



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales
Programa de Maestría en Producción Agropecuaria con
opción terminal Agrícola



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES

PRODUCCIÓN SEMI-MASIVA DE UN BACULOVIRUS Y USO DE
FOTOPROTECTORES EN SUS FORMULADOS PARA EL CONTROL DEL
GUSANO COGOLLERO *Spodoptera frugiperda* J. E. SMITH

TESIS

Para obtener el grado académico de:

Maestro en Producción Agropecuaria

PRESENTA:

BIOL. EDER GERVASIO ROSAS

Directora de tesis:

DRA. ANA MABEL MARTÍNEZ CASTILLO
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Codirector de tesis:

DR. SAMUEL PINEDA GUILLERMO
Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Morelia, Michoacán, México, enero de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por permitirme desarrollar mi tesis dentro de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiar mi tesis.

A la Dra. Ana Mabel Martínez Castillo, por ayudarme a continuar mi formación académica, y ser mi guía en el camino del conocimiento y ayudar a enamorarme de la ciencia, por ser más que una figura de enseñanza, ser una amiga, muchas gracias.

A mis sinodales, Dr. Samuel Pineda Guillermo, Dr. José Isaac Figueroa de la Rosa, Dr. Benjamín Gómez Ramos, Dr. Fernando Tamayo Mejía, por haberme acompañado en este camino.

A la Universidad Federal de Lavras por ser el vínculo para llevar a cabo mi estancia de investigación en Embrapa Milho e Sorgo, en Minas Gerais Brasil.

Al Dr. Fernando Hercos Valicente por brindarme su apoyo y amistad durante mi estadía en Embrapa.

A todos mis amigos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, por brindarme momentos de alegría que pasamos juntos durante estos años, al igual que a mis amigos de Brasil por haberme hecho sentir en casa a pesar de estar alejado miles de kilómetros, los llevaré siempre en mi corazón.

DEDICATORIA

Sin pensar más de una vez a quien dedicar esta obra de mi vida, la dedico a mi familia a mis padres, hermanos, primos y tíos por ser mis segundos padres, porque son ellos quienes me han dado la fuerza de voluntad para seguir a delante cada vez que tropiezo, quienes son el pilar de mi alegría, fortaleza, valor y humildad para ser quien soy ahora, porque ustedes son quienes me han enseñado el verdadero significado del amor, y porque gracias a ustedes estoy cumpliendo un sueño más, muchas gracias familia.

Una dedicatoria especial a la mujer que amo, Diosinancy Pérez de la O, por brindarme la dicha de ser padre y a amar a un ser con pureza y fervor sin siquiera conocerle aún.

Estas palabras son para ti hija, nunca olvidaré el día cuando tu mamá me dio la noticia de tu existencia, quiero decirte que ese día lo declaro como el más feliz de mi vida, las lágrimas que derramé al saber de ti son las más puras que he derramado porque estaban llenas de amor, querida hija con la mano en el corazón te prometo esforzarme por ser el mejor padre, por ser tu mejor amigo y apoyarte cada vez que lo necesites, te prometo brindarte todo mi amor y cariño. Mi alma ahora se encuentra en plenitud al saber que compartiré mi vida contigo, espero pronto tu llegada hija mía, con amor papá.

Contenido

I. RESUMEN	7
II. ABSTRACT	9
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. ANTECEDENTES	13
4.1. Baculovirus	13
4.1.1. Generalidades.....	13
4.1.2. Estructura de los baculovirus.....	13
4.1.3. Ciclo de infección.....	14
4.1.3.1. Infección primaria.....	14
4.1.3.2. Infección secundaria.....	15
4.1.4. Sintomatología	16
4.2. Sistema de reproducción in vivo de los baculovirus	16
4.3. Efecto del medio ambiente en los baculovirus	17
4.4. Sustancias fotoprotectoras en formulaciones de baculovirus	17
4.5. Importancia del maíz y <i>S. frugiperda</i>	18
4.5.1. Daños causados por <i>S. frugiperda</i>	19
4.5.2. Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i> y su distribución geográfica	19
4.5.3. Métodos de control de <i>S. frugiperda</i>	20
4.6. El Nucleopoliedrovirus múltiple de <i>S. frugiperda</i>	22
V. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos particulares	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1. Cría del insecto	24
6.2. Replicación de los virus	24
6.3. Evaluación de dietas semi-sintéticas para la cría de <i>S. frugiperda</i>	25
6.4. Producción semi-masiva del Sf-MER	27
6.5. Efecto de la luz UV sobre formulados de virus en condiciones de laboratorio	29
6.5.1. Diseño del experimento	29
6.6. Efecto de compuestos fotoprotectores del SfMNPV en plantas de maíz	30

6.6.1. Experimento de semi-campo en México.....	30
6.6.1.1. Cultivo de las plantas de maíz	30
6.6.1.2. Diseño del experimento	30
6.6.1.3. Análisis de datos.....	31
6.7. Experimento semi-campo en Brasil.....	31
6.7.1. Cultivo de las plantas de maíz	31
6.7.1.1. Diseño del experimento	32
VII. RESULTADOS	33
7.1. Evaluación de dietas para la cría de <i>S. frugiperda</i>	33
7.2. Producción semi-masiva del SfMNPV	34
7.3. Efecto de compuestos fotoprotectores del SfMNPV en laboratorio y en plantas de maíz en México y Brasil	35
7.3.1. Experimento en laboratorio	35
7.3.2. Experimento de semi-campo en México.....	39
7.3.3. Experimento de semi-campo en Brasil.....	42
VIII. DISCUSIÓN.....	43
IX. CONCLUSIONES	49
X. BIBLIOGRAFÍA	50

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de infección de los baculovirus (imagen tomada de Infante-Rodríguez, 2013).....	15
Figura 2. Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i>	20
Figura 3. Porcentaje de mortalidad acumulada en larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a los diferentes tratamientos con exposición UV artificial en condiciones de laboratorio.	38

Índice de cuadros

Cuadro 1. Ingredientes de las tres dietas utilizadas.	26
Cuadro 2. Escala visual para estimar el daño ocasionado por <i>S. frugiperda</i> al cultivo del maíz (Fernández y Expósito, 2000).....	31
Cuadro 3. Peso de lavas (tercero y quinto estadio) y pupas de <i>S. frugiperda</i> (promedio \pm EE) de individuos que se alimentaron con tres diferentes dietas semi-sintéticas.....	33
Cuadro 4. Promedio de peso inicial y previo a la muerte en larvas de cada uno de los tratamientos evaluados.	34
Cuadro 5. Promedio de peso de larvas de <i>S. frugiperda</i> previo a la muerte y producción de OBs/larva entre los distintos tratamientos (ver descripción de tratamientos en el texto).....	35
Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad larvaria en los diferentes tratamientos a exposición de UV artificial en condiciones de laboratorio.....	37
Cuadro 7. Promedio de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> en experimento con plantas de maíz en México.	40
Cuadro 8. Promedio de daño la hoja de maíz en los diferentes tratamientos, según la escala de Fernández y Expósito, (2000).....	41
Cuadro 9. Porcentaje promedio de mortalidad (\pm EE) de larvas de <i>S. frugiperda</i> expuestas a los distintos tratamientos aplicados sobre plantas de maíz y después de seis horas de exposición solar.	42

I. RESUMEN

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), es la plaga de mayor importancia del maíz, *Zea mays* L., en América y su nucleopoliedrovirus múltiple (SfMNPV) es un baculovirus altamente patogénico que puede ser una alternativa de control al uso de los insecticidas químicos. En el primer objetivo de este estudio se evaluó el efecto de tres dietas semi-sintéticas, elaboradas a base de harina de soya, sémola de maíz y harina de garbanzo, sobre el desarrollo y reproducción de este insecto. *Spodoptera frugiperda* se desarrolló satisfactoriamente sobre las tres dietas ensayadas debido a que no observaron diferencias significativas en el peso de las larvas ni en la reproducción. En el segundo objetivo se evaluaron tres sistemas para la producción semi-masiva de un aislado mexicano del SfMNPV (Sf-MER). En dos de estos sistemas, las larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* se individualizaron en contenedores de plástico para la replicación del virus (exposición al virus durante todo el experimento o sólo por 24 h) y, en el otro sistema, la replicación del patógeno se realizó en larvas mantenidas en grupos. En los tres sistemas se usó como base la dieta elaborada con harina de soya y las larvas se inocularon con una concentración del virus de 1×10^9 OBs/ml (del inglés occlusion body). La productividad del virus en uno de los sistemas de larvas individualizadas (2.85×10^9 OBs/mg larva) fue significativamente igual a la obtenida en la infección de larvas en grupo (2.50×10^9 OBs/mg larva), pero en este último hubo una pérdida de 29% de larvas por canibalismo. En la última parte de este estudio se evaluó, en condiciones de laboratorio y semi-campo, el efecto de tres compuestos (Tinopal C1101-1%, melaza-10% y aceite de soya-0.5%) como fotoprotectores del SfMNPV, esto debido a que uno de los factores que limitan el uso de insecticidas baculovirus incluyen la inactivación del virus por radiación solar UV. Para el experimento de laboratorio, se utilizaron hojas de tres plantas hospederas de *S. frugiperda* (maíz, sorgo [*Sorghum vulgare* Pers.] y soya [*Glycine max* L.]), las cuales se trataron con un aislado del SfMNPV proveniente de Brasil (“aislado 6”) en mezclas con cada uno de los fotoprotectores. Posteriormente, las hojas se expusieron a luz UV artificial durante 50 min. La mayor mortalidad de larvas se registró en las hojas de sorgo (rango de 8.75 a 68.7%) seguido por las de soya (rango de 3.12 a 56.2%) y maíz (rango de 3.12 a 37.5%). En el experimento de semi-campo se evaluó el efecto de los mismos fotoprotectores en México y Brasil, sobre los aislados Sf-MER y “aislado 6”,

respectivamente, sobre plantas de maíz. En el experimento de México, la actividad biológica del virus, después de 2 h de exposición solar, fue muy alta tanto en el tratamiento de virus solo como en los tratamientos de virus combinado con los fotoprotectores (entre 93 y 100%). Sin embargo, en el último tiempo de exposición solar (4 h) se observó una disminución en la mortalidad del insecto (entre 10 y 17%). En el experimento de Brasil, el rango de mortalidad fue menor (entre 41 y 74 %) y el mayor porcentaje de mortalidad de larvas se presentó en el tratamiento Melaza (10%) + virus ($73.75 \pm 8.53\%$). En conclusión, las tres dietas ensayadas pueden utilizarse como base para la producción *in vivo* del SfMNPV en larvas individualizadas o en grupos de larvas. El uso de los fotoprotectores aquí estudiados aún amerita futuros estudios debido a que sus efectos fueron variables y dependieron de la planta hospedera.

Palabras clave: control biológico, bioinsecticidas, dietas, plagas, maíz.

II. ABSTRACT

The armyworm, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), is the most important pest of maize, *Zea mays* L., in the Americas and its multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) is a highly pathogenic baculovirus that can be a control alternative to use of chemical insecticides. The first objective of this study was evaluated the effect of three semi-synthetic diets, elaborated based on soybean, corn and chickpea flour, on the development and reproduction of this insect. *Spodoptera frugiperda* developed satisfactorily on the three diets tested because they did not observe significant differences in larval weight or reproduction. In the second objective, three systems were evaluated for the semi-massive production of a Mexican isolate of SfMNPV (Sf-MER). In two of these systems, fourth-instar larvae of *S. frugiperda* were individualized in plastic containers for virus replication (continuous exposition of virus throughout the experiment or for 24 h only) and, in the other system, the pathogen was replicated in larvae maintained in groups. In the three systems, the diet based on soybean flour was used and the larvae were inoculated with a concentration of the virus at 1×10^9 OBs (occlusion bodies)/ml. The productivity of the virus in one of the systems of individualized larvae (2.85×10^9 OBs/mg larva) was significantly equal to that obtained in the infection of larvae in the group (2.50×10^9 OBs/mg larva), but in the latter there was a 29% loss of larvae due to cannibalism. In the last part of this study, the effect of three compounds (Tinopal C1101-1%, molasses-10% and soybean oil-0.5%) as photoprotectors of the SfMNPV was evaluated in laboratory and semi-field conditions, since factors limiting the use of baculovirus insecticides include inactivation of the virus by UV solar radiation. In the laboratory experiment, leaves from three host plants of *S. frugiperda* (corn, sorghum [*Sorghum vulgare* Pers.] and soybean [*Glycine max* L.]) were used, which were treated with an isolated SfMNPV from Brazil ("Isolated 6") in mixtures with each photoprotector. Subsequently, the leaves were exposed to artificial UV light during 50 min. The highest mortality of larvae was recorded in sorghum leaves (range from 8.75 to 68.7%) followed by soybean (range from 3.12 to 56.2%) and corn (range from 3.12 to 37.5%). In the semi-field experiment, the effect of the same photoprotectors described above in Mexico and Brazil was evaluated on the Sf-MER and "isolated 6" isolates, respectively, on maize plants. In the Mexican experiment, the biological activity of the virus, after 2 h of solar UV radiation, was very high both in the

treatment of viruses alone and in the treatments of viruses combined with the photoprotectors (between 93 and 100%). However, in the last time of solar exposure (4 h) a decrease in insect mortality was observed (between 10 and 17%). In the Brazilian experiment, the mortality was lowest (between 41 and 74%) and the highest percentage of larval mortality was observed in the molasses treatment (10%) + virus ($73.75 \pm 8.53\%$). In conclusion, the three diets tested can be used as a basis for the *in vivo* production of SfMNPV in individualized larvae or larval groups. The use of the photoprotectors studied here still merits future studies because their effects were variable and depended on the host plant.

Key words: Biological control, bioinsecticides, diets, pests, corn.

III. INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae), es considerado una de las plagas más importantes del maíz, *Zea mays* L., en México y otros países de América. Es una especie endémica del hemisferio occidental que se distribuye desde el sureste de Canadá hasta Chile y Argentina, incluyendo todas las islas del Caribe (Sparks, 1979). El principal método de control contra el gusano cogollero es el uso de insecticidas químicos; sin embargo, el uso excesivo de estos compuestos afecta negativamente a la salud humana, a los insectos no blanco y el medio ambiente (Williams *et al.*, 1999). Esta situación ha incrementado la necesidad de estudiar opciones ecológicamente más aceptables para el control de este insecto.

La familia Baculoviridae es la más numerosa y ampliamente estudiada, con aplicaciones en programas de control de plagas agrícolas y forestales (Moscardi, 1999; Williams *et al.*, 1999; Cisneros *et al.*, 2002; Armenta *et al.*, 2003). En general, los baculovirus (BVs) se caracterizan por ser altamente infectivos y específicos de insectos (Moscardi, 1999). Un aspecto fundamental para el desarrollo de los baculovirus como agentes de control biológico, es la optimización y estandarización de sus procesos de producción. Así mismo, la selección del tipo de formulación es básica para lograr un mejor impacto para controlar las especies plaga. Debido a ello, la explotación comercial de un baculovirus requiere del desarrollo de tecnologías que hagan posible su producción a un costo aceptable (Mihm, 1983; Lasa *et al.*, 2008).

Actualmente, los bioinsecticidas elaborados a base de BVs que se encuentran en el mercado son el resultado del sistema de producción *in vivo*. Este sistema involucra la inoculación de cantidades masivas de larvas, la cría del huésped durante la replicación del virus y la obtención de los cuerpos de inclusión (OBs, del inglés occlusion body) (Sciocco de Cap, 2001), y para la producción masiva del huésped es necesaria la exploración de dietas semi-sintéticas para la alimentación del insecto huésped es un punto clave que puede repercutir directamente en la cantidad y calidad del virus producido y en los costos de producción (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Etzel y Legner, 1999). Debido a ello, las dietas deben cumplir con los requerimientos nutricionales básicos para lograr un buen desarrollo, supervivencia y reproducción (Shapiro, 1986; Cohen, 2001). Estas dietas incluyen fuentes

ricas en carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas y minerales, además de aditivos que permitan proveer aceptabilidad por parte de las larvas como el uso de emulsificantes, agentes gelificantes (agar o carragenina) fagoestimulantes y atrayentes, entre otros (Gervasio, 2015; Carroll *et al.*, 1997; Johnson y Felton, 2001). Aunado a ello, un aspecto importante que se debe considerar para la producción *in vivo* es el uso de contenedores que permitan una adecuada distribución de los insectos y que mantengan condiciones de temperatura y humedad homogéneas que sean óptimas para el desarrollo de los insectos. Para la reducción de costos, se deben considerar tanto el tamaño de éstos como el tipo de dieta y la densidad de larvas que se introducirán en el sistema (Zamora, 2013; Shapiro, 1986).

Por otro lado, la radiación solar es el factor más destructivo o limitante que afecta la persistencia y/o actividad de los BVs. Debido a ello, varias investigaciones han propuesto evaluar sustancias que, incorporadas en sus formulados, permitan incrementar su efectividad en condiciones de campo (Williams y Cisneros, 2001). Estudios recientes indican que aislados del nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* (SfMNPV) colectados en zonas agrícolas de México, tienen un alto potencial insecticida y pueden ser utilizados para el control del gusano cogollero (García-Banderas, 2016), pero aún se requieren más estudios que permitan generar un insumo que pueda ser utilizado por los agricultores. En el presente estudio se pretende explorar dietas semi-sintéticas modificadas para la cría del insecto huésped, un sistema que optimice la producción semi-masiva del SfMNPV y el uso de sustancias fotoprotectoras que incrementen la persistencia del inóculo sobre plantas de maíz.

IV. ANTECEDENTES

4.1. Baculovirus

4.1.1. Generalidades

La familia Baculoviridae incluye virus ocluidos que poseen ADN de doble cadena y afectan invertebrados, especialmente insectos (Miller, 1997; Caballero *et al.*, 2001). Estos virus se caracterizan por tener un pequeño espectro de hospederos y una alta patogenicidad y virulencia, lo que les confiere características ideales como agentes de control biológico de plagas (López, 2010). El genoma de los baculovirus se encuentra empacado en viriones con forma de bastón y ocluidos dentro de una matriz proteica conocida como cuerpo de oclusión (OB, por sus siglas en inglés) los cuales proveen protección a ciertas condiciones ambientales (Rohrmann, 2014).

Los viriones se presentan en dos formas: viriones derivados de OBs (ODV) y viriones brotados (BV), los cuales son similares en la estructura de su nucleocápsida, pero difieren en su origen, composición de las envolturas y papel en el ciclo infectivo del virus (Miller, 1997). La familia Baculoviridae está compuesta por cuatro géneros, *Alfabaculovirus* (nucleopoliedrovirus, NPVs, de lepidópteros), *Betabaculovirus* (granulovirus, GVs, de lepidópteros), *Gammabaculovirus* (NPVs de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (NPVs de dípteros) (Jehle *et al.*, 2006). Existen actualmente más de 30 bioinsecticidas a base de baculovirus, los cuales se han utilizado para controlar a diversas plagas en todo el mundo tanto en ecosistemas agrícolas como forestales (Moscardi, 1999; Beas *et al.*, 2014). Por tal motivo, se han empezado a comercializar distintos productos que utilizan aislados nativos de baculovirus en la lucha contra algunas plagas, tanto en ecosistemas agrícolas como forestales (Cisneros *et al.*, 2002).

4.1.2. Estructura de los baculovirus

La nucleocápsida (NC) es una estructura cilíndrica que presenta una forma típica de bastón, asimétrica con una base en uno de los extremos y un ápice en el otro, en su interior se encuentra el ADN genómico viral enrollado, empaquetado y altamente condensado

(Federici, 1986). La principal función que esta estructura tiene es la de transportar la información genética del virus en una forma fuertemente compactada al interior de las células del hospedero y poder iniciar un proceso de transcripción y replicación del virus (Vialard *et al.*, 1995). El virión es el principal elemento infeccioso de los baculovirus, tanto en la dispersión del virus entre los individuos de una población como en los tejidos y órganos de un individuo. El virión se forma cuando este adquiere una membrana que tiene una estructura trilaminar, compuesta por dos capas de proteínas y una de lípidos (Rohrmann, 2008).

Una de las características de los baculovirus es que sintetizan altas cantidades de proteínas al final del proceso infeccioso, llamadas poliedrina para los NPVs y granulina para los GVs, las cuales son cristalizadas y forman una matriz proteica o OBs, los que a su vez son una forma de resistencia del virus, ya que constituyen una protección mecánica de los viriones a las agresiones ambientales y que les permite sobrevivir fuera de una célula hospedadora por periodos largos hasta ser ingeridos por un insecto susceptible. Los OBs son solubles en soluciones alcalinas como las que se dan en el tubo digestivo de algunos insectos (pH 9-11) (Granados y Williams, 1986), lo cual facilita la liberación de los viriones para que puedan iniciar una infección. En los NPVs, los OBs de las distintas especies de virus varían entre 0.5 y 15 μm y su forma puede ser cúbica, dodecaédrica, tetraédrica e irregular. El tamaño de los OBs de los granulovirus de las distintas especies es bastante homogéneo y varía entre 160 y 300 nm de ancho por 300-500 nm de largo (Federici, 1986).

4.1.3. Ciclo de infección

4.1.3.1. Infección primaria

El proceso de infección inicia cuando las larvas ingieren los OBs en el medio en el que se alimentan, aunque existen otros métodos de contaminación, tales como contaminación superficial de los huevos, la contaminación que se da dentro del huevo, el paso a través de los espiráculos y por parasitismo (Granados y Lawler, 1981; Mazzone, 1985). Una vez en el interior del huésped la matriz proteica de los OBs se solubiliza en el medio alcalino pH (9-11) (Lepore *et al.*, 1996, Wang y Granados, 2000). Los viriones son liberados y

atraviesan la membrana peritrófica y entran en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio por medio de fusión a la membrana citoplasmática, ya dentro de la membrana de la célula se dirigen al núcleo en donde se liberan el ADN viral, ya en el núcleo empieza la transcripción de genes y se genera una nueva descendencia del virus (Vialard *et al.*, 1995).

4.1.3.2. Infección secundaria

La contaminación de los demás tejidos es a causa de los BVs, la dispersión de los viriones a más células se da por endocitosis (Rorhmann, 2008) siguiendo dos rutas importantes de diseminación, que son los hemocitos y las células traqueales los cuales provocan una contaminación de múltiples órganos: epidermis, tejido adiposo, muscular, nervioso, reproductivo, granular y células pericardiales (Passarelli, 2011). Todo el proceso infeccioso tiene un fin que es la muerte de la larva y en una etapa muy tardía de la infección, las NC adquieren su envoltura en el núcleo (ODVs) mismos que se ocluyen en una matriz de poliedrina para formar los OBs que son liberados por lisis celular quedando disponibles para iniciar un nuevo ciclo de infección (Figura 1) (Rorhmann, 2008).

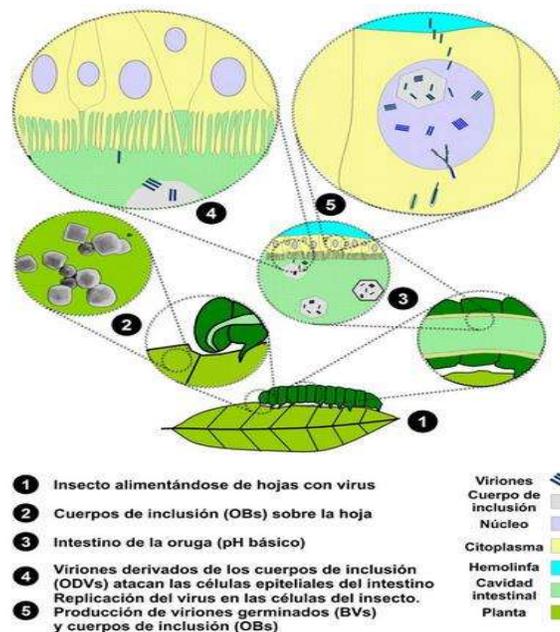


Figura 1. Proceso de infección de los baculovirus (imagen tomada de Infante-Rodríguez, 2013).

4.1.4. Sintomatología

Los síntomas causados por los baculovirus son notorios en aquellas especies que presentan una enfermedad avanzada después de la ingestión del virus. Los signos que se observan son una cutícula transparente o levemente pigmentada por los tejidos que han sido afectados, tornándose las larvas de color blanquecino o amarillento. Los insectos exhiben, además, una menor movilidad, mayor flacidez, pérdida de apetito y retraso en el desarrollo. En las infecciones producidas por NPVs en lepidópteros se observa que las larvas tienden a alejarse de su fuente de alimentación, migrando hacia las partes superiores de la planta, donde mueren colgadas de sus patas posteriores, lisándose y dejando disponible el inóculo para ser ingerido por otros individuos de la población plaga (Caballero *et al.*, 2009).

4.2 Sistema de reproducción in vivo de los baculovirus

Debido a que los virus son parásitos intracelulares obligados, la producción de baculovirus ya sea masiva o experimental se debe realizar en el individuo susceptible (*in vivo*) o en células de insectos producidas *in vitro* (Del Rincón *et al.*, 1997). Debido a ello, el uso de dietas artificiales juega un papel importante porque posibilita la obtención del virus con un mínimo nivel de contaminantes, en insectos criados asépticamente (Romero *et al.*, 2009). La técnica empleada para la obtención de inóculo consiste básicamente en alimentar larvas con dieta semi-sintética, la cual es superficialmente contaminada con la suspensión del virus o integrada a la dieta (Caballero *et al.*, 2009). Una vez que las larvas han sido infectadas, su desarrollo continúa bajo condiciones controladas de fotoperiodo y temperatura. Las larvas muertas son recogidas y los cadáveres triturados y homogenizados obteniendo una producción de OBs (Caballero *et al.*, 2009).

Algo de suma importancia es definir la dosis del inóculo, así como el estadio larvario más adecuado para inocular, ya que deben determinarse experimentalmente con el objetivo de asegurar la máxima producción de OBs por individuo con la mínima dosis de inoculación (Del Rincón *et al.*, 1997). Murhammer (1996) señala que un objetivo de la producción masiva es mantener una colonia de insectos altamente tecnificada y bajo condiciones óptimas de cría, que permita proveer cantidades masivas de individuos susceptibles, en forma continua y sincronizada para producir los OBs. Todo esto con la

mejora de contenedores para la cría de insectos y producción de virus con dietas bajas en costos. Otro aspecto importante es que tanto las dietas para los insectos como los sistemas de cría masiva, deben ser específicamente desarrollados para cada sistema hospedero-baculovirus (Caballero *et al.*, 2009).

4.3. Efecto del medio ambiente en los baculovirus

La habilidad de los baculovirus para permanecer activos depende en su mayoría de las condiciones del medio ambiente (Young, 2005). Al respecto, se ha demostrado que la temperatura por encima de 50 °C puede producir la inactivación del virus en cuestión de minutos (Young, 2005); sin embargo, las temperaturas bajas mantienen su viabilidad durante varios años (Batista *et al.*, 2001). Otros de los factores de importancia es el pH, ya que valores alcalinos superiores a 8-9 la inactivación de los virus puede ocurrir en minutos, mientras que a valores cercanos a la neutralidad es estable (Young, 2005).

La exposición solar es el factor más destructivo de los baculovirus (Sporleder *et al.*, 2000), ya que después de cuatro horas de exposición a la radiación solar los baculovirus pierden su actividad hasta un 92% (Tamez-Guerra *et al.*, 2010). Los daños se ven reflejados en la molécula de ADN provocando lesiones directas como el rompimiento de la hebra en la molécula de ADN debido a la formación de dímeros de pirimidina, impidiendo así su replicación y la consecuente formación de viriones nuevos (Wakefield *et al.*, 2004, Devotto y Gerding, 2003, Chaparro, 2008). Debido a esta limitante se recomienda la aplicación del bioinsecticida en horas de menor incidencia de radiación solar (Caballero *et al.*, 2001).

4.4. Sustancias fotoprotectoras en formulaciones de baculovirus

La formulación de los baculovirus consiste en reducir o eliminar los factores que limitan la eficacia del producto. Además del efecto protector, se ha comprobado la capacidad que poseen algunos compuestos fotoprotectores para potenciar la actividad insecticida de los baculovirus.

De acuerdo al modo de acción, estas sustancias se clasifican con las siguientes denominaciones i) **absorbentes**: sustancias que se caracterizan por tener un amplio espectro de absorción de radiación UV (Ballesteros, 2006); entre ellas el carbón activado,

rojo congo, sulfato de lignina y tinta india, entre otros (Williams y Cisneros, 2001); ii) **abrillantadores ópticos:** también conocidos como blanqueadores ópticos, son un grupo de derivados del estilbena, que tiene una capacidad de absorber la radiación UV y emiten luz en la región azul del espectro visible. Los abrillantadores ópticos son ampliamente utilizados en la industria textil, papel y plásticos, para dar brillo (Shapiro, 1992). Shapiro y Robertson (1990) describieron su uso como fotoprotector para los baculovirus con buenos resultados, con éstos, se ha demostrado que los virus formulados con abrillantadores mantienen hasta el 100% de su actividad insecticida hasta después de dos semanas de exposición a la radiación solar. iii) **Colorantes y aceites:** éstos también han demostrado tener un efecto fotoprotector, ya que la mayoría absorbe la radiación UV, como resultado de esta actividad se ha probado la actividad de colorantes como, el índigo, el carmín, los cuales obtuvieron resultados satisfactorios en la fotoestabilidad del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Ragaei, 1999), también colorantes como el verde de lissamida, amarillo de acridina, el azul alcalino y el mercurio cromo han resultado efectivos, pues redujeron la inactivación del nucleopoliedrovirus de la palomilla *Lymantria dispar* L. (Shapiro y Robertson, 1990). El aceite de soya, que es de origen vegetal, también ha sido probado como protector de baculovirus contra la radiación solar por Gómez y Rumiatto (1987) en Brasil, donde se aplicó como protector del virus de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) registrando una fotoprotección de 80 a 93%.

4.5. Importancia del maíz y *S. frugiperda*

El maíz, *Zea mays* L., es uno de los cultivos más importante a nivel mundial, ocupa el tercer lugar después del trigo y del arroz, produciendo 1,025.6 millones de toneladas (FIRA, 2017). En México, el maíz es el cultivo de mayor importancia, desde el punto de vista alimentario, industrial y social (Guzmán-Soria *et al.*, 2011). La producción de maíz en México se divide principalmente en maíz blanco y amarillo con una producción de 23.6 y 3.5 millones de toneladas, respectivamente (SAGARPA, 2016). Este cultivo es atacado por varias especies de insectos, estos pueden alimentarse tanto del área foliar como de la semilla. Las especies más importantes que se pueden mencionar son: *S. frugiperda*; *Diabrotica balteata* Leconte y *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae); gallina ciega, *Phyllophaga* spp., *Cyclocephala* spp., (Coleoptera: Scarabaeidae); gusanos cortadores,

Agrotis ipsilon (Hufnagel), *Agrotis* spp; gusano soldado *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae); trips, *Frankiniella* spp., (Thysanoptera: Thripidae); ácaros *Tetranychus* spp., *Paratetranychus* spp., *Olygonychus* spp., (Trombidiformes: Tetranychidae); y el frailecillo *Macrodactylus* sp., (Coleoptea: Scarabidae) (CIMMYT, 1987). El gusano cogollero es la plaga que se documentará a mayor profundidad por ser el objeto de este estudio.

4.5.1. Daños causados por *S. frugiperda*

Los dos primeros estadios larvales de la plaga se alimentan de la hoja a manera de raspaduras sin romper el parénquima, lo que le da una apariencia de “ventanas”. Posteriormente, las larvas se trasladan al cogollo, el cual es punto de crecimiento de la planta y puede provocar daños que retrasan el desarrollo de la planta. Los estadios larvales más avanzados se localizan en el suelo, barrenan los tallos de la plántula a nivel del cuello. Ocasionalmente, algunas larvas grandes penetran el elote ya sea en la base o en la parte media de éste, destruyendo los granos y favoreciendo la entrada de otros insectos y patógenos (Bautista, 2006), posteriormente el sexto estadio larval penetra en el suelo para pupar a una profundidad de 3 a 5 cm (Pacheco, 1994).

Es bien conocido que *S. frugiperda* es la principal plaga del maíz, sin embargo, la plaga también tiene hospederos alternos. Casmuz *et al.* (2010) realizaron una revisión bibliográfica de los hospederos del gusano cogollero e identificaron un total de 186 de plantas distribuidas en 42 familias.

4.5.2. Ciclo de vida de *S. frugiperda* y su distribución geográfica

El gusano cogollero es un insecto que presenta una metamorfosis completa u holometábola, es decir, presentan los estados de desarrollo de huevo, larva, pupa y adulto (Figura 2). La duración del ciclo depende de las condiciones del ambiente, aproximadamente entre 35 y 40 días y depende de la temperatura y la humedad (Murúa *et al.*, 2003). La etapa de huevo tiene una duración que puede estar en un rango de tres a cinco días (Montes-Molina *et al.*, 2009). La duración de la etapa larval y de pupa es variable según las condiciones climáticas y el tipo de alimentación. Murúa *et al.* (2003) mencionan que puede durar ~14-22 días y para la pupa el tiempo estimado de desarrollo es de ~7-13 días, los cuales los pasa

generalmente en el suelo (Murúa *et al.*, 2003). Los adultos son palomillas con alas anteriores café grisáceo y presentan dimorfismo sexual, con una longevidad de 10 a 12 días en promedio (Murúa *et al.*, 2003).

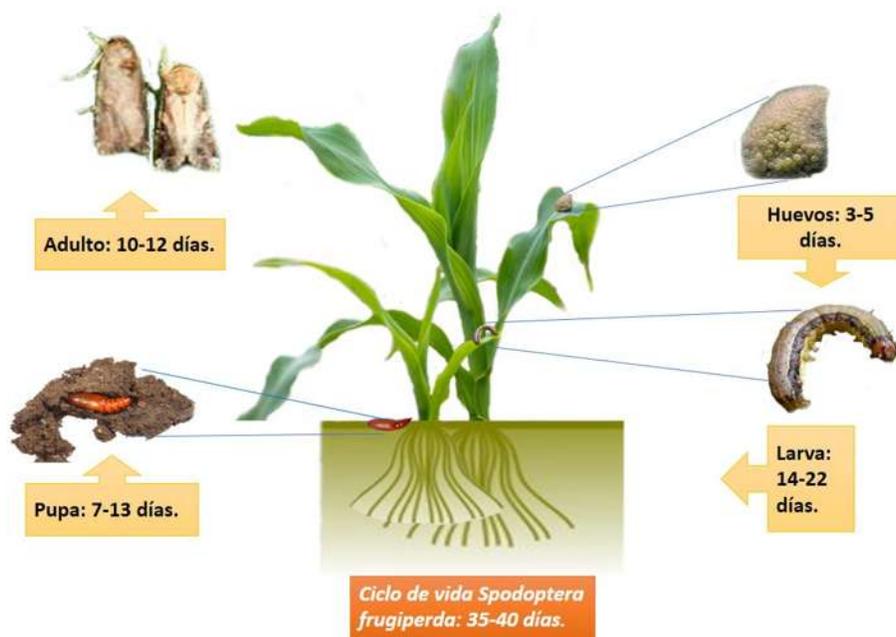


Figura 2. Ciclo de vida de *S. frugiperda*.

Spodoptera frugiperda es un insecto tropical cuya distribución se extiende desde Argentina hasta Norteamérica (López-Edwards *et al.*, 1999; Pashley *et al.*, 2004; Busato *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Martinelli *et al.*, 2007). Recientemente, se reportó su presencia en el continente Africano (Goergen, 2016). Busato *et al.* (2004) señalan que este insecto es considerado como una de las plagas primarias de cultivos de maíz y secundaria en algodón, arroz y algunas hortalizas en Estados Unidos y Brasil. De igual manera, la distribución de esta plaga es bastante amplia en México (Bautista, 2006; Hernández *et al.*, 2008).

4.5.3. Métodos de control de *S. frugiperda*

El principal método de control es el uso de insecticidas químicos debido a la rápida acción que éstos ofrecen (McConnell y Hruska, 1993); sin embargo, existen prácticas culturales

que ayudan a regular a las plagas. A continuación, sólo se mencionan al control químico y biológico.

Control químico. Este método de control es ampliamente utilizado por los agricultores, por su velocidad de acción, costos y fácil aplicación (McConnell y Hruska, 1993). Los piretroides, fosforados y carbamatos son ampliamente usados para el control de *S. frugiperda*. Sin embargo, el uso excesivo en las aplicaciones de estos productos aumenta su nivel de resistencia. Además, dichos productos perjudican al humano, medio ambiente e insectos benéficos (Jiménez, 2009). En el período 1987-1990 en México se realizó un monitoreo sistémico de resistencia en el gusano cogollero del maíz, estudio que señaló alta resistencia a insecticidas organofosforados (Pacheco-Covarrubias, 1993). En el año 1991 aumentaron los casos documentados de resistencia en poblaciones de *S. frugiperda* provenientes de Gainesville, Florida, Estados Unidos de América, las cuales mostraron niveles de resistencia moderados, a insecticidas de los principales grupos químicos (organofosforados, carbamatos y piretroides), como resultado de la enorme presión de selección a la que fue sometido el insecto en esa zona productora de maíz (Yu, 1991).

Control biológico. Una de las formas de manejar poblaciones plaga, que consiste en el uso de uno o más organismos para reducir la densidad plaga, a su vez se puede definir como el uso de organismos benéficos (enemigos naturales) contra poblaciones plaga para reducir las a una escala donde no puedan causar daño económico (DeBach, 1982). Nicholls (2008) y Badii y Abreu (2006) hacen mención de los siguientes enemigos naturales entomófagos para este lepidóptero: i) depredadores: chinche pirata, *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae); crisopas, *Chrysoperla carnea* Stephens (Neuroptera: Chrysopidae); catarinas, *Cycloneda sanguinea* L., *Hippodamia convergens* (Guerin) y *Olla abdominalis* (Say) (Coleoptera: Coccinellidae), ii) parasitoides: *Chelonus insularis* Cresson y *Meteorus laphygmae* Viereck, (Hymenoptera: Braconidae) y iii) agentes entomopatógenos tales como: *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin y *Entomophthora aulicae* (Reichardt), protozoarios; *Nosema laphygmae* Weiser, nematodos; *Hexameris* sp. y bacterias como *Bacillus thuringiensis* (Berliner) y los baculovirus (NPV y GV) (Garden y Fuxa, 1980).

4.6. El Nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda*

El SfMNPV ha sido estudiado intensivamente desde comienzos de la década de los 70s, debido al potencial que tiene en su uso como bioinsecticida (Summers y Anderson, 1973). Se ha demostrado que este virus es capaz de generar epizootias cuando su huésped se encuentra en altas densidades (Hamm y Young, 1971). Es altamente patogénico en contra de su hospedero homólogo el gusano cogollero y con una virulencia semi-permisiva para hospederos alternos como los lepidópteros *S. exigua* y *Spodoptera littoralis* (Simón *et al.*, 2004). En países como Colombia, Brasil, Perú, Honduras y México se han realizado estudios para validar que SfMNPV es efectivo en laboratorio y campo (Moscardi, 1999; Barrera *et al.*, 2011). En México y Honduras se realizaron experimentos en campo y se comprobó una mortalidad de aproximadamente 40% al ser aplicado en solución acuosa a 6×10^{12} OBs/ha de maíz (Williams *et al.*, 1999). Sin embargo, debido a su baja deficiencia ante la radiación solar se necesitan realizar más estudios que validen el uso de distintas sustancias fotoprotectoras.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar tres dietas semi-sintéticas para la cría de *S. frugiperda*, la producción semi-masiva del SfMNPV y el efecto de sustancias fotoprotectoras en sus formulados sobre plantas de maíz.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar tres dietas semi-sintéticas para la cría del gusano cogollero.
- Evaluar tres sistemas para la producción semi-masiva *in vivo* del SfMNPV.
- Evaluar el efecto de sustancias fotoprotectoras en formulados del SfMNPV de un aislado mexicano y otro brasileño sobre plantas de maíz.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cría del insecto

Los individuos de *S. frugiperda* utilizados en la presente investigación provinieron de una colonia establecida en el laboratorio de Entomología Agrícola del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF). Los adultos se alimentaron con una solución de miel de abeja al 15% y las larvas con una dieta semi-sintética modificada de Mihm (1983), la cual se describe en el apartado 4.4. Como sustrato de oviposición para los adultos se utilizaron bolsas de papel de estraza del No. 12, mismas que se reemplazaron periódicamente. Las condiciones ambientales de cría y de los bioensayos se mantuvieron en $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $75 \pm 5\%$ de HR y 16:8 (L: O).

6.2. Replicación de los virus

Aislado mexicano. El aislado denominado Sf-MER se obtuvo del laboratorio de Patología de Insectos del IIAF, cuya actividad biológica fue previamente estudiada por García-Banderas (2016) y que procede de muestras de suelo colectadas en cultivos de maíz de la Península de Yucatán. Para incrementar el inóculo, se realizó un pase de replicación en larvas de cuarto estadio mediante la técnica de inoculación de la gota (Hughes y Wood, 1981). Las larvas infectadas y muertas con evidentes síntomas del virus se maceraron y purificaron mediante filtración. Por último, el virus se cuantificó en una cámara de conteo Neubauer (10^{-4}cm^3) a 40x con un microscopio con contraste de fases. Finalmente, la suspensión del virus (2.47×10^7 OBs/ml) se almacenó a -20°C hasta su uso. Con este aislado se realizaron los experimentos de evaluación del sistema *in vivo*, así como la evaluación del efecto de sustancias fotoprotectoras sobre plantas de maíz en semi-campo en México.

Aislado brasileño. El aislado denominado “aislado 6” se colectó en el año 2006 en larvas de *S. frugiperda* infectadas sobre plantas de higerilla, *Ricinus communis* L. Posteriormente, el virus se depositó en el banco de patógenos de la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA), Institución Estatal Federal Pública Brasileña vinculada al

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento de Brasil. Para incrementar el inóculo, se realizó un pase de replicación en larvas de cuarto estadio mediante la ingestión de hoja contaminada. Para ello, hojas de maíz contaminadas con el virus a una concentración de 6.9×10^8 OBs/ml se colocaron en contenedores de plástico con capacidad de 2 L y después se liberaron 400 larvas que previamente habían estado sin alimentarse durante 8 h. Después de 48 h, las larvas se transfirieron e individualizaron en bandejas (20 cm de ancho x 28.30 cm de largo) subdividas en 16 celdas provistas con dieta semi-sintética libre de virus. Una vez que las larvas manifestaron los síntomas de infección, se colectaron y se obtuvo el virus, el cual se purificó y cuantificó obteniendo una concentración de 6.9×10^7 OBs/ml. Con este inóculo se realizaron los experimentos para evaluar el efecto de la luz UV sobre formulados con sustancias fotoprotectoras en condiciones de laboratorio y semi-campo en Brasil.

6.3. Evaluación de dietas semi-sintéticas para la cría de *S. frugiperda*

Se evaluaron tres dietas para la cría del insecto: i) una dieta estándar ampliamente utilizada para la cría de nóctuidos (dieta modificada de Mihm, 1983), ii) una dieta descrita por el CIMMYT (1987) con algunas modificaciones, y iii) una dieta basada en harina de garbanzo (Polanía *et al.*, 2009) con algunas modificaciones (Cuadro 1). En general, las modificaciones de las dietas se basaron en la sustitución y/o disminución del 50% de la harina de soya, la adición de harina de maíz y garbanzo, una reducción del germen de trigo, la sustitución de las vitaminas Varnderzant por vitaminas de uso pecuario Vitafort® A (Ciudad de México, México) y la exclusión del formaldehído (Cuadro 1). Los minerales más esenciales se determinaron con base a la fórmula de las sales de Wesson's (Elvira *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Ingredientes de las tres dietas utilizadas.

Ingredientes gr/ml	Dieta		
	Estándar	Estándar-modificada	Garbanzo
Agua destilada	1000	900	1000
Agar	14	10	10
Germen de trigo	31.7	4	4
Harina de garbanzo	0	0	183.3
Sémola de maíz	0	70	0
Harina de soya	81	40	0
Levadura de cerveza	25	20	60
Azúcar	13	0	0
Ácido benzoico	1.6	1.6	1.6
Ácido ascórbico	4.3	4	4
Sales Wesson	5.25	5	5
Nipagin	1	1	1
Ácido acético	12	12	12
Cloruro de colina	7.3	7.3	7.3
Antibiótico	2	2	2
Vitaminas	1	1	1

El desarrollo y la reproducción de una colonia de laboratorio de *S. frugiperda* se evaluaron cuando las larvas se alimentaron con las tres dietas distintas. Para ello, un grupo de aproximadamente 100 larvas neonatas se colocaron en contenedores de plástico de medio litro y se les permitió alimentarse con la dieta correspondiente hasta que mudaron al tercer estadio. Posteriormente, se seleccionaron 50 larvas al azar, las cuales se pesaron y colocaron, individualmente, en vasos de plástico de 28 ml de capacidad (Envases Cuevas, S. A. de C.V, México). En cada vaso se colocó un cubo de dieta (~ 1.5 g) y, conforme el avance de la alimentación de las larvas, la dieta se reemplazó periódicamente. Se realizaron

tres repeticiones por cada dieta. Los individuos se pesaron, por segunda ocasión, cuando las larvas mudaron al quinto estadio y cuatro días después de la formación de la pupa.

Las condiciones ambientales de las crías fueron las mismas que las mencionadas en el apartado de *Cría del insecto*. Las variables de respuesta fueron peso de larvas en tercer y quinto estadio, peso de pupas al tercer día después de su formación y reproducción (fecundidad y fertilidad). Para determinar la fecundidad y fertilidad de las hembras provenientes de cada dieta, se utilizaron 10 parejas de adultos vírgenes (24 h de edad). Cada pareja se colocó en una bolsa de papel estraza del No. 2. En cada bolsa se colocó un vaso de plástico de 10 ml que contenía algodón impregnado con una solución de miel de abeja al 15%. Una vez que inició el periodo de oviposición, las bolsas de papel se reemplazaron diariamente y se contabilizó el número de huevos por masa por día. Todos los adultos se revisaron diariamente hasta su muerte. El porcentaje de eclosión de larvas se determinó en base a las masas de huevos de la segunda oviposición. Se consideraron huevos fértiles aquellos donde existió formación y eclosión de la larva, mientras que los infértiles fueron aquellos donde no existió formación de la larva. Los datos de todas las variables determinadas se analizaron con el programa SAS mediante el modelo lineal generalizado (GLM). La separación de medias se realizó mediante la prueba de metodología de mínimos cuadrados ($P \leq 0.05$.)

6.4. Producción semi-masiva del Sf-MER

Todos los experimentos de producción semi-masiva se realizaron con el virus Sf-MER a una concentración que provocó ~90% de mortalidad ($\sim 1 \times 10^9$ OBS/ml), dicha concentración se determinó mediante ensayos previos. La producción del virus se llevó a cabo con el uso de la dieta estándar-modificada del experimento anterior. Se realizaron tres tratamientos que se explican a continuación.

Tratamiento 1. La dieta se cortó en láminas de aproximadamente 1.5 cm de ancho por 15 cm de largo y 5 mm de alto, las cuales se colocaron en contenedores de plástico transparente (19 cm de ancho \times 26 cm de largo). Se aplicó el inóculo del aislado Sf-MER sobre la dieta y se dejó secar por 30 minutos. Posteriormente, se introdujeron 50 larvas de

cuarto estadio de *S. frugiperda* con un periodo de ayuno de 12 h. Después de 24 horas de consumo de la dieta, las larvas se trasladaron a cajas de cultivo celular de 24 celdas donde se continuaron alimentando con la misma dieta hasta su muerte. Previo a la muerte, las larvas se colocaron en microtubos de 1.5 ml y se preservaron a -20°C. Posteriormente, se procedió a la cuantificación de la producción de OBs por mg de larva con base a la técnica publicada por Lasa *et al* (2008).

Tratamiento 2. La dieta se vertió en un contenedor de ~ 24.5 × 24.5 cm con la cantidad suficiente para tener un grosor de ~ 5 mm. Después de su secado, el inóculo se dispersó con una espátula metálica y se dejó secar por una hora. Posteriormente, sobre la dieta se colocó una rejilla de plástico con celdas de ~ 15 × 15 mm provista por el fondo con una malla metálica de acero inoxidable y se colocaron individualmente 50 larvas de cuarto estadio con las mismas condiciones de ayuno que el sistema anterior. La rejilla se cubrió con una malla metálica para evitar el escape de las larvas y permitir una adecuada ventilación. La colecta de las larvas y cuantificación de la producción de virus se realizaron de la misma forma que en el tratamiento 1.

Tratamiento 3. Las condiciones de este tratamiento fueron las mismas que las del tratamiento 1, con excepción de que las larvas no se retiraron del contenedor después de 24 horas de alimentarse con la dieta tratada. Después de este tiempo, la dieta tratada con virus se sustituyó por una dieta sin tratar. Las larvas permanecieron en el contenedor alimentándose hasta el momento justo previo a la muerte y de esta manera poder observar la pérdida por canibalismo.

En los tres tratamientos, las larvas se pesaron individualmente antes de colocarlas sobre la dieta. Se realizaron tres repeticiones con 50 larvas por repetición. Se tomó una muestra al azar que representó el 30% de larvas muertas por repetición para cuantificar la producción del virus. Los análisis de peso larvario y producción del virus se realizaron con el programa SAS mediante GLM. La separación de medias se realizó mediante la prueba de metodología de mínimos cuadrados ($P \leq 0.05$.)

6.5. Efecto de la luz UV sobre formulados de virus en condiciones de laboratorio

Para el presente experimento se utilizó un virus procedente de Brasil “aislado 6” a una concentración de 6.9×10^7 OBs/ml. Se evaluaron los siguientes tratamientos: i) Virus solo, ii) Virus + el abrillantador óptico Tinopal® C1101 al 1% (muestra de laboratorio de Ciba Especialidades Químicas, México, D. F. (Velasco *et al.*, 2010), iii) Virus + melaza de caña de azúcar al 10% (Martignoni e Iwai, 1985), y iv) Virus + Aceite de Soya al 0.5% (Sinhá®, Indústria Brasileira, Óleo de Soja Refinado).

6.5.1. Diseño del experimento

Se utilizaron cajas de Petri de cristal de 13.5 cm de diámetro x 2.5 de altura, en las cuales se vertieron 45 ml de cada uno de los formulados mencionados anteriormente. Estas cajas se colocaron en una campana de radiación de 130 cm de ancho por 67 cm de altura provista con una lámpara de luz ultravioleta con un rango de 200 a 280 nm. La altura entre la base de las cajas de Petri y la lámpara fue de 60 cm. Las cajas de Petri que contenían los formulados se expusieron a la luz durante 50 min, con excepción del tratamiento que contenía el virus solo, el cual se utilizó como punto de referencia. Posteriormente, cada formulado se vertió a una bolsa de plástico transparente y se colocaron 32 piezas iguales (~2.5 cm × 1.5 cm) de hojas de maíz, sorgo o soya previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1%. Las bolsas se cerraron y se agitaron para permitir la adhesión del virus sobre las hojas.

Una vez que las piezas de hojas de maíz, sorgo o soya se trataron con los formulados, se colocaron individualmente en dos bandejas con 16 celdas cada una y se dejaron secar durante 30 min. Después de este tiempo, se colocaron individualmente larvas de segundo estadio y se dejaron alimentar durante 48 h. Posteriormente, las piezas de hojas de los distintos tratamientos se retiraron y se colocó un trozo de dieta semi-sintética libre de virus por cada celda. La mortalidad larvaria se registró durante siete días después de la aplicación. Se realizaron 32 repeticiones por cada uno de los tratamientos, considerándose a cada larva como una repetición. De los resultados obtenidos por la prueba GLM (software SAS versión 9.0), únicamente se analizaron los resultados correspondientes a las 72 y 168

horas después de la aplicación del tratamiento (hpt), esto porque en dicho periodo se observó la mayor mortalidad larvaria durante la evaluación del experimento.

6.6. Efecto de compuestos fotoprotectores del SfMNPV en plantas de maíz

6.6.1. Experimento de semi-campo en México

6.6.1.1. Cultivo de las plantas de maíz

Se utilizaron las semillas de maíz de la var. H-318, las cuales se sembraron en bolsas negras para invernadero (25 cm de ancho × 35 cm de profundidad) en el invernadero del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Las condiciones de siembra y mantenimiento de las plantas se realizaron como lo describe Velasco *et al.* (2010). Las plantas utilizadas para el experimento fueron de ~ 30 días de edad, las cuales se fertilizaron con 250 ml de la solución nutritiva al 50% de Steiner (1984) cada cuatro días de los siguientes macro: Ca [NO₃]₂, MgSO₄, KH₂PO₄, KNO₃ y K₂SO₄ y micronutrientes: manganeso, boro, zinc, cobre y molibdeno (Kelatex-Multi®, San Nicolás de Los Garza, Nuevo León, México).

6.6.1.2. Diseño del experimento

Se aplicaron los mismos tratamientos que los descritos en el experimento anterior, con excepción del formulado con aceite de soya, el cual se excluyó debido al bajo efecto fotoprotector que se observó en el experimento anterior. Se utilizó el aislado del virus Sf-MER a una concentración de 2.47×10^7 OBs/ml. Se utilizaron plantas de maíz de ~25 cm de altura (var. H-318), las cuales se asperjaron a punto de goteo. Las aspersiones se realizaron bajo la sombra y, una vez que las hojas se sacaron, se tomó la primera muestra de hojas (tiempo cero). Posteriormente, las plantas se trasladaron a cielo abierto durante 4 h. Se realizaron dos cortes de hojas a las 2 y 4 hpt. Las hojas se cortaron desde su base y llevaron al laboratorio para colocarlas a un contenedor de plástico (~ ¼ de L) con una tapa acondicionada para permitir la ventilación y evitar el escape de las larvas. Por cada hoja se colocaron 16 larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*. Después de 24 h, las larvas se transfirieron a vasos individuales provistos con dieta semi-sintética. Previo a ser expuestas al tratamiento, las larvas se pusieron en ayuno durante 8 h. La mortalidad larvaria se

cuantificó diariamente a partir del tercer día y durante ocho días. Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento (una planta por repetición). Además, se evaluó el daño en las hojas de cada uno de los tratamientos según la escala de Fernández y Expósito (2000) (Cuadro 2).

Cabe señalar que este experimento se realizó durante el mes de junio (día 8), en un horario de 12:00 a 16:00 pm, horario en que había una longitud de onda de 302 nm (Weatherspark, 2018), longitud de onda que se encuentra radiación UV tipo B.

Cuadro 2. Escala visual para estimar el daño ocasionado por *S. frugiperda* al cultivo del maíz (Fernández y Expósito, 2000).

Grado	Características del daño
1	Ningún daño visible, o solamente de 1-3 daños en forma de ventana.
2	Más de 3 daños en forma de ventana, y/o 1-3 daños menores de 10 mm.
3	Más de 3 daños menores de 10 mm, y/o 1-3 daños mayores de 10 mm.
4	De 3-6 daños mayores de 10 mm, y/o verticilo destruido más del 50 %.
5	Más de 6 daños mayores de 10 mm, y/o verticilo totalmente destruido.

6.6.1.3. Análisis de datos. Los datos de mortalidad larvaria de todos los experimentos se analizaron con el software SAS versión 9.0 mediante una prueba de Modelos Lineales Generalizados (GLM). La separación de medias se realizó mediante la metodología de mínimos cuadrados (LS-Means).

6.7. Experimento semi-campo en Brasil

6.7.1. Cultivo de las plantas de maíz

Se utilizaron las semillas de maíz del híbrido Syngenta, las cuales se sembraron en macetas de plástico (42 cm de ancho x 40 cm de profundidad). Durante aproximadamente 20 días las plantas se regaron dos veces al día. Cuando las plantas tuvieron una altura aproximada de 30 cm se fertilizaron en una sola ocasión con urea ((NH₂)₂CO) (~ 10 g por maceta). Por cada maceta se sembraron 4 plantas.

6.7.1.1. Diseño del experimento

Se aplicaron los mismos tratamientos que los descritos en el experimento anterior, pero en este caso se utilizó una concentración del virus de 6.9×10^7 OBs/ml. Las macetas con las plantas de maíz se expusieron a la luz solar durante aproximadamente 6 horas y se realizaron las aplicaciones con cada uno de los tratamientos. Para esto, se utilizó un aspersor manual a un volumen de 300 ml por tratamiento. Después, cada hoja de maíz se cortó en 16 partes iguales, las cuales se colocaron en una bandeja de crianza (20 cm de ancho x 28.30 cm de largo) de 16 celdas (un corte de hoja por celda). En cada celda se colocó una larva de *S. frugiperda* de seis días de edad (segundo estadio) para su alimentación durante 24 h. Después de este periodo, los cortes de hojas de maíz se retiraron y se remplazaron por un trozo de dieta semi-sintética libre de virus en cada celda. Cada corte de hoja de maíz expuesta a una larva se consideró como una repetición. La mortalidad por virus se registró diariamente durante 12 días. El experimento se realizó durante el mes de marzo (día 17), en un horario de 10:00 a 16:00 pm, horario en el que había una longitud de onda de 291 nm (Weatherspark, 2018), longitud de onda que se encuentra radiación UV tipo B (Martignoni e Iwai, 1985).

VII. RESULTADOS

7.1. Evaluación de dietas para la cría de *S. frugiperda*

Peso de larvas y pupas. Las dietas estándar, estándar-modificada y dieta-garbanzo permitieron un adecuado desarrollo del insecto. No se observaron diferencias significativas entre estas tres dietas cuando las larvas se pesaron en el tercero y quinto estadio. Sin embargo, el peso de las pupas que se formaron en las dietas estándar y dieta-garbanzo fue significativamente mayor comparado con la dieta estándar-modificada ($P < 0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Peso de lavas (tercero y quinto estadio) y pupas de *S. frugiperda* (promedio \pm EE) de individuos que se alimentaron con tres diferentes dietas semi-sintéticas.

Dietas	Etapas de desarrollo		
	Tercer estadio	Quinto estadio	Pupa
Estándar	2.66 \pm 2.23 a	92.52 \pm 2.23 a	224.69 \pm 2.29 b
Estándar-modificada	2.88 \pm 2.23 a	89.99 \pm 2.23 a	215.41 \pm 2.43 a
Dieta-garbanzo	2.98 \pm 2.23 a	97.31 \pm 2.23 a	218.86 \pm 2.34 b

Literales dentro de la misma columna, seguidas por la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Reproducción. La fecundidad de los adultos que procedieron de las larvas alimentadas con las tres dietas semi-sintéticas no mostró un cambio significativo ($P \geq 0.05$). La cantidad de huevos total por hembra se observó en promedios de 1321 \pm 126.10, 1371 \pm 100 y 1240 \pm 106 ($F_{2,80} = 0.39$; $P = 0.7$) (dieta estándar, estándar-modificada y dieta-garbanzo, respectivamente). Así mismo, no se observaron cambios significativos entre dietas en el porcentaje de eclosión de huevos: 94 \pm 0.02, 93 \pm 0.02 y 95 \pm 0.02%, para cada dieta, respectivamente ($P \geq 0.05$).

7.2. Producción semi-masiva del SfMNPV

No se encontraron diferencias significativas en los pesos ($P \geq 0.05$) iniciales de las larvas de *S. frugiperda* del testigo y las destinadas para los distintos tratamientos (rango de 10.42 ± 0.22 a 10.58 ± 0.20), con excepción del tratamiento 2 cuyos pesos fueron ligeramente mayores (11.41 ± 0.17) comparados con su respectivo testigo (10.50 ± 0.17) (Cuadro 4). En relación con los pesos previos a la muerte, las larvas que se infectaron con el tratamiento 2 tuvieron un peso significativamente mayor (97.5 ± 4.56 mg) comparado con el tratamiento 1 (59.50 ± 3.21) y 3 (48.53 ± 6.87) ($P < 0.05$) (Cuadro 4). Cabe señalar que en el tratamiento 3 se observó una pérdida de $29 \pm 4\%$ de larvas por canibalismo.

Cuadro 4. Promedio de peso inicial y previo a la muerte en larvas de cada uno de los tratamientos evaluados.

Tratamiento	Peso inicial larvas testigo	Peso inicial larvas virus	Peso previo a la muerte
Tratamiento 1	10.58 ± 0.20 a	10.66 ± 0.20 a	59.50 ± 3.21 b
Tratamiento 2	10.50 ± 0.17 a	11.41 ± 0.17 b	97.50 ± 4.56 c
Tratamiento 3	10.41 ± 0.28 a	10.42 ± 0.22 a	48.54 ± 6.87 a

Literales dentro de la misma columna, seguidas de la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$) (ver descripción de los tratamientos en el texto).

El mayor peso promedio de las larvas previo a la muerte por virus se observó en el tratamiento 2, aunque éste no fue significativamente distinto del tratamiento 1 (Cuadro 5). Las larvas del tratamiento 3 tuvieron significativamente el menor peso promedio ($P \geq 0.05$). Por otro lado, la menor producción de OBs por larva se observó en el tratamiento 1. No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos 2 y 3, cuyas tasas de producción de virus fueron 1.4 y 1.3 veces más altas, respectivamente, comparadas con el primer tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Promedio de peso de larvas de *S. frugiperda* previo a la muerte y producción de OBs/larva entre los distintos tratamientos (ver descripción de tratamientos en el texto).

	Tratamientos	N	Promedio
Peso/mg^a	1	49	90.64 ± 5.41 b
	2	56	107.04 ± 7.10 b
	3	20	60.25 ± 10.86 a
OBS/larva^b	1	44	1.96 X 10 ⁹ ± 8.47 X10 ⁷ a
	2	54	2.50 X 10 ⁹ ± 9.69 X10 ⁷ b
	3	20	2.85 X 10 ⁹ ± 4.02 X10 ⁸ b

Literales entre los tratamientos seguida por la misma letra no son significativamente distintas ($P \leq 0.05$). ^aF_{2,106} = 7.428, $P \leq 0.001$; ^bF_{2,106} = 9.864, $P < 0.001$.

7.3. Efecto de compuestos fotoprotectores del SfMNPV en laboratorio y en plantas de maíz en México y Brasil

7.3.1. Experimento en laboratorio

El inicio de la mortalidad larvaria se observó a las 72 hpt (Cuadro 6). El Virus c/UV se obtuvo 3% de muerte en todos los casos, mientras que en el Virus s/UV se observó una mortalidad entre 9.4 ± 0.04 y 18.7 ± 0.04 %. El menor porcentaje correspondió para el tratamiento con hojas de soya. No se observaron diferencias significativas entre las hojas de maíz y sorgo. En la combinación Virus + Tinopal (1%) c/UV la mortalidad fue significativamente mayor en las hojas de soya (43.7 ± 0.04) y maíz (34.4 ± 0.04) comparado con las hojas de sorgo (12.5 ± 0.04). En la combinación Virus + Melaza (10%) c/UV la mortalidad fue significativamente mayor en las hojas de maíz (43.7 ± 0.04) comparado con sorgo (15.6 ± 0.04). No se observó mortalidad en el bioensayo con soya. En la combinación Virus + Aceite de Soya (0.5%) c/UV únicamente se observó mortalidad en las hojas de sorgo (3.1 ± 0.04). No se observó mortalidad larvaria en ninguno de los testigos.

A las 168 hpt, el tratamiento Virus c/UV provocó un porcentaje de muerte significativamente mayor (68.75 ± 0.04) en las hojas de sorgo comparado con las hojas de

maíz y soya. En el Virus s/UV no se observaron diferencias significativas entre las hojas de sorgo (46.87 ± 0.04) y soya (43.75 ± 0.04), pero ambos valores fueron mayores comparado con maíz (34.37 ± 0.04). En la combinación Virus + Tinopal (1%) c/UV, la mortalidad fue significativamente mayor en sorgo ($43.75 \pm 0.04\%$) y maíz (37.50 ± 0.04). En contraste, en las combinaciones Virus + Melaza (10 %) c/UV y Virus + Aceite de Soya (0.5%) c/UV, la mayor mortalidad se observó en soya (56.25 ± 0.04 y 37.50 ± 0.04) seguido de sorgo (31.25 ± 0.04 y 18.75 ± 0.04) y maíz (3.12 ± 0.04 y 9.37 ± 0.04 , respectivamente). No se observó mortalidad larvaria en ninguno de los testigos. En el mismo periodo de tiempo (168 hpt), las combinaciones con Virus s/UV y Virus + Tinopal (1%) c/UV provocaron el mayor porcentaje de mortalidad en las hojas de maíz (34.7 ± 0.04 y 37.50 ± 0.04 respectivamente), mientras que en las hojas que sorgo, el Virus c/UV provocó una mortalidad significativamente mayor (68.75 ± 0.04) con respecto al resto de los tratamientos. No se observaron diferencias significativas entre las combinaciones Virus s/UV y Virus + Tinopal (1%) c/UV (46.89 ± 0.04 y 43.75 ± 0.04 , respectivamente). Finalmente, en las hojas de soya tratadas con el Virus + Melaza (10%) c/UV se observó la mayor mortalidad (56.25 ± 0.04) con respecto al resto de los tratamientos (rango entre 43.75 ± 0.04 y 3.12 ± 0.04) (Cuadro 6).

Asimismo, la tendencia de muerte acumulada al final del experimento mostró un patrón distinto en algunos casos (Figura 3). En el caso del maíz y la soya, la mayor mortalidad (> 90% y entre 60 y 80%, respectivamente) se observó en las combinaciones Virus s/UV, Virus + Melaza (10%) c/UV y Virus + Tinopal (1%) c/UV, mientras que en sorgo la mayoría de los tratamientos provocaron > 80%. En todos los casos, la combinación con aceite de soya provocó el menor nivel de muerte (entre 30 y 40%) (Figura 3). Los resultados de la mortalidad total acumulada, considerado en los tres tipos de hoja para cada tratamiento, mostraron que la combinación Virus + Melaza al (10%) c/UV provocó la mayor mortalidad; sin embargo, no fue significativamente diferente con respecto a las combinaciones con Tinopal C1001 (1%) y Virus c/UV ($P < 0.005$).

Cuadro 6. Porcentaje de mortalidad larvaria en los diferentes tratamientos a exposición de UV artificial en condiciones de laboratorio.

Tratamientos	Tiempo post-exposición a UV (h)			Tiempo post-exposición a UV (h)		
	72 hpt ¹			168 hpt		
	Maíz	Sorgo	Soya	Maíz	Sorgo	Soya
Testigo	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.00 ± 0.04 Aa	0.00 ± 0.04 Aa	0.00 ± 0.04 Aa	0.00 ± 0.04 Aa
Virus con UV	3.12 ± 0.04 Aa	3.12 ± 0.04 Aa	3.1 ± 0.04 Aa	15.62 ± 0.04 Bb	68.75 ± 0.04 Ec	3.12 ± 0.04 Aa
Virus sin UV	18.7 ± 0.04 Ba	15.6 ± 0.04 Ba	9.4 ± 0.04 Aa	34.37 ± 0.04 Ca	46.87 ± 0.04 Db	43.75 ± 0.04 Dab
Virus + Tinopal (1%) c/UV	34.4 ± 0.04 Cb	12.5 ± 0.04 Ba	43.7 ± 0.04 Bb	37.50 ± 0.04 Cb	43.75 ± 0.04 Db	25.00 ± 0.04 Ba
Virus + Melaza 10 % c/UV	43.7 ± 0.04 Dc	15.6 ± 0.04 Bb	0.0 ± 0.04 Aa	3.12 ± 0.04 Aa	31.25 ± 0.04 Cb	56.25 ± 0.04 Ec
Virus + Aceite de Soya (0.5%) c/UV	0.0 ± 0.04 Aa	3.1 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	9.37 ± 0.04 ABa	18.75 ± 0.04 Ba	37.50 ± 0.04 Ca

¹Horas posteriores al tratamiento.

Literales en la misma columna seguidos de la misma letra (mayúscula) no difieren significativamente ($P \geq 0.05$). Literales en la misma fila para las diferentes hojas seguidas de la misma letra (minúscula) no difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

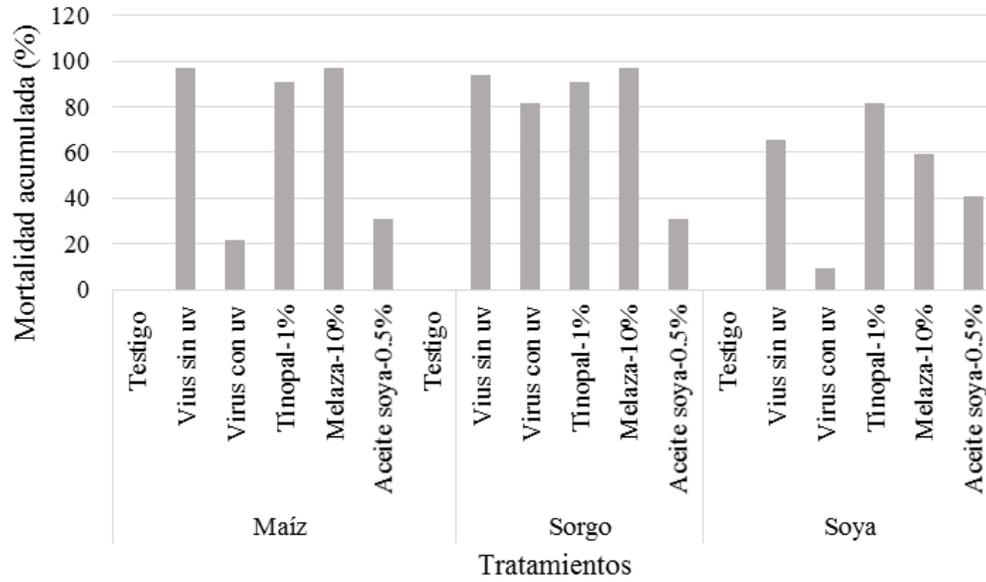


Figura 3. Porcentaje de mortalidad acumulada en larvas de *S. frugiperda* expuestas a los diferentes tratamientos con exposición UV artificial en condiciones de laboratorio.

7.3.2. Experimento de semi-campo en México

En general, en los tres tiempos de exposición solar (0, 2 y 4 h), la mortalidad larvaria que se observó en los tratamientos libres de virus (Agua, Melaza y Tinopal) fue menor al 17% (Cuadro 7). Sin embargo, en el resto de los tratamientos la mortalidad total acumulada fue mayor al 83%. En el tiempo cero, la mayor mortalidad se observó entre las 96 y 120 hpt en todos los tratamientos y disminuyó significativamente en las horas posteriores. A las 2 h de exposición solar, se observó un rango de mortalidad entre 5 y 36% al considerar todas las horas observadas después del tratamiento. La mayor mortalidad larvaria se observó desde las 96 hpt en los tratamientos virus solo (18.42 ± 0.04) y Melaza (10%) + Virus (36.84 ± 0.04) y, a las 120 hpt, en la combinación Tinopal (1%) + Virus (44.44 ± 0.04). A las 4 h de exposición solar, se observó un rango de mortalidad entre 3 y 31% al considerar todas las horas observadas después del tratamiento. La mayor mortalidad larvaria se observó desde las 120 hpt para los tratamientos Virus solo (22.22 ± 0.04) y Tinopal (1%) + Virus (30.66 ± 0.04), mientras que en la combinación Melaza (10%) + Virus, la mayor mortalidad se observó 24 h más tarde (144 hpt) (30.66 ± 0.04) (Cuadro 7). En general, la mortalidad acumulada después de 2 h de exposición solar fue muy alta tanto en el tratamiento Virus solo como en los tratamientos del virus combinado con los fotoprotectores (rango entre 93 al 100%). Sin embargo, en el último tiempo de exposición solar (4 h) se observó una disminución del porcentaje de muerte entre el 10 y 17%.

Cuadro 7. Promedio de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* en experimento con plantas de maíz en México.

Horas de exposición solar	Horas post-tratamiento	Agua	Melaza	Tinopal	Virus	Melaza (10%) + Virus	Tinopal (1%) + Virus
0	72	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	8.3 ± 0.04 Aa	22.2 ± 0.04 Bc	0.0 ± 0.04 Aa
	96	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	28.9 ± 0.04 Ab	28.9 ± 0.04 Bc	28.9 ± 0.04 Bc
	120	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	38.8 ± 0.04 Cc	38.8 ± 0.04 Cd	41.7 ± 0.04 Bd
	144	8.3 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	11.1 ± 0.04 Aa	8.3 ± 0.04 Ab	13.9 ± 0.04 Bb
	168	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	2.8 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	11.1 ± 0.04 Aab
	192	2.7 ± 0.04 Aa	11.1 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa
	Total	11.1 ± 0.02	11.1 ± 0.02	0.0 ± 0.02	90.1 ± 0.02	98.4 ± 0.02	95.5 ± 0.02
2	72	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	8.3 ± 0.04 Aa	25.0 ± 0.04 Ba	5.5 ± 0.04 Aa
	96	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	18.4 ± 0.04 Aa	36.8 ± 0.04 Bb	34.2 ± 0.04 Bb
	120	5.5 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	2.9 ± 0.04 Aa	16.6 ± 0.04 Aa	13.9 ± 0.04 Ba	44.4 ± 0.04 Bb
	144	11.1 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	2.9 ± 0.04 Aa	16.6 ± 0.04 Aa	16.6 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa
	168	0.0 ± 0.04 Aa	8.3 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	16.6 ± 0.04 Ba	11.1 ± 0.04 ABac	0.0 ± 0.04 Aa
	192	0.0 ± 0.04 Aa	2.8 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	16.6 ± 0.04 Ba	0.0 ± 0.04 Ac	11.1 ± 0.04 Aa
	Total	16.6 ± 0.02	11.1 ± 0.02	5.7 ± 0.02	93.4 ± 0.02	100 ± 0.02	95.3 ± 0.02
4	72	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	11.1 ± 0.04 Aa	11.1 ± 0.04 ABa	2.9 ± 0.04 Aa
	96	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	5.2 ± 0.04 Ba	13.1 ± 0.04 Aa	10.5 ± 0.04 Aac
	120	2.9 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	5.5 ± 0.04 Aa	22.2 ± 0.04 BAb	8.3 ± 0.04 ABa	30.6 ± 0.04 ABb
	144	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	8.3 ± 0.04 Aa	30.6 ± 0.04 Bb	19.4 ± 0.04 Bcb
	168	2.9 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	0.0 ± 0.04 Aa	19.4 ± 0.04 Bc	19.4 ± 0.04 Ba	11.1 ± 0.04 Aac
	192	0.0 ± 0.04 Aa	16.6 ± 0.04 Bb	0.0 ± 0.04 Aa	16.6 ± 0.04 Bc	0.0 ± 0.04 Aac	8.3 ± 0.04 Aac
	Total	5.76 ± 0.02	16.6 ± 0.02	5.55 ± 0.02	83.0 ± 0.02	82.7 ± 0.02	82.9 ± 0.02

Literales en la misma columna seguidas de la misma letra minúscula no difieren significativamente ($P \leq 0.0001$). Literales en la misma columna seguidas de la misma letra mayúscula para los mismos días de cada tratamiento no difieren significativamente ($P \leq 0.0001$).

El nivel de daño foliar se observó en un rango entre 1.1 y 2.0 entre todos los tratamientos y horas evaluadas; sin embargo, la mayoría de los valores se observaron entre los niveles 1.1 y 1.7. A la 0 h de exposición solar, las hojas con la combinación Virus + Tinopal (2.06 ± 0.11) tuvieron el promedio de daño significativamente mayor comparado con los demás tratamientos, mientras que a las 2 h de exposición, las hojas expuestas al Tinopal solo y Virus + Tinopal presentaron mayor daño (1.64 ± 0.11 y 1.56 ± 0.11 respectivamente). Para la última hora de exposición (4 h), los tratamientos de Agua, Melaza, Tinopal solo y Virus solo fueron estadísticamente mayores a las combinaciones Virus + Melaza y Virus + Tinopal (Cuadro 8).

Cuadro 8. Promedio de daño la hoja de maíz en los diferentes tratamientos, según la escala de Fernández y Expósito, 2000.

Tratamiento	Horas de exposición solar		
	0	2	4
Agua	1.25 ± 0.11 a	1.44 ± 0.11 abc	1.47 ± 0.11 b
Melaza	1.19 ± 0.11 a	1.50 ± 0.11 abc	1.64 ± 0.11 b
Tinopal	1.72 ± 0.11 b	1.64 ± 0.11 bc	1.50 ± 0.11 b
Virus solo	1.25 ± 0.11 a	1.31 ± 0.11 a	1.53 ± 0.11 b
Virus + Melaza	1.39 ± 0.11 a	1.25 ± 0.11 a	1.11 ± 0.11 a
Virus + Tinopal	2.06 ± 0.11 c	1.56 ± 0.11 6 bc	1.17 ± 0.11 a

Literales dentro de la misma columna seguidas de la misma literal no difieren significativamente ($P \leq 0.0001$).

7.3.3. Experimento de semi-campo en Brasil

Cuando los resultados se analizaron en su conjunto, el mayor porcentaje de mortalidad larvaria se presentó en la combinación Virus + Melaza (10%) ($73.75 \pm 8.53\%$) (Cuadro 9). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos Virus solo, Virus + Tinopal (1%) y Virus + Aceite de Soya (0.5%) cuya mortalidad se observó alrededor del 40%. La mortalidad del testigo (Agua) (9.5%) fue significativamente menor comparado con todos los tratamientos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje promedio de mortalidad (\pm EE) de larvas de *S. frugiperda* expuestas a los distintos tratamientos aplicados sobre plantas de maíz y después de seis horas de exposición solar.

Tratamiento	Mortalidad
Agua	9.50 ± 8.53 a
Virus solo	40.75 ± 8.53 b
Virus +Tinopal (1%)	47.00 ± 8.53 b
Virus +Melaza (10%)	73.75 ± 8.53 c
Virus +Aceite de Soya (0.5 %)	42.25 ± 8.53 b

Literales de los tratamientos seguidas por la misma letra no son significativamente distintas ($P \leq 0.005$).

VIII. DISCUSIÓN

El gusano cogollero, *S. frugiperda*, se encuentra ampliamente distribuido en el continente Americano (Rangel *et al.*, 2014). Debido a su reciente expansión al continente Africano (Georgen *et al.*, 2016), las investigaciones en torno a este insecto han cobrado un creciente interés. Una parte de estas investigaciones se han enfocado en la cría semi-masiva de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio, la cual tiene como objetivo estudiar su biología (Ruíz *et al.*, 2015), proveer material biológico para reproducir entomopatógenos (ej., hongos, nematodos y virus) y/o evaluar el impacto de distintos métodos de control (Quinter, 2015). En el presente estudio se evaluó el desarrollo y la reproducción de esta plaga alimentada con tres dietas semi-sintéticas (dieta estándar, dieta estándar-modificada y dieta-garbanzo), todas ellas elaboradas con base en protocolos estándares, pero con algunas modificaciones (Mihm 1983; CIMMYT, 1987; Polanía *et al.*, 2009).

En general, no se observaron diferencias significativas entre los pesos de las larvas de tercer y quinto estadio que se alimentaron con las distintas dietas; sin embargo, el peso de las pupas fue mayor cuando las larvas se alimentaron con la dieta-estándar y la dieta-garbanzo (224.69 ± 2.29 y 218.86 ± 2.34 , respectivamente). Posiblemente, este resultado se relacione con un mayor peso acumulado (Llanderal, 2000) en el sexto estadio y/o con el aporte nutricional de cada una de estas dos dietas, las cuales se elaboraron con una mayor cantidad de levadura, sobre todo la dieta-garbanzo (60 g), componente que aporta una alta cantidad de proteínas (40-60%) seguido del germen de trigo (25%), harina de soya y sémola de maíz (Aguilar y Vélez, 2013). También es probable que este efecto ocurriera por la cantidad de proteínas que aportó la harina de soya y el germen de trigo en la dieta-estándar. Además, ambos compuestos son fuentes ricas de esteroides, los cuales son utilizados como componentes estructurales de las células y síntesis de reguladores de crecimiento naturales como la ecdisona (Cibrián-Tovar, 1994). Si bien, la sémola de maíz fue el compuesto de mayor proporción en la dieta-modificada (70 g), posiblemente su poca aportación como fuente de proteínas (5.8%) no contribuyó a incrementar el peso de las larvas en el último estadio y, consecuentemente en las pupas, comparado con las demás dietas.

En general, el peso de las pupas del gusano cogollero registrado en el presente estudio coincide con los estudios de Martínez et al. (2004) y Huerta-Valdovinos (2015), quienes obtuvieron un peso de pupas entre un rango de 210 y 200 mg en individuos criados sobre dietas semi-sintéticas en condiciones de laboratorio. En otros estudios, López-Edwards *et al.* (1999) encontraron diferencias significativas en un rango de 156 a 215 mg entre cinco poblaciones mexicanas alimentadas con un genotipo de maíz. Villacorta y Cobo (1978) obtuvieron un peso promedio de pupas de 195 mg cuando las larvas se alimentaron con una dieta elaborada con base en frijol. Sin embargo, Busato *et al.* (2006) con una dieta similar con base en frijol, los pesos de pupas de *S. frugiperda* fueron mayores (entre 254 y 272 mg). Posiblemente, la variabilidad de peso observada en los anteriores estudios, incluido el presente, se relacione con las pequeñas o mayores diferencias entre las dietas y/o las condiciones de cría de los insectos bajo estudio.

En el presente estudio no se observaron diferencias en la reproducción de los individuos que se criaron con las tres dietas ensayadas. El número promedio de huevos/hembra (rango entre 1371 ± 100 y 1240 ± 106) coinciden con el estudio de Huerta-Valdovinos (2015), quien determinó que la producción de huevos de cuatro poblaciones mexicanas del gusano cogollero, no fue significativamente diferente y se mantuvo en un rango entre 909 y 1,037 huevos/hembra. Así mismo, Pacheco (1994) señaló que una hembra de *S. frugiperda*, de origen no mencionado, fue capaz de ovipositar 1,000 huevos en masas de hasta 300. Martínez *et al.* (2004) observaron que una población originaria de Chiapas alimentada con dieta semi-sintética tuvo una producción entre 750 y 1,100 huevos/hembra. Un estudio realizado con una población colombiana del insecto determinó que cuando las larvas se alimentaron con hojas de maíz y cuatro dietas merídicas, la producción de huevos no difirió significativamente y se mantuvo en un rango de 673 a 906 huevos/hembra (Maldonado y Polanía, 2009), un efecto similar a lo observado en el presente estudio.

Si bien, la evaluación de las dietas semi-sintéticas es parte fundamental para la manutención de una cría de insectos, también es necesario el uso de éstas en investigaciones enfocadas al desarrollo de tecnologías que hagan posible la producción masiva o semi-masiva de los baculovirus (Caballero *et al.*, 2009). Una pauta de esta

tecnología se basa en el desarrollo de sistemas que permitan utilizar una alta densidad de larvas y automatizar el proceso de la producción del patógeno, reduciendo con ello los costos de producción (Quinter, 2015). Por tal motivo, en el presente estudio se evaluaron tres sistemas para la producción semi-masiva del SfMNPV; en dos de éstos se individualizaron las larvas (tratamientos 1 y 2) y uno con infección en un grupo (tratamiento 3). Cabe señalar que, posiblemente, el menor peso inicial observado en las larvas destinadas al tratamiento 3 (10.42 ± 0.22) se reflejó en un mejor peso de las mismas previo a la muerte (48.54 ± 6.87); sin embargo, esta disminución no afectó la producción de OBs/mg de larva, ya que este tratamiento, al igual que el tratamiento 2, ofrecieron una mayor productividad de OBs/mg de larva (2.50 y 2.85×10^9 , respectivamente).

La multiplicación *in vivo* depende de las condiciones de cría apropiadas para el desarrollo del huésped y éstos deben criarse en contenedores durante el período de multiplicación del virus (Grzywacz *et al.*, 2014). En países en desarrollo como México, las perspectivas de producción de qué deben ser de bajo costo, debido a ello se requiere que los contenedores sean reutilizables y que permitan métodos de limpieza efectivos para evitar la contaminación por bacterias y hongos. Algunas especies de insectos, como *Cydia pomonella* (L.), pueden criarse en grupos durante la multiplicación del virus. Sin embargo, en otras especies (ej., *Heliothis/Helicoverpa* y *Spodoptera* spp.) son caníbales por lo que deben criarse individualmente para evitar la pérdida excesiva del virus (Grzywacz *et al.*, 2014). En el presente estudio, la productividad del virus en el sistema con individualización de larvas (2.85×10^9 OBs/mg larva) fue equivalente a la obtenida por la infección en grupo de larvas (2.50×10^9 OBs/mg larva); sin embargo, en este último se obtuvo una pérdida de 29% por el citado efecto de canibalismo. Similarmente, Zamora-Avilés *et al.* (2017) observaron una baja recuperación de larvas de *S. exigua* infectadas en grupo con el SeMNPV debido al efecto por canibalismo y necrofagia (~25%), comportamiento también descrito por Elvira *et al.* (2010). Aunque este factor puede afectar la cantidad de virus obtenida por contenedor, es importante realizar futuros estudios que determinen si, a gran escala, esta pérdida es significativa tomando en cuenta que un sistema de infección en grupo requiere menor mano de obra.

Generalmente, las metodologías utilizadas para la producción comercial de los baculovirus son parcialmente publicadas debido a la propiedad intelectual y comercial del producto (Grzywacz *et al.*, 2014). La visión del presente estudio fue evaluar un sistema óptimo para la producción del SfMNPV, pero con el uso de materiales reutilizables, de fácil obtención y que puedan ser accesibles por los productores de menores recursos. Sin embargo, el sistema con individualización de las larvas aún amerita futuros estudios, sobre todo aquellos relacionados con el uso de dietas más económicas y de fácil elaboración. El uso de dietas elaboradas en frío tiene altas perspectivas, puesto que pueden ofrecer las ventajas de reducir en el tiempo de su elaboración, minimizar el riesgo de inactivación del virus por temperatura y reducir los costos de producción (Zamora-Avilés *et al.*, 2017). Actualmente, se realizan estudios para evaluar este tipo de dietas para la producción del SfMNPV con el sistema de rejillas propuesto en el presente estudio (A. M. Martínez, com. pers).

Los valores de producción del presente estudio fueron similares a los publicados en otros estudios. Por ejemplo, Romero y Romero (2011) observaron una producción entre 2.3 y 5.95×10^9 OBs/larva cuando las larvas de quinto estadio de *S. frugiperda* fueron infectadas con el SfMNPV. Quinter (2015) obtuvo una producción de 5.05×10^9 OBs/larva cuando utilizaron larvas de quinto estadio de *S. frugiperda* infectadas individualmente. Ruíz *et al.* (2015) también utilizaron un sistema de individualización de larvas de *S. frugiperda* y obtuvieron promedios de producción en larvas de quinto estadio entre 2.57×10^9 y 4.64×10^9 OBs/mg de larva. Así mismo, Velasco *et al.* (2012) individualizaron larvas de *S. frugiperda* y obtuvieron promedios de producción entre 3.68×10^6 y 1.3×10^7 OBs/mg cuando infectaron diferentes estadios larvarios (primero a sexto). La diferencia entre algunos valores posiblemente se debe a los distintos estadios del insecto utilizados, a las distintas concentraciones del virus, genética del propio virus y/o a las condiciones climáticas.

Por otro lado, la alta sensibilidad de los baculovirus a la luz UV es el principal factor que afecta a la capacidad infecciosa de las partículas virales (Payne, 1986, Hawtin y Posse, 1993). Una de las estrategias más utilizadas para minimizar esta limitación incluye la incorporación de sustancias biológicas o químicas que actúen como fotoprotectores en

los formulados virales (Hawting y Possee, 1993). En el presente estudio, el efecto de tres sustancias fotoprotectoras (Tinopal® C1101, melaza de caña de azúcar y aceite de soya) se evaluaron en condiciones de laboratorio y semi-campo. En condiciones de laboratorio, el tipo de hoja (maíz, sorgo y soya) influyó sobre la mortalidad de las larvas. Después de 50 min de exposición a la luz UV, la mayor mortalidad a las 168 hpi se observó cuando el virus se depositó sobre hojas de soya (rango de 25 a 56%), seguido de hojas de sorgo (rango de 19 a 44%) y maíz (rango de 3 a 37%). Aunque no se tiene una explicación clara a este respecto, posiblemente se relacione con la estructura de la superficie foliar (Kergunteuil *et al.*, 2016), ya que la adhesión del virus puede ser distinta en hojas con menor o mayor pubescencia. Por otro lado, un análisis que se realizó considerado en los tres tipos de hoja, indicó que el tratamiento con Melaza al 10% + virus provocó la mayor mortalidad, aunque este no fue significativamente diferente con respecto a los tratamientos con Tinopal C1001 1% y Virus c/UV. Este resultado puede confirmar que la melaza de caña de azúcar y el Tinopal pueden actuar como fotoprotectores; sin embargo, el resultado del último tratamiento (Virus c/UV) fue no esperado, ya que en el caso del sorgo se conservó una alta mortalidad de las larvas (81%), aun después de la exposición a la luz UV. Por lo tanto, se recomienda realizar nuevos experimentos para descartar la posibilidad de factores inherentes al bioensayo.

Los resultados de los experimentos de exposición UV solar con plantas de maíz no fueron consistentes entre los experimentos realizados en Brasil y México, lo cual se atribuye a las distintas metodologías utilizadas y a los factores ambientales. En Brasil, el compuesto que conservó una mayor mortalidad de larvas por virus fue la melaza (73%) comparado con el virus solo (9.5%), mientras que en México se observó una alta mortalidad tanto en el virus solo como en mezclas con la melaza y el Tinopal (rango entre 83 y 100%) al considerar todos los tiempos de exposición (0, 2 y 4 h). Aunque ambos experimentos se realizaron en horarios similares (12:00 a 16:00 pm en Mexico y 10:00 a 16:00 pm en Brasil); posiblemente, el tipo de aplicación y una mayor incidencia solar en Brasil (parámetro no evaluado en este estudio) afectó mayormente la persistencia del virus. La temperatura promedio durante el experimento en Brasil fue superior a 33°C, mientras que en México la temperatura fue ~ 29°C.

La utilización de los abrillantadores ópticos como fotoprotectores está ampliamente documentado (Martignoni e Iwai 1985, Shapiro 1992; Shapiro y Robertson 1992, Hamm y Shapiro 1992; Mondragón *et al.*, 2007). El éxito de estos abrillantadores ópticos se debe a que poseen una alta capacidad para absorber la luz UV en la región UV-A (320-400 nm) y UV-B (280-310 nm). Estudios realizados en condiciones de laboratorio han dado a conocer que los abrillantadores ópticos Tinopal DCS-X y Tinopal DCS a una concentración de 1 y 5%, respectivamente, demostraron un alto potencial como fotoprotectores del nucleopoliedrovirus de *Orgia pseudotsugata* (McDunnough) (OpMNPV), el cual provocó una mortalidad larvaria entre el 87 y 97% después de un periodo de exposición de 4 h a una fuente de UV (Martignoni y Iwai, 1985). Shapiro (1992) demostró que, de 23 abrillantadores ópticos, ocho de ellos indujeron una protección completa al nucleopoliedrovirus de *L. dispar* en condiciones de laboratorio.

Una de las limitantes de los abrillantadores ópticos es su alto costo, lo cual es una de las razones principales para que los productores consideren su uso. Debido a ello, en el presente estudio se evaluaron compuestos más accesibles y de fácil manejo. La melaza, además, podría tener la perspectiva de actuar como un fagoestimulante o como atrayente de enemigos naturales, pero hacen falta estudios que demuestren este potencial en campo o posibles limitaciones sobre su efecto sobre las hojas. En el caso del aceite de soya, Shapiro y Dougherty (1994), observaron que puede incrementar la persistencia del virus funcionando como potenciador de la actividad biológica del baculovirus; sin embargo, el presente estudio de laboratorio mostró una menor mortalidad larvaria cuando este compuesto se mezcló con el virus.

El nivel de daño foliar en general fue muy bajo, la mayoría de los valores se observaron entre las escalas 1.1 y 1.7 (daños menores de 10 mm). Posiblemente, el bajo nivel de defoliación se deba al poco tiempo de exposición de las larvas sobre las hojas (24 h). Sin embargo, este tiempo fue suficiente para provocar una alta mortalidad en las larvas de tercer estadio (rango entre 80 y 100% al considerar todos los tratamientos y tiempos de exposición solar), lo cual indica que el SfMNPV es efectivo para controlar al gusano cogollero, como se ha observado en otros estudios de laboratorio y campo (Williams *et al.*, 1999; Mondragón *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2009).

IX. CONCLUSIONES

- El tipo de dieta no influyó en el desarrollo larvario y reproducción de *S. frugiperda*, lo anterior indica que cualquiera de ellas puede ser utilizada para establecer una cría masiva del insecto de manera óptima y además utilizarlas como base para la producción semi-masiva *in vivo* del Sf-MER.
- El uso de un sistema con individualización de larvas permitió una adecuada producción del Sf-MER sin el riesgo de la pérdida del material por canibalismo.
- La mortalidad larvaria dependió del tipo de hoja (maíz, sorgo o soya). El mayor rango de mortalidad se observó en las hojas de sorgo (rango de 8.75 a 68.7%), seguido de soya (rango de 3.12 a 56.2%) y maíz (rango de 3.12 a 37.5%). En general, la mayor mortalidad (entre 60 y 90%) se observó maíz y la soya en los tratamientos Virus s/UV, Virus + Melaza (10%) c/UV y Virus +Tinopal (1%) c/UV.
- En México se observó una alta mortalidad larvaria, tanto en el virus solo como en mezclas con la melaza y el Tinopal (rango entre 83 y 100%), al considerar todos los tiempos de exposición, mientras que en Brasil la mortalidad fue más baja (rango entre 40 y 73%) y la mayor tasa se observó cuando el virus se mezcló con la melaza (73%) comparado con el virus solo (9.5%). Estas diferencias se atribuyen a las distintas metodologías utilizadas y/o a los factores ambientales que prevalecieron en los experimentos
- En general, el nivel de daño foliar fue muy bajo; sin embargo, este tiempo fue suficiente para provocar una alta mortalidad en las larvas de tercer estadio (rango entre 80 y 100%).

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, V. G. y J. F. Vélez. 2013. **Propiedades nutricionales y funcionales del garbanzo (*Cicer arietinum* L.).** *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7 (2): 25-34.
- Armenta, R., A. M. Martínez, J. W. Chapman, R. Magallanes, D. Goulson, P. Caballero, R. D. Cave, J. Cisneros, J. Valle, V. Castillejos, D. I. Penagos, L. F. García y T. Williams. 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.
- Badii, M. H. y J. L. Abreu. 2006. **Control biológico, una forma sustentable de control de plagas.** *International Journal of Good Conscience. I (1):* 82-89.
- Ballesteros, J. 2006. **Productos para protección solar con extracto de zanahoria: Estado del arte. Programa de especialización en ciencias y tecnología cosmética.** Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D. C., Colombia. pp. 13-23.
- Barrera, G., O. Simón, L. Villamizar, T. Williams y P. Caballero. 2011. ***Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia.** *Biological Control* 58: 113-120.
- Batista, A., S. Alves, N. Augusto, R. Pereira y L. Alves. 2001. **Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatilis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV).** *Neotropical Entomology* 30 (3): 411-416.
- Bautista, M. N. 2006. **Insectos plaga. Una guía ilustrada para su identificación.** Colegio de postgraduado. Estado de México, México. 113 pp.

- Beas, C. A., A. M. Sánchez, F. C. García, A. G. Contreras y E. G. Molina. 2014. **Baculovirus bioinsecticidas: an overview.** *The Journal of Animal and Plant Sciences* 24 (2): 362-373.
- Busato, G. R., A. D. Gruztmacher, A. C. De Oliveira, E. A. Vieira, P. A. Zimmer, M. M. Kopp, J. De Bandeira y T. Magalães. 2004. **Análise da estrutura e diversidade molecular de poblaciones de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) asociadas as culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul.** *Neotropical Entomology* 33: 709-716.
- Busato, G.R., M. S. García, A. E. Loeck, M. Zart, A. M. Nunes, O. Bernardi y F. S. Andersson. 2006. **Adequação de uma dieta artificial para os biótipos “Milho” e “Arroz” de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Bragantia*, Campinas. 65(2):317-323.
- Caballero, P., M. López-Ferber y T. Williams. 2001. **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** Universidad Pública de Navarra. *Phytoma España* 518 pp.
- Caballero, P., R. Murillo, D. Muñoz y T. Williams. 2009. **The nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) as a biopesticide: analysis of recent advances in Spain** *Revista Colombiana de Entomología* 35 (2): 105-115.
- Carroll, M., A. Hanlon, T. Hanlon, A. R. Zangerl y M. R. Berenbaum. 1997. **Behavioral effects of carotenoid sequestration by the parsnip webworm, *Depressaria pastinacella*** *Journal of Chemical Ecology* (23): 2707-2719.
- Casmuz, A., M. L. Juárez, M. G. Socías, M. G. Murúa, S. Prieto, S. Medina, y G. Gastaminza. 2010. **Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69 (3-4): 209-231.

- Chaparro, R. 2008. **Efecto de dos formulaciones en la fotoestabilidad y eficacia de un baculovirus para el control de *Tecia solanivora***. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogota D. C. 111 pp.
- CIMMYT. 1987. **Toward insect resistant maize for the third World. Proceedings of the international symposium on methodologies for developing host plant resistance to maize insects**. CIMMYT, México. 322 pp.
- Cibrián T. J. 1994. **Factores que influyen en la cría de insectos en condiciones controladas**. En: **Técnicas para la Cría de Insectos**. M. N. Bautista, G. Vejar y J. L. Carrillo. Eds. Colegio de Posgraduados. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Estado de México. pp: 11-23.
- Cisneros, J., J. A. Pérez, D. I. Penagos, V. J. Ruiz, D. Goulson, P. Caballero, R. D. Cave y T. Williams. 2002. **Formulation of nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize**. *Biological Control* 23: 87-95.
- Clark, P. L., J. Molina-Ochoa, S. Martinelli, S. R. Skoda, D. I. Isenhour, D. J. Lee, J. T. Krumm y J. E. Foster. 2007. **Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in western hemisphere**. *Journal of Insect Science* 7:05.
- Claus, D. y A. I. Sciocco de Cap. 2001. **Producción masiva de baculovirus**. Instituto de Microbiología, Argentina. pp. 257-312.
- Cohen, A. C. 2001. **Formalizing insect rearing and artificial diet technology**. *Entomology* 47: 198-206.

- DeBach, P. 1982. **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. Editorial Continental, México, Mexico. 949 pp.
- Del Rincón, M. C., A. P. Bravo y J. E. Ibarra. 1997. **Baculovirus entomopatógenos: una alternativa para el control de plagas**. *Folia Entomológica Mexicana* 100:45-62.
- Devotto, L. y M. Gerding. 2003. **Respuesta de dos aislamientos chilenos de *Metharhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sokorin a la adición de un protector solar**. *Agricultura Técnica* 63 (4): 339-346.
- Elvira, S., N. Gorría, D. Muñoz, T. Williams y P. Caballero. 2010. **A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production**. *Journal of economic entomology* 103 (1): 17-24.
- Etzel, L. K. y E. F. Legner. 1999. **Culture and colonization**. Handbook of biological control. Academic Press, San Diego. pp. 125-197.
- Federici, B. A. 1986. **Ultrastructure of baculoviruses**. En: Granados, B. A. Eds. **The biology of baculoviruses: biological properties and molecular biology**. Academic Press. pp. 61-88.
- Fernández, J. L. y I. E. Expósito. 2000. **Nuevo método para el muestreo de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) en el cultivo del maíz en Cuba**. *Centro Agrícola* 27:32-38.
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2016. **Panorama Agroalimentario, Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial**. 41 pp.

- García-Banderas, D. V. 2016. **Actividad biológica de tres nucleopoliedrovirus sobre distintas poblaciones mexicanas del gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* J. E. smith (Lepidoptera: Noctuidae).** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Morelia Michoacán, México. 69 pp.
- Garden, W. A. y J. R. Fuxa. 1980. **Pathogens for suppression of the fall armyworm.** *Florida Entomology* 63: 439-447.
- Gervasio, R. E. 2015. **Virulencia de cuatro nucleopoliedrovirus en larvas de *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae): influencia del color sobre la preferencia del insecto a una dieta semi-sintética.** Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 49 pp.
- Georgen, G., P. L. Kumar, S. B. Sankung, A. Togola y M. Tamò. 2016. **First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa.** *PLoS one* 11(10), e0165632.
- Gómez, S. A. y M. Rumiatto. 1987. **Controle da lagarta da soja pelo Baculovirus anticarsia aplicado, vía aérea, com melaço e óleo de soja.** EMBRAPA-UEPAE Dourados Comunicado técnico. 12 pp.
- Granados, R. R. y K. A. Lawler. 1981. **In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection.** *Virology* 108: 297-308.
- Granados, R. R. y K. A. Williams. 1986. **In vivo infection and replication of baculoviruses.** En: Granados R. R. y B. A. Federici. Eds. **The Biology of Baculoviruses. Biological Properties and Molecular Biology.** Boca Raton, Florida USA. CRC Press. pp. 89-108.

- Grzywacz, D., D. Moore y R. J. Rabindra. 2014. **Mass production of entomopathogens in less industrialized countries.** *Mass production of beneficial organisms* 519-561.
- Guzmán-Soria. E., R. S. Rebollar, M. J. Hernández, S. J. García, C. M. De la Garza, J. N. Callejas y C. A. Terrones. 2011. **La oferta de maíz grano en Guanajuato, México: 1980-2009.** *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 857-866.
- Hamm, J. J. y J. R. Young. 1971. **Value of virus presilk treatment for corn earworm and fall armyworm control in sweet corn.** *Journal of Economic Entomology* 64: 144-146.
- Hamm, J. J. y M. Shapiro. 1992. **Infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus enhanced by a fluorescent brightener.** *Journal of Economic Entomology* (85): 2149-2152.
- Hawtin, R. E. y R. D Possee. 1993. **Genetic manipulation of the baculovirus genome for insect pest control.** En: Beckage, N. E., S. N. Thompson y B. A. Federici (Eds.) **Parasites and pathogens of insects.** Academic Press, San Diego. Volumen 2. pp. 179-195.
- Hernández, M. J., B. E. López, G. E. Garza y P. N. Mayek. 2008. **Spatial distribution of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize landraces grown in Colima, México.** *International Journal of Tropical Insect Science*. 28: 126-129.
- Hughes, P. R. y H. A. Wood. 1981. **A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses.** *Journal of Invertebrate Pathology* 37 (2): 154-159.
- Jehle, J. A., M. Lange, H. Wang, Z. HU, Y. Wang, y R. Hauschild. 2006. **Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera.** *Virology* 346:180-193.

- Jiménez, E. M. 2009. **“Métodos de Control de Plagas”**. Universidad Nacional Agraria, Facultad de Agronomía. Managua, Nicaragua. 145 pp.
- Johnson, K. S. y W. G. Felton. 2001. **Plant phenolics as dietary antioxidants for herbivorous insects: a test with genetically modified tobacco**. *Journal of Chemical Ecology* 27 (12): 2579-2597.
- Kergunteuil, A., M. Bakhtiari, L. Formenti, Z. Xiao, E. Defosse y S. Rasmann. 2016. **Biological control beneath the feet: a review of crop protection against insect root herbivores**. *Insects* 7 (4): 70.
- Lasa, R., T. Williams y P. Caballero. 2008. **Insecticidal properties and microbial contaminants in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (Baculovirus) stored at different temperatures**. *Journal of Economic Entomology* 101 (1): 42-49.
- Lepore, L. S., P. R. Roelvink y R. R. Granados. 1996. **Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates Nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metaalloprotease**. *Journal of Invertebrates Pathology* (68): 131-140.
- Llenderal C. C. 2000. **Introducción a la Fisiología de Insectos**. Colegio de Posgraduados. Instituto de Fitosanidad. Montecillo, Edo. de México. pp: 153-162.
- López-Edwards, M., J. L. Hernández-Mendoza, A. Pescador-Rubio, J. Molina-Ochoa, R. Lezmagutierrez, J. J. Hamm y B. R. Wiseman. 1999. **Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico**. *Florida Entomologist* 82 (2): 254-262.
- López, M. G. 2010. **Complementación de baculovirus que no forman cuerpos de oclusión mediante líneas celulares establemente transformadas con el gen poliedrina**. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 136 pp.

- Maldonado, H. A. y I. Z. de Polanía. 2009. **Evaluación de dietas merídicas para la cría en laboratorio de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: noctuidae).** *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 12(1): 79-90.
- Martignoni, M. E. y P. J. Iwai. 1985. **Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of douglas-fit tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus.** *Journal Economic Entomology* 78:982-987.
- Martinelli, S., P. L. Clark, M. I. Zucchi, M. C. Silvafilho, J. E. Foster y C. Omoto. 2007. **Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton field in Brazil.** *Bulletin of Entomological Research* 97: 225-231.
- Martínez, A. M., P. Caballero, M. Villanueva, N. Miralles, I. San Martín, E. López y T. Williams. 2004. **Formulation with an optical brightener does not increase probability of developing resistance to *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus in the laboratory.** *Journal of Economic Entomology* 97: 1202-1208.
- Mazzone, H. M. 1985. **Pathology associated with baculovirus infection.** En: Maramorosch K. y K. E. Sherman. Eds. **Viral insecticides for Biological Control.** Academic Press. Orlando, Florida. pp. 81-120.
- McConnell, R. y A. Hruska. 1993. **An epidemic of pesticide poisoning in Nicaragua: implications for prevention in developing countries.** *American Journal of Public Health* 83:1559-1562.
- Mihm, J.A. 1983. **Techniques for efficient mass rearing and infestation of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J.W. Smith, for host plant resistance studies.** CIMMYT, México.

- Miller, L. 1997. **The Viruses: The Baculoviruses**. New York: Plenum Press. 433 pp.
- Mondragón, G., S. Pineda, A. Martínez y A. M. Martínez. 2007. **Optical Brightener Tinopal C1101 as an ultraviolet protectant for a nucleopolyhedrovirus**. *Communications In Agricultural And Biological Science* 72: 243-247.
- Montes-Molina, A., P. N. Espinoza, R. E. Garrido y M. F. Gutiérrez. 2009. **Reproducción del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* del maíz (*Zea mayz* L) bajo condiciones de laboratorio**. <http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/veracruz01/...IV/CIV-25.pdf> (Accesada en abril de 2014).
- Moscardi, F. 1999. **Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera**. *Annual review of entomology* 44 (1): 257-289.
- Murhammer, D. W. 1996. **Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture**. *Applied Biochemistry Biotechnology* 59:199-220.
- Murúa, G., V. Defagó y E. Virla. 2003. **Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides**. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas* 29: 43-51.
- Nicholls, E. C. 2008. **Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico**. Ciencia y Tecnología. Editorial Universidad de Antioquia. 294 pp.
- Quinter R. L. M. 2015. **Uso de baculovirus como alternativa de control biológico de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo del maíz: una revisión conceptual y de avances en su aplicación**. Universidad Abierta y a Distancia Escuela de Ciencias Agrícolas y del Medio Ambiente Especialización en Biotecnología Agrícola Villavicencio. 51 pp.

- Pacheco-Covarrubias, J. J. 1993. **Monitoring insecticide resistance in *Spodoptera frugiperda* populations from the Yaqui Valley, Son., México.** *Resistant Pest Management Newsletter* 5(1):3-4.
- Pacheco, M. F. 1994. **Plagas de los cultivos oleaginosos en México.** Centro de Investigación Regional del Noroeste. INIFAP. Cd. Obregón, Sonora, México. 600 pp.
- Pashley, D. P., M. McMichael y J. F. Silvain. 2004. **Multilocus genetic analysis of host use, introgression and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae).** *Annals of Entomological Society of America* 97 (5): 1034-1044.
- Passarelli, A. L. 2011. **Barriers to success: How baculoviruses establish efficient systemic infections.** *Virology* 411: 383-392.
- Payne, C. C. 1986. **Insect pathogenic viruses as pest control agents.** En: Franz, J. M. (Ed.). **Biological and plant health protection.** Fischer-Verlag, Stuttgart, Austria. pp. 183-200.
- Polanía, I. Z., A. Maldonado, H. Adrián, M. C. Rodolfo y J. L. Díaz. 2009. ***Spodoptera frugiperda*: respuesta de distintas poblaciones a la toxina Cry1Ab.** *Revista Colombiana de Entomología* 35 (1): 34-41.
- Ragaei, M. 1999. **Radiation protection of microbial pesticides.** *Journal Applied Entomology* 123:381-384.
- Rangel N. J. C., R. M. F. Vázquez y C. M. C. Rincón. 2014. **Caracterización biológica y molecular de cepas exóticas de baculovirus SfNPV, con actividad bioinsecticida hacia una población mexicana del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).** *Interciencia* 39:320-326.

- Rohrman, G. F. 2008. **Baculovirus molecular biology**. En: Bethesda, M. D. **National Center for Biotechnology Information (US)**. (Accesada en diciembre 2014).
- Rohrman, G. F. 2014. **Baculovirus molecular biology**. Department of Microbiology Oregon State University (3): 211.
- Romero, M. G., E. Romero, D. S. Gómez y E. Willink. 2009. **Evaluación de aislamientos de baculovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), plaga clave del maíz en el noroeste argentino**. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán Argentina* 86 (2): 7-15.
- Romero, M. G. y E. R. Romero. 2011. **Producción del nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera frugiperda*, aislamiento leales, en larvas del gusano cogollero en insectario. determinación del equivalente larval**. Facultad de Agronomía y Zootecnia, Universidad Nacional de Tucumán. 7 pp.
- Ruíz, C., J. V. Gómez, M. Chaparro, P. Sotelo y L. Villamizar. 2015. **Adjusting the conditions of a system for the *in vivo* production of a nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. *Biotecnología aplicada* 32: 4311-4316.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA).
<http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/nayarit/boletines/Paginas/BNSAGDIC042016.aspx#> (Accesada el 07 de mayo de 2018).
- Shapiro, M. 1986. **In vivo production of baculoviruses**. En: Granados R. R. y B. A. Federici. Eds. **The biology of baculoviruses**. CRC, Boca Raton, FL. 2: 31-62.

- Shapiro, M. 1992. **Use of optical brighteners as radiation protectants for Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nuclear polyhedrosis virus.** *Journal Economic Entomology* 85(5): 1682-1686.
- Shapiro, M. y E. M. Dougherty. 1994. **Enhancement in activity of homologous and heterologous viruses against the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by an optical brightener.** *Journal Economy Entomology* 87: 361-365.
- Shapiro, M. y J. L. Robertson. 1992. **Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculoviruses activity by optical brighteners.** *Journal of Economic Entomology* (85): 1120-1124.
- Shapiro, M. y J. Robertson. 1990. **Laboratory evaluation of dyes as ultraviolet screens for the gypsy moth “Lepidoptera Lymantriidae” nuclear polyherdrosis virus.** *Economic Entomology* 72:57-61.
- Simón, O., T. Williams, M. Lopez-Ferber y P. Caballero. 2004. **Virus entry or the primary infection cycle are not the principal determinants of host specificity of *Spodoptera* spp. nucleopolyhedroviruses.** *Journal of General Virology* 85:2845-2855.
- Sparks, N. A. 1979. **A review of the biology of the fall armyworm.** *Florida Entomologist* 62 (2): 82-87.
- Sporleder, M., O. Zegarra, J. Kroschel, J. Huber y A. Lagnaoui. 2000. **Assesment of the inactivation time of *Photorimaea operculella* granulovirus (PoGV) at different intensities of natural irradiation.** CIP. Lima Perú. pp. 123-127.
- Steiner, A. A. 1984. **The universal nutrient solution.** *Plant and Soil.* 15 (2): 134-154.

- Summers, M. D. y D. L. Anderson. 1973. **Characterization of nuclear polyhedrosis virus DNAs.** *Journal of Virology* 12:1336-1346.
- Tamez-Guerra, P., C. Rodríguez y L. Galán. 2010. **Solar radiation (UV) protectants for microbial insecticides.** Facultad de Ciencias Biologicas, UANL, Nuevo Leon, México. 21 pp.
- Velasco, C., G. Gallegos, D. Berlanga, J. Cambero y A. Romo. 2012. **Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus.** *Florida Entomologist* 752-757.
- Velasco, S. P., S. Pineda, A. Méndez, M. España, R. Cárdenas-Navarro, J. S. Bayuelo-Jiménez y A. M. Martínez Castillo. 2010. **Reflectancia foliar, crecimiento y respuestas fisiológicas de maíz y tomate a un abrillantador óptico.** *Revista fitotecnica mexicana* 33 (1): 45-52.
- Vialard, J., M. Arif y C. Richardson. 1995. **Introduction to the molecular biology of baculoviruses.** *Methods in Molecular Biology* 39:1-24.
- Villacorta, A. y L. S. Cobo De Martínez. 1978. **Efecto del modo de preparación de la dieta sobre el crecimiento y desarrollo de *Spodoptera frugiperda*.** ICA (Colombia). p.96-103.
- Wakefield, G., M. Green, S. Lipscomp y B. Flutter. 2004. **Modified titania nanomaterials for sunscreen applications – reducing free radical generation and DNA damage.** *Material Science and Technology* 20 (8): 985-988.
- Wang, P. y R. R. Granados. 2000. **Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (30): 135-143.

Weather Spark: El clima típico de cualquier lugar del mundo.
<https://es.weatherspark.com/d/30495/3/17/Tiempo-promedio-el-17-de-marzo-en-Sete-Lagoas-Brasil> (Accesada el 11 de diciembre de 2018).

Weather Spark: El clima típico de cualquier lugar del mundo.
<https://es.weatherspark.com/d/4452/6/8/Tiempo-promedio-el-8-de-junio-en-Morelia-M%C3%A9xico#Sections-SolarEnergy> (Accesada el 11 de diciembre de 2018).

Williams, T., D. Goulson, P. Caballero, J. Cisneros, A. M. Martínez, J. W. Chapman, D. X. Roman y R. D. Cave. 1999. **Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small scale maize growers in Latin America.** *Biological Control* 14: 67-75.

Williams, T. y J. Cisneros. 2001. **Formulación y aplicación de los baculovirus bioinsecticidas.** En: **Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.** pp. 313-372.

Young, S. 2005. **Persistence of viruses in environment.** <http://www.agctr.isu.edu/s265/Young.htm>. (accesada en febrero en 2005).

Yu, S. J. 1991. **Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith).** *Pestic Biochem Physiol* 39:84-91.

Zamora-Avilés, N. 2013. **Diversidad genética de aislamientos del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera exigua*, su potencial insecticida y actividad de azadiractina contra el gusano soldado.** Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Morelia Michoacán, México. 66 pp.