

MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

Nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera frugiperda* SfNPV003: compatibilidad con agroquímicos y estabilidad en condiciones de almacenamiento

Spodoptera frugiperda Nucleopolyhedrovirus SfNPV003: Compatibility with agrochemicals and storage stability

Adriana Marcela Santos¹, Liz Alejandra Uribe², Jenny Carolina Ruiz³, Lizeth Tabima⁴,
Juliana Andrea Gómez⁵, Laura Fernanda Villamizar⁶

¹Microbióloga Industrial. MSc. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. Mosquera, Colombia. asantos@corpoica.org.co

²Microbióloga Industrial. C.MSc. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. Mosquera, Colombia. luribe@corpoica.org.co

³Microbióloga Industrial. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. Mosquera, Colombia. jruiz@corpoica.org.co

⁴Microbióloga Industrial. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. lizeth0490@hotmail.com

⁵Microbióloga Industrial. C.PhD. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. Mosquera, Colombia. jagomez@corpoica.org.co

⁶Química Farmacéutica. MSc. PhD. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica. Mosquera, Colombia. lvillamizar@corpoica.org.co

Fecha de recepción: 30/10/2013

Fecha de aceptación: 24/02/2014

ABSTRACT

A Colombian isolate of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus SfNPV003 was formulated as a powder by microencapsulating it with a methacrylic acid polymer, which increased the photostability of the virus. In order to generate recommendations for the use of this biopesticide, the objective of this study was to establish *in vitro* compatibility with chemicals (insecticides and fungicides) and to determine the product stability during 15 months at 8 °C, 18 °C and 28 °C. The virus was compatible with eight chemicals tested, with an insecticidal activity greater than 80%. When the biopesticide was stored at 8 °C, 18 °C and 28 °C, the insecticidal activity and the content of contaminants were within acceptance limits established for each property. Results indicated that microencapsulated SfMNPV can be stored at temperatures below 28 °C, thus ensuring product quality for at least 17 months, enough time for its distribution and use.

RESUMEN

Con un aislamiento colombiano del nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera frugiperda* SfNPV003 se desarrolló una formulación en polvo mediante un proceso de microencapsulación con un polímero del ácido metacrílico, el cual aumentó la fotoestabilidad del virus. Con el fin de generar las recomendaciones para el uso de este bioplaguicida, el objetivo de la presente investigación fue establecer la compatibilidad *in vitro* con los productos químicos (insecticidas y fungicidas) que se utilizan con mayor frecuencia en el cultivo de maíz y determinar la estabilidad del producto durante 15 meses de almacenamiento a 8, 18 y 28 °C. El virus fue compatible con ocho agroquímicos evaluados y presentó una actividad insecticida superior a 80%. Cuando el bioplaguicida fue almacenado a 8, 18 y 28 °C, la actividad insecticida y el contenido de contaminantes se mantuvieron dentro de los límites de aceptación establecidos para estos parámetros. Con base en los resultados obtenidos se recomendó el almacenamiento del bioplaguicida a base del SfNPV003 en temperaturas inferiores a 28 °C, lo que garantiza la calidad del producto durante mínimo 17 meses, tiempo adecuado para su distribución y uso.

Key words: baculovirus, fungicides, fall armyworm, biological insecticide, insecticides, shelf-life.

Palabras claves: baculovirus, fungicidas, gusano cogollero, insecticida biológico, insecticidas, vida útil.

INTRODUCCIÓN

Entre las limitantes fitosanitarias de mayor impacto asociadas al cultivo de maíz (*Zea mays* L.), se destaca el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), considerado el insecto plaga más importante del cultivo en Centroamérica y Sudamérica (Farias *et al.*, 2008). En Colombia, este insecto afecta otros cultivos como sorgo, arroz, caña de azúcar, algodón, tomate de huerta, melón y girasol (De Polanía *et al.*, 2007; ICA, 2008). En la actualidad, se estima que puede reducir los rendimientos del cultivo de maíz hasta en 60%, debido a su amplia distribución y a su gran número de hospederos (ICA, 2008).

Tradicionalmente, el control de este insecto se realiza con productos químicos como los organofosforados, los carbamatos y los piretroides, compuestos altamente tóxicos (Morillo y Notz, 2001; De Polanía *et al.*, 2007). Como una alternativa ecológicamente sostenible surge el control biológico mediante el uso de virus entomopatógenos (baculovirus), microorganismos con un potencial interesante para ser incluidos en programas de manejo integrado de plagas (MIP) (Szewczyk *et al.*, 2006). Dentro de la familia Baculoviridae, se encuentran los alfabaculovirus que han demostrado una alta efectividad contra diferentes especies de *Spodoptera* sp., tanto en cultivos agrícolas como en ecosistemas agroforestales (Caballero y Murillo, 2009; Moscardi, 1999).

Los alfabaculovirus se caracterizan por que los viriones se encuentran incluidos dentro de una matriz proteica denominada cuerpo de inclusión (CI), que tiene formapoliédrica y los protege de condiciones ambientales adversas (Caballero *et al.*, 2001). A pesar de la formación de los CI, una de las principales limitantes del uso de estos virus como bioinsecticidas es su susceptibilidad a factores ambientales como la radiación ultravioleta, la temperatura, la humedad, el pH y las condiciones de almacenamiento (Tamez-Guerra *et al.*, 2006; Sajap *et al.*, 2009), factores que en conjunto limitan el uso y la comercialización de dichos productos (Ravensberg, 2011). Con base en estas limitantes, es necesario desarrollar sistemas de producción y formulación que permitan contar con productos de igual o mayor eficacia que los productos químicos; dos de los requisitos para la aceptación y comercialización de un producto biológico son su compatibilidad con agroquímicos y su estabilidad en condiciones de almacenamiento (Szewczyk *et al.*, 2005; ICA, 2011).

Teniendo en cuenta el potencial de los nucleopoliedrovirus para el control de *S. frugiperda* y que en Colombia no existe ningún producto biológico registrado para tal fin (ICA, 2013), el aislamiento colombiano codificado como SfNPV003, perteneciente a la colección de trabajo del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, fue seleccionado para el desarrollo de un bioplaguicida debido a su alta patogenicidad (Gómez *et al.*, 2010). La formulación consiste en un polvo mojable (wetable powder -WP-) donde el virus fue microencapsulado usando un copolímero del ácido metacrílico, proceso que aumentó cuatro veces la foto-estabilidad del virus (Villamizar *et al.*, 2010).

Con el fin de generar las recomendaciones para el uso de este bioplaguicida, el objetivo del presente trabajo fue establecer la compatibilidad *in vitro* con insecticidas y fungicidas químicos que se utilizan con mayor frecuencia en el cultivo de maíz y determinar la estabilidad del producto mediante la estimación de su vida útil, a las temperaturas de 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 15 meses de almacenamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Propagación viral

Para obtener la cantidad requerida de inóculo viral, se utilizaron larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda* obtenidas a partir de una colonia mantenida en condiciones de laboratorio, que fueron establecidas a partir de huevos y larvas colectadas de un cultivo de maíz en el Tolima (Colombia). Esta colonia fue renovada con insectos obtenidos en campo cada seis meses (F6). Las larvas fueron mantenidas a 28 ± 2 °C, a 60% de humedad relativa (RH) y con un fotoperiodo natural de 12:12 h (luz:oscuridad) en una dieta semisintética basada en germen de trigo, descrita por Greene *et al.* (1976). Las larvas se colocaron individualmente en vasos plásticos de 15 mL, en los cuales se adicionaron 10 μ L de una suspensión viral (SfNPV003) a una concentración de $1,0 \times 10^7$ CI/mL y una vez consumido el inóculo viral se adicionó un cubo de dieta semisintética (Gómez *et al.*, 2010). Los recipientes se incubaron a 28 ± 2 °C y a partir del quinto día se realizó la recolección de larvas muertas que presentaron sintomatología típica de infección viral.

Principio activo

Las larvas infectadas obtenidas de la propagación viral de SfNPV003 se homogenizaron con un Ultra-Turrax; la suspensión obtenida se filtró por una muselina estéril con el fin de eliminar el tejido del insecto y posteriormente se cuantificó mediante recuento en cámara de Neubauer el número de CI. La suspensión viral se liofilizó a -50 °C durante 48 horas, obteniéndose una humedad final inferior a 5%.

Compatibilidad con agroquímicos

Para la prueba de compatibilidad con agroquímicos, se seleccionaron 4 insecticidas y 4 fungicidas (tabla 1) comúnmente utilizados en el cultivo de maíz. Se tomaron 5 mL del virus purificado a una concentración de 2×10^8 CI/mL y se mezclaron con 5 mL de cada uno de los productos a evaluar, ajustando la concentración al doble de la dosis recomendada. Las mezclas se incubaron a 20 °C durante 24 h en un baño termostático.

Como tratamiento control se utilizó el virus mezclado con agua.

Purificación del nucleopoliedrovirus mezclado con los agroquímicos

Para garantizar que la mortalidad obtenida en los bioensayos es causada únicamente por la infección del SfNPV003 y no por la mezcla con los agroquímicos, se realizó una purificación, para lo cual cada mezcla se centrifugó a 12000 rpm durante 30 minutos a 10 °C, recuperándose el sedimento que se resuspendió en 1 mL de tampón tris (pH 7,4; 0,1 M) y se ubicó sobre una solución de sacarosa de 60%. La muestra se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 30 minutos y se recuperó el sedimento formado, el cual corresponde al virus. Por último se realizaron 10 lavados con agua destilada, se resuspendió el sedimento en 500 µL de agua destilada estéril y posteriormente se ajustó la concentración a $4,0 \times 10^7$ CI/mL.

Tabla 1. Insecticidas y fungicidas químicos seleccionados para estudiar su compatibilidad con el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* SfNPV003

Tipo de agroquímico	Producto (nombre comercial)	Ingrediente activo	Grupo químico	Dosis recomendada (ppm)	Plaga/ enfermedad
Insecticida	Match® 50 EC	Lufenuron 5%	Acylureas	37,5	<i>S. frugiperda</i>
	Ponto® 100 EC	Novaluron	Benzoylureas	75	<i>S. frugiperda</i>
	Lorsban® 4 EC	Clorpirifos	Organofosforado	1200	<i>S. frugiperda</i>
	Sharcalotrina® 5% EC	Lambdacialotrina	Piretroide	18,75	<i>S. frugiperda</i>
Fungicida	Dithane® M45	Mancozeb	Ditiocarbamato	12000	<i>Colletotrichum graminicola</i> , <i>Helminthosporium turcicum</i>
	Derosal® 500 SC	Carbendazim	Benzimidazol	1250	<i>Cercospora personata</i>
	Score® 250 EC	Difenoconazol	Conazol	93,75	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Ascochyta pisi</i> , <i>Erysiphe polygoni</i>
	Taspa® 500 EC	Difenoconazol-propiconazol	Conazol	156,25	<i>Phoma lingam</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i>

Concentración expresada en partes por millón (ppm).

Evaluación del efecto de agroquímicos sobre la actividad biocontroladora de SfNPV003

La actividad insecticida del nucleopoliedrovirus SfNPV003 purificado se evaluó mediante el método de la gota (Hughes y Wood, 1981). Para tal fin, cada tratamiento se mezcló en una proporción 50:50 con una solución de sacarosa al 4% y azul de alimentos al 1% obteniendo una concentración viral final de $2,0 \times 10^7$ CI/mL. A partir de esta suspensión se dispensaron gotas de 2 μ L en forma circular en un disco plástico de color blanco. Posteriormente, se ubicaron en el interior del círculo 60 larvas de 24 h de edad de *S. frugiperda* sometidas a 12 h de ayuno. Mediante observación al estereoscopio, se seleccionaron 45 larvas que presentaron coloración azul como consecuencia de la ingestión del tratamiento (virus + colorante) y se ubicaron individualmente en recipientes plásticos de 15 mL que contenían un cubo de dieta semisintética. Cada tratamiento contó con tres repeticiones, cada una compuesta por 15 unidades experimentales, las cuales consistieron en un recipiente plástico con una larva neonata de *S. frugiperda*. Se contó con un testigo absoluto que consistió en larvas de 24 h de edad de *S. frugiperda* que no fueron sometidas a ningún tratamiento. Siete días después se determinó la mortalidad y se calculó la eficacia mediante la fórmula de Schneider - Orelli (Zar, 1999).

$$\text{Eficacia (\%)} = \left[\frac{(B - K)}{(100 - K)} \right] \times 100$$

Donde *K* es el porcentaje de mortalidad en el testigo y *B* es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento.

Estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento

Elaboración del bioplaguicida

El polvo obtenido después de liofilizar la suspensión viral fue utilizado como núcleo central en el proceso de microencapsulación y para tal fin fue mezclado con una solución del copolímero del ácido metacrílico Eudragit® S100. Esta mezcla de polímero y núcleo se utilizó para el proceso de microencapsulación utilizando la metodología descrita por Villamizar *et al.* (2010) con modificaciones, ya que las microcápsulas fueron secadas por liofilización.

Estabilidad en condiciones de almacenamiento

Para un lote de bioplaguicida se empacaron muestras de 0,5 g en bolsas metalizadas de 2 cm de ancho x 4 cm de largo y se sellaron al vacío. Como tratamiento control se utilizó virus liofilizado sin formular. Treinta muestras de cada tratamiento se almacenaron en incubadoras ajustadas a las temperaturas correspondientes a 8 ± 2 °C, 18 ± 2 °C y 28 ± 2 °C. El contenido de contaminantes (bacterias, mohos y levaduras) y la actividad insecticida fueron los parámetros evaluados al producto manufacturado después de 3, 9 y 15 meses de almacenamiento.

Para medir el contenido de contaminantes, a una de las muestras se adicionaron 9 mL de Tween 80® al 0,1% y se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-5} . De las tres últimas diluciones se sembraron 100 μ L en cajas de Petri: para la evaluación de mohos en medio agar-papa-dextrosa suplementado con Tritón al 0,1% (agar PDA + Tritón), para la cuantificación de levaduras en medio agar extracto de levadura y malta (agar YM), y para el recuento de bacterias contaminantes en medio agar nutritivo. Cada dilución se sembró por triplicado. El resultado se expresó como recuento de unidades formadoras de colonia de contaminantes por gramo de producto (UFC/g). La determinación de la actividad insecticida se realizó mediante la metodología anteriormente descrita. El diseño experimental fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo y todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Análisis de resultados

La normalidad y homocedasticidad de los resultados se determinaron mediante las pruebas de Shapiro Wilks (95%) y Bartlett (95%) respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se aplicó a un análisis de varianza (anova) y a una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) utilizando el programa Statistix versión 8.1 (Analytical Software, Florida, USA). La variable eficacia obtenida en el estudio de estabilidad se correlacionó con el tiempo utilizando diferentes modelos matemáticos para determinar la vida útil del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* SfNPV003, que se definió como el tiempo en el cual la eficacia fue igual a 80%. En esta investigación se evaluaron los modelos descritos por Santos *et al.* (2012):

Orden cero: $y = kt$

Primer orden: $\ln(y) = kt$

Segundo orden: $\frac{1}{y} = kt$

Modelo de Higuchi: $y = k\sqrt{t}$

Modelo de Kosmeyer and Peppas: $y = kt^n$

Modelo polinomial: $y = k + kt + kt^2 + kt^3 \dots + kt^n$

Donde: y corresponde a la variable eficacia, t al tiempo de almacenamiento y k a una constante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compatibilidad con agroquímicos

Los resultados del efecto de los ocho agroquímicos evaluados sobre la actividad insecticida de SfNPV003 se describen en la tabla 2. El rango de la eficacia del virus expuesto tanto a los insecticidas como a los fungicidas fue de 88,6% a 100%; lo cual evidenció que el nucleopoliedrovirus no mostró incompatibilidad con ninguno de los agroquímicos empleados, ya que no se presentaron diferencias significativas entre el virus mezclado con los tratamientos y el virus usado como control, mezclado con agua ($F = 0,85$; $gl = 8$; $p = 0,5727$).

La estabilidad del nucleopoliedrovirus ante los agroquímicos empleados posiblemente se deba a la protección brindada por los cuerpos de inclusión que lo hace estable durante largos periodos de tiempo, asegurando una alta resistencia a los efectos de factores como el agua, agentes químicos y fenómenos físicos como deshidratación, radiación y cambios bruscos de temperatura (Jacques y Morris, 1981; Benz, 1987). Dicho efecto protector también fue observado por Gómez y Villamizar (2009), al evaluar la compatibilidad de un granulovirus aislado de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) con ocho agroquímicos, donde no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos en los que el virus fue expuesto a los agroquímicos, ni entre éstos y el virus puro no expuesto; esto sugiere la compatibilidad con los productos evaluados.

Batista *et al.* (2001) encontraron resultados semejantes donde un baculovirus de *Anticarsia gemmatalis* (AgNPV) fue compatible después de 12 horas de contacto con el insecticida Thiamethoxam. Igualmente, Jacques y Morris (1981) demostraron que de diez combinaciones de virus con plaguicidas, nueve resultaron en un efecto sinérgico en la mortalidad del insecto. Moscardi y Sosa-Gómez (1992) no observaron reducción en la actividad insecticida del AgNPV mezclado con varios insecticidas, al igual que Crébio y Melhorança (1999), quienes concluyeron que los herbicidas ensayados en campo no interfirieron con la eficacia de AgNPV en el control de la oruga de las leguminosas *A. gemmatalis*.

Tabla 2. Compatibilidad del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* SfNPV003 con insecticidas y fungicidas químicos. Compatibilidad expresada como mortalidad (%) y eficacia (%) sobre larvas de *S. frugiperda*

Tipo de agroquímico	Agroquímicos	Mortalidad (%)	Eficacia (%)	Desviación estándar
Insecticida	Lufenuron	88,9	88,6	10,2
	Novaluron	95,6	95,5	7,7
	Clorpirifos	100,0	100,0	0,0
	Lambdacialotrina	100,0	100,0	0,0
	Mancozeb	100,0	100,0	0,0
Fungicida	Carbendazim	97,8	97,7	3,9
	Difenoconazol	100,0	100,0	0,0
	Difenoconazol-propiconazol	91,1	90,9	3,9
Control		97,7	97,7	3,9

Los tratamientos no presentan diferencias significativas según anova (95%).

El uso combinado del nucleopoliedrovirus SfNPV003 con fungicidas e insecticidas se convierte en una herramienta clave en el desarrollo de MIP, considerando que las enfermedades y los insectos plaga llegan a afectar entre 11% y 44% del área total sembrada de maíz en los trópicos bajos, causando altas pérdidas económicas y siendo necesario el uso de diferentes productos para el manejo fitosanitario de este cultivo. Teniendo en cuenta que los agroquímicos evaluados en el presente trabajo no ejercieron ningún efecto perjudicial en la acción insecticida del nucleopoliedrovirus SfNPV003, se puede recomendar su intervención en estrategias de manejo integrado, donde se reemplacen los insecticidas para el control del cogollero por el bioplaguicida a base de baculovirus.

Estabilidad en condiciones de almacenamiento

Contenido de contaminantes

El bioplaguicida recién manufacturado presentó un contenido de contaminantes bacterianos inicial de $1,40 \times 10^4$ UFC/g de producto, el cual disminuyó significativamente a través del tiempo ($F = 19,9$; $gl = 11$; $p < 0,0001$) (tabla 3), lo que indica que no se presentó crecimiento bacteriano sino una reducción en la viabilidad de los microorganismos contaminantes.

El contenido de contaminantes fúngicos incluyendo mohos y levaduras presentó un comportamiento similar. El bioplaguicida recién manufacturado presentó un contenido de mohos contaminantes de $3,67 \times 10^4$ UFC/g de producto y un contenido de levaduras de $1,27 \times 10^4$ UFC/g (tabla 3), valores que disminuyeron a través del tiempo de almacenamiento a las diferentes temperaturas (tabla 3). En general, los tres tipos de contaminantes cuantificados en el producto (bacterias, mohos y levaduras) se mantuvieron durante los 15 meses de almacenamiento para las tres temperaturas, en valores inferiores al límite máximo de aceptación establecido en la caracterización del producto (10^6 UFC/g) (Gómez *et al.*, 2013), lo que permite sugerir que este parámetro fue estable durante el tiempo y no afectó la calidad microbiológica del bioplaguicida durante su vida de anaquel.

La contaminación microbiana inicial del producto pudo ser aportada por el ingrediente activo viral cuya producción se realiza en condiciones *in vivo*, lo que genera una carga importante de bacterias y hongos saprófitos que colonizan las dietas, la superficie del insecto, el intestino y las heces del mismo (Caballero *et al.*, 2001). Jenkins y Grzywacz (2000) y Guillon (1997) argumentan que la mayoría de estos microorganismos son generalmente especies comunes de *Pseudomonas*, *Enterococcus*, especies coliformes de la familia Enterobacteriaceae y *Bacillus cereus*.

Tabla 3. Contenido de contaminantes bacterianos y fúngicos del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* SfNPV003 almacenado a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante 15 meses

Contenido de contaminantes (UFC/g)	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)			
		0	3	9	15
Bacterias	8±2	$1,40 \times 10^4$ * a	$1,40 \times 10^4$ a	$1,83 \times 10^4$ a	$1,83 \times 10^3$ c
	18±2	$1,40 \times 10^4$ a	$2,10 \times 10^4$ a	$6,11 \times 10^3$ b	$1,40 \times 10^3$ c
	28±2	$1,40 \times 10^4$ a	$7,00 \times 10^3$ b	$1,20 \times 10^3$ c	$1,20 \times 10^3$ c
Hongos	8±2	$3,67 \times 10^4$ * a	$7,33 \times 10^3$ b	$3,30 \times 10^4$ ab	$3,30 \times 10^4$ ab
	18±2	$3,67 \times 10^4$ a	$4,33 \times 10^3$ b	$1,58 \times 10^4$ ab	$1,10 \times 10^4$ ab
	28±2	$3,67 \times 10^4$ a	$7,00 \times 10^3$ b	$1,90 \times 10^4$ ab	$1,47 \times 10^4$ ab
Levaduras	8±2	$1,27 \times 10^4$ * a	$9,97 \times 10^3$ b	$5,33 \times 10^2$ c	$5,23 \times 10^2$ c
	18±2	$1,27 \times 10^4$ a	$1,20 \times 10^2$ c	$1,30 \times 10^3$ bc	$1,30 \times 10^3$ bc
	28±2	$1,27 \times 10^4$ a	$1,00 \times 10^2$ c	$8,67 \times 10^2$ c	$8,67 \times 10^2$ c

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

El análisis se realizó independientemente para cada contaminante.

La estabilidad del contenido de contaminantes a través del tiempo posiblemente se debió a la baja humedad del producto (1,84%) y a la poca disponibilidad de nutrientes presentes en la formulación. Según Costa *et al.* (2002), una baja humedad (inferior al 5%) estabiliza los microorganismos debido a que entran en un estado de latencia donde el metabolismo disminuye significativamente. Este comportamiento favorece la estabilidad del bioplaguicida porque las bacterias contaminantes, al presentar una actividad metabólica baja, reducen la producción de metabolitos de carácter ácido o básico que podrían causar la proteólisis de los cuerpos de inclusión, afectando directamente la eficacia del producto (Jenkins y Grzywacz, 2000). En la actualidad, para los productos a base de los baculovirus no existen estándares de calidad internacionalmente aceptados por la industria o por los entes regulatorios (Ravensberg, 2011).

Actividad insecticida

El bioplaguicida recién manufacturado presentó una eficacia de 91,89%, valor que no fue significativamente diferente al presentado por el virus liofilizado sin formular (94,4%) ($F = 0,23$; $gl = 1$; $P = 0,6574$). Este resultado sugiere que la formulación no mejoró la actividad insecticida del virus, pero tampoco tuvo un efecto negativo sobre ésta, lo que indica que durante el desarrollo del producto se realizó una selección adecuada de excipientes compatibles y se ajustaron las condiciones del proceso

para no generar inactivación de las partículas virales (Villamizar *et al.*, 2010).

El comportamiento de la eficacia del bioplaguicida y del virus sin formular almacenados durante 15 meses a 8 °C, 18 °C y 28 °C se describe en la tabla 4, donde se puede observar que el producto formulado no presentó una disminución significativa en la actividad insecticida durante los quince meses del estudio ($F = 1,11$; $gl = 11$; $P = 0,3952$). Por el contrario, el virus liofilizado sin formular presentó una reducción significativa de la eficacia ($F = 11,3$; $gl = 11$; $P < 0,0001$) en el mes quince de almacenamiento a las temperaturas de 18 °C y 28 °C, con valores de 75,76% y 63,63% respectivamente (tabla 4). Este resultado indica que el producto formulado mejoró la estabilidad biológica del virus, manteniéndolo activo mínimo durante los 15 meses, sin evidenciarse un efecto de la temperatura, mientras que el virus liofilizado sin formular solo se mantuvo estable durante nueve meses a 18 °C y 28 °C. Esta mayor estabilidad de un baculovirus formulado con respecto al sin formular también fue evidenciada por Batista *et al.* (2001), quienes evaluaron el nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* sin formular y dos formulaciones diseñadas como un concentrado emulsionable (CE) y un polvo mojable (WP). Los autores evidenciaron que después de 20 meses de almacenamiento el CE causaba una mortalidad cercana a 80%, mientras que el virus sin formular mostró una reducción de 40% en la actividad biológica después del mismo tiempo de almacenamiento.

Tabla 4. Eficacia (%) del bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* SFPV003 y del virus sin formular almacenados a 8 °C, 18 °C y 28 °C durante quince meses

Tratamientos	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)			
		0	3	9	15
Virus formulado	8±2	91,89	100	86,48	87,80
	18±2	91,89	100	97,30	87,87
	28±2	91,89	100	94,60	90,90
Virus sin formular	8±2	95,12* a	100 a	100 a	93,90 a
	18±2	95,12 a	100 a	97,3 a	75,75 b
	28±2	95,12 a	100 a	97,3 a	63,63 b

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%). El análisis se realizó independientemente para cada tratamiento.

Para estimar la vida útil del bioplaguicida a base del SfNPV, se evaluó el ajuste de la eficacia *versus* el tiempo de almacenamiento con varios modelos matemáticos (tabla 5). El mejor ajuste correspondió al modelo polinomial (tablas 5 y 6) de forma similar a lo observado en trabajos previos con otros bioproductos (Lahlalia *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012). Una vez definido el modelo más adecuado para interpretar el comportamiento de los datos, se procedió a establecer la vida

útil de los productos calculando, mediante la ecuación determinada, el tiempo en el cual la eficacia alcanza un valor igual a 80%. Este límite se definió con base en lo recomendado por diferentes autores como Jenkins y Grzywacz (2000), Villamizar *et al.* (2005) y Ravensberg (2011), quienes establecieron que, para garantizar la calidad y eficacia de bioplaguicidas a base de baculovirus durante el almacenamiento, se requiere una actividad biocontroladora expresada como eficacia mínima de 80%.

Tabla 5. Coeficientes de determinación para definir el ajuste de los datos de eficacia *vs.* tiempo de almacenamiento estimados mediante seis modelos matemáticos

Tratamiento	Temperatura de almacenamiento (°C)	Modelos matemáticos					
		Orden cero	Primer orden	Segundo orden	Higuchi	Kosmeyer and Peppas	Polinómica
Virus formulado	8±2	0,230	0,223	0,139	0,085	0,172	1,000
	18±2	0,120	0,117	0,023	0,002	0,026	0,913
	28±2	0,038	0,039	0,004	0,000	0,007	1,000
Virus sin formular	8±2	0,015	0,016	0,000	0,004	0,000	0,965
	18±2	0,506	0,513	0,297	0,201	0,292	1,000
	28±2	0,603	0,618	0,374	0,265	0,364	0,995

Los valores de vida útil estimados para el bioplaguicida a base de SfNPV y para el virus sin formular se muestran en la tabla 6, donde se observa que los mayores tiempos de vida útil se obtuvieron a la temperatura de almacenamiento de 8 °C, con valores de 23,4 meses y 20,7 meses respectivamente; y en la temperatura más alta evaluada

se obtuvieron las menores vidas útiles. Behle *et al.* (2003) encontraron un comportamiento similar para una formulación del nucleopoliedrovirus de *A. falcifera* (AfMNPV), que presentó una vida útil de 30 meses almacenado a 4 °C y de 3 meses cuando se almacenó a 30 °C.

Tabla 6. Ecuación del modelo polinomial y vida útil estimada con dicho modelo, para el bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* y el virus sin formular

Tratamiento	Temperatura de almacenamiento (°C)	Ecuación del modelo	Vida útil (meses)
Virus formulado	8±2	$\gamma = -0,010\chi^2 + 0,438\chi + 95,176$	23,4
	18±2	$\gamma = -0,167\chi^2 + 2,135\chi + 93,000$	19,8
	28±2	$\gamma = -0,0978\chi^2 + 1,2327\chi + 93,731$	17,1
Virus sin formular	8±2	$\gamma = -0,1122\chi^2 + 1,5638\chi + 95,537$	20,7
	18±2	$\gamma = -0,2529\chi^2 + 2,5146\chi + 94,985$	14,1
	28±2	$\gamma = -0,373\chi^2 + 3,5724\chi + 94,254$	12,6

El efecto positivo de la formulación sobre un baculovirus durante el tiempo de almacenamiento también fue observado por Quiroga *et al.* (2011), quienes evaluaron la estabilidad de la actividad insecticida del granulovirus de *Phthorimaea operculella* formulado como un granulado dispersable (WG) y un concentrado emulsionable. Los autores encontraron que el virus formulado utilizando los dos sistemas de entrega presentó una alta estabilidad cuando se almacenó a 6 °C y 20 °C, manteniendo su eficacia por encima de 80% por 6 meses, resultado que se atribuyó a la adecuada selección de los excipientes utilizados en la formulación.

El bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus (SfNPV003) evaluado en el presente estudio es competitivo comparado con los disponibles comercialmente y se recomendaría su almacenamiento a temperaturas inferiores a 28 °C hasta por 17 meses, tiempo durante el cual se garantiza su calidad microbiológica y su actividad insecticida. Teniendo en cuenta que a escala mundial

existen varios productos a base de baculovirus como Elcar®, Biovirus-H®, TM Biocontrol-1®, Spod-X® y Spodo-lure®, para los cuales los fabricantes estimaron una vida útil de entre un año y dos años a temperaturas entre 4 °C y 25 °C (Copping, 2009).

CONCLUSIONES

El bioplaguicida a base del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (SfNPV003) presenta un alto potencial para ser incluido dentro de programas de manejo integrado del cultivo de maíz, dado que es compatible con los agroquímicos comúnmente empleados para este. Además, el bioplaguicida es estable hasta 17 meses en condiciones de almacenamiento sin necesidad de refrigeración, lo cual le otorga una ventaja competitiva frente a bioproductos a base de hongos o bacterias cuya vida útil es inferior a estos períodos y requieren cadena de frío para su distribución y comercialización.

REFERENCIAS

- Batista A, Almeida J, Lamas C. 2001. Effect of Thiamethoxam on Entomopathogenic Microorganisms. *Neotrop. Entomol.* 30:437–447.
- Batista A, Alves SB, Augusto N, Pereira RM, Alves L. 2001. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotrop. Entomol.* 30:411–416.
- Behle RW, Tamez-Guerra P, McGuire MR. 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* Nucleopolyhedrovirus (AfMNPV) in spray-dried lignin-based formulations. *J. Econ. Entomol.* 96:1066–1075.
- Benz G. 1987. Environment. In: *Epizootiology of infectious diseases*. Editors: Fuxa J, Tanada Y. New York, USA. p. 150.
- Caballero P, Murillo R. 2009. El nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. *Rev. Colomb. Entomol.* 35:105–115.
- Caballero P, Williams T, López-Ferber M. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Madrid, España, Phytoma.
- Copping L. 2009. *The Manual of Biocontrol Agents, The Biopesticide Manual*. 4th ed. Hampshire, Reino Unido: The British Crop Protection Council.
- Costa E, Usall J, Teixidó N, Torres R, Viñas I. 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *J. Appl. Microbiol.* 92:873–878.
- Crébio JA, Melhorança A. 1999. Eficiência do vírus de poliedrose nuclear em mistura com herbicidas pósemorgentes, no controle de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *An. da Soc. Entomológica do Bras.* 28:339–341.
- De Polanía I, Arévalo H, Mejía R. 2007. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y algunas plantas transgénicas. *Rev. Colomb. Ciencias Hortícolas* 1:103–113.
- Farias PR, Barbosa J, Busoli C, Overal W, Miranda V, Ribeiro S. 2008. Spatial analysis of the distribution of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and losses in maize crop productivity using geostatistics. *Neotrop. Entomol.* 37:321–327.
- Gómez J, Guevara E, Barrera G, Cotes AM, Villamizar L. 2010. Aislamiento, identificación y caracterización de nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. *Rev. Fac. Nac. Agron.* 63:5511–5520.
- Gómez J, Guevara J, Cuartas P, Espinel C, Villamizar L. 2013. Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropod populations in maize. *Biocontrol Sci. Technol.* 23:829–846.
- Gómez J, Villamizar L. 2009. Actividad insecticida y compatibilidad con agroquímicos de un granulovirus aislado de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Resúmenes del XXXVII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología - Socolen*. Bogotá. p. 116.
- Greene G, Leppla N, Dickerson W. 1976. Velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology* 69:487–488.
- Guillon M. 1997. Quantification of biopesticide activity – a rapid survey of methods and standardization problems. *EPPO Bull.* 27:123–125.
- Hughes P, Wood H. 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of Invertebrate Pathology.* 37(2): 154–159.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2008. Resolución ICA No. 000879. Colombia.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2011. Resolución 0698 del 4 de febrero de 2011. Colombia.

- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2013. Bioinsumos registrados al 20 de junio de 2013. En: <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/Productos-bioinsumos-mayo-13-de-2008.aspx>. Consultado: marzo 2014.
- Jacques R, Morris O. 1981. Compatibility of pathogens with other methods of pest control and crop protection. En: Burges HD, editor. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases*. London, Academic Press. p. 230.
- Jenkins NE, Grzywacz D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents - assurance of product performance. *Biocontrol Sci. Technol.* 10:753–777.
- Lahlalia R, Serrhinib M, Jijakl M. 2006. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of *P. expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* 103:315–322.
- Morillo F, Notz A. 2001. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambdacihalotrina y metomil. *Entomotropica* 16:79–87.
- Moscardi F, Sosa-Gómez D. 1992. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In: Copping MB, Green M, Rees R, editors. *Pest management in soybean*. London, Elsevier Applied Science. p. 369.
- Moscardi F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 44:257–289.
- Quiroga I, Gómez M, Villamizar L. 2011. Estabilidad de formulaciones a base de granulovirus para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Rev. Colomb. Entomol.* 37:27–35.
- Ravensberg W. 2011. A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods. Springer Netherlands. London. U.K. p. 410.
- Sajap A, Bakir M, Kadir H, Samad K. 2009. Efficacy of selected adjuvants for protecting *Spodoptera litura* nucleopoliedrovirus from sunlight inactivation. *J. Asia-Pacif Entomol.* 12:85–88.
- Santos A, García M, Cotes AM, Villamizar L. 2012. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Rev. Iberoam. Micol.* 29:150–156.
- Szewczyk B, Hoyos-Carvajal L, Paluszczek M, Skrzecz I, Lobo de Souza M. 2006. Baculoviruses re-emerging biopesticides. *Biotechnol. Adv.* 24:143–160.
- Szewczyk B, Souza ML, Elita M, Castro B, Moscardi ML, Moscardi F. 2005. Baculovirus Biopesticides. In: Stoytcheva M, editor. *Pesticides - Formulations, Effects, Fate*. 2nd ed. New York, USA: inTech. p. 450.
- Tamez-Guerra P, Zamudio V, Martínez J. 2006. Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con brillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Cienc. UANL IX*:149–156.
- Villamizar L, Barrera G, Cotes AM, Martínez F. 2010. Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: physicochemical characterization, photostability and *in vitro* virus release. *J. Microencapsulation* 27:314–324.
- Villamizar L, Zeddám JL, Espinel C, Cotes AM. 2005. Implementación de técnica de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV. *Rev. Colomb. Entomol.* 31:127–132.
- Zar J. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4a. ed. New Jersey, Estados Unidos: Prentice Hall.