tejas transparentes y retirando la polisombra, permitiendo el aumento de la temperatura (rango: 31 ± 3 °C) y la humedad (promedio 77,3%), simulando las condiciones registradas en campo. Teniendo en cuenta que el aumento de la temperatura puede acelerar el proceso de infección viral y favorecer el ciclo de vida del insecto, se realizó así mismo la lectura de los resultados a los 4, 7 y 11 días después del montaje.

Con el bioplaguicida y el virus sin formular bajo estas condiciones se presentaron valores de daño fresco que oscilaron entre el 2% y el 17%, mientras que en el tratamiento control se obtuvo un daño del 90% 11 días después de la aplicación (Figura 36). El daño fresco en el testigo fue significativamente mayor que el de los tratamientos ($p < 0,05$) en las dosis de evaluación, lo que nuevamente sugiere que la aplicación de NPV ejerce un control eficiente de la plaga en plantas de maíz.

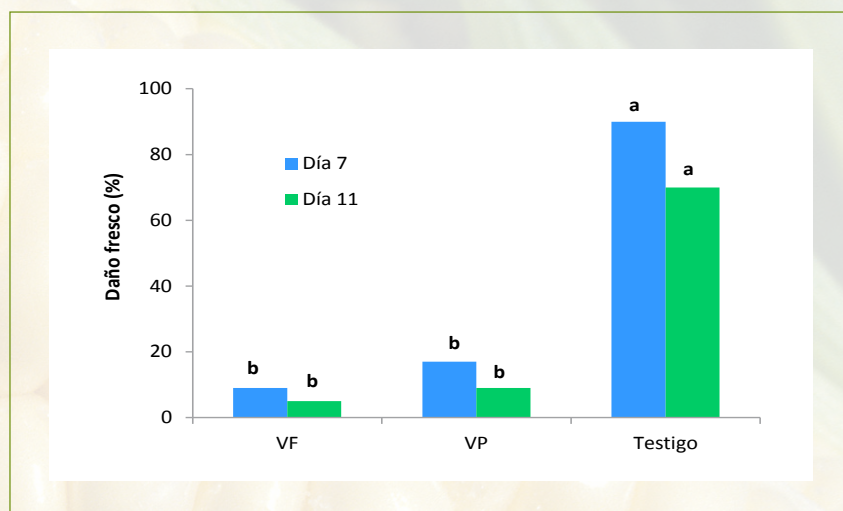


Figura 36. Efecto de la aplicación del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* formulado y sin formular sobre el nivel de daño fresco en plantas de maíz en casa de malla (Puerto López – Meta). VF: virus formulado, VP: virus puro sin formular (Tukey 95%).

En cuanto a la eficacia al día 11 después de la aplicación, se obtuvieron valores del 60% y el 65% para el virus sin formular y formulado respectivamente, y no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,05$) confirmando que la formulación no tuvo efecto alguno sobre la eficacia del agente biocontrolador bajo condiciones de casa de malla.

Cabe resaltar que en los dos bioensayos se encontraron larvas muertas por infección viral a partir del cuarto día, confirmando que la muerte se produjo por la acción del virus (Figura 37).



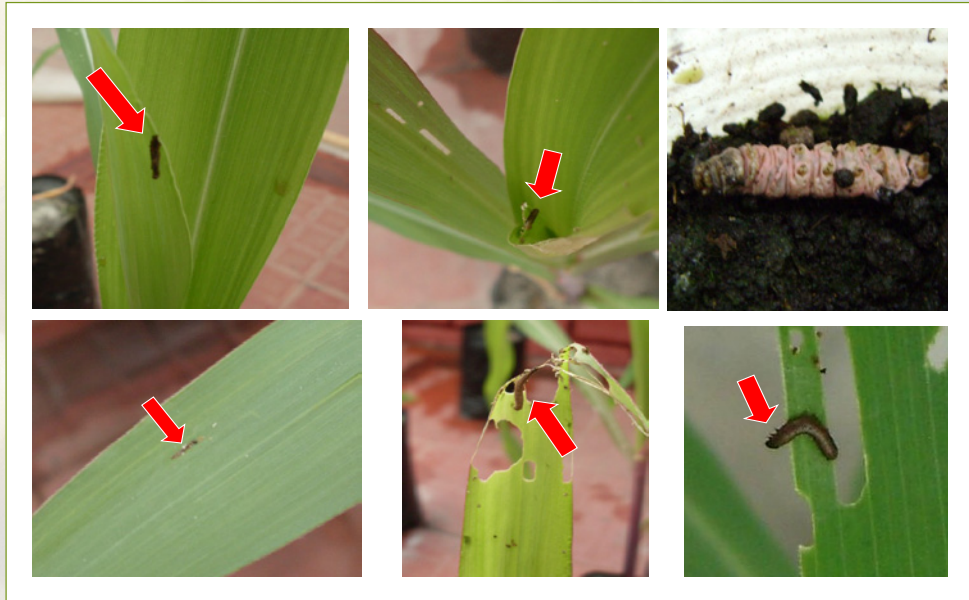


Figura 37. Larvas de *S. frugiperda* muertas por infección viral

Otros autores han evaluado la eficacia de nucleopoliedrovirus para el control de diferentes insectos bajo condiciones de casa de malla o invernadero. Tal es el caso de Bianchi *et al.* (2000) quienes evaluaron el control ejercido por un aislamiento de NPV sobre larvas de *Spodoptera exigua* en crisantemos. Al igual que en el presente trabajo, se demostró que el uso de NPV disminuyó significativamente el daño causado sobre los pétalos y hojas de crisantemos por larvas de segundo y tercer instar en condiciones de invernadero. Los resultados de laboratorio realizados previamente también habían demostrado la eficacia del virus a las concentraciones evaluadas, lo cual también se evidenció en este estudio.

En el 2007, Lasa y colaboradores realizaron un estudio en casa de malla para probar la efectividad de una formulación de NPV sobre *S. exigua* en plantas de pimienta. La variable evaluada fue la mortalidad de larvas, encontrando que el virus formulado produjo una mortalidad de larvas significativamente mayor que el virus sin formular. Esto pudo deberse a la protección que confiere la formulación al virus contra factores como la luz ultravioleta, ya que a pesar de la estructura plástica que cubre los invernaderos la radiación ingresa hasta el nivel de las plantas pudiendo ocasionar daños en el genoma viral (Lasa *et al.*, 2007).

Determinación de la actividad biocontroladora del preformulado bajo condiciones de campo en parcelas de agricultores

Ensayo 1

Ubicación: km 92 vía Puerto Gaitán

Fecha: segundo semestre de 2010

Condiciones climáticas: temperatura promedio: 28 °C / humedad promedio: 85% – 90%.

Después de los muestreos de vigilancia, se determinó que para los días 25 y 33 después de la siembra (dds) el nivel de daño por cogollero era superior al umbral establecido (mayor al 15%) y se realizó la aplicación de los tratamientos (Figura 38). El nivel de daño fresco inicial por cogollero (25 dds) fue del 19%. A los 33 y 40 dds el daño fresco en las parcelas testigo en las que no se realizó la aplicación de ningún producto para el control de *S. frugiperda*, se mantuvieron entre el 13,3% y el 20%. Estos valores fueron relativamente bajos, comparados con el nivel de daño descrito en otros estudios sobre cultivos de maíz, el cual oscila entre el 25 y el 95% (Fernández, 2001; Sosa, 2002; Garcés *et al.*, 2009). No obstante, estos porcentajes pueden considerarse de alto impacto económico si el daño foliar es alto e incluye afectación del verticilio de la planta, que como consecuencia pueden detener su crecimiento e incluso ocasionar la muerte de la planta (García y Pulido, 1988; Fernández *et al.*, 2001).



Figura 38. Lote experimental de maíz para evaluación del bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control de *S. frugiperda* en Puerto Gaitán (Meta).

Al comparar el porcentaje de daño fresco ocasionado por *S. frugiperda* en la etapa inicial del cultivo y el porcentaje de daño fresco a los 25 días del uso del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus (40 dds, evaluación final), se observaron diferencias significativas ($p= 0,0481$) entre el porcentaje de daño inicial, el tratamiento control y el bioplaguicida usado a una dosis de 1.500 g/ha y el testigo químico, obteniendo un porcentaje de daño fresco menor en las parcelas tratadas con el bioplaguicida a 1.500 g/ha (3,33%) y con el producto químico (1,67%), sin encontrar diferencias significativas entre estos dos tratamientos (Figura 39).

Con respecto a la dosis intermedia (750 g/ha) y a la dosis más baja (375 g/ha), se observa una reducción del porcentaje de daño fresco con respecto al daño inicial en el cultivo y el tratamiento control, pero dicha reducción no fue estadísticamente significativa.

Por último, el porcentaje de daño ocasionado por *S. frugiperda* en los tratamientos en los cuales se aplicó el bioplaguicida fue dependiente de la dosis aplicada (Figura 39), lo cual indica que existe una relación directa entre la dosis viral y la mortalidad larval, y por tanto se observan menores porcentajes de daño fresco en las plantas aplicadas a la mayor concentración del bioplaguicida. Estos resultados sugieren que los dos productos (biológico a la dosis más alta y químico) fueron igualmente eficientes para controlar el



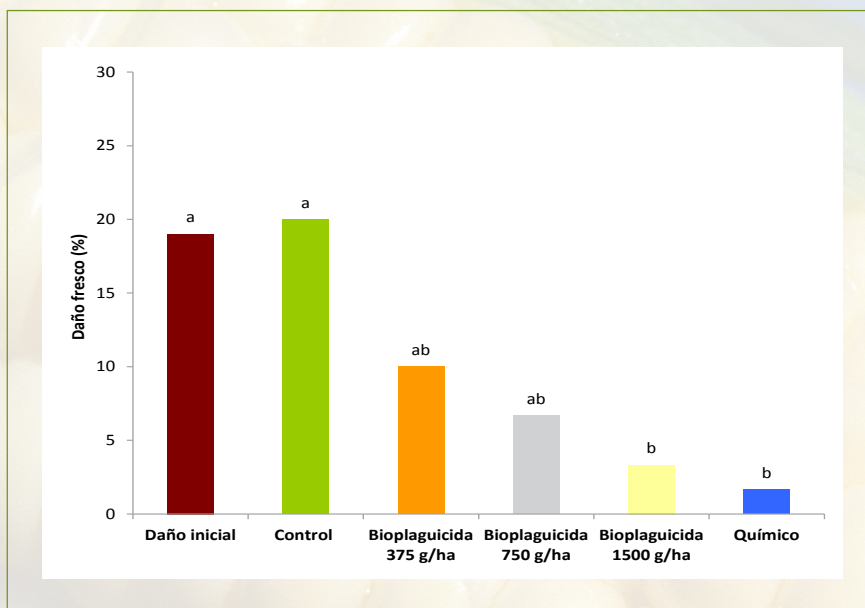


Figura 39. Daño fresco causado por *S. frugiperda* en plantas de maíz. Evaluación del bioplaguicida a base de NPV 40 dds (evaluación final) en la parcela experimental de Puerto Gaitán (Meta). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de comparación múltiple de medias DMS (95%) ($p=0,0481$).

daño causado por *S. frugiperda*.

Con respecto a la eficacia, esta se determinó empleando los niveles de daño registrados en la última lectura (40 días después de siembra), obteniendo los siguientes valores:

- Bioplaguicida (375 g/ha): 50%
- Bioplaguicida (750 g/ha): 66,7%
- Bioplaguicida (1.500 g/ha): 83,3%
- Químico: 91,6%

Nuevamente se observó el efecto directo de la dosis sobre la actividad del bioplaguicida, obteniéndose la mayor eficacia con la dosis de 1,5 kg/ha, la cual no fue estadísticamente diferente de la obtenida con el producto químico a la dosis recomendada.

Ensayo 2

Ubicación: km 12 vía Villavicencio - Puerto López

Fecha: segundo semestre de 2010

Condiciones climáticas: temperatura promedio 26 °C / humedad promedio: 75% - 85%

Después de los muestreos de vigilancia, se determinó que para los días 25 y 33 después de la siembra el nivel de daño por cogollero era superior al umbral establecido (mayor al 15%) y se realizó la aplicación de los tratamientos (Figura 40).



Figura 40. Lote experimental de maíz para evaluación del bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control de *S. frugiperda* en Puerto López (Meta).

El nivel de daño fresco inicial en las parcelas fue del 33%. A los 32 y 39 días después de la siembra, las parcelas del tratamiento testigo en el que no se realizó la aplicación de ningún producto para el control de *S. frugiperda* presentaron niveles entre el 23% y el 25%.

Al comparar el porcentaje de daño fresco ocasionado por *S. frugiperda* en la etapa inicial del cultivo y el porcentaje de daño fresco a los 30 días del uso del bioplaguicida (45 dds, evaluación final) se observaron diferencias significativas ($p= 0,0046$) entre el porcentaje de daño inicial, el tratamiento control y el bioplaguicida usado a una dosis de 750 y 1.500 g/ha. Se obtuvo un porcentaje de daño fresco menor en las parcelas tratadas con el bioplaguicida a 750 g/ha (6,25%) y a 1.500 g/ha (6,25%), sin presentar diferencias significativas entre estos (Figura 41).

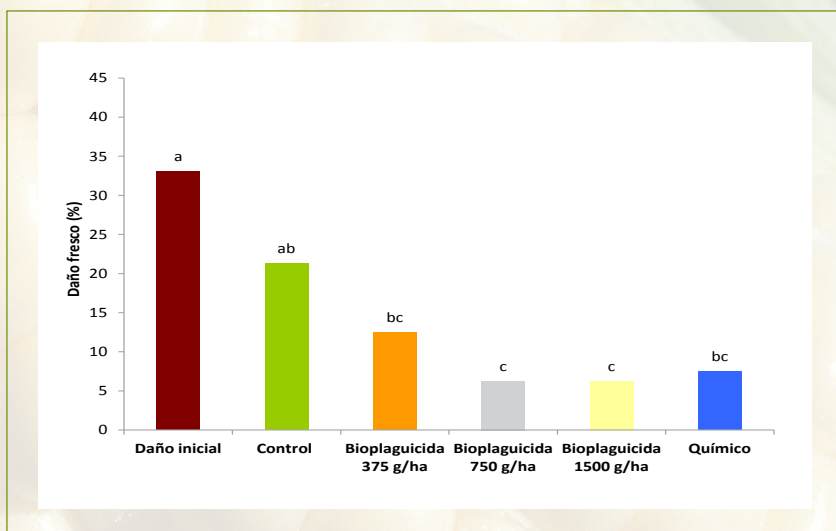


Figura 41. Daño fresco causado por *S. frugiperda* en plantas de maíz. Evaluación del bioplaguicida 45 dds (evaluación final) en la parcela experimental de Puerto López (Meta). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de comparación múltiple de medias DMS (95%) ($p= 0,0046$).



Con respecto a la dosis intermedia (750 g/ha), se encontró un porcentaje de daño del 12,5%, el cual fue similar al encontrado en las parcelas tratadas con el producto químico (7,50%); además, este tratamiento presentó diferencias significativas al compararlo con el porcentaje de daño inicial.

Es importante resaltar que con el bioplaguicida aplicado a la mayor dosis se encontró un menor porcentaje de daño fresco (6,25%) que el obtenido con el insecticida químico, sugiriendo una eficacia mayor con el bioinsecticida. El mejor efecto con el producto biológico podría estar relacionado con la alta presencia de otros agentes de biocontrol (parasitoides y depredadores) en las parcelas tratadas con este, que puedan estar ejerciendo un control adicional y a los que la alta especificidad del virus no los afectó (Figura 42). Estos agentes de control biológico no se detectaron en el tratamiento químico.



Figura 42. A. Adulto de *Coleomegilla* sp. (Coleoptera: Coccinellidae) depredador de huevos de *S. frugiperda*. B. Huevos de *S. frugiperda* consumidos por el insecto depredador

Al igual que en el ensayo llevado a cabo en Puerto Gaitán, se pudo observar un efecto directo de la dosis empleada sobre la reducción de daño fresco.

La eficacia se determinó empleando los niveles de daño registrados en las dos lecturas realizadas, obteniendo los siguientes valores:

- Bioplaguicida (375 g/ha): 43,92%
- Bioplaguicida (750 g/ha): 61,96%
- Bioplaguicida (1.500 g/ha): 75,29%
- Químico: 45,69%

En promedio la eficacia del bioplaguicida a la dosis más alta fue del 81% en las parcelas experimentales de maíz.

Teniendo en cuenta que la concentración del producto fue de 1×10^9 CI/g, se recomienda una dosis de aplicación en campo de 2×10^{12} CI/ha, equivalente a 1,5 kg de producto por hectárea, valor que se encuentra dentro del rango de dosis recomendado

tanto para insecticidas químicos como biológicos. La dosis de 2×10^{12} CI/ha es similar a la recomendada para la aplicación de otros productos base de NPV para el control de lepidópteros, como *Heliothis zea* NPV $1,5 \times 10^{12}$ CI/ha (Copping, 2004; citado por Grzywacz *et al.*, 2008), *Helicoverpa armigera* NPV $1,5 \times 10^{12}$ CI/ha (Cherry *et al.*, 1997; citado por Grzywacz *et al.*, 2008), *Spodoptera exigua* NPV $1,0 \times 10^{12}$ CI/ha (Federici, 1999; citado por Grzywacz *et al.*, 2008).

Otros autores han evaluado la eficacia de bioplaguicidas a base de baculovirus para el control de diferentes plagas en campo, encontrando resultados de control exitosos. Tal es el caso de Behle *et al.* (2003), quienes evaluaron una formulación a base de NPV elaborada por atomización en lecho fluido para el control de *Trichoplusia ni* en cultivos de repollo encontrando una actividad insecticida en campo del 67%, aplicando 10^{12} CI/ha. En Tanzania, Grzywacz *et al.* (2008) encontraron una reducción significativa de la población de *Spodoptera exempta* en cultivos de pastos 10 días después de la aplicación de un bioplaguicida a base de NPV a una dosis de 10^{12} CI/ha.

La aplicación del bioplaguicida a las tres dosis seleccionadas no presentó problemas en la reconstitución, no hubo separación de fases ni presencia de flóculos (grumos formados por la agregación de sólidos en suspensión) y no se detectó taponamiento de boquillas (Figura 43). Por lo tanto, se puede concluir que la suspensión fue estable, lo que indica que el ingrediente activo posiblemente se encontraba homogéneamente distribuido por todo el sistema después de la reconstitución en agua, asegurando así una aplicación adecuada.



Figura 43. Reconstitución del microencapsulado a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV003

Por último, cabe resaltar que en el presente trabajo se encontraron larvas de *S. frugiperda* con sintomatología de infección viral durante los muestreos, lo que corroboró que la mortalidad de las larvas y la protección de las plantas se debieron a la aplicación de los productos a base de baculovirus (Figura 44).

Producción

El cultivo ubicado en la finca de Puerto Gaitán fue llevado hasta la cosecha donde se midió el rendimiento expresado como la cantidad de grano obtenido por área cultivada (kg/ha) (Figura 45).





Figura 44. Larvas de *S. frugiperda* muertas por infección viral encontradas en campo



Figura 45. Cosecha de parcela experimental de maíz con aplicación del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus para el control de *S. frugiperda*

Con respecto al rendimiento de grano por hectárea, para todos los tratamientos se obtuvieron valores que oscilaron entre 415 kg y 540 kg, sin presentarse diferencias significativas entre ellos según el análisis de varianza ($p > 0,05$) (Figura 46). Los resultados sugieren que la aplicación del producto biológico tuvo el mismo efecto que el químico sobre la variable rendimiento de grano.

Lo anterior pudo deberse a que la infestación de larvas de *S. frugiperda* en el cultivo no causó un daño severo a la yema apical de las plantas y por ende no se vio afectado el rendimiento. Otros autores han demostrado que en muchas ocasiones los niveles de plaga son altos pero de poca afectación a los rendimientos, puesto que las plantas son capaces de recuperarse del daño foliar causado (Fernández y Expósito, 2000).

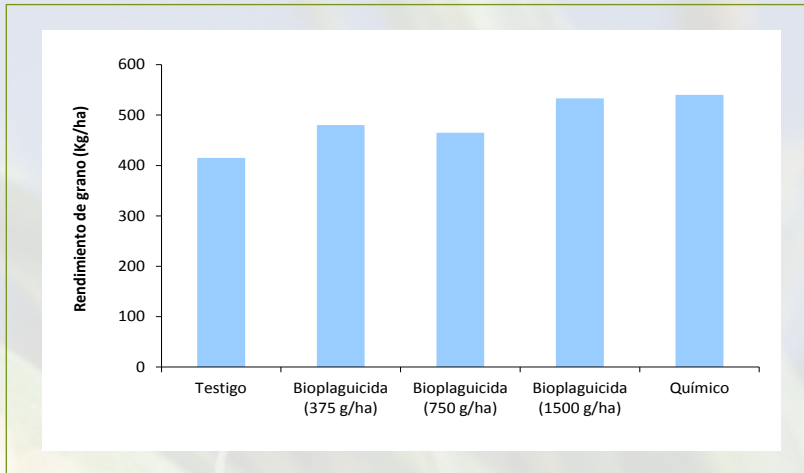


Figura 46. Rendimientos en la parcela experimental de maíz en Puerto Gaitán (Meta).

CONCLUSIÓN

El bioplaguicida fue eficaz para el control de larvas de *S. frugiperda*, tanto en condiciones controladas de casa de malla como en campo en dos zonas de la altillanura colombiana. Los resultados permitieron seleccionar la dosis de 1.500 g/ha (equivalente a 10^{12} CI/ha) como la más eficiente para mantener el nivel de daño fresco causado por la plaga por debajo del umbral de impacto económico, establecido en el 30%.

Bibliografía

- BEHLE, R.; TÁMEZ, P.; MCGUIRE, M.** (2003). Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. *Journal of Economic Entomology*. 96 (4): 1066-1075.
- BIANCHI, F.; JOOSTEN, N.; VLAK, J.; VAN DER WERF, W.** (2000). Greenhouse Evaluation of Dose- and Time-Mortality Relationships of Two Nucleopolyhedroviruses for the Control of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*, on Chrysanthemum. *Biological Control*: 19(3): 252 – 258.
- CABALLERO, P.; WILLIAMS, T.** (2008). Capítulo 8. Virus entomopatógenos. En: *Control Biológico de Plagas Agrícolas*. Editorial Phytoma. ISBN: 978-84-935247-0-8. 121-135.
- CABALLERO, P.; WILLIAMS, T.; LÓPEZ-FERBER, M.** (2001). Capítulo 7: Capacidad insecticida de los baculovirus. En: *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Editorial Phytoma. ISBN: 84-932056-0-5. 204-216.



- FERNÁNDEZ J.** (2001). Ecología y elementos para el control biológico y cultural de insectos plagas del maíz en cuatro municipios de la provincia Granma, Cuba. Tesis Doctoral, Universidad Central de Las Villas. Cuba. 198 pp.
- FERNÁNDEZ, J.; EXPÓSITO, I.** (2000). Nuevo método para el muestreo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en el cultivo del maíz en Cuba. Centro Agrícola 27: 32-38.
- GARCÉS, N.; MÉNDEZ, M.; VERGARA, S.; MEZ, M.; SAAVEADRA, A.** (2009). Fluctuación poblacional y daños causados por gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) en maíz cultivado en el sistema de producción continua afectado por el huracán Isidoro. Publicaciones de Universidad y Ciencia Trópico Húmedo. 25(3):273-277.
- GARCÍA, F.; PULIDO, J.** (1988). Plagas del maíz y su manejo. IX Seminario Manejo de Enfermedades y Plagas del Maíz. Programa Cooperativo de investigación agrícola para la subregión andina. Palmira, Colombia.
- GUPTA, R.; RAINA, J.; ARORA, R.; BALI, K.** (2007). Selection and field effectiveness of Nucleopolyhedrovirus isolates against *Helicoverpa armigera* (Hubner). International Journal of Virology. 3 (2): 45-59.
- GRZYWACZ, D.; MUSHOBOZIB, M.; PARNELLA, M.; JOLLIFEC, F.; WILSON, K.** (2008). Evaluation of *Spodoptera exempta* nucleopolyhedrovirus (SpexNPV) for the field control of African armyworm (*Spodoptera exempta*) in Tanzania. Crop Protection 27: 17-24.
- LASA, R.; PAGOLA, I.; IBAÑEZ, I.; BELDA, J.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P.** (2007). Efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in greenhouses of southern Spain. Biocontrol Science & Technology 17, 221 - 232.
- PRATER, C.; REDMOND, C.; BARNEY, W.; BONNING, B.; POTTER, D.** (2006). Microbial control of Black Cutworm (Lepidoptera: Noctuidae) in turfgrass using *Agrotis ipsilon* multiple nucleopolyhedrovirus. Journal of Economic Entomology. 99 (4): 1129-1137.
- SOSA, M.** (2002). Estimación de daño de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz con infestación natural en tres fechas de siembra en el noreste santafesino. INTA EEA Reconquista. Información para Extensión N° 70:39-45.

CAPÍTULO 6.

Validación del uso del bioplaguicida en un cultivo semicomercial de maíz

CARLOS ESPINEL Ph.D., JULIANA GÓMEZ cPh.D., LAURA VILLAMIZAR Ph.D.

INTRODUCCIÓN

La investigación en producción, formulación y forma de entrega de los bioplaguicidas son puntos clave para contribuir a una correcta comercialización de estos; por tal razón, dentro de la forma de entrega se incluye la validación del bioplaguicida en cultivos semicomerciales, ya que es la única forma en que se puede someter a las condiciones reales de terreno, clima, densidad natural de la plaga y las prácticas de manejo agronómico (Ranga Rao *et al.*, 2007). De igual forma, se busca verificar la eficacia de las dosis y frecuencias de aplicación determinadas en el capítulo anterior.

Aparte de otros aspectos importantes de investigación –como la epidemiología y el estudio de umbrales económicos de la plaga–, con la información generada en la validación se efectúan las últimas recomendaciones de uso del producto y de inclusión en el manejo del cultivo (Ovies, 2003). En la validación se pueden incluir otras variables que brinden información adicional del producto como valor agregado; por ello se tuvo en cuenta en el presente capítulo, adicionalmente al efecto directo de control del bioplaguicida, el efecto sobre la artropofauna que se encontraba asociada al cultivo de maíz, la cual puede presentar diferentes funciones ecológicas, tal como lo mencionan Armenta *et al.* (2003).

En este sentido, el objetivo del trabajo fue validar el uso del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* para el control del gusano cogollero en un cultivo semicomercial de maíz y determinar su efecto sobre la artropofauna asociada a este.

MATERIALES Y MÉTODOS

La validación del bioplaguicida se llevó a cabo en un cultivo semicomercial de maíz ubicado en la finca La Ilusión, vereda San Ignacio, municipio de Granada (Meta). El ensayo se realizó en el primer semestre del 2011, presentando una temperatura promedio de 25,6 °C y una humedad promedio del 73%.



El área total del experimento fue de 5.000 m², en un diseño experimental de parcela única dividida en dos parcelas experimentales, cada una de 2.500 m². El terreno del ensayo se caracterizó por estar rodeado de un cultivo de maíz germinado 15 días antes del establecimiento del experimento y por un cultivo de arroz seco (Figura 47).

Para la labranza se realizaron tres pases de rastrillo y dos pases de rastra; después de la mecanización el suelo fue preabonado con 20% de N (120 kg/ha), 100% de P₂O₅ (50 kg/ha), 100% de K₂O (90 kg/ha) y 100% de S-Mg (30 kg/ha).

Se utilizó semilla de maíz variedad Fnc 318, sembrando de 3 a 4 semillas por sitio. La distancia entre surcos fue de 90 cm y la distancia entre plantas de 30 cm, con un total aproximado de 65.000 plantas establecidas. Se realizó la fertilización en diferentes tiempos del cultivo con urea V6 y V10 al 40% y con Agronex a la dosis recomendada (300cm³/ha). El control de arvenses en el cultivo se realizó mediante deshierbe y aplicación de productos químicos como Atrazina 80 (1,2 kg/ha), glifosato (2 L/ha) y nicosulfurón (50 g/ha). Pasados 30 días después de la siembra se realizó el raleo manual, dejando únicamente dos plantas por sitio de siembra.

Los tratamientos consistieron en una parcela de 2.500 m² (denominada 'biológica'), en donde se utilizó el bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus NPV003 a la dosis seleccionada en el ensayo descrito en el capítulo anterior (1.500 g/ha). En la segunda parcela de 2.500 m² (denominada 'convencional') se utilizaron los productos químicos Atabron EC, Insectrina 20 EC y Match EC a la dosis recomendada. Cada tercer día se revisó el momento de la germinación en las dos parcelas, y a partir de esta se realizaron muestreos semanales de vigilancia y se determinó el porcentaje de daño fresco causado por las larvas de *S. frugiperda* presentes naturalmente. El registro de datos fue realizado dentro de diez unidades de muestreo de 4 m² distribuidas al azar en cada una de las parcelas únicas, las cuales fueron marcadas y se mantuvieron fijas durante todo el experimento (Figura 47).

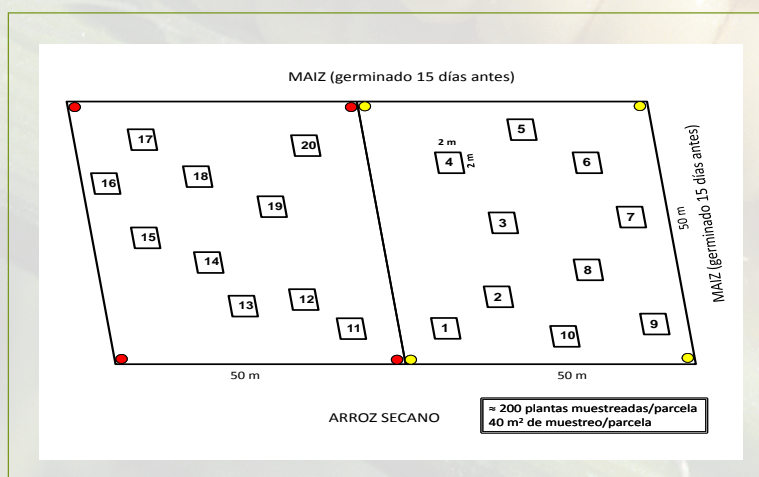


Figura 47. Distribución de las parcelas en campo para la validación del uso del bioplaguicida a base de NPV003 en un cultivo semicomercial

Se partió de un umbral de acción del 15% de plantas con daño fresco para realizar la aplicación del bioplaguicida, y para la parcela convencional se tuvo en cuenta la evaluación cualitativa del agricultor según la presencia o ausencia de la plaga. Las aplicaciones se realizaron por aspersión dirigida al cogollo de la planta utilizando una bomba de espalda. La unidad de muestreo en cada planta fue la primera hoja formada del cogollo, en donde se examinó la presencia de manchas translúcidas y la presencia de daño a nivel del cogollo, así como la presencia de larvas o excrementos frescos (Figura 48).



Figura 48. Daño fresco de *S. frugiperda* en plantas de maíz

Como un valor agregado a la evaluación del bioplaguicida, se realizó un muestreo de la artopofauna asociada al cultivo de maíz después de las aplicaciones de los productos tanto biológicos como químicos, con el fin de determinar su efecto sobre otras especies no blanco. Para ello se realizó un muestreo de cada planta dentro de cada unidad de muestreo de 4 m² empleando un aspirador bucal o mediante la recolección directa con pinzas blandas (Figura 49). Se registró cada morfoespecie encontrada. Las morfoespecies registradas por primera vez se colectaron en frascos con alcohol al 70%, se les asignó un código y se llevaron al laboratorio para su identificación. Si en la revisión de cada unidad de muestreo se encontraban morfoespecies repetidas, se registraba su presencia mediante el código asignado pero no se colectaba, con el propósito de provocar la menor interferencia posible en las poblaciones de artopofauna. Con los registros de morfoespecies se procesaron los datos por cada tratamiento y por cada día de muestreo, determinándose ni (# de individuos de la especie i), Pi (abundancia proporcional de la especie i, $P_i = n_i/N$, donde



Figura 49. Registro de datos de artopofauna en la parcela de maíz en Granada (Meta)

N=número total de individuos). Se estimó el número total de individuos por parcela/día, y la riqueza específica (S); se escogió esta última, pues es la forma más sencilla de medir la biodiversidad debido a que se basa en el número de especies presentes sin tomar en cuenta el valor de importancia de cada una de ellas (Moreno, 2001). Por último se determinó el índice de diversidad de Margalef ($D_{mg} = S-1/\ln N$, donde S=número total de morfoespecies y N= número total de individuos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El día 25 de marzo de 2011 se sembró el lote con la variedad de maíz Fnc 318; la germinación de las plantas se presentó tres días después de la siembra (28/03/11) (Figura 50).



Figura 50. Lote experimental de maíz para evaluación del bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus para el control de *S. frugiperda* en Granada (Meta). Banderas rojas: unidades de muestreo de la parcela convencional. Banderas amarillas: unidades de muestreo de la parcela biológica.

En la parcela biológica se realizaron tres aplicaciones del bioplaguicida de nucleopoliedrovirus para el control del gusano cogollero: la primera aplicación se realizó 4 días después de la germinación (ddg) como una aplicación preventiva; la segunda se realizó a los 11 ddg como una medida de control, debido a que se detectó un nivel de daño por cogollero cercano al umbral establecido; y la tercera se realizó a los 29 ddg, debido a la severidad del daño ocasionado por *S. frugiperda*, puesto que en esta evaluación se observaron plantas con daño al nivel del meristemo apical comprometiendo directamente el crecimiento de las mismas (Figura 51) (García y Pulido 1988; Willink *et al.*, 1994; Fernández *et al.*, 2001).

De igual forma, en la parcela convencional se realizaron dos aplicaciones de productos químicos para el control del cogollero según la evaluación cualitativa del agricultor: la primera aplicación se realizó a los 11 ddg utilizando el producto Atabrón EC (Chlorfluazuron: inhibidor de síntesis de quitina. Categoría toxicológica IV) e Insectrina 20 EC (Cipermetrina: Piretroide. Cat. Toxicológica II) y la segunda aplicación se realizó pasados 29 ddg con el producto Match EC (Lufenuron: inhibidor de síntesis de quitina. Cat. Toxicológica III).



Figura 51. Daño severo en plantas de maíz causado por larvas de *S. frugiperda* en la parcela biológica a los 29 ddg

El nivel de daño fresco por cogollero inicial (7 ddg) fue del 11,28%. Durante los 40 días de evaluación, en la parcela biológica el daño osciló entre el 0,71 y el 14,18%, mientras que en la parcela convencional varió entre el 0,81 y el 17,47% (Figura 52).

Con respecto al porcentaje de daño fresco para la parcela biológica, se observó que en ninguna de las evaluaciones este porcentaje fue superior al umbral establecido (15%). Por el contrario, en la parcela química se observó que el umbral se sobrepasó a los 21 ddg con un porcentaje de daño fresco del 17,47%, aunque no se considera de importancia económica para la aplicación de productos químicos (Figura 52). El porcentaje de daño encontrado los días 17, 21 y 29 después de germinación en la parcela biológica fue inferior al encontrado en la parcela convencional, si bien no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

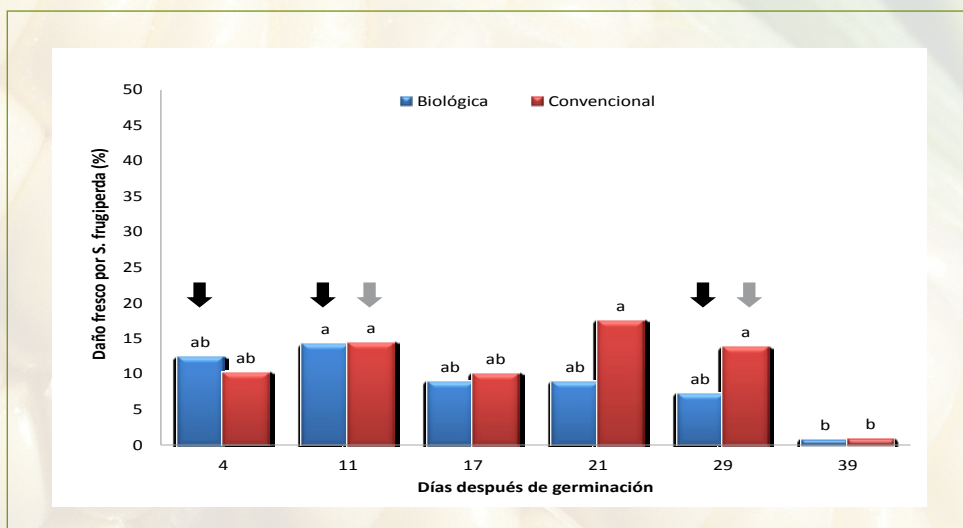


Figura 52. Porcentaje de daño fresco causado por *S. frugiperda* en plantas de maíz durante la evaluación del bioplaguicida a base de nucleopoliedrovirus en cultivo semicomercial en Granada (Meta). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey (95%). Las flechas negras indican aplicación de bioplaguicida y las grises de producto químico. ddg: días después de germinación.



Para el último día de evaluación (39 ddg) se observó que el porcentaje de daño fresco tanto en la parcela biológica como en la parcela convencional fue inferior al obtenido en las evaluaciones anteriores y significativamente diferente al porcentaje obtenido a los 11, 21 y 29 ddg en la parcela convencional. El descenso del daño en este último día de evaluación se pudo presentar por el avanzado estado fenológico del cultivo, el cual no ya no se ve afectado por *S. frugiperda* (García *et al.*, 1999) y en un menor grado por la aplicación tanto del bioplaguicida como del producto químico a los 29 ddg.

Cabe resaltar el efecto de persistencia en el ambiente del bioplaguicida en las plantas, ya que con la aplicación a los 11 ddg se presentó una reducción del porcentaje de daño fresco que se mantuvo por varios días. Dicho comportamiento pudo ser influenciado por varios factores tecnológicos, como la selección de aislamientos virales adecuados (Escribano *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999; Thiem y Cheng, 2009), uso de dosis efectivas para campo (Caballero *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2007; Grzywacz, 2008) y momentos y sistemas adecuados de aplicación, así como de algunos factores biológicos como la densidad y el estado de desarrollo de la plaga, factores fenológicos del cultivo y factores ambientales, como la radiación solar (Shapiro, 1995; Moscardi, 1999; Caballero *et al.*, 2001).

La aplicación del bioplaguicida en etapas tempranas del cultivo –como se realizó en la parcela biológica– puede llevar a un resultado exitoso, ya que las larvas en los primeros estadios de desarrollo son más susceptibles a la infección por baculovirus (Gupta *et al.*, 2007). Además, el comportamiento perforador de las larvas del cogollero brinda una mayor probabilidad de que la larva ingiera una dosis letal del patógeno, comparado con el comportamiento de otras plagas (Moscardi, 1999). De igual manera, la arquitectura de las plantas de maíz, la aplicación del producto dirigida al cogollo y los filtros solares utilizados en la formulación le confieren al virus una protección adicional contra ciertas condiciones ambientales como la radiación solar (Moscardi, 1999; Caballero *et al.*, 2001).

En el caso de los productos químicos para el control de la plaga, su aplicación produce un descenso inmediato de la población, pero a largo plazo produce el resurgimiento de la plaga. Aparte de esto, se ha demostrado que la mayoría de insecticidas usados para el cogollero del maíz no son muy persistentes en campo, debido a su volatilización o descomposición química (Grzywacz *et al.*, 2008).

Por último, cabe resaltar que en el presente trabajo se encontraron larvas de *S. frugiperda* con sintomatología de infección viral durante todos los muestreos realizados, lo que corroboró que la mortalidad de las larvas y la protección de las plantas en la parcela biológica se dieron por la aplicación de los productos a base de baculovirus (Figura 53).

Artropofauna asociada en el ensayo de maíz

El primer valor estimado fue el número total de individuos en cada parcela. Al día 4 ddg se evidencia un bajo número en las dos parcelas (aproximadamente 50 individuos), posiblemente debido al estado fenológico del cultivo, caracterizado por plantas de bajo tamaño. El número de individuos se incrementó significativamente en la parcela biológica a partir del día 11 y se evidenció una reducción significativa del número de individuos en la parcela agricultor, por una aplicación de insecticida químico hecha el día anterior (Figura 54). En los siguientes días



Figura 53. Larvas de *S. frugiperda* muertas por infección viral encontradas en el cultivo semicomercial

de muestreo la población se recuperó paulatinamente, pero nunca logró igualar la población encontrada en la parcela biológica. Consecuentemente, a medida que el cultivo se desarrolló, la población de artropofauna asociada aumentó (Figura 54).

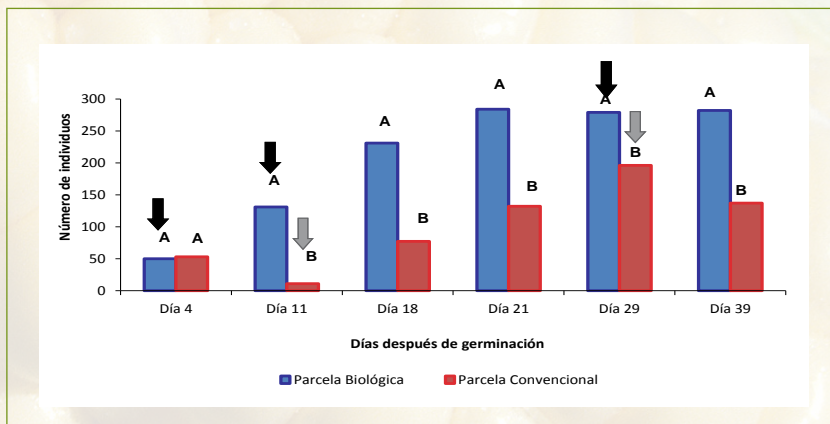


Figura 54. Número total de individuos de la artropofauna asociada al cultivo de maíz en Granada (Meta). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey (95%). Las flechas negras indican aplicación del bioplaguicida y las grises de producto químico para el control de *S. frugiperda*.

Esta misma tendencia es evidente al determinarse la riqueza específica (S), en la que se observó la reducción a la mitad del número de morfoespecies en la parcela convencional en comparación de la parcela biológica en el día 11 ddg, después de una aplicación de insecticidas químicos el día anterior a la lectura (Figura 55).

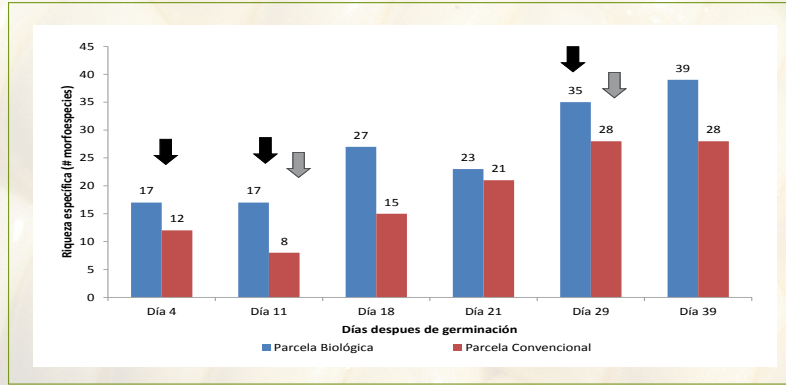


Figura 55. Índice de riqueza específica de la artropofauna asociada al cultivo de maíz en Granada (Meta). Las flechas negras indican aplicación del bioplaguicida y las grises de producto químico para el control de *S. frugiperda*.

El índice de diversidad de Margalef muestra la tendencia de una mayor diversidad en la parcela biológica, aunque en general las dos parcelas no presentaron una diversidad baja (caracterizada por un índice inferior a 2,0), a pesar de ser un ecosistema con alta intervención del hombre. Por otro lado, se observa que la diversidad aumentó a medida que el estado fenológico del cultivo fue mayor. Igualmente, se observó que la aplicación de los insecticidas químicos no afectó la diversidad, contrario a lo observado con la riqueza específica, la cual sí disminuyó (Figura 56).

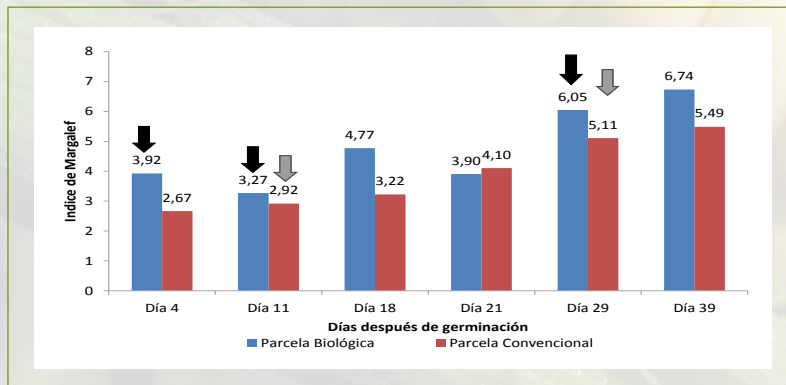


Figura 56. Índice de Margalef de la artropofauna asociada al cultivo de maíz en Granada (Meta). Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey (95%). Las flechas negras indican aplicación de bioplaguicida y las grises de producto químico para el control de *S. frugiperda*.

En las dos parcelas se presentaron diferentes morfoespecies dentro de los órdenes encontrados (figuras 57 - 63), algunas con un papel muy importante como enemigos naturales de diferentes plagas a *S. frugiperda*. Se destacan dentro de los órdenes Coleoptera (Coccinellidae- depredadores), Hemiptera heteroptera (Antocoridae y Reduviidae, depredadores), Hymenoptera (parasitoides), Diptera (Syrphidae, depredadores) y del grupo de las arañas con tela y sin tela (depredadoras).

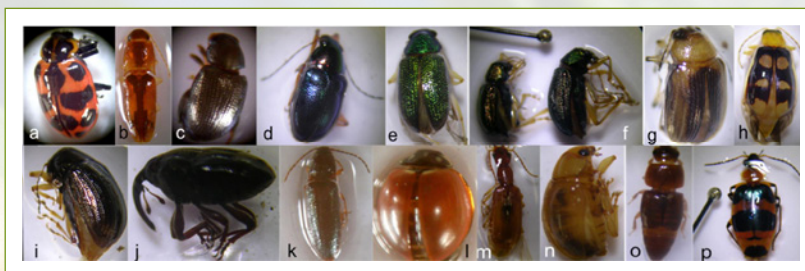


Figura 57. Algunas morfoespecies (Msp) de Coleoptera encontradas en el cultivo semicomercial de maíz en Granada (Meta). **a.** Msp 1 (Coccinellidae: *Coleomegilla*); **b.** Msp 2 (Elateridae); **c.** Msp 3 (Chrysomelidae: *Epitrix*); **d.** Msp 4 (Chrysomelidae); **e.** Msp 5 (Chrysomelidae); **f.** Msp 5, macho y hembra; **g.** Msp 6; **h.** Msp 7 (Chrysomelidae); **i.** Msp 8; **j.** Msp 9 (Curculionidae); **k.** Msp 12 (Elateridae); **l.** Msp 14 (Coccinellidae: *Cycloneda sanguinea*); **m.** Msp 18; **n.** Msp 20; **o.** Msp 21; **p.** Msp 22.

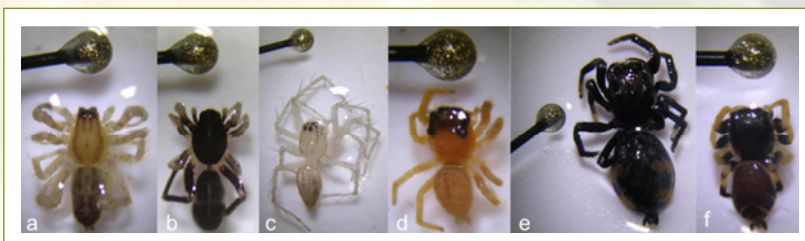


Figura 58. Algunas morfoespecies (Msp) de Arañas encontradas en el cultivo semicomercial de maíz en Granada (Meta). **a.** Msp 3; **b.** Msp 4; **c.** Msp 5; **d.** Msp 7; **e.** Msp 14; **f.** Msp 16.



Figura 59. Algunas morfoespecies (Msp) de Hemiptera heteroptera encontradas en las parcelas. **a.** Msp 1; **b.** Msp 2 (Antocoridae: *Orius*); **c.** Msp 3 (Reduviidae); **d.** Msp 4 (Reduviidae).

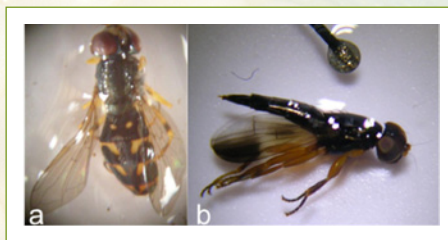


Figura 60. Algunas morfoespecies (Msp) de Diptera encontradas en las parcelas. **a.** Msp 1 (Diptera: Syrphidae); **b.** Msp 2.

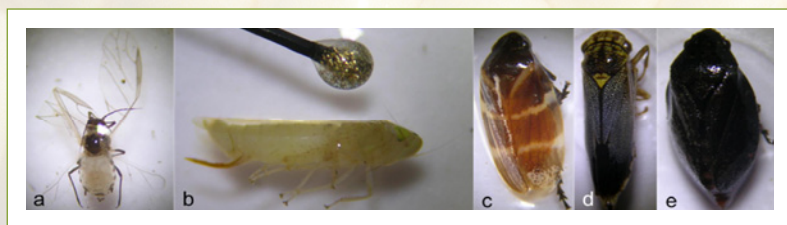


Figura 61. Algunas morfoespecies (Msp) de Hemiptera homoptera encontradas en el cultivo semicomercial de maíz en Granada (Meta). **a.** Msp 1 (Aphididae: *Rhopalisiphum*); **b.** Msp 2 (Cicadelidae: *Empoasca*); **c.** Msp 3 (Cercopidae: pos *Aeneolamia*); **d.** Msp 4; **e.** Msp 5.

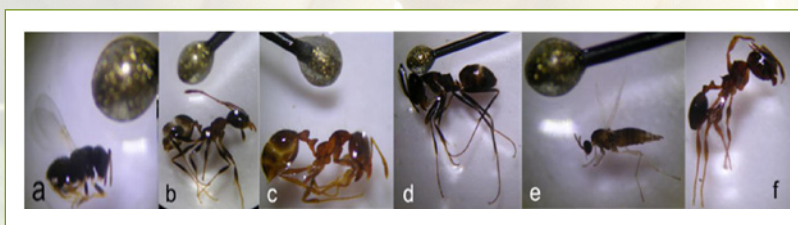


Figura 62. Algunas morfoespecies (Msp) de Hymenoptera encontradas en el cultivo semicomercial de maíz en Granada (Meta). **a.** Msp 2 (Chalcidoidea); **b** y **c.** Msp 4, diferentes castas (Mirmicinae); **d.** Msp 5 (Formicinae); **e.** Msp 7; **f.** Msp 6 (Mirmicinae).

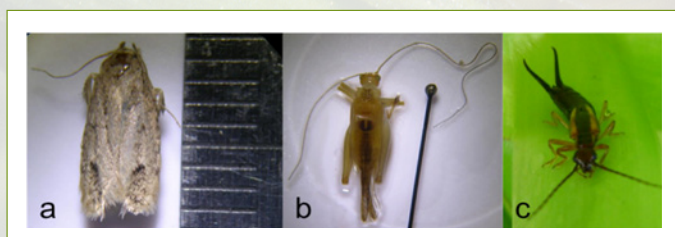


Figura 63. Algunas morfoespecies (Msp) de otros órdenes encontradas en el cultivo semicomercial de maíz en Granada - Meta. **a.** Msp 1 (Lepidoptera), **b.** Msp 1 (Orthoptera: Grillidae), **c.** Msp 1 (Dermaptera).

La aplicación de productos químicos para el control de *S. frugiperda* tuvo un efecto negativo sobre la población de artrópodos del cultivo disminuyendo drásticamente la cantidad de individuos, aunque después de las aplicaciones estas poblaciones tendieron a aumentar. Esto puede deberse al movimiento de los insectos desde la parcela biológica o a las condiciones ambientales como radiación solar, lluvias y el crecimiento de las plantas que hacen que el plaguicida sea degradado o diluido (Williams *et al.*, 1999; Al-Deeb *et al.*, 2001).

El estado fenológico del cultivo tuvo un efecto claro en el grado en el cual la población de artropofauna fue afectada por el tratamiento químico, observándose un mayor efecto en el estado joven del cultivo (11 ddg) y un efecto mucho menos drástico en un estado más avanzado (29 ddg) (Figura S4). Posiblemente el aumento del área foliar en el estado avanzado del cultivo genera dilución de los residuos de plaguicida y reduce la capacidad de penetración del producto, permitiendo una mayor supervivencia de artrópodos.

En contraste, el tratamiento con nucleopoliedrovirus no disminuyó las poblaciones de artropofauna asociadas al cultivo de maíz. Esto refleja la alta especificidad de los baculovirus, los cuales generalmente afectan una cantidad muy limitada de especies cercanamente relacionadas (Gröner, 1986).

Otros autores han evaluado el efecto de la aplicación de bioplaguicidas a base de baculovirus sobre especies no blanco, como el estudio realizado por Armenta *et al.* (2003), quienes determinaron que la aplicación de nucleopoliedrovirus para el control de *S. frugiperda* en cultivos de maíz en México no causó efecto alguno sobre enemigos naturales como el parasitoide *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae) ni sobre otras especies de insectos no blanco, en comparación con la aplicación del insecticida químico clorpirifos, el cual redujo en más del 50% la población de insectos dos días después de la aplicación. El mantenimiento de poblaciones naturales de insectos en los cultivos es importante, puesto que muchos de ellos tienen un papel relevante en el ecosistema ejerciendo funciones como polinizadores, parasitoides y depredadores que ayudan a mantener controladas las poblaciones de otros insectos. Aparte de los aspectos mencionados, se debe considerar la capacidad de transmisión horizontal que tienen los baculovirus en campo y cómo esta transmisión puede estar asociada a la presencia de enemigos naturales en el cultivo (Moscardi, 1999; Williams *et al.*, 1999; Grzywacz *et al.*, 2008).

CONCLUSIÓN

El bioplaguicida a base del NPV de *S. frugiperda* para el control del gusano cogollero del maíz presentó la misma eficacia que los insecticidas químicos utilizados para el control de este insecto, razón por la cual se podría reemplazar el uso de agroquímicos para el control de este insecto plaga en cultivos semicomerciales. Además, se demostró una buena persistencia en el campo, y su impacto sobre otras especies de artrópodos asociados al cultivo es mínimo o nulo, en comparación con los productos químicos.



Bibliografía

- AL-DEEB, M.; WILDE, G.; ZHU, K.** (2001). Effect of insecticides used in corn, sorghum and alfalfa on the predator *Orius insidiosus* (Hemiptera: Anthocoridae). *Journal of Economic Entomology* 94: 1353 – 1360.
- ARMENTA, R.; MARTÍNEZ, M.; CHAPMAN, J.; MAGALLANES, R.; GOULSON, D.; CABALLERO, P.; CAVE, R.; CISNEROS, J.; VALLE, J.; CASTILLEJOS, V.; PENAGOS, D.; GARCÍA, F.; WILLIAMS, T.** (2003). Impact of a Nucleopolyhedrovirus Bioinsecticide and Selected Synthetic Insecticides on the Abundance of Insect Natural Enemies on Maize in Southern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 96 (3): 649 – 661.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ- FERBER, M.; WILLIAMS, T.** (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. Navarra, España. 518 p.
- ESCRIBANO, A.; WILLIAMS, T.; GOULSON, D.; CAVE, R.; CHAPMAN, J. W.; CABALLERO, P.** (1999). Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology*.
- FERNÁNDEZ J.** (2001). Ecología y elementos para el control biológico y cultural de insectos plagas del maíz en cuatro municipios de la provincia Granma, Cuba. Tesis Doctoral, Universidad Central de Las Villas. Cuba. 198 pp.
- GARCÍA, F.; MOSQUERA, A.; VARGAS, C.; ROJAS, L.** (1999). Manejo integrado del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Boletín técnico Corpoica – Pronatta. 24. pp. 24.
- GARCÍA, F.; PULIDO, J.** (1988). Plagas del maíz y su manejo. IX Seminario Manejo de Enfermedades y Plagas del Maíz. Programa Cooperativo de investigación agrícola para la subregión andina. Palmira, Colombia.
- GRÖNER, A.** (1986). Specificity and safety of baculoviruses. The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology. Vol. 1. Academic, San Diego, CA. pp.177 - 202.
- GRZYWACZ, D.; MUSHOBOZIB, M.; PARNELLA, M.; JOLLIFEC, F.; WILSON, K.** (2008). Evaluation of *Spodoptera exempta* nucleopolyhedrovirus (SpexNPV) for the field control of African armyworm (*Spodoptera exempta*) in Tanzania. *Crop Protection* 27: 17-24.
- GUPTA, R.; RAINA, J.; ARORA, R.; BALI, K.** (2007). Selection and field effectiveness of Nucleopolyhedrovirus isolates against *Helicoverpa armigera* (Hubner). *International Journal of Virology*. 3 (2): 45-59.
- MORENO, C. E.** (2001). Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza. 84 pp.
- MOSCARDI, F.** (1999). Assessment of the application of Baculoviruses for control of lepidoptera. *Annual Review of Entomology*. 44: 257-289.

- OVIES, J.** (2003). Biopesticides in cuban agriculture. En: Proceedings of the international symposium on biopesticides for developing countries. CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp. 93-97.
- RANGA RAO, G.; RUPELA, O.; RAMESHWAR RAO, V.; REDDY, V.** (2007). Role of biopesticides in crop protection: present status and future prospects. Indian Journal of Plant Production, 35 (1): 1-9.
- SHAPIRO, M.** (1995). Radiation protection and activity enhancement of viruses. En: Biorrational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. Editorial FR Hall. Estados Unidos. 153-164.
- THIEM, S.; CHENG, X.** (2009). Baculovirus host-range. Virologica Sinica. 24 (5): 436-457.
- WILLIAMS, T.; GOULSON, P.; CABALLERO, P.; CISNEROS, J.; MARTÍNEZ, A.; CHAPMAN, J.; ROMAN, D.; CAVE, R.** (1999). Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small scale maize growers in Latin America. Biological Control 14: 67 - 75.
- WILLINK, E.; OSORES, V.; COSTILLA, M.** (1994). Ataque de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en diferentes fechas de siembra del maíz en Tucumán. Rev. Ind. y Agríc. de Tucumán, 71(1-2): 69-72.





Terminó de imprimirse
en febrero de 2012 en



Tel: 893 7710
Bogotá, DC, Colombia

