

Colecta, identificación y multiplicación de virus entomopatógenos en el género *Spodoptera* presente en el cultivo del maíz

Fecha de recepción: 02/03/2010

Fecha de aceptación: 14/06/2010

Jorge A. Vargas Leandro¹

Laura Durán Román²

Viviana Carranza Rodríguez³

Agustín Víquez Zamora⁴

Vladimir Villalba Velásquez⁵

Palabras clave

Spodoptera frugiperda, maíz, insecticida biológico, virus entomopatógeno, virus de la poliedrosis nuclear (VPN).

Resumen

El uso de un insecticida biológico contra la plaga del maíz *Spodoptera frugiperda*, basado en la acción de un virus entomopatógeno, fue probada. Se estableció un pie de cría para el proceso de producción y multiplicación del virus por medio de hospederos vivos, infectando las larvas con una formulación líquida a base de larvas maceradas con síntomas virales. Se obtuvo el inóculo inicial del virus a base de larvas que

presentaran la sintomatología característica. La formulación líquida fue utilizada sobre larvas sanas, con el fin de probar su efectividad *in vivo*. Se identificaron individuos con posible sintomatología de virus; sin embargo, la formulación líquida alcanzó bajas tasas de mortalidad en su aplicación, probablemente por la degradación del virus frente a la luz UV o la baja concentración viral presente en la solución.

Se tomaron muestras del sistema digestivo de larvas muertas con sintomatología de infección viral para ser observadas en microscopía electrónica de transmisión. No se visualizaron claramente poliedros u otras partículas virales; por lo tanto, no se logró

1. Ingeniero en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
Correo electrónico: joral_12@hotmail.com
2. Estudiante Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
Correo electrónico: lauradr_682@hotmail.com
3. Estudiante Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
Correo electrónico: vcrdz89@hotmail.com
4. Estudiante de Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
Correo electrónico: agustin_viquez@hotmail.com
5. Profesor investigador, Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
Correo electrónico: vvillalba@itcr.ac.cr

corroborar la infección viral. Varios factores afectaron las muestras. El congelamiento lento (2-4 °C) de larvas muertas pudo provocar la formación de cristales de agua intracelulares, que destruyeron los tejidos. Un lapso prolongado entre la muerte de la larva y su disección pudo iniciar procesos de necrosamiento y putrefacción posteriores a la muerte celular, que también pudo provocar la dispersión del contenido celular, siendo esto una dificultad para visualizar el virus en el microscopio electrónico.

Key words

Spodoptera frugiperda, corn, biological insecticide, entomopathogenic virus, nuclear polyhedrosis virus (NPV).

Abstract

The use of a biological insecticide against *Spodoptera frugiperda* –important corn plague- based on the action of an entomopathogenic virus, is tested. A small population of healthy worms was established worms were used for production and multiplication of the virus, by spraying them with a liquid formulation based on macerated worms with tentative symptoms of infection. The initial inoculum of the virus was obtained from worms with symptoms of infection observed in field. Liquid formulation was tested on healthy larvae and effectiveness was measured at *in vitro* conditions. Individuals with possible symptoms of virus infection were identified; however, the liquid formulation produced a low mortality.

A possible degradation of the virus by UV light or low viral concentration in the solution could be causes for low mortality. Samples of the digestive system of dead worms with symptoms of viral infection were observed under a transmission electron microscopy. Polyhedra or inclusion bodies, and other viral particles

were not observed, therefore, corroboration of virus infection was not achieved. The inability to observe the virus was due to various factors such as sample freezing (2-4° C), which had lead to the formation of intracellular crystals of water, producing the destruction of cell tissues. Also, a prolonged period of time between the death of the worm and its dissection could initiate processes of decomposition and post-necrotic cell death, which could cause the dispersal of cellular contents, making difficult to see the virus under the electron microscope.

Introducción

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: noctuidae) es considerado la plaga más importante del maíz en América Latina. Esta afecta toda la etapa del crecimiento inicial de la planta (Román, 1998; Méndez *et ál.*, 2002; Vásquez *et ál.*, 2002; Fernández, 2002; Sotelo y Zelaya, 2004). Se han documentado pérdidas de hasta un 73% en el rendimiento del maíz (Méndez *et ál.*, 2002).

El método de control de *Spodoptera frugiperda*, comúnmente utilizado en el maíz, es el uso de plaguicidas sintéticos. Sin embargo, se ha reportado poca efectividad, altos costos, daños ambientales y perjuicio en la salud humana. Este hecho ha incentivado la realización de constantes esfuerzos, tendientes a encontrar alternativas efectivas en la utilización de los plaguicidas convencionales (Román, 1998; Escribano *et ál.*, 1999; Vásquez *et ál.*, 2002; Sotelo y Zelaya, 2004; Badii y Abreu, 2006; Rodríguez *et ál.*, 2002, Lecuona, 2002).

Existen más de 700 virus con la capacidad de infectar diferentes especies de insectos. Muchas de estas enfermedades virales ocurren naturalmente en insectos de importancia agrícola; estos representan una muy buena alternativa, sobre todo para pequeños agricultores, ya que la inversión

Existen más de 700 virus con la capacidad de infectar diferentes especies de insectos. Muchas de estas enfermedades virales ocurren naturalmente en insectos de importancia agrícola; estos representan una muy buena alternativa, sobre todo para pequeños agricultores, ya que la inversión inicial no es alta.

La producción de virus en insectos hospederos vivos es el método actualmente más utilizado para obtener material utilizable en los insecticidas virales (Román, 1998; Lasa et ál., 2008), pues los insectos que han sido infectados por los baculovirus representan una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles presentes en un cultivo.

inicial no es alta (Marina y Narváez, 2001; Cruz, 2002). Por lo tanto, los virus son agentes promisorios para ser utilizados como insecticidas biológicos en programas de biocontrol (Román, 1998; Marina y Narváez, 2001). De acuerdo con Lecuona (2002), la lista de bioinsecticidas basados en virus entomopatógenos no parece ser muy numerosa. Los virus entomopatógenos son entidades submicroscópicas y de obligada patogenicidad (Román, 1998), que generan enfermedades infecciosas y se multiplican en los tejidos de los insectos hasta, eventualmente, ocasionar su muerte.

Los virus de poliedrosis nuclear (VPN) forman parte de los baculovirus y son exclusivos de los artrópodos, que infectan a numerosas especies de insectos, principalmente lepidópteros (Maracajá et ál., 1994; Román, 1998; Badii y Abreu, 2006). Estos ofrecen un gran potencial para ser utilizados dentro del manejo integrado del cogollero (Román, 1998; Vásquez et ál., 2002; Rodríguez et ál., 2002; López et ál., 2004), por su alta especificidad a determinadas plagas, alta virulencia, compatibilidad con otras tácticas de control, facilidad de producción, estabilidad en el almacenamiento, seguridad (inocuo al hombre y otros animales) y la ventaja de no afectar el balance natural del agroecosistema (Maracajá et ál., 1994; Román, 1998; López et ál., 2004; Murillo et ál., 2000; Badii y Abreu, 2006).

La producción de virus en insectos hospederos vivos es el método actualmente más utilizado para obtener material utilizable en los insecticidas virales (Román, 1998; Lasa et ál., 2008), pues los insectos que han sido infectados por los baculovirus representan una fuente de inóculo para otras larvas susceptibles presentes en un cultivo (Román, 1998; Marina y Narváez, 2001).

El objetivo principal del presente estudio fue realizar la recolección, identificación y multiplicación de virus entomopatógenos de *Spodoptera frugiperda* presentes en

los cultivos de maíz, mediante el uso de hospederos vivos.

Materiales y métodos

Recolecta de larvas

Se estableció el cultivo de maíz en una parcela de la Escuela de Ingeniería Agrícola del Instituto Tecnológico de Costa Rica. No se aplicó ningún tipo de agroquímico. De dichas parcelas se extrajeron tanto los individuos para el pie de cría como gusanos naturalmente infectados por el virus, junto a individuos recolectados también en parcelas de Guápiles y San Ramón.

La sintomatología consistía en el amarillamiento en ciertas zonas del cuerpo y otras partes necrosadas. Además, luego de mantenerse varios días en los frascos de recolecta, algunas larvas presentaron en su cuerpo un tejido de apariencia acuosa y blanda, y en los recipientes hubo restos líquidos, de un color café grisáceo. Las larvas recolectadas con la sintomatología descrita con anterioridad fueron transportadas individualmente, para luego ser almacenadas en un congelador a una temperatura de entre 2 y 4°C.

Cría del insecto hospedante

Se realizó una recolecta de individuos para el establecimiento inicial del pie de cría. Las larvas recolectadas se transportaron hasta el laboratorio en microjaulas rectangulares (12 x 25 x 7 cm) de plástico o frascos individuales de 3,5 x 4,5 cm, con hojas tiernas de maíz como alimento temporal.

En el laboratorio, los ejemplares fueron individualizados en recipientes plásticos pequeños, de 3,5 x 4,5 cm, agujereados en la tapa para permitir la circulación del aire y agregado un cubo de dieta artificial (desarrollada por Chacón et ál., 2007) de aproximadamente 1 cm³.

Solución viral

La extracción del VPN se realizó por medio del macerado de 35 larvas con sintomatología de muerte por virus

homogenizado, con 40 mL de agua destilada hasta obtener una solución líquida, la cual se coló con el fin de retener restos grandes de tejido animal. Esta solución fue disuelta nuevamente (0,06 larvas/mL) con agua destilada en un recipiente con asperjador de 500 mL, la cual fue almacenada a una temperatura de entre 2 y 4°C en un congelador.

Inoculación del VPN y su efecto sobre las colonias sanas del hospedante

Un grupo de 50 larvas individualizadas de *Spodoptera frugiperda*, entre el tercer y cuarto estadio de desarrollo, fue rociado con la solución viral preparada anteriormente. Cada dos días, en el tiempo de una semana, se roció directamente a las larvas con la solución viral; estas se revisaron a diario, con el fin de identificar aquellas que presentaran sintomatología evidente de acción viral. Las que lo hacían fueron almacenadas en tubos eppendorf en un congelador, a una temperatura de entre 2 y 4°C.

Identificación microscópica

La identificación de los cuerpos de inclusión viral se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica, ubicada en San Pedro de Montes de Oca. Se analizaron tres muestras de tejido digestivo por microscopía electrónica de transmisión (MET), provenientes de una disección de las larvas muertas, tentativamente, por infección viral.

Para la disección se sumergieron las larvas en agua caliente por 30 segundos, y con la ayuda de un estereoscopio, agujas de disección, una caja de Petri con cera sólida en el fondo y agua destilada estéril se procedió a cortarlas por la parte ventral del abdomen con un bisturí, de tal manera que estuviera expuesto el sistema digestivo, del cual se tomaron las muestras que fueron introducidas en una solución fijadora Karnovsky para su posterior análisis en microscopía electrónica.

Preparación de la muestra para microscopía electrónica

La fijación inicial para la preparación de las muestras se realizó introduciendo las muestras extraídas en fijador Karnovsky glutaraldehído 2,5%; paraformaldehído 2%; amortiguador de fosfato de sodio 2,5 M; pH 7,2) por un mínimo de dos horas. Luego, se realizaron tres lavados en este mismo fijador, cada lavado por un periodo de 15 minutos. Las muestras fueron fijadas, posteriormente, en tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1% y lavadas tres veces en agua destilada por 15 minutos cada una.

Se procedió a la deshidratación, introduciendo las muestras en un gradiente ascendente de acetona (30%, 50%, 70%, 90%, 95% y 100%), y se realizaron lavados de 15 minutos en cada concentración, excepto en la de 100%, en la cual se hacen dos lavados por el mismo tiempo. Posteriormente, se embebieron las muestras en una mezcla 1 : 1 de resina-acetona por 12 horas; luego se dejaron en resina pura por 12 horas. Después, las muestras fueron incluidas en resina pura y se polimerizaron a 70 °C por un tiempo de entre 48 y 72 horas.

Finalmente, las muestras fueron cortadas utilizando un ultramicrotomo con cuchilla de diamante, y se realizaron cortes de un grosor de entre 10 y 80 nm. Los cortes fueron contrastados en acetato de uranilo e hidróxido de plomo por 15 minutos cada uno; luego se observaron en un microscopio electrónico de transmisión, Hitachi 7100, con el fin de observar los cuerpos de inclusión.

Resultados y discusión

Recolecta de larvas y cría del insecto hospedante

Las recolectas totalizaron una cantidad de 437 larvas, las cuales fueron muriendo con el paso del tiempo, debido a que las condiciones en las que se encontraban no eran las óptimas para poder mantener al

mayor número de larvas vivas (Fotoperiodo 14:10, Temperatura 27 ± 1 °C).

Probablemente, estas pérdidas del pie de cría sucedieron debido a que, según Marina y Narváez (2001), los laboratorios para la cría de insectos necesitan mantener condiciones de sanidad estrictas para controlar la contaminación del alimento con microorganismos, así como enfermedades en los insectos, lo cual puede impedir la producción. A pesar de esto, se logró mantener un pie de cría estable.

Se lograron identificar larvas muertas que presentaban síntomas de amarillamiento en ciertas zonas del cuerpo, y otras partes necrosadas debido a la degradación total del tejido. De igual manera, se observaron algunas larvas con síntomas acuosos en su cuerpo, con un aspecto blando y restos líquidos de un color café grisáceo en los recipientes, esto provocado por la destrucción del integumento que contiene los cuerpos virales de inclusión (Román, 1998); lo evidenció hacia la presencia de síntomas de muerte por causa de agentes virales. Estas larvas fueron separadas y puestas a temperaturas de congelación, entre los 2 y 4 °C.

Inoculación del virus y efecto del VPN sobre colonias sanas del hospedante

Tras asperjar la solución viral, se obtuvo una mortalidad de aproximadamente el 2% para el primer día, un 10% para el cuarto día y un máximo de 30% para el octavo día. No se utilizaron larvas control, por lo que no se pudo hacer una comparación.

Estos bajos porcentajes de mortalidad, en comparación con una efectividad teórica del 90% en condiciones controladas de invernadero (Lasa *et ál.* 2007), fueron producto de varios factores, dentro de los que se encuentran la degradación de partículas virales por causa de los rayos UV (Martínez *et ál.*, 2003), además de las condiciones de temperatura del laboratorio, las cuales no eran controladas y pudieron interferir en los resultados, porque a temperatura ambiente (24-26°C) la eficacia del material se pierde en un 59%, en un periodo máximo de 22 días (Román, 1998).

Asimismo, la disolución realizada en el recipiente de 500 mL pudo haber disminuido la concentración del virus, de manera que su efectividad decayera considerablemente. Esto se explica porque es necesaria una concentración mínima del virus para que la infección sea

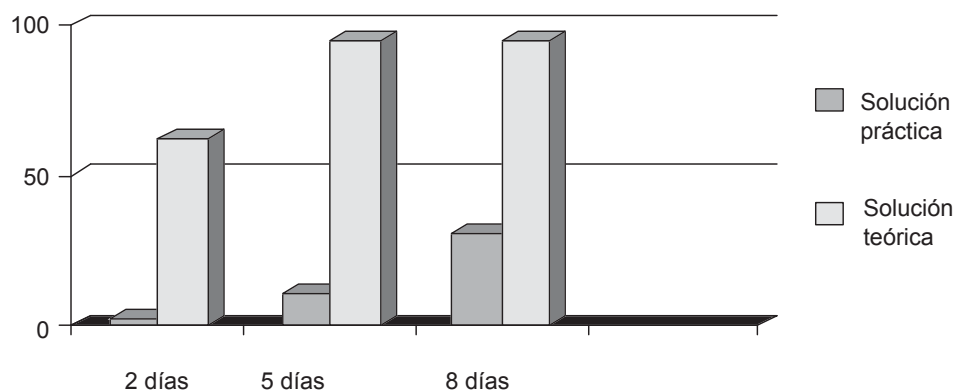


Gráfico 1. Comparación gráfica entre los resultados en el laboratorio con la solución obtenida y los resultados de eficiencia del virus realizados por Lasa *et ál.*, (2007) en condiciones controladas bajo un sistema de invernadero.

efectiva (Escribano *et ál.*, 1999), y dicha concentración en la formulación pudo no haber sido suficiente para causar la muerte de una mayor cantidad de larvas, pues no se contaba con una metodología para la cuantificación de las partículas virales a nivel de laboratorio.

Identificación microscópica y preparación de la muestra para microscopía electrónica

Para el caso de la microscopía electrónica, no fue posible identificar los cuerpos de inclusión viral ni partículas virales sencillas, solamente se observaron unas estructuras similares que podrían haberse confundido con otro compuesto del tejido insectil. En células infectadas con un virus como el VPN se deberían observar síntomas citopáticos típicos, como agrandamiento del núcleo celular, granulaciones alrededor de este y formación de poliedros (Narayanan, 2002).

Entre los factores que imposibilitaron la observación de tales partículas, se identificaron algunos errores metodológicos. El tiempo transcurrido entre la muerte de las larvas, su recolección y fijación en Karnovsky afectó negativamente la observación del virus. Desde el momento en que muere la larva, se produce un daño irreversible, haciendo que se alcance un punto sin retorno, donde se dan cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos, los cuales impiden a las células realizar sus funciones vitales y las arrastran a la muerte. La muerte celular se produce por necrosis, cuando el daño es letal o se produce una muerte accidental.

La pérdida de viabilidad se asocia a la rotura de la membrana plasmática con la consecuente lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos, dañando al tejido en el que se encuentra (Lizarbe 2007). Debido a lo anterior, el virus, en su necesidad de células vivas para replicarse, dejará de hacerlo y las partículas se dispersarán fuera del

núcleo, debido a la lisis de las membranas, imposibilitándose así su observación.

La congelación de muestras es considerado un procedimiento inadecuado. Al someter las larvas a congelación, se forman cristales a partir del agua presente en los tejidos celulares, los cuales producen el rompimiento de las mismas células (Abdelnour *et ál.*, 2007). Como consecuencia, se da la dispersión del contenido celular y la pérdida de tejido formado por motivos de descomposición natural posterior a la muerte del insecto, de manera que a la hora de visualizar las muestras en microscopía electrónica, lo que se observó fue el contenido celular disperso, sin la presencia de conjuntos de células en donde se pudieran visualizar las inclusiones virales.

Además, la actividad del virus es lítica, por eso, luego de su replicación, destruye la célula huésped con el fin de seguir propagándose por todo el tejido. El tiempo transcurrido entre la muerte de la larva, la identificación y la posterior congelación de esta pudo provocar que el virus destruyera gran cantidad de tejido digestivo, ya que es el sitio en donde se empieza a replicar dicho virus y de donde se tomaron las muestras para ser analizadas en microscopía electrónica de transmisión, de manera tal que contribuyera, junto con los factores anteriormente analizados, a dificultar la visualización de tejido celular del insecto.

Se encontraron unas partículas que, al compararlas con la forma de los báculos de los viriones por estudiar, se halló una pequeña similitud. A pesar de esto, luego de la comparación fotográfica realizada y un incremento en el aumento del microscopio de estas estructuras, la similitud de estas hizo mayor referencia hacia la presencia de colágeno, ya que estas no se encontraban recubiertas de poliedrina, formando los cuerpos de inclusión poliedral (CIP) o poliedros, manera en que se agrupan los

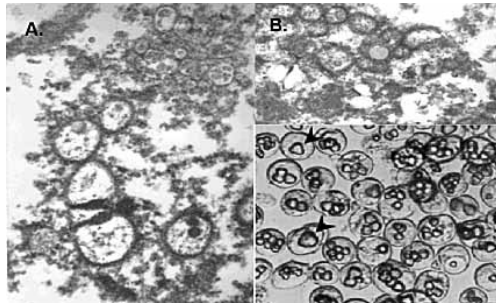


Figura 1. Fotos obtenidas de la microscopía electrónica de transmisión vistas a 30×10^3 aumentos. Obsérvese en A y B la ausencia de organizaciones de células en tejidos por la degradación de la muestra, en comparación con la forma en que se debería ver un conjunto celular íntegro infectado por virus de poliedrosis nuclear (Woo & Ahn, 2006).

viriones fuera del núcleo de las células, formando estructuras poliédricas diferentes (figura 1) (López *et al.*, 2004).

Conclusiones

Se logró una identificación de larvas con sintomatología similar a la de la infección provocada por el virus de la poliedrosis nuclear, la cual presentaba necrosis en el cuerpo del insecto, además de un aspecto amarillento, acuoso y un notable ablandamiento del tejido.

Por otra parte, no fue posible identificar por medio de microscopía electrónica las inclusiones virales en las células de las larvas electrónica; esto, debido a la degradación celular ocurrida. Se encontraron estructuras similares a las partículas virales, pero a la vez se asemejaban al colágeno celular y no fue posible discriminar su verdadera identidad.

La tasa de efectividad del virus en solución líquida fue baja, debido a que no se pudo comprobar verazmente que las larvas murieran por efectos del agente viral o por otros factores como el fotoperiodo o las condiciones de sanidad dentro del laboratorio donde se realizó la investigación.

Bibliografía

- Abdelnour A, Rojas G & Alfaro U. (2007). *Estudios preliminares para la criopreservación de especies forestales arbóreas*. Tecnología en Marcha. Vol. 20-1.
- Badii, M.H. & Abreu, J.L. (2006). *Control biológico una forma sustentable de control de plagas*. Daena: International Journal of Good Conscience. 1(1): 82-89.
- Cruz, E. (2002). *Estimación de la DL50 y DL90 del Virus de la Poliedrosis Nuclear Autographa californica en Spodoptera exigua y Helicoverpa zea*. Tesis. Lic. Ing. Agron. Zamorano, Honduras.
- Chacón, Y.; Garita, C.; Vaglio, C.; Villalba, V. (2007). *Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero Spodoptera frugiperda (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola*. Informe Final de Proyecto de Investigación Estudiantil del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica.
- Escribano, A.; Williams, T.; Goulson, D.; Cave, R.; Chapman, J. & Caballero, P. (1999). *Selection of a Nucleopolyhedrovirus for Control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae): Structural, Genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas*. J. Econ. Entomol. 92(5): 1079-1085.
- Fernández, J. L. (2002). *Estimación de umbrales económicos para Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo del maíz*. Invest. Agr. Prod. Prot. Veg. 17 (3): 467-474.
- Lasa, R.; Ruiz, C.; Alcázar, M.; Belda, J.; Caballero, P.; y Williams, T. (2007). *Efficacy of optical brightener formulation of Spodoptera exigua multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouse in southern Spain*. Biological Control 40 (2007) 89-96
- Lasa, R.; Williams, T. & Caballero, P. (2008). *Insecticidal Properties and Microbial Contaminants in a Spodoptera exigua Multiple Nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) Formulation Stored at Different Temperatures*. J. Econ. Entomol. 101(1): 42-49.
- Lecuona, R. (2002). *Situación Actual y Perspectivas de uso de Bioplaguicidas en Latinoamérica*. Conferencia ofrecida y publicada en el Manual del Curso Internacional de Producción y uso de Agentes Microbianos para el Control de Plagas en Agricultura

- Ecológica*. CATIE y GTZ. Turrialba, Costa Rica. pp. 9-16.
- Lizarbe, M. (2007). *El suicidio y la muerte celular*. Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp) Vol. 101, N° 2, pp.
- López, P.; Narváez, C.; & Rizo, C. (2004). *Control Biológico de Insectos mediante virus entomopatógenos*. Control Biológico de Plagas Agrícolas. 53: 59-69.
- Maracajá, P.; Vargas, E. & Santiago, A. (1994). *Actividad biológica de biopreparados del virus de la poliedrosis nuclear de Spodoptera littoralis (Boisd.) obtenidos en el hospedador natural y en el alternativo Spodoptera exigua (Hübner)* Bol. San. Veg. Plagas, 20: 495-499.
- Marina, C. & Narváez, C. (2001). *Uso y producción de virus de poliedrosis nuclear en Nicaragua*. Manejo integrado de plagas (Costa Rica) 61: 90-96.
- Méndez, W.; Valle, J.; Ibarra, J.; Cisneros, J.; Penagos, D. & Williams, T. (2002). *Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in maize*. Biological Control 25:195–206.
- Murillo, R.; Lipa, J.; Muñoz, D.; Amate, J.; Barranco, P.; Cabello, T. & Caballero, Y. P. (2000). *Caracterización bioquímica de un nucleopoliedrovirus de Chrysodeixis chalcites autóctono de España*. Bol San. Veg. Plagas. 26: 637-644.
- Narayanan, K. (2002). *Microbial control of insect pests: role of genetic engineering and tissue culture*. Microbial Biopesticides. Londres.
- Rodríguez, J.; Cabrera, J.; Pinedo, E.; Pinto, D. & Zeddám, J. (2002). *Caracterización y utilización de un Nucleopoliedrovirus patógeno a Spodoptera eridania y S. ochrea*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63: 39.45.
- Román, S. (1998). *Bioensayos de campo y análisis económico de la producción del virus de la poliedrosis nuclear Spodoptera frugiperda*. Tesis. Lic. Ing. Agron. Zamorano, Honduras.
- Sotelo, B. & Zelaya, V. (2004). *Evaluación de la eficacia de 5 bioplaguicidas sobre poblaciones de gusano cogollero (Spodoptera frugiperda J.E.Smith) y su efecto sobre el crecimiento y rendimiento en el cultivo del maíz (Zea mays L.)* Trabajo de diploma. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Programa de Recursos genéticos. Managua, Nicaragua.
- Vásquez, J.; Zeddám, J.L. & Tresierra, A.A. (2002). *Control Biológico del "cogollero del maíz" Spodoptera frugiperda, (Lepidoptera; Noctuidae) con el Baculovirus SFVPN*. Iquitos-Peru. Folia Amazónica 13: 1-2.