

Universidad Pública de Navarra

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS**

Nafarroako Unibertsitate Publikoa

*NEKAZARITZAKO INGENIARIEN
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

**Producción de un bioinsecticida artesanal a base del
nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* para su
uso en plantaciones de maíz en la Sierra Central de Perú**

presentado por

Iratxe Aquesolok

aurkeztua

INGENIERO AGRONOMO
NEKAZARITZA INGENIARITZA

abril, 2011 / 2011, *apirila*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría dar las gracias a Primitivo Caballero y las personas del área de Cooperación al Desarrollo por darme la oportunidad de realizar este trabajo en Perú. Pero sobre todo a Oihane por su dedicación y disponibilidad constantes.

No puedo olvidarme de todos mis compañeros de Perú, en especial de Ángela, sin la cual no habría tenido ni siquiera maíz, y todos los habitantes de San Juan, que tan amistosamente me acogieron. Todos vosotros habéis hecho mi estancia inolvidable. Gracias también a los compañeros de clase y a mi familia y amigos por haber estado ahí.

Índice

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	5
3. OBJETIVO	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA DEL MAÍZ EN LA SIERRA CENTRAL DE PERÚ	9
4.2 ESTABLECIMIENTO Y MUESTREO DEL CULTIVO DE MAÍZ. ESTABLECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN DE <i>S. frugiperda</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.	9
4.3 EFICACIA EN CAMPO	12
4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS	14
4.4.1 Insectos.....	14
4.4.2 Multiplicación del virus.....	15
4.4.3 Purificación de los poliedros	15
4.4.4 Extracción de ADN viral y digestión con endonucleasas	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1 PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA DEL MAÍZ EN LA SIERRA CENTRAL DE PERÚ	17
5.1.1 Siembra del maíz	17
5.1.2 Plagas más frecuentes del maíz	17
5.1.3 Métodos de control	18
5.2 ESTABLECIMIENTO Y MUESTREO DEL CULTIVO DE MAÍZ. ESTABLECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN DE <i>S. frugiperda</i> EN CONDICIONES DE LABORATORIO.	19
5.3 EFICACIA EN CAMPO	22
5.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS	26
6. DISCUSIÓN.....	29
7. CONCLUSIONES.....	33
8. BIBLIOGRAFÍA.....	34

1. RESUMEN

Spodoptera frugiperda es una especie fitófaga que causa grandes daños y pérdidas económicas en los cultivos de maíz de la Sierra Central de Perú. El método de lucha utilizado para su control basado en la aplicación de plaguicidas químicos orgánicos de síntesis supone el mayor coste de producción del maíz lo que conlleva que en algunos casos no se realice control ninguno debido a la escasez de recursos técnicos y económicos de la zona. Entre los diversos enemigos naturales de este insecto se encuentran los nucleopoliedrovirus que han demostrado ser agentes de control efectivos y selectivos. Mediante este trabajo fin de carrera se pretende desarrollar un bioinsecticida artesanal basado en aislados nativos del SfMNPV para su uso en los maizales de la Sierra Central de Perú. Para la búsqueda de los aislados nativos de este virus se muestreó un maizal, pero debido a que no se encontraron larvas con síntomas característicos de infección por nucleopoliedrovirus, el inóculo para la preparación de los bioinsecticidas se obtuvo del Servicio Nacional de Seguridad Agraria de Perú (SENASA). Se ensayaron en campo un biopreparado granulado ya formulado y un biopreparado líquido desarrollado a partir de larvas de *S. frugiperda* muertas proporcionadas por dicho organismo. Los parámetros medidos fueron el daño foliar promedio (DFP), el porcentaje de hojas dañadas y el número de larvas vivas con respecto a las muertas, tanto el día de la aplicación como el día de diagnóstico. Tanto el DFP como el porcentaje de hojas dañadas fue significativamente menor en las parcelas tratadas con ambos biopreparados, mientras que el porcentaje de larvas muertas fue significativamente mayor respecto al control, indicando que los supuestos biopreparados granulado y líquido eran efectivos. Sin embargo, la caracterización molecular realizada mediante el análisis del ADN genómico viral con endonucleasas de restricción (REN) que generan perfiles de restricción de ADN característicos para cada una de las especies virales demostró que los biopreparados utilizados no eran aislados de SfMNPV y probablemente tampoco de ningún otro virus. Por otro lado, los síntomas producidos por ambos biopreparados no eran los síntomas típicos de infección por nucleopoliedrovirus, y tampoco se observó la presencia de cuerpos de inclusión en los tejidos de las larvas infectadas. En consecuencia, sería conveniente realizar una búsqueda y caracterización de aislados peruanos bajo la supervisión de expertos en la materia para el desarrollo de un programa efectivo y barato de control biológico contra *S. frugiperda* en lugares de bajos recursos económicos.

2. INTRODUCCIÓN

El maíz, *Zea Mays* L., es un cultivo originario del continente americano, específicamente de México, Centroamérica y Sudamérica. Es uno de los cereales que representa la base de la alimentación diaria, ocupando el tercer lugar en consumo después del arroz y el trigo (Llanos, 1994). Su cultivo está extendido por todo Perú, ocupando el 18% del área cultivada y se emplea tanto en la dieta humana como para alimentación animal (FAO, 2009). La región de Huancavelica, situada en la Sierra Central del Perú, presenta unas condiciones climáticas muy favorables para el cultivo de maíz, con diversos pisos ecológicos y ecosistemas, donde las variedades abundan por lo que el cultivo del maíz está muy extendido en la zona.

Spodoptera frugiperda (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es la plaga más importante del maíz en América Latina (Andrews, 1988) (Fig. 1). Las larvas se alimentan del follaje de la planta, reduciendo su capacidad fotosintética y retardando su crecimiento y desarrollo, lo que al final trae como consecuencia la disminución del rendimiento del cultivo. La plaga afecta al cultivo en casi todas sus etapas, desde plántula hasta llenado de grano (CATIE, 1990). Es considerada como una de las más dañinas en el cultivo del maíz (Carrillo-Sánchez, 1993) y puede reducir el rendimiento en grano del cultivo del 15-73% si la infestación del cultivo es mayor del 55% (Hruska y Gould, 1997). En observaciones en campo, en la Cuenca Media del Río Mantaro, Huancavelica y Junín, se ha detectado la presencia del cogollero del maíz durante todo el año. Asimismo, la información proporcionada por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) del Ministerio de Agricultura de Perú confirma que este insecto ha sido una de las principales plagas del cultivo en Huancavelica en 2010.

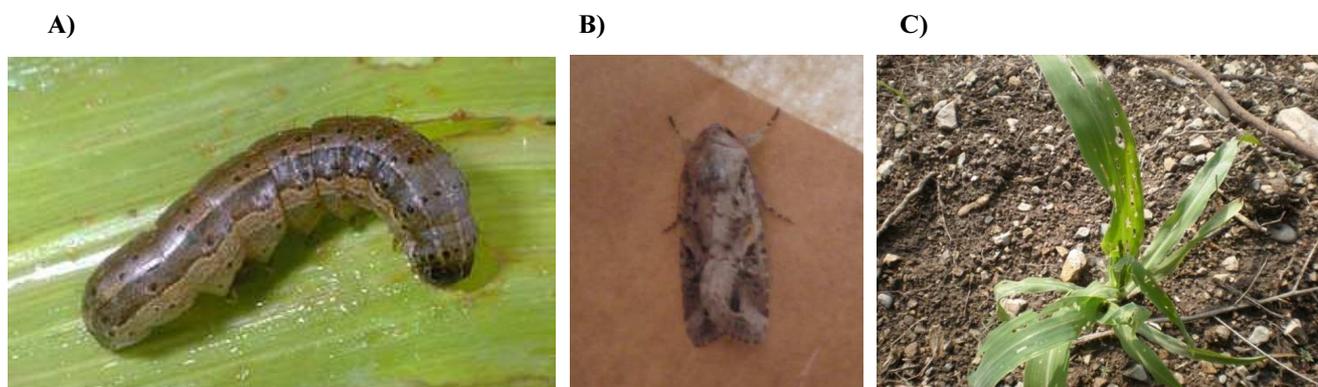


Figura 1. A) Larva y B) adulto de *Spodoptera frugiperda*. C) Daños causados por la larva de esta especie.

Tradicionalmente, las poblaciones de *S. frugiperda* han sido controladas por medio de plaguicidas químicos orgánicos de síntesis (Chandler y Sumner, 1991) cuyo costo representa una fracción importante de la producción total del cultivo debido a que se requieren entre dos y cuatro aplicaciones de insecticidas químicos durante el ciclo del cultivo pudiendo llegar a suponer un coste de 4,2 millones de dólares al año (Rowland y Dreyer, 2001; Fernández, 2002). Por otro lado, debido al uso desmedido de estos agroquímicos, muchas veces por la escasez de alternativas de manejo de la plaga, se han observado efectos perjudiciales en el agroecosistema del cultivo y en el ambiente como resistencias a los insecticidas piretroides, eliminación de enemigos naturales y residualidad de agroquímicos (Guillebeau y All, 1991).

A raíz de ello, se ha originado un conflicto entre la reducción en el uso de plaguicidas químicos y la necesidad de mantener un adecuado nivel productivo, por lo que se pretende encontrar alternativas seguras, efectivas y económicas a la utilización de los plaguicidas convencionales como los bioplaguicidas, productos biológicos o de origen natural que no ocasionan los problemas de los plaguicidas tradicionales (Duran, 2002).

Entre los diversos enemigos naturales de *S. frugiperda* se encuentran los baculovirus, una familia de virus exclusivamente patógenos de insectos que se divide en cuatro géneros: Alphabaculovirus, nucleopolihedrovirus (NPV) específicos de lepidópteros; los Betabaculovirus, o granulovirus (GV) infectivos para lepidópteros; los Gammabaculovirus, NPVs específicos de himenópteros, y Deltabaculovirus o NPVs infectivos de dípteros (Jehle *et al.*, 2006). La efectividad y alto potencial de estos virus para el control de diferentes insectos plaga han sido ampliamente demostrados (Valicente y Da Costa, 1995; Batista *et al.*, 2001; Barreto *et al.* 2005; Villamizar *et al.* 2005; Murillo y Caballero, 2006), debido principalmente a su estrecho espectro de huésped y seguridad medioambiental (Moscardi, 1999), a la ausencia de residuos tóxicos y a su estabilidad durante largos periodos (Jaques, 1985). Varios son los baculovirus que han sido desarrollados como bioinsecticidas tanto para el control de plagas agrícolas como forestales. Así, el uso de *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV) para controlar la oruga de las leguminosas, *A. gemmatalis*, es el exitoso ejemplo de un baculovirus utilizado como pesticida biológico (Moscardi, 1999). En Brasil se utiliza en el cultivo de soja sobre más de 2 millones de hectáreas al año (Oliveira *et al.*, 2006). Asimismo, recientemente, se han desarrollado y probado en

campo el NPV de *Helicoverpa armigera* con propiedades insecticidas mejoradas (Zhang *et al.*, 1995; Sun y Peng, 2007). Del mismo modo, un aislado autóctono del NPV de *S. exigua* (SeMNPV) ha sido desarrollado como bioinsecticida comercial en cultivos hortícolas de invernaderos de Almería (Caballero *et al.*, 2009).

Varios aislados de diferentes regiones del Norte, Centro y Sur América del NPV de *S. frugiperda* (SfMNPV) han sido caracterizados tanto a nivel molecular como biológico (Loh *et al.*, 1982; Shapiro *et al.*, 1991; Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999; Tumilasci *et al.*, 2003; Simón *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2008). El aislado Nicaragüense del SfMNPV ha sido evaluado en campo como un biopesticida potencial para controlar el cogollero en maíz (Moscardi, 1999; Williams *et al.* 1999; Cisneros *et al.*, 2002; Armenta *et al.*, 2003). Aplicaciones del virus causan niveles significativos de mortalidad en las larvas de los cultivos de maíz sin afectar a las poblaciones de enemigos naturales (Williams *et al.*, 1999; Armenta *et al.*, 2003). Se ha observado que dichos aislados presentan diferente efectividad hacia las diferentes poblaciones de *S. frugiperda*, siendo las poblaciones de este insecto más susceptibles hacia los aislados nativos (Escribano *et al.*, 1999).

El presente trabajo tiene como objetivo la búsqueda de aislados nativos que sean efectivos para el control de *S. frugiperda* para, posteriormente, desarrollar un sistema de producción artesanal del SfMNPV que permita la autonomía productiva del agricultor. Se pretende así impulsar la capacidad del agricultor para implementar medidas de control, así como un sistema alternativo de producción a los plaguicidas sintéticos, promoviendo su autosuficiencia minimizando sus gastos en insumos y productos, protegiendo al mismo tiempo tanto su salud como la del consumidor y reduciendo el daño ambiental.

3. OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un sistema de producción artesanal del SfMNPV a partir de un aislado nativo. Para ello, se llevará a cabo la búsqueda de aislados nativos del SfMNPV en plantaciones de maíz para después evaluar su efectividad en campo.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA DEL MAÍZ EN LA SIERRA CENTRAL DE PERÚ

Con el objetivo de conocer el manejo actual del cultivo del maíz y de la plaga del cogollero, se realizaron diversas preguntas a distintos agricultores de los departamentos de Junín, Huancavelica y Castrovirreyna, región de Huancavelica que se basaban en los siguientes puntos:

- a) CULTIVO DE MAÍZ: variedades cultivadas, época de siembra, ciclo del maíz, manejo del recurso hídrico (tipo de riego y frecuencia).
- b) PLAGAS MÁS FRECUENTES DEL MAÍZ: plagas más frecuentes e identificación de las mismas.
- c) MÉTODOS DE CONTROL DE LAS PLAGAS: utilización de métodos químicos, biológicos o nulo.

4.2 ESTABLECIMIENTO Y MUESTREO DEL CULTIVO DE MAÍZ. ESTABLECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN DE *S. frugiperda* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

La región de Huancavelica se ubica en la Sierra Central del Perú, en el denominado trapecio andino. El muestreo y la recogida de larvas tuvieron lugar en un vivero de la comunidad campesina de Lanza, distrito de Ahuaycha, en la Cuenca Media del Río Mantaro, provincia de Tayacaja, Huancavelica (Figuras 2 y 3A).

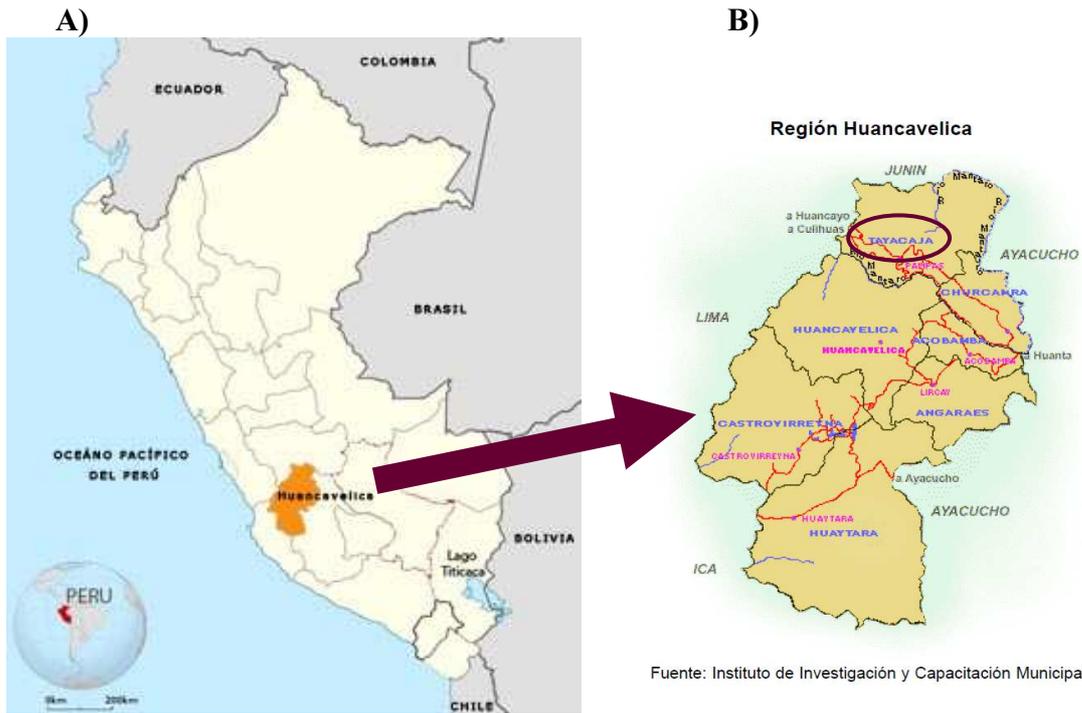


Figura 2. A) Localización de la Región de Huancavelica en Perú. B) Departamento de Tayacaja, en la Región de Huancavelica.

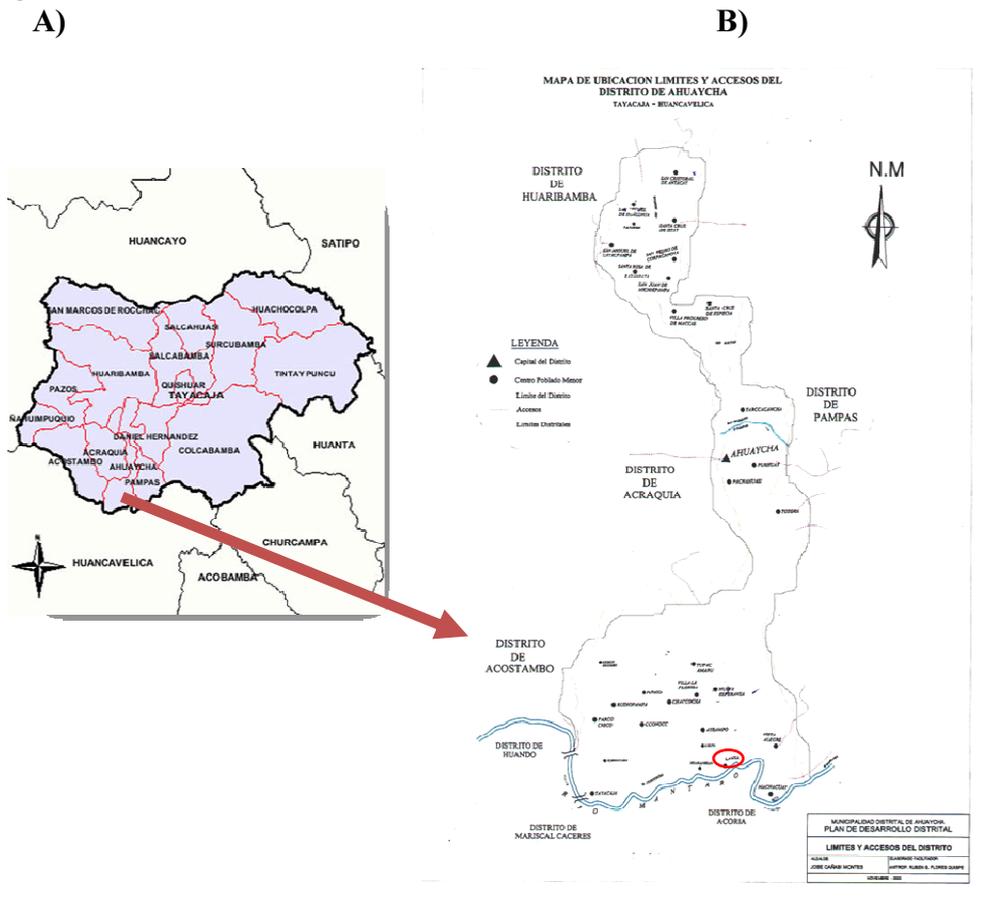


Figura 3. A) Mapa del departamento de Tayacaja y B) Distrito de Ahuaycha, donde se localiza la comunidad campesina de Lanza.

El maíz se cultivó en una parcela de 1.363 m² localizada en la comunidad campesina de Lanza (Fig. 3B). La variedad de maíz utilizado fue Blanco de Urubamba, dicha siembra se realizó el 6 de agosto y fue tratada con un fungicida (VITAVAX-300[®] Carboxin + Captan, Grupo ANDEX) para evitar la aparición de hongos. Este producto es un polvo mojante, mezcla de un fungicida sistémico y un protector para el control de hongos como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Aspergillus*, *Ustilago* y *Phytium* que atacan las semillas y causan su pudrición y muerte (<http://www.grupoandina.com>). Por otro lado, con el fin de evitar que el maíz fuera atacado por otras plagas además del cogollero y teniendo en cuenta que durante todo el muestreo no iban a aplicarse químicos, se construyeron 10 trampas amarillas con pegante.

El 25 de septiembre se hizo el abonado en superficie y el 29 del mismo mes se procedió a la aplicación de químicos. Posteriormente se realizó el muestreo de larvas y diversos entomopatógenos. La recolección manual de larvas se efectuó por la mañana durante 37 días consecutivos (del 24 de agosto al 29 de septiembre). El muestreo se realizó sobre toda la parcela, planta por planta, mirando tanto en el cogollo para ver si había presencia de larvas en el mismo, como en las hojas y el envés de las mismas.

Los individuos recogidos en campo se mantuvieron individualizados en recipientes de plástico de 25 ml con el fin de evitar contaminaciones cruzadas así como competencia por los recursos entre los distintos individuos. De esta manera, también se evitaban sus hábitos caníbales. Dichas larvas se alimentaban todos los días con trozos de hojas de maíz recogidas del campo. Las larvas que murieron y los parasitoides encontrados (capullos) se recogieron en tubos Eppendorf. Las pupas se colocaron en bolsas de papel que contenían algodón en su base. Las palomillas emergentes se trasladaron a un ponedero donde se alimentaban mediante unas bandas de papel en las que se colocaron gotitas de miel diluidas en agua. Una vez que los adultos emergieron tardaron de 4 a 6 días en ovipositar. Posteriormente, la puesta se trasladaba a un táper de mayor tamaño junto con hojas de maíz que servían de alimento a las larvas recién nacidas. Al llegar las larvas al estadio L4 se individualizaban en los recipientes de plástico reciclados que habían sido previamente lavados y desinfectados con lejía para evitar posibles contaminaciones y se volvía a repetir el ciclo.

4.3 EFICACIA EN CAMPO

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos inóculos virales de SfMNPV procedentes del Programa de Control Biológico del SENASA en Ate-Vitarte, Lima. El primero, era un bioinsecticida granulado formulado elaborado el 19 de marzo de 2010 en el Centro de Programa Biológico del SENASA a base de un aislado del SfMNPV procedente del departamento de San Martín (Vásquez *et al.*, 2002) en la selva peruana (Hilda Gamarra, comunicación personal). Su concentración de OBs era de $3,5 \times 10^9$ OBs/g. El segundo inóculo viral procedía de larvas muertas obtenidas en los ensayos de campo realizados en el mismo departamento tras dispersar el primer inóculo granulado. Para realizar la semipurificación de este segundo inóculo viral, que se utilizaría posteriormente para elaborar el biopreparado líquido, se añadió en un recipiente 1 ml de agua destilada por cada larva muerta y se trituró con la ayuda de un mortero hasta que los restos de larvas fueron mínimos. En total se trituraron 23 larvas y la mezcla se filtró por un colador para separar todas las partes gruesas del insecto (cabezas y cutícula). El filtrado final fue la materia activa del bioinsecticida. Debido a que las larvas infectadas por baculovirus no eran muy recientes se preparó 1 l de caldo por cada 4 larvas trituradas.

La aplicación del bioinsecticida en campo se realizó en una parcela localizada en Colcayá, distrito de San Juan de Castrovirreyna, en el departamento de Castrovirreyna, región de Huancavelica (Figura 4). La parcela estaba compuesta por 5 líneas de maíz,



Figura 4. Mapa del departamento de Castrovirreyna, donde se localiza el distrito de San Juan.

con 58 plantas por línea de 12 m de longitud cada una. La variedad de maíz correspondió a la variedad amilácea y fue sembrada el 30 de noviembre. Dicho maíz emergió el 8 de diciembre y los tratamientos se realizaron el 21 diciembre. La primera línea fue la línea testigo que no recibió ningún tratamiento, estando apartada de las demás para evitar contaminaciones. En las líneas 2 y 3 se aplicó el bioinsecticida granulado, mientras que en las líneas 4 y 5 se aplicó el biopreparado líquido.

Para aplicar el biopreparado líquido se utilizó una mochila pulverizadora de 20 l de capacidad. Con anterioridad, al biopreparado se le añadieron unas gotas de WETTEX® (Alquilsulfato) (Comercial Andina Industrial S.A.C.), un adherente-dispersante concentrado que evita el lavado de los pesticidas y nutrientes foliares agrícolas por las lluvias y fuertes rocíos. En el caso del bioinsecticida granulado, con la yema de los dedos índice y pulgar se cogió una pizquita de los polvos y se colocó dentro del cogollo de todas las plantas.

El diagnóstico de las plantas se realizó el 28 de diciembre, y con el fin de comparar la efectividad de los distintos tratamientos se estimó el Daño Foliar Promedio (DFP) causado por *S. frugiperda*, empleando la escala y la ecuación básica propuesta por Fernández y Expósito (2000). Dicha escala identifica 4 niveles de daño visual como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Escala utilizada para determinar el grado de daño causado por *S. frugiperda* en las hojas de maíz (Fernández y Expósito, 2000).

Grado	Características del daño
0	La planta no presenta ningún daño.
1	Daño en forma de ventana ocasionado por larvas pequeñas consistente en pequeños raspados de menos de 5mm de diámetro en la superficie inferior de las hojas tiernas, destruyendo el mesófilo y dejando intacta la epidermis superior, que se observa translúcida.
2	Daño mayor de 5 y menos de 10mm, ocasionando unas perforaciones características generalmente circulares, casi siempre en el interior de las hojas, raramente en sus bordes.
3	Daño mayor de 10mm, tanto en los bordes como en el interior de la hoja.

El DFP se calculó mediante la fórmula:

$$DFP = \frac{\sum (f_i x X_i)}{N}$$

donde:

X_i : valor de las observaciones (entre 0 y 3, de acuerdo a la escala de daños)

f_i : Frecuencia (número de observaciones) de cada valor.

N: Número total de observaciones realizadas (plantas examinadas).

Por otro lado, también se determinó el porcentaje de hojas atacadas así como el número de larvas muertas en los distintos tratamientos respecto al total observado.

Para el análisis de datos se emplearon el programa Excel (Microsoft Excel) y el programa estadístico R. Los gráficos se realizaron con la ayuda de los programas Sigma Plot y Excel. La comparación del DFP, porcentaje de hojas atacadas y el número de larvas de *S. frugiperda* muertas con respecto al total observado en los distintos tratamientos se realizó mediante los correspondientes Análisis de la Varianza (ANOVA). Posteriormente, para determinar diferencias entre los distintos tratamientos se realizó el test de rango múltiple de Tuckey ($\alpha = 0,05$).

4.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS

4.4.1 Insectos

Las larvas de *S. frugiperda* utilizadas para la caracterización molecular del virus procedían de una población establecida durante varias generaciones en el insectario de la UPNA con pupas recibidas de El Zamorano, Honduras, en 1997 y refrescadas periódicamente con pupas de Tapachula, México. Esta población se mantiene en condiciones controladas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, 75% de HR (Humedad Relativa) y fotoperiodo de 16 horas de luz: 8 horas de oscuridad. Los estadios larvarios se alimentaron con una dieta artificial semisintética (Greene *et al.*, 1976) cuya composición se detalla en el Cuadro 2. Los adultos se alimentaron con miel diluida al 30% (P/V).

Cuadro 2. Composición de la dieta semisintética empleada para la cría de larvas de *S. frugiperda* (Greene *et al.*, 1976).

Ingrediente	g/l	Ingrediente	g/l
Germen de trigo	72	Carragenina	18,75
Proteína de soja	25	Ácido sórbico	1,5
Azúcar comercial	29,25	Ácido benzoico	0,375
Levadura de cerveza	14,25	Vitaminas y antibióticos	4,37
Mezcla de sales Wesson	9,4	Cloruro de colina	0,94
Colesterol	0,94	Agua destilada	0,71
Nipagina	0,94		

4.4.2 Multiplicación del virus

Con el fin de realizar la caracterización molecular de los dos biopreparados utilizados en campo, se llevó a cabo la multiplicación de los mismos *in vivo* utilizando 200 larvas L₄ de *S. frugiperda*. Como control de la sintomatología y mortalidad se realizó al mismo tiempo la multiplicación del aislado SfMNPV-NIC (Simón *et al.*, 2004). La inoculación del virus se llevó a cabo a través del método de la gota descrito por Hughes y Wood (1981) utilizando una concentración de 10⁸ OBs/ml. Una vez inoculadas las larvas se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo. La dieta semisintética empleada para la cría de las larvas fue la descrita anteriormente (Cuadro 2).

Algunas de las larvas vivas y muertas durante la multiplicación de los dos biopreparados se utilizaron para determinar la presencia de OBs en los distintos tejidos larvarios. Para ello, se diseccionaron las larvas realizando un corte transversal del abdomen, con el fin de observar posteriormente los distintos tejidos al microscopio óptico de contraste de fases de 400x.

4.4.3 Purificación de los poliedros

Los cadáveres de las larvas infectadas se recogieron de forma conjunta para cada uno de los biopreparados. Después de la adición de 5 ml de SDS (Sodio Dodecil Sulfato) al 0,1% para liberar los poliedros, las larvas se trituraron con la ayuda de una lanceta. A continuación, las suspensiones obtenidas se filtraron por medio de una tela de muselina para eliminar los restos de tegumento y se centrifugaron a 6.000 rpm durante 5

min. Los precipitados resultantes se resuspendieron en 1 ml de SDS al 0,1% y volvieron a centrifugarse a 6.000 rpm durante 5 min. Finalmente, los OBs obtenidos se resuspendieron en 1 vol de agua bidestilada estéril y se conservaron a 4 °C hasta su utilización. Tras la purificación de los mismos se realizó la observación de la preparación al microscopio óptico de contraste de fases.

4.4.4 Extracción de ADN viral y digestión con endonucleasas

La extracción del ADN se llevó a cabo a partir de OBs purificados tras la multiplicación de los mismos. A 100 µl de virus se les añadió 100 µl de la solución alcalina 0,5 M Na₂CO₃, 50 µl de SDS 10% y 250 µl de agua destilada estéril, y se incubó durante 10 min a 60 °C. Esta solución permite la ruptura de la matriz proteica de los OBs y la liberación de los viriones al medio. A continuación se sedimentaron los restos de poliedrina mediante centrifugación durante 5 min a 6.000 rpm y el sobrenadante, conteniendo los viriones, se incubó con 500 µg/ml de proteinasa K durante 45 min a 50 °C para romper las envolturas de los viriones. Posteriormente el ADN se extrajo por fenolización mediante tres pases: los dos primeros con fenol y el último con cloroformo. En cada uno de los pases se agitó la mezcla suavemente para homogeneizarla y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min, recuperando la fase acuosa. El ADN se precipitó añadiendo 1/10 vol de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) (40µl) y 2,5 vol de etanol 100%, y se centrifugó a 6.000 rpm durante 10 min. A continuación, se lavó con etanol 70% y se centrifugó 5 min a 6.000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante el ADN se resuspendió en 50 µl de TE (Tris/EDTA) al 0,1%.

El ADN se digirió con la endonucleasa de restricción *Pst*I, ya que es la que mejor diferencia aislados del SfMNPV (Escribano *et. al.*, 1999; Simón *et al.*, 2004), durante 4-24 h a 37°C utilizando el tampón de digestión recomendado por el proveedor (Takara Bio INC. Otsu Shiga, Japón). Los fragmentos resultantes se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón de TAE (40 µM Tris-acetato; 1mM EDTA, pH 8,0) a 16 V durante aproximadamente 16 h.

Posteriormente el gel se tiñó en una solución que contenía bromuro de etidio (0,01 mg/ml) para la observación de los fragmentos de ADN y se fotografió utilizando el programa informático Chemi-doc (CioRad, Madrid, España).

5. RESULTADOS

5.1 PROBLEMÁTICA FITOSANITARIA DEL MAÍZ EN LA SIERRA CENTRAL DE PERÚ

5.1.1 Cultivo de maíz

En la actualidad, los agricultores de la región de Huancavelica siembran una multitud de variedades de maíz: Blanco de Urubamba, Criolla Huancavelicana, Amiláceo, Astilla, Chulpi, Chispa, Ccaruay, Morocho, etc. Por otro lado, la época de siembra varía mucho pero de forma general puede decirse que se cultiva durante todo el año, siendo la época normal de siembra los meses que van desde septiembre a diciembre aunque hay agricultores que siembran en marzo y abril e incluso junio. El cultivo está muy bien adaptado al clima y debido a la gran cantidad de variedades que existen los agricultores pueden elegir la variedad que más les convenga en cada época del año.

El ciclo del maíz varía también según la variedad, el clima, altitud, etc. pero generalmente se observa un ciclo más corto en el maíz blanco (3-6 meses) que en el amarillo (5-6 meses).

Existen zonas de regadío por superficie a través de canales de riego y acequias, en las que se riega cada 8-10 días una vez que el cultivo está implantado, y por otro lado, existen zonas en las que la finca (o “chacra”) no dispone de sistema de riego. La época de lluvia suele ser de diciembre a marzo, y dependiendo de la zona las lluvias son más o menos fuertes.

5.1.2 Plagas más frecuentes en maíz

Según las encuestas realizadas, las plagas más frecuentes son el cañero (*Agrotis sp.*), el mazorquero (*Helicoverpa zea*) y el cogollero o utuskuru (*Spodoptera frugiperda*). La identificación de las mismas es visual y sobre todo adquirida por experiencia dado que la mayoría de los agricultores practican esta actividad desde niños y raramente han tenido capacitación.

Algunos saben distinguir el cogollero de las otras dos especies identificando los daños que éste realiza en el cultivo (agujeros, ventanas) y por el momento de aparición (al mes, mes y medio, dos meses o desde que la planta ha emergido hasta que sale la mazorca o “el choclo”). Sin embargo, muchos otros confunden las tres especies,

independientemente de las diferencias morfológicas y los diferentes síntomas de daños en la planta. Por otro lado, entre los mismos agricultores hay ciertas discrepancias en cuanto a la aparición del cogollero en los cultivos.

5.1.3 Métodos de control

El método de control de dichas plagas se basa en la utilización de insecticidas químicos de síntesis. La casi totalidad de los agricultores aplica un insecticida líquido mediante pulverización con una mochila, y ninguno de ellos utiliza ningún tipo de protección, aunque reconocen que es conveniente usarla. Otros aplican insecticidas sintéticos granulados o en polvo (como DIPTER, DETOMIL o GRANULATE), e incluso mezclado con otros insecticidas líquidos (Pirinex, Tifón o Perfection). Esto se debe a que el agricultor, aunque sí es cierto que en ocasiones es asesorado por algún ingeniero agrónomo, suele acudir al responsable de la tienda de agroquímicos y consulta a dicho responsable de la utilización de los mismos. Por último, un pequeño porcentaje (8%) no aplica ningún tipo de insecticida, debido a que las pérdidas producidas por las plagas no compensan el gasto que supone la utilización de dichos productos.

Un caso que llama la atención entre el uso indiscriminado de los insecticidas y el nulo uso de los mismos, es el de un agricultor que asesorado por un ingeniero agrónomo utiliza un “remedio casero” a base de rocoto (un fruto del género *Capsicum* utilizado como condimento picante en la cocina latinoamericana) triturado y dice haber tenido mejores resultados que incluso con los químicos. Éste es un ejemplo del uso de extractos vegetales como bioinsecticidas artesanales.

Por otro lado, el uso de químicos por parte de los agricultores ha ido en aumento. Todos ellos estaban de acuerdo en que hace 20-25 años no se hacía uso de ningún tipo de químicos, ni siquiera para abonar. Aunque hoy en día sigue utilizándose estiércol de corral para abonar los cultivos, antiguamente éste era uno de los pocos aportes que se realizaban a la tierra tanto para abonar como para evitar las plagas.

Por último, es interesante comentar que casi ningún agricultor conoce el control biológico y ninguno de ellos reconoce el término “bioinsecticida” o “insecticida biológico”. Cabe decir que muchos de ellos no están interesados debido a que no están capacitados para su uso y raramente comprenden el mecanismo de acción de los mismos. Sin embargo, muchos otros están interesados en todo aquello que suponga una innovación tecnológica y una mejora de sus cultivos.

5.2 ESTABLECIMIENTO Y MUESTREO DEL CULTIVO DE MAÍZ. ESTABLECIMIENTO DE UNA POBLACIÓN DE *S. frugiperda* EN CONDICIONES DE LABORATORIO.

Durante todo el muestreo se observó una gran infestación natural de larvas del cogollero a partir de la segunda semana de emergencia del maíz. Asimismo, también se observó la presencia de otras plagas de gran importancia en Perú, como *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomellidae) comúnmente conocida como lorito, o *Dalbulus maidis* (Homoptera: Cicadellidae) que además de aparecer en las plantas fueron capturadas con las trampas pegajosas amarillas.

Por otro lado, se caracterizaron distintos depredadores de *S. frugiperda* como *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae), *Orius spp.* (Hemiptera: Anthocoridae), *Crysoperla spp.* (Neuroptera: Chrysopidae) y *Eriopis spp.* (Coleoptera: Coccinellidae) (Cuadro 3). También se encontraron hormigas, que se sabe reducen significativamente las poblaciones del gusano cogollero del maíz (Perfecto, 1991). Por el contrario, no se encontraron en campo microorganismos como *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) controlador biológico que se desarrolla en el Centro de Programa Biológico de Lima, ni tampoco otras especies como *Cycloneda sanguinea* (Coleoptera: Coccinellidae) que suelen ser habituales en la zona.

Cuadro 3. Enemigos naturales de *S. frugiperda* encontrados durante la fase de muestreo.

Enemigos naturales observados		Presencia
Depredadores	<i>Orius spp.</i>	SI
	<i>Eriopis spp.</i>	SI
	<i>Hippodamia convergens</i>	SI
	<i>Crysoperla spp.</i>	SI
	Hormigas (especie no identificada)	SI
	<i>Cycloneda sanguinea</i>	NO
Endoparasitoides	<i>Campoletis spp.</i>	SI
Microorganismos	<i>Beauveria bassiana</i>	NO

Durante los 37 días que duró el muestreo se recolectaron 326 larvas. Durante la época lluviosa se observó que había un control físico de *S. frugiperda* muy eficaz debido a que las larvas pequeñas mueren dentro del cogollo de las plantas por ahogamiento por la acumulación de agua. Por otro lado, el riego por aspersión también puede ser igual de efectivo dado que provoca el mismo efecto; las gotas de agua que caen sobre las hojas de maíz se acumulan en el cogollo, produciendo la muerte de las larvas pequeñas por ahogamiento. Por este motivo, el número de larvas recolectadas no fue muy elevado.

En esta primera etapa del ensayo, la mortalidad larvaria natural por causas no identificadas fue muy elevada (20,9%) posiblemente debido a las condiciones de cría, ya que no eran controladas y a los desplazamientos desde el lugar de recogida al lugar de cría. Asimismo, aunque el desarrollo de las larvas restantes fue normal, de 17 pupas (5,2%) no emergió ningún adulto, de manera que la mortalidad natural o por causas no identificadas ascendió al 26,1%.

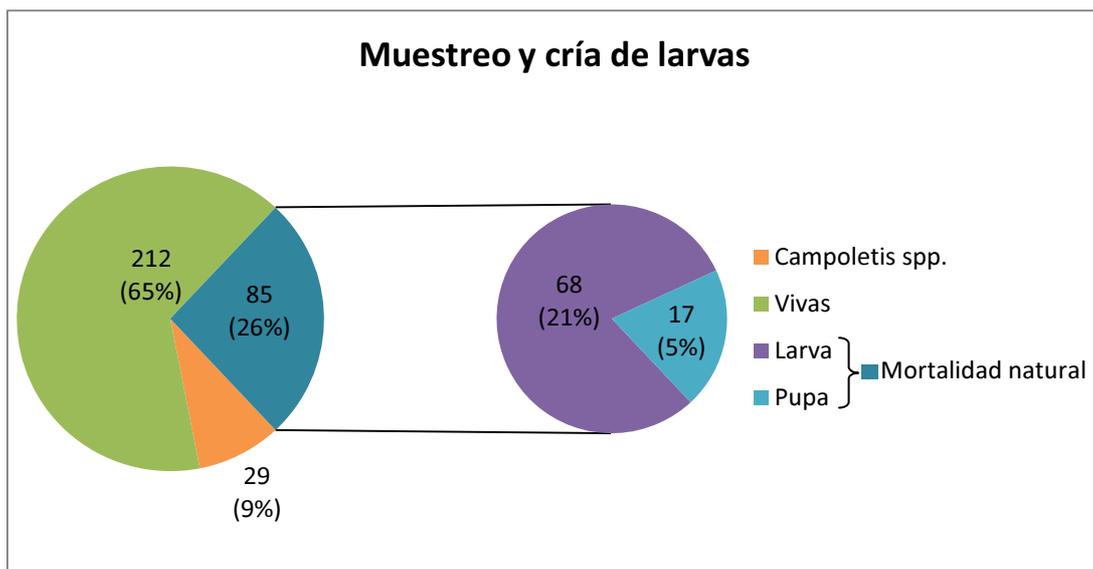


Figura 5. Porcentaje de larvas vivas y muertas, éste último apartado dividido en causas: debido a un endoparasitoide (*Campoletis spp.*), por Baculovirus y debido a la mortalidad natural observada por causas no identificadas, que se ha subdividido a su vez en mortalidad larvaria y pupal.

Durante el seguimiento de las larvas que se habían recolectado cabe destacar que el 8,9% de las mismas presentaban un endoparasitoide: *Campoletis spp.* (Blanchard) (Hymenoptera: Ichneumonidae), un coinobionte-solitario que ataca larvas del primer y segundo estadio permitiendo el desarrollo del hospedador hasta el cuarto estadio, momento en el que teje externamente su capullo (Figura 6).



Figura 6. Capullo externo de *Campoletis spp.*

Por otro lado, ninguna de las larvas recolectadas en campo presentó los síntomas típicos de enfermedad por baculovirus.

Con respecto al ciclo biológico del gusano cogollero cabe destacar que, en las condiciones en las que se estableció la población, la duración del mismo fue mayor de lo habitual. El período larvario duró de 29 a 39 días, mientras que los períodos de pupa y adulto se extendieron de 11 a 13 y de 5 a 8 días, respectivamente (Cuadro 4). El número de días en que tardaron en eclosionar los huevos también se prolongó con respecto a lo observado en otros trabajos, siendo de 6 a 9 días. La duración observada de cada etapa fue igualmente superior a lo observado previamente (Montes *et al.*, 2001; Chacón *et al.*, 2009). Esta prolongación puede justificarse debido a que el ciclo biológico de *S. frugiperda* se encuentra altamente influenciado por condiciones ambientales (Chacón *et al.*, 2009). Se ha comprobado que si bien este insecto es capaz de soportar temperaturas constantes dentro de un rango bastante amplio (15°C-35°C) su desarrollo, mortalidad y capacidad reproductiva se ven favorecidas a temperaturas comprendidas entre los 20°C y los 30°C, aumentando el número de días necesarios para completar las fases del ciclo biológico a medida que la temperatura se hace más baja (Clavijo *et al.*, 1991).

Cuadro 4. Duración mínima y máxima observada de cada etapa del ciclo de vida del cogollero del maíz *S. frugiperda* bajo condiciones ambientales (temperatura, humedad y fotoperiodo) no controladas y siendo alimentado con hojas de maíz.

Estadío	Observado
Larva	29 – 39 días
Pupa	11 – 20 días
Adulto (hasta que oviposita)	8 – 10 días
Huevos	6 - 9 días

Por último, queda comentar que los daños observados en campo se corresponden con los descritos por otros autores (Cruz *et al.*, 2002; Fernández, 2002; Fernández y Expósito, 2000): esqueletización de hojas, daño como cortador y daño como cogollero.

5.3 EFICACIA EN CAMPO

El 21 de diciembre, día de aplicación de los bioinsecticidas y diagnóstico inicial de la situación del cultivo, el DFP (daño foliar promedio), porcentaje de hojas dañadas y el número de larvas muertas con respecto al total fue el mismo para las distintas líneas del cultivo de maíz. El DFP el 21 de diciembre fue de 0,360, 0,414 y 0,353 para el control y los dos biopreparados, respectivamente (Figura 7). Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas ni en el porcentaje de hojas atacadas ($\chi^2 = 0,593$; gl = 2; $p > 0,05$), ni en el número de larvas muertas/total ($\chi^2 = 0,566$; gl = 2; $p > 0,05$). Así, el porcentaje de hojas dañadas fue de 13,1, 11,6 y 10,2% para los tratamientos testigo, biopreparado granulado y biopreparado líquido, respectivamente (Figura 8). Por otro lado, el número de larvas muertas encontradas en el tratamiento testigo fue de 2 respecto a un total de 14 (14,3%) que fue similar a lo observado en los tratamientos con el biopreparado granulado, 5 respecto a 47 (10,6%); o el líquido, 4 respecto a 33 (12,1%) (Figura 10A).

El día 28 de diciembre se realizó el muestreo de las distintas líneas de maíz. A diferencia de lo observado el día 21 se observaron diferencias significativas tanto en el DFP, en el porcentaje de hojas dañadas, así como en el porcentaje de larvas muertas/total entre los distintos tratamientos.

Durante la semana en la que se dejaron actuar los tratamientos, el testigo sufrió un DFP significativamente mayor ($\chi^2 = 0,040$; gl = 2; $p < 0,05$) con respecto al T2 y T3, siendo el DFP final acumulado mucho menor en estos dos últimos, aunque el DFP siguió aumentando debido a que el efecto de los tratamientos no es inmediato. En la figura 7 puede observarse una acumulación de DFP (color granate) mucho mayor en el testigo (0,52) que en los otros dos tratamientos (siendo de 0,11 en el T2 y 0,21 en el T3). El DFP acumulado fue significativamente superior (0,88) para el tratamiento testigo ($\chi^2 = 0,013$; gl = 2; $p < 0,05$), mientras que fue menor en el maíz tratado con los biopreparados granulado y líquido, siendo en este caso 1,7 y 1,6 veces menor, respectivamente, no presentando diferencias significativas entre ambos biopreparados

($\chi^2 = 0,51$; gl = 1; $p > 0,05$). Las líneas tratadas mediante el granulado, fueron las que menos daño foliar sufrieron esa semana, aunque los análisis estadísticos indican que no hay diferencias significativas entre ambos biopreparados.

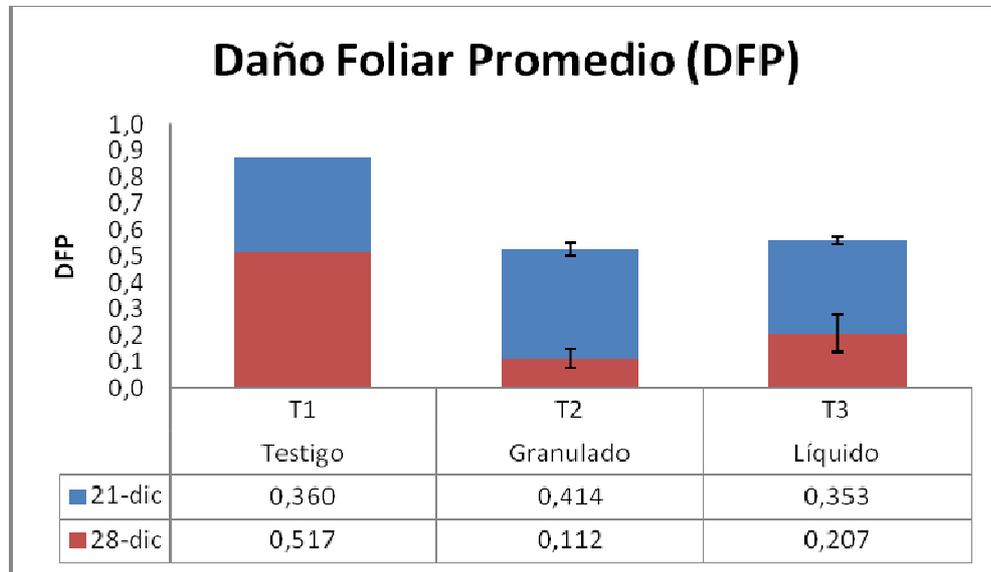


Figura 7. Daño foliar promedio observado según el tipo de tratamiento aplicado: ninguno o testigo (T1), granulado (T2) y biopreparado líquido (T3).

Por otro lado, el porcentaje de hojas atacadas el 28 de diciembre varió significativamente ($\chi^2 = 0,013$; gl = 2; $p > 0,05$) entre los tratamientos, siendo de 27,0, 16,6 y 16,9% para el control, preparado granulado y líquido, respectivamente (Figura 8B). Además, según los datos recogidos, en todos los tratamientos aumentó el número de plantas con hojas atacadas, pero el testigo fue el único que presentó plantas con daño de grado 3, es decir daño mayor de 10 mm, tanto en los bordes como en el interior de la hoja, y también se observaron muchas más plantas con daño de grado 2 (16 frente a 6 de los otros tratamientos), es decir, plantas con daños mayores de 5 y menores de 10 mm, con perforaciones generalmente circulares y casi siempre en el interior de las hojas (Figura 9).

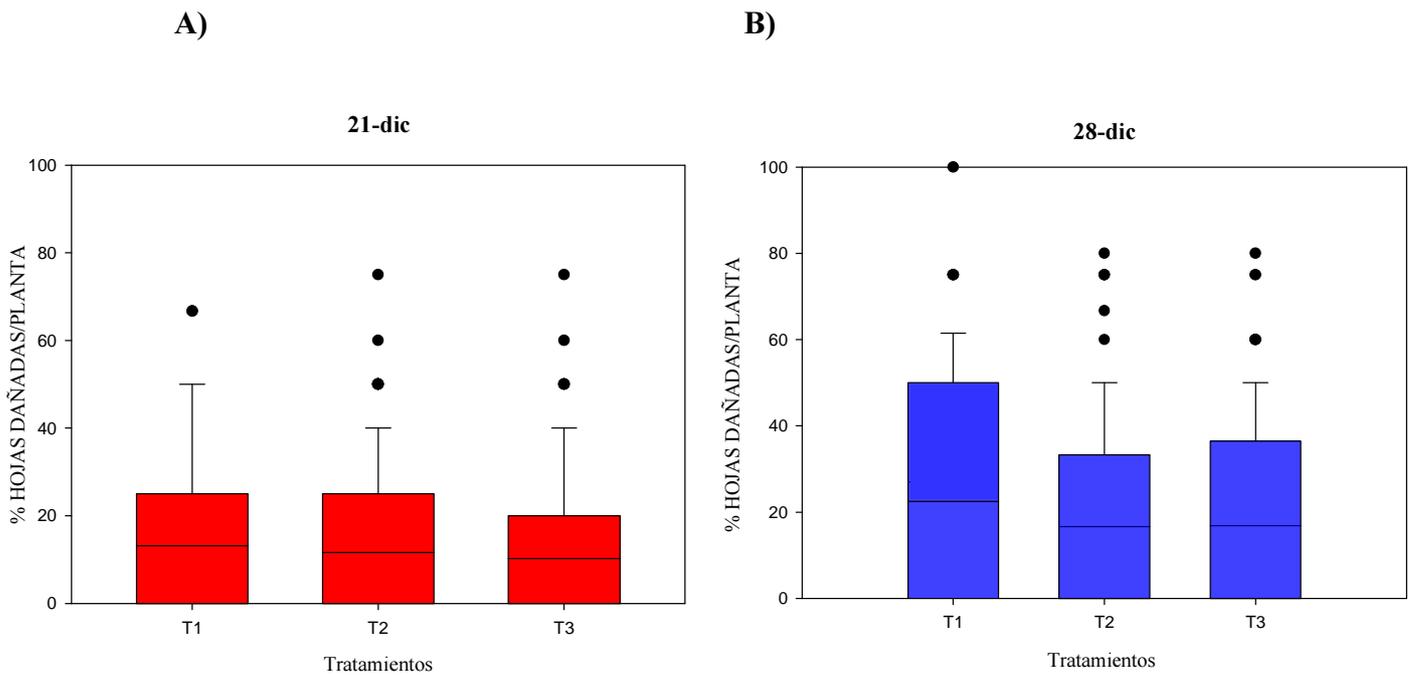


Figura 8. Diagrama de cajas del porcentaje de hojas dañadas diagnosticado en los tres tratamientos: (T1) Testigo, (T2) Granulado, (T3) Biopreparado líquido. Las líneas horizontales de cada una de las cajas representan las medias del porcentaje de hojas dañadas para cada tratamiento. **A)** 21 de diciembre: no se observaron diferencias significativas ($\chi^2 = 0,593$; gl = 2; $p > 0,05$). **B)** El 28 de diciembre el porcentaje de hojas atacadas varió significativamente entre los tratamientos ($\chi^2 = 0,013$; gl = 2; $p > 0,05$).

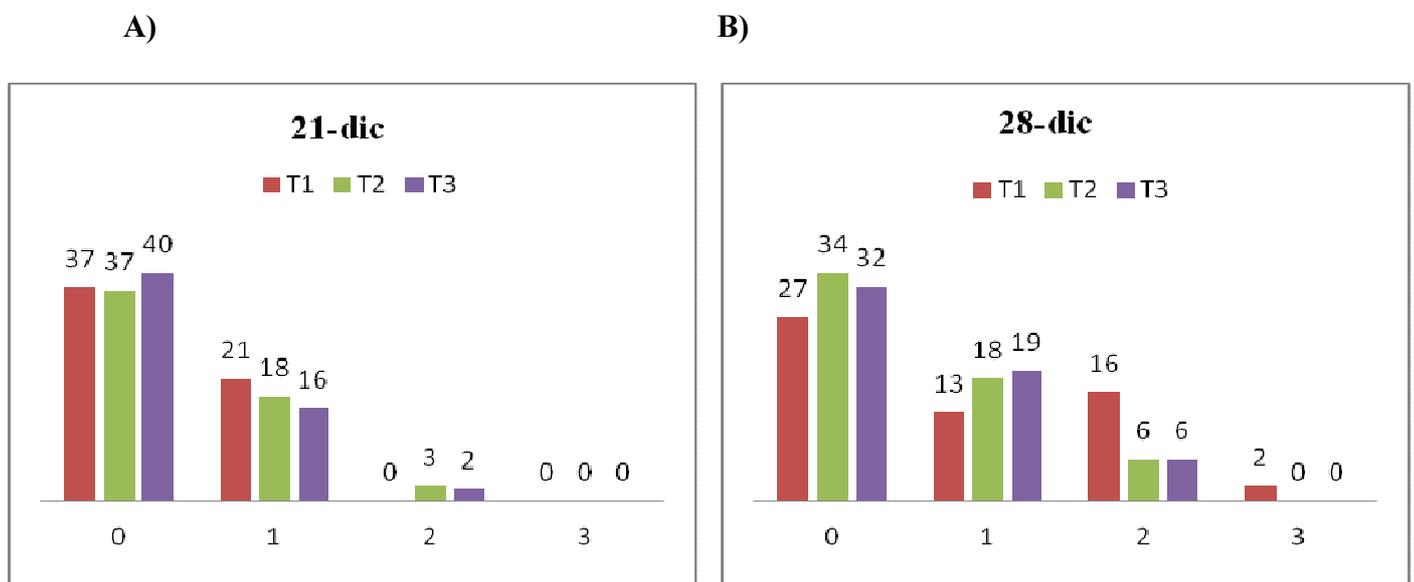


Figura 9. Número de plantas que presentaban daños de grado 0, 1, 2, 3 según el tratamiento recibido: testigo (T1), biopreparado granulado (T2) y biopreparado líquido (T3) los días **A)** 21 de diciembre y **B)** 28 de diciembre. El grado de daño se corresponde con lo indicado en el Cuadro 1.

También se evaluó el número de larvas muertas encontradas respecto al total observado. Esta cantidad fue significativamente mayor en las líneas tratadas que en la testigo ($\chi^2 = 0,049$; $gl = 2$; $p < 0,05$). El número de larvas muertas encontradas en el tratamiento testigo fue de 6 respecto a un total de 32 (18,8%), frente a las 39 respecto a 53 del biopreparado granulado (73,6%) y 41 respecto a 69 en el líquido (59,4%) (Figura 10B). Por tanto, en el tratamiento testigo no se observan diferencias entre el porcentaje de larvas muertas con respecto al total entre el 21 de diciembre (14,3%) y el 28 de diciembre (18,8%). Sin embargo, el 28 de diciembre el número de larvas muertas respecto al total encontradas es significativamente mayor en los tratamientos con los biopreparados granulados y líquido, aumentando del 10,6 al 73,6% y del 12,1 al 59,4%, respectivamente.

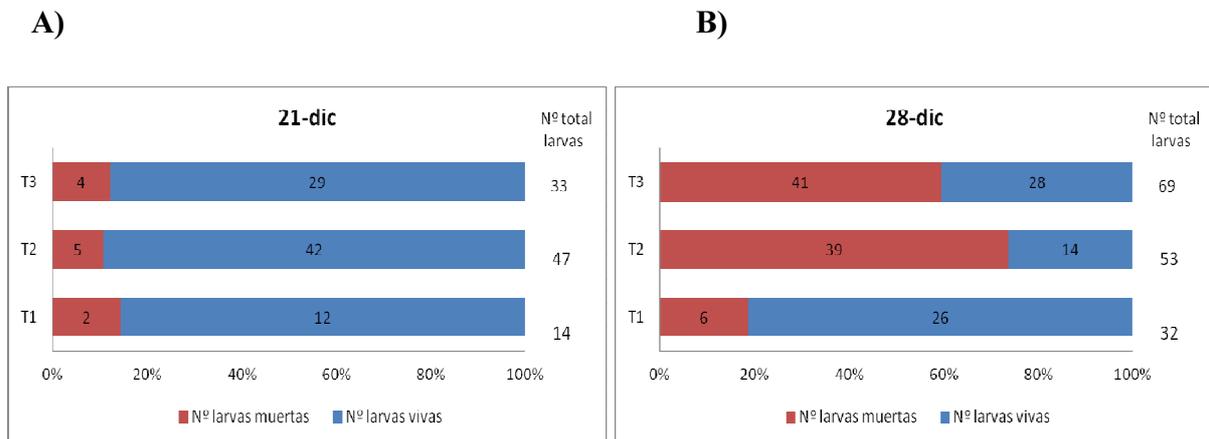


Figura 10. Diagramas de barras del porcentaje de larvas muertas respecto al total diagnosticado en los tres tratamientos: (T1) Testigo, (T2) Granulado, (T3) Biopreparado líquido. Se indica en granate el número de larvas muertas y en azul el número de larvas vivas. El número total de larvas encontradas en cada tratamiento se representa en la parte derecha de cada barra. **A)** 21 de diciembre: no se observaron diferencias significativas en el número de larvas muertas respecto al total en los distintos tratamientos ($\chi^2 = 0,566$; $gl = 2$; $p > 0,05$). **B)** 28 de diciembre: el T1 es el único tratamiento que presenta diferencias significativas ($\chi^2 = 0,049$; $gl = 2$; $p < 0,05$).

5.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS

Tras observar la eficacia en campo tanto del bioinsecticida granulado como del líquido, se llevó a cabo la caracterización molecular de dichos aislados con el fin de conocer la naturaleza de los mismos. Para ello y con el fin de obtener un buen stock de virus, se realizó una multiplicación de los mismos sobre larvas de *S. frugiperda*, utilizando como control el aislado nicaragüense del SfMNPV (SfMNPV-NIC) previamente caracterizado (Simón *et al.*, 2004).

Inicialmente, se llevó a cabo la comparación de los síntomas producidos por los distintos virus. Así, se observó que los síntomas producidos por el aislado SfMNPV-NIC y los otros dos biopreparados peruanos (granulado y líquido) fueron muy distintos. Las larvas infectadas con el SfMNPV-NIC presentaron cambios en la coloración del tegumento y de comportamiento, así como en sus hábitos alimenticios ya que las larvas infectadas con SfMNPV-NIC redujeron su apetito hasta cesar de alimentarse. Se observó también que tras la muerte de estas larvas se produjo la desintegración de los tejidos y órganos, liberándose al medio los nuevos OBs. El tegumento de dichas larvas era muy frágil y se rompió con facilidad, liberando el contenido líquido con millones de OBs. Además, muchas de las larvas emigraron hacia la parte superior del compartimento y murieron colgando de sus pseudópodos (Figura 12A). Sin embargo, en el caso de las larvas infectadas con el biopreparado granulado o líquido utilizado en los ensayos de campo en Perú, la movilidad era mínima durante todos los días de la infección, incluso en los primeros días donde no se observa un efecto claro de infección por baculovirus. Por otro lado, el tegumento de dichas larvas se oscureció hasta hacerse casi negro y se endureció, de forma que no se rompía o desintegraba en comparación con el tegumento de las larvas infectadas con SfMNPV-NIC (Figura 12B). Por último, no se observó un crecimiento en esos primeros días tras la infección. Por tanto, los síntomas producidos por el aislado SfMNPV-NIC son muy distintos a los producidos por los biopreparados peruanos. El SfMNPV-NIC produce los síntomas típicos, mientras que los síntomas producidos por los biopreparados peruanos vienen a ser más parecidos a los provocados por una infección bacteriana.

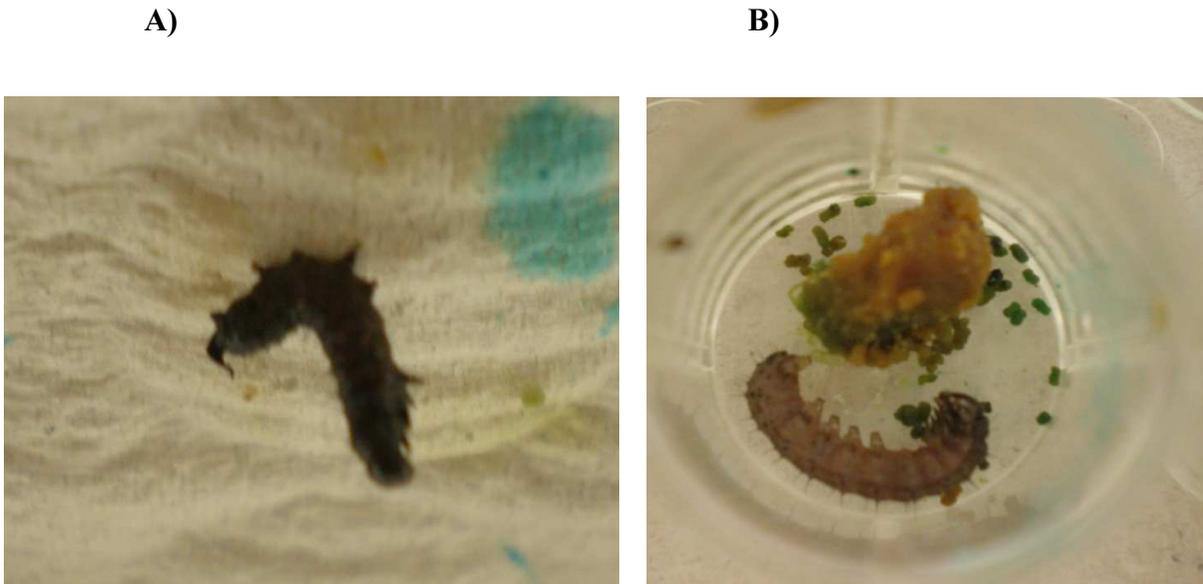


Figura 12. Síntomas causados por los dos aislados. A) Larva infectada mediante SfMNPV-NIC que ha muerto colgada de sus pseudópodos. Su tegumento es blando y se desintegra fácilmente. B) Las larvas infectadas mediante los biopreparados peruanos presentan movilidad reducida y su tegumento es más duro en comparación con las larvas infectadas por baculovirus.

Mediante la observación al microscopio y disección de las larvas muertas por los biopreparados peruanos se comprobó la presencia de algún poliedro, aunque no había suficientes como para haber producido la muerte de las larvas por poliedrosis. Sin embargo, se observó una gran presencia de bacterias, siendo éstas las posibles causantes de la muerte de las larvas. A diferencia de lo observado en las larvas muertas por los biopreparados peruanos, las muertas por el aislado SfMNPV-NIC presentaron gran cantidad de OBs en los distintos tejidos.

Por último, con las larvas muertas tanto por el SfMNPV-NIC, así como por los biopreparados peruanos, se llevó a cabo la purificación de los OBs así como la extracción de ADN viral y su posterior digestión con la enzima de restricción *Pst*I. El perfil de ADN obtenido a partir de las larvas muertas por los biopreparados peruanos no se correspondía con los perfiles típicos obtenidos con los distintos nucleopoliedrovirus. El perfil obtenido presenta muchas menos bandas que el perfil de SfMNPV-NIC (Fig. 13), por lo que puede decirse que no se trata de un aislado del SfMNPV. En base a las observaciones realizadas tanto en las infecciones *in vivo*, al microscopio óptico con las larvas muertas, así como con el ADN viral, podríamos decir que los aislados peruanos no son un nucleopoliedrovirus y que probablemente sean una bacteria.

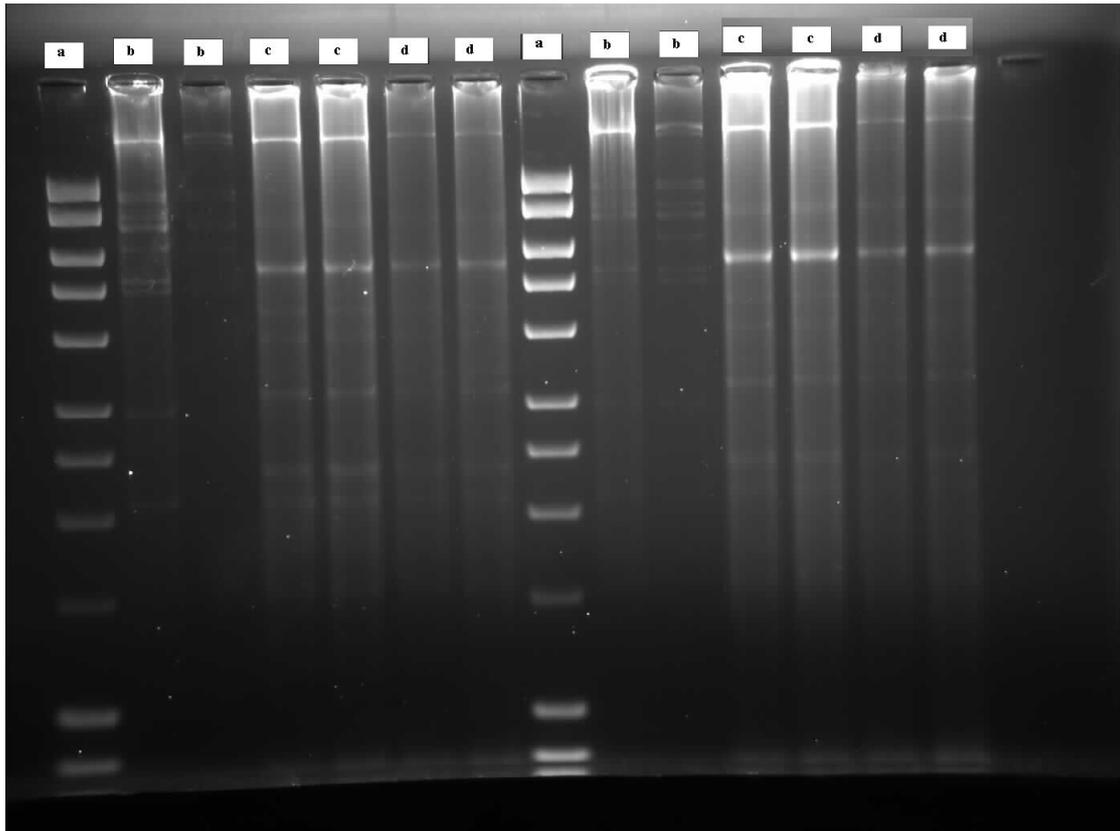


Figura 13. Perfiles de restricción obtenidos con la enzima *Pst*I a partir del ADN extraído de larvas infectadas con SfMNPV-NIC (b), con el bioinsecticida granulado (c) y con el bioinsecticida líquido (d). El carril de la derecha de la fotografía (a) se corresponde con el marcador de peso molecular 1Kb ladder (Bioline).

6. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo fue el de desarrollar un sistema de producción artesanal del SfMNPV para el control de *S. frugiperda* en la Sierra Central de Perú utilizando un aislado autóctono del mismo virus. Para ello, se llevó a cabo la búsqueda de aislados nativos en los maizales de la Sierra de Huancavelica, Perú. Durante el muestreo se observaron distintos enemigos naturales de esta especie como *Campoletis spp.*, catalogado como un importante endoparásitoide del cogollero, aunque no uno de los parasitoides más prevalentes de Centroamérica y Sudamérica, que es *Chelonus insularis* (Molina-Ochoa *et al.*, 2003). Sin embargo, no se encontraron larvas que presentasen los síntomas típicos de infección por baculovirus, por lo que el inóculo con el que se desarrollaron los insecticidas se obtuvo del Servicio Nacional de Sanidad Agraria de Perú (SENASA). En base a los resultados obtenidos en los ensayos de campo realizados con los dos biopreparados se puede decir que dichos biopreparados fueron muy efectivos en el control de *S. frugiperda*, dado que tanto el DFP así como el porcentaje de hojas atacadas disminuyó significativamente en las parcelas donde se aplicaron ambos biopreparados. Además, el número de larvas muertas de *S. frugiperda* respecto al total de larvas observadas también fue significativamente mayor en las parcelas tratadas. Por tanto, parece ser que ambos biopreparados son efectivos para el control de *S. frugiperda*.

Sin embargo, al realizar la multiplicación de ambos biopreparados en el laboratorio de Bioinsecticidas Microbianos del Instituto de Agrobiotecnología bajo la supervisión de expertos en la caracterización de baculovirus, se observó que los síntomas producidos por estos aislados en las larvas de *S. frugiperda* no se correspondían con los síntomas típicos provocados por los baculovirus (Granados y Williams, 1986; Volkman, 1997; Williams y Faulkner, 1997). Posteriormente, la caracterización molecular realizada mediante el análisis del ADN genómico viral con endonucleasas de restricción (REN) que generan perfiles de restricción de ADN característicos para cada una de las especies virales demostró que los supuestos biopreparados utilizados no eran aislados del SfMNPV, y tampoco de ningún otro baculovirus. Este tipo de análisis es ampliamente utilizado y ha demostrado ser una herramienta muy útil para la caracterización de distintas especies de baculovirus e incluso distintos aislados geográficos de una misma especie, ya que con determinadas endonucleasas los distintos

aislados geográficos muestran uno o varios fragmentos de ADN de tamaño característico (Gettig y McCarthy, 1982; Shapiro *et al.*, 1991; Caballero *et al.*, 1992; Hara *et al.*, 1995; Laitinen *et al.*, 1996; Escribano *et al.*, 1999; Takatsuka *et al.*, 2003; Barrera, 2008). Sin embargo, debido a los limitados recursos tecnológicos así como al desconocimiento de los síntomas producidos por estos virus, se concluyó que los biopreparados proporcionados por SENASA eran muy efectivos para el control de *S. frugiperda*. Se llegó a esta conclusión en parte porque SENASA cedió estos biopreparados asegurando que se trataban de aislados del SfMNPV. En 1997, el SENASA detectó la presencia de un microorganismo benéfico catalogado por Zeddám *et al.* (1997) como un baculovirus, el cual podría ser capaz de matar a *S. frugiperda*, sin ocasionar daño alguno a los insectos benéficos (Agronoticias, 1997). El virus se colectó en el distrito de Tarapoto, región de San Martín, y fue identificado en el Centro Internacional de la Papa (CIP) a partir de larvas de *S. frugiperda* infectadas por el virus (Vásquez *et al.*, 2002). Los resultados de dicho estudio concluyeron que el SfMNPV demostró ser un patógeno muy eficiente porque provoca alta mortalidad en las poblaciones larvarias de este insecto. Sin embargo, en base a la sintomatología producida así como a los patrones de restricción se podría decir que se trata más de un agente bacteriano que vírico. Es por ello, que en el presente trabajo se sugiere que los análisis o procedimientos llevados a cabo a partir de los supuestos biopreparados proporcionados por el SENASA no son adecuados o suficientes para confirmar la naturaleza de estos inóculos y que los ensayos realizados en campo con estos inóculos no pueden ser comparados con los realizados con distintos aislados geográficos del SfMNPV dado que se desconoce cuál es, en realidad, la materia activa utilizada en el presente trabajo.

La efectividad y uso de los baculovirus para el control de plagas agrícolas y forestales han sido ampliamente demostrados. Hasta la fecha, varias son las especies que han sido desarrolladas como bioinsecticidas, como son el AgMNPV para el control de *A. gemmatilis* en Brasil (Moscardi, 1999), el SeMNPV para el control de *S. exigua* en los invernaderos de Almería (Caballero *et al.*, 2009) o el HaSNPV utilizado para el control de *H. armigera* en China (Sun y Peng, 2007; Zhang *et al.*, 1995). Además de la gran diversidad interespecífica existe también una gran diversidad intraespecífica que se ha puesto de manifiesto mediante la caracterización de distintos aislados geográficos de un mismo virus. Así, del SfMNPV se han caracterizado distintos aislados geográficos

como el procedente de Nicaragua (SfMNPV-NIC) (Escribano *et al.*, 1999; Simón *et al.*, 2004), Colombia (SfMNPV-COL) (Barrera, 2008), Argentina (Berreta *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 2008) o Estados Unidos (Harrison *et al.*, 2008). Dichos aislados no se diferencian únicamente a nivel genómico o en sus perfiles de restricción, sino que también varían frecuentemente en su actividad biológica hacia las diferentes poblaciones de *S. frugiperda* (Escribano *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 1998., 1999; Simón *et al.*, 2004), siendo las poblaciones de este insecto más susceptibles hacia los aislados nativos. De esta manera, los insectos procedentes de una población hondureña son más susceptibles a aislados de virus de países vecinos como Nicaragua (SfMNPV-NIC) (Escribano *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha observado que un aislado nativo colombiano, SfMNPV-COL, presenta mejores propiedades insecticidas para el control de poblaciones autóctonas de *S. frugiperda* que el aislado SfMNPV-NIC (Barrera, 2008).

Ninguno de ellos ha llegado a ser desarrollado como bioinsecticida pero las perspectivas son buenas. En México y Honduras aplicaciones de SfMNPV-NIC entre 1.2×10^{12} y 6×10^{12} OBs/ha causan aproximadamente la infección del 40% de las larvas recogidas el segundo día después de la aplicación (Williams *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2000; Cisneros *et al.*, 2003). En Brasil también se han llevado a cabo experimentos en campo utilizando suspensiones acuosas del SfMNPV, demostrando que aquellas plantas de maíz tratadas con el virus sufrieron menor daño foliar y que la mortalidad de larvas fue mayor que en aquellas plantas que no fueron tratadas (Cruz *et al.*, 1997, 2002). Igualmente, se ha comprobado la eficiencia del SfMNPV tanto bajo condiciones de laboratorio (Valicente y Cruz, 1991) como mediante un sistema de irrigación (Valicente y Costa, 1995). En Venezuela también se conoce que larvas infectadas con una cepa del mismo virus en maíz que contenía 6×10^6 OBs/ml causó la mortalidad al 100% de las larvas cuya edad estaba comprendida entre los 7 y 10 días (Agudelo *et al.*, 1983) y en Argentina se ha constatado que un SfMNPV procedente de Leales también provoca una gran mortalidad de *S. frugiperda* (Yasem de Romero *et al.*, 2009). Sin embargo, aún siendo efectivos es interesante mencionar que análisis preliminares donde se evaluó el coste de la producción viral y de su aplicación, indicaron que el virus era considerablemente más costoso que el control convencional (Williams *et al.*, 1999). Por el contrario, el método artesanal de producción propuesto en este trabajo disminuiría

considerablemente los costes de producción, promoviendo, por tanto, un sistema de producción más sostenible en esta región.

En el caso de que se lleven a cabo estudios futuros sobre el uso del SfMNPV en Perú, sería interesante que hubiera una mejor coordinación entre los entes implicados en el Control Biológico en Perú como es el SENASA y las entidades interesadas en desarrollar dichos estudios, de manera que se facilitara tanto la comunicación como la cooperación entre los mismos.

En conclusión, la búsqueda y el estudio de aislados peruanos de baculovirus es interesante y necesario para el desarrollo de un programa efectivo y barato de control biológico contra *S. frugiperda* en lugares de bajos recursos económicos, puesto que trabajos anteriores han demostrado que el SfMNPV es eficiente para el control de este insecto. Por ello, los muestreos, análisis y procedimientos para la puesta en marcha del programa deben ser, al mismo tiempo, evaluados por expertos en la materia para que sean correctos y no se presenten los problemas indeseables que repercutan en los resultados e investigaciones futuras.

7. CONCLUSIONES

1. En la actualidad el control de *Spodoptera frugiperda* en la Sierra Central del Perú se realiza a base de la utilización de insecticidas químicos de síntesis, normalmente líquido y sin ningún tipo de protección, e incluso un pequeño porcentaje no aplica ningún tipo de insecticida. Casi ningún agricultor conoce el control biológico y ninguno de ellos reconoce el término “bioinsecticida” o “insecticida biológico”, aunque algunos presentan interés por la innovación tecnológica y mejora de sus cultivos.
2. En Huancavelica se ha observado la presencia de una gran variedad de depredadores y endoparasitoides de *S. frugiperda*.
3. La mortalidad natural de la población establecida en condiciones de cría no controladas fue muy elevada, y su ciclo biológico fue más largo probablemente debido a las condiciones de cría.
4. No se encontraron de forma natural larvas de *S. frugiperda* con síntomas de infección por baculovirus, por lo que para los ensayos de campo se utilizaron dos biopreparados proporcionados por SENASA.
5. Ambos biopreparados resultaron ser efectivos para el control de *S. frugiperda*. El DFP y el porcentaje de hojas dañadas fue significativamente menor en las parcelas tratadas con ambos biopreparados que en las parcelas control, mientras que el porcentaje de larvas muertas respecto al total fue significativamente mayor.
6. La caracterización molecular realizada mediante el análisis del ADN genómico viral con endonucleasas de restricción (REN) demostró que los biopreparados utilizados no eran aislados de SfMNPV y tampoco de ningún otro baculovirus. Además, los síntomas producidos por ambos biopreparados no eran los síntomas típicos, y tampoco se observó la presencia de cuerpos de inclusión en los tejidos de las larvas infectadas.
7. La búsqueda de aislados peruanos es interesante y necesaria para el desarrollo de un programa efectivo y barato contra *S. frugiperda*, pero al mismo tiempo, el proceso debe ser evaluado por expertos en la materia.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, F., M. Romano, H. Wassink y H. Cuello de Ucategui.** 1983. Una poliedrosis de *Spodoptera frugiperda* en Venezuela. Turrialba **33**: 219-222.
- Agronoticias,** 1997. No descuidar la producción. Revista para el desarrollo. Edición No. **213**. 90 pp.
- Andrews, K.L.** 1988. Latin american research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomologist **71**: 630-653.
- Armenta, R., A.M. Martinez, J.W. Chapman, R. Magallanes, D. Goulson, P. Caballero, R.D. Cave, J. Cisneros, J. Valle y otros autores.** 2003. Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in southern Mexico. Journal of Economic Entomology **96**: 649–661.
- Barrera, G.P.** 2008. Colombian *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: genetic and biological comparison of field isolates. Tesis de master. Máster en Biotecnología. Departamento de Producción Agraria. Universidad Pública de Navarra.
- Barreto, M., C. Guimaraes, F. Teixeira, E. Paiva y F. Valiciente.** 2005. Effect of *Baculovirus Spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* larvae and their characterization by RAPD. Neotropical Entomology **34 (1)**: 67-75.
- Batista, A., N. Alves, N. Augusto, R. Pereira, E. Alves.** 2001. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). Neotropical Entomology **30 (3)**: 411-416.
- Berretta, M.F., M.L. Rios and A. Sciocco de Cap.** 1998. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. Journal of Invertebrate Pathology **71**: 280-282.
- Caballero, P., R. Murillo, D. Muñoz, 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.

- Caballero, P., D. Zuidema, C. Santiago-Álvarez y J.M. Vlak.** 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Science and Technology* **2**: 145-157.
- Carrillo-Sánchez, J.L.** 1993. Síntesis del control biológico de *Heliothis spp.* y *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en México. *Folia Entomológica Mexicana* **87**: b 85-93.
- CATIE, 1990.** Guía para el Manejo Integrado de Plagas del Cultivo de Maíz. Turrialba, C.R.
- Chacón, Y., C. Garita, C. Vaglio, V. Villalba.** 2009. Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. *Tecnología en Marcha* **22 (4)**: 28-37.
- Chandler, L.D. y H.R. Summer.** 1991. Effect of various chemigation methodologies on suppression of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in corn. *Florida Entomologist* **74**: 270-279.
- Cisneros, J., J.A. Perez, D.I. Penagos, J. Ruiz, D. Goulson, P. Caballero, R.D. Cave y T. Williams.** 2002. Formulation of a nucleopolyhedrovirus with boric acid for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *Biological Control* **23**: 87-95.
- Cisneros, J., D.I. Penagos y T. Williams.** 2003. Potencial de un nucleopoliedrovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) en el maíz. *Memorias del XXVI Congreso de Control Biológico*. Guadalajara. pp. 315-318.
- Clavijo, S., A. Delgado, J. Lathullerie, A. Fernández-Badillo y A. Ramírez.** 1991. Influencia de la temperatura sobre el desarrollo de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). *Agronomía Tropical* **41 (5-6)**: 245-256.
- Cruz, I., E.P. Gonçalves y M.L.C. Figueredo.** 2002. Effect of a nuclear polyhedrosis virus on *Spodoptera frugiperda* (Smith) larvae, its damage and yield of maize crop. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* **1**: 20-27.
- Cruz, I., M.L.C. Figueredo, F. H. Valiciente y E A. C. Oliveria.** 1997. Application rate trials with a nuclear polyhedrosis virus to control *Spodoptera frugiperda* (Smith) on maize. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **26**: 145-152.

- Duran, J.** 2002. Bioplaguicidas: Guía de Ingredientes Activos en América Central. Turrialba 145.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R.D. Cave, J.W. Chapman y P. Caballero.** 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology* **92**: 1079-1085.
- FAO 2009.** FAOSTAT database. <http://www.fao.org>
- Fernández, J.L.** 2002. Estimación de umbrales económicos para *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep.: Noctuidae) en el cultivo del maíz. *Investigaciones Agrarias: Producción y Protección Vegetales* **17**: 467-474.
- 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.
- Gettig, R.R. y W.J. McCarthy.** 1982. Genotypic variation among wild isolates of *Heliothis spp* nuclear polyhedrosis viruses from different geographical regions. *Virology* **117**: 245-252.
- Granados, R.R. y K.A. Williams.** 1986. *In vivo* Replication of baculoviruses. P. 89-108. En: R.R. Granados y B.A. Federici, (ed.), *The Virology of Baculoviruses*, Vol. I. C.R.C. Press, Boca Raton Florida.
- Greene, G.L., N.C. Leppla y W.A. Dickerson.** 1976. Velvetbean Caterpillar – (Lepidoptera: Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economical Entomology* **69**: 487-488.
- Guillebeau, L.P. y J.N. All.** 1991. Use of pyrethroids, methomyl and chlorpyrifos to control fall armyworm (Lep: Noctuidae) in whorl stage field corn, sweet corn and sorghum. *Florida Entomologist* **74**: 261-270.
- Hara, K., M. Funakoshi y T. Kawarabata.** 1995. *In vivo* and *in vitro* characterization of several isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Acta Virologica* **39**: 215-222.
- Harrison, R., B. Puttler y H.J. Popham.** 2008. Genomic sequence analysis of a fast-killing isolate of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **89**: 775-790.

- Hruska, A.J. y F. Gould.** 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatrea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology* **90** (2): 611-622.
- Hughes, P.R. y H.A. Wood.** 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology* **37**: 154-159.
- Jaques, R.P.** 1985. Stability of insect viruses in the environment, p. 285-359. En: K. Maramorosch y K.E. Sherman (ed), *Viral insecticides for biological control*. Academic Press, Orlando.
- Jehle, J.A., M. Lange, H.L. Wang, Z.H. Hu, Y.J. Wang y W. Hauschild.** 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology* **346**: 180-193.
- Laitinen, A.M., I.S. Otvos y D.B. Lewis.** 1996. Genotypic variation among wild isolates of douglas-fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology* **89**: 640-647.
- Llanos, M.** 1994. El maíz: su cultivo y aprovechamiento. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 127-142 pp.
- Loh, L. C., J.J. Hamm, C. Kawanishi y E. Huang.** 1982. Analysis of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus genome by restriction endonucleases and electron microscopy. *Journal of Virology* **44**: 747-756.
- Martínez, A.M., D. Goulson, J.W. Chapman, P. Caballero, R.D. Cave y T. Williams.** 2000. Is it feasible to use optical brightener technology with a baculovirus bioinsecticide for resource-poor maize farmers in meosamerica? *Biological Control* **17**: 174-181.
- Molina-Ochoa, J., J.E. Carpenter, E.A. Heinrichs y J.E. Foster.** 2003. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean Basin: an inventory. *Florida Entomologist* **86**: 254-289.
- Montes, J.A., N. Espinosa, E.R. Garrido y F.A. Gutiérrez.** 2001. Reproducción del gusano cogollero (*Spodoptera Frugiperda* L.) del maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones de laboratorio. *Memorias del IX Congreso Nacional de*

- Biotecnología y Bioingeniería, II Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, Veracruz, México.
- Moscardi, F.** 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* **44**: 257-289.
- Muñoz, D., J.I. Castillejo y P. Caballero.** 1998. Two naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus strain. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 4372-4377.
- Muñoz, D., R. Murillo, P.J. Krell, J.M. Vlak y P. Caballero.** 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. *Virus Research* **59**: 61-74.
- Murillo, R. y P. Caballero.** 2006. El potencial de los baculovirus como agentes de control biológico de plagas. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal* **179**: 51-63.
- Oliveira, J.V.C., J.L.C. Wolff, A. Garcia-Maruniak, B.M. Ribeiro, M.E.B. de Castro, M.L. de Souza, F. Moscardi, J.E. Maruniak y P.M.A. Zanotto.** 2006. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **87**: 3233-3250.
- Perfecto, I.** 1991. Ants (Hymenoptera: Formicidae) as natural control agents of pests in irrigated maize in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology* **84 (1)**: 64-70.
- Rowland, R. y M. Dreyer, M.** 2001. Efectos de *Azadirachta indica* y Carbofuran granulado en control de *Spodoptera frugiperda* asociada al cultivo de maíz. *Esporas* **1(1)**: 175-179.
- Simón, O., T. Williams, M. López-Ferber y P. Caballero P.** 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: High prevalence of deletion genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* **10 (9)**: 5579-5588.
- Shapiro, D.I., J.R. Fuxa, H.D. Braymer y D.P. Pashley.** 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Invertebrate Pathology* **58**: 96-105.
- Sun, X.L. y H. Peng.** 2007. Recent advances in biological pest insects by using viruses in China. *Virologica Sinica* **22**: 158-162.

- Takatsuka, J., S. Okuno, M. Nakai and Y. Kunimi.** 2003. Genetic and biological comparison of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* **26**: 32–39.
- Tumilasci, V.F., E. Leal, P.M. Zanotto, T. Luque y J.L. Wolff.** 2003. Sequence analysis of a 5.1 kbp region of the *Spodoptera frugiperda* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome that comprises a functional ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene. *Virus Genes* **27**: 137–144.
- Valicente, F. y E. Da Costa.** 1995. Controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), com o Baculovirus *spodoptera*, aplicado via água de irrigação. *Anales de la Sociedade Entomologica do Brasil* **24 (1)**: 61-67.
- Valicente, F.H. y I. Cruz.** 1991. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com *Baculovirus spodoptera*. Sete Lagoas, 23p. (EMBRAPA) CNPMS, Circular Técnica 15.
- Vásquez, J., J.L. Zeddám y A.A. Tresierra.** 2002. Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfNPV, en Iquitos-Perú. *Folia Amazónica* **13 (1-2)**: 25-39.
- Villamizar, L., J. Zeddám, C. Espinel y A. Cotes.** 2005. Implementación de técnicas de control de calidad en el proceso productivo de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV. *Revista Colombiana de Entomología* **31 (2)**: 127-132.
- Volkman, L.E.** 1997. Nucleopolyhedrovirus interactions with their insect host. *Advances in Virus Research* **48**: 313-347.
- Williams, T., D. Goulson, P. Caballero, J. Cisneros, A.M. Martínez, J.W. Chapman, D.X. Roma y R.D. Cave.** 1999. Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small scale maize growers in Latin America. *Biological Control* **14**: 67–75.
- Williams, G.W. y P. Faulkner.** 1997. Cytological changes and viral morphogenesis during baculovirus infection p. 61-107. En: L.K. Miller (ed.), *The Baculoviruses* Plenum Press, New York.
- Wolff J.L.C, F.H. Valicente, J.V.C. Oliveira y P.M.A. Zanotto.** 2008. The Analyzes of the Genome of *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrosis virus (SfMNPV-

19) and the high genomic heterogeneity in Group II NPV. *Journal of General Virology* **89**: 1202–1211.

Yasem de Romero, M.G., E.R. Romero, D. Sosa y E. Willink. 2009. Evaluación de aislamientos de baculovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae), plaga clave del maíz en el noroeste argentino. *Revista industrial y agrícola de Tucumán* **86** (2): 7-15.

Zeddám, J.L., J. Luna, J. Cabrera, Z. Vargas y H. Gómez. 1997. Aislamiento y caracterización de un virus de poliedrosis nuclear patogénico a *Spodoptera eridania*. *Revista peruana de Entomología* **40**: 63-70.

Zhang, G. Y., X.L. Sun, Z.X. Zhang, Z.F. Zhang y F.F. Wan. 1995. Production and effectiveness of the new formulation of *Helicoverpa* virus pesticide-emulsifiable suspension. *Virologica Sinica* **10**: 242-247.