

Formulación y aplicación de los baculovirus bioinsecticidas

TREVOR WILLIAMS Y JUAN CISNEROS

1. ¿Qué es una formulación?	315
1.1. ¿Por qué es importante la formulación?	315
1.2. La formulación básica y los coadyuvantes	316
1.3. La entrega del virus al insecto plaga	317
1.4. Otras maneras de emplear los baculovirus	317
2. ¿Cómo se prepara una formulación?	318
2.1. Preparados sólidos del virus	318
2.2. Portadores para formulaciones	319
2.2.1. Formulaciones sólidas	319
2.2.2. Formulaciones líquidas	320
2.3. Los coadyuvantes	322
2.3.1. Surfactantes	322
2.3.2. Adherentes	324
2.3.3. Espesantes	324
2.3.4. Ligantes	324
2.3.5. Los cebos y estimulantes alimenticios	324
2.4. Protección ultravioleta	326
2.4.1. Blanqueadores ópticos	329
2.4.2. Modo de acción	329
2.4.3. Acción potenciadora: dosis y tiempo letal	330
2.4.4. Eficiencia como protectores UV	330
2.4.5. Experimentos de campo	332
2.4.6. Otras sustancias fotoprotectoras	332
2.5. Otros potenciadores de los baculovirus	334
2.5.1. Enzimas	335

2.5.2. El ácido bórico	335
2.5.3. Azadiractina (Nim)	336
2.5.4. Insecticidas biológicos y químicos	336
2.6. La tecnología de microencapsulación	337
3. La vida de almacenamiento	338
3.1. Control de la contaminación por microorganismos	340
4. Aspectos de seguridad	341
5. Formulación y registro de un bioinsecticida	342
6. La aplicación del virus	343
6.1. Gotas	345
6.2. Dosis y volumen de la aplicación	347
6.3. Equipos y boquillas	350
6.4. Patrones de aplicación en espacio y tiempo	351
7. Recomendaciones para estudios futuros	352
8. Agradecimiento	352
9. Bibliografía	352

1. ¿Qué es una formulación?

Una formulación es el resultado de mezclar un ingrediente activo, en este caso un baculovirus, con una o más sustancias para mejorar la eficacia, estabilidad y manejo del bioinsecticida. Existen diferentes métodos para lograr lo anterior, incluyendo la producción de suspensiones líquidas, gránulos y polvos mojables. La formulación adecuada dependerá de diversos factores tales como el comportamiento y hábitat de la plaga, la disponibilidad y coste de los componentes de la formulación, el equipo empleado para aplicar el producto y las preferencias de los usuarios.

1.1. ¿Por qué es importante la formulación?

Las experiencias con los bioinsecticidas caseros utilizados en los países en vías de desarrollo indican que en muchos casos, el éxito de los baculovirus como insecticidas biológicos no depende de formulaciones o métodos de aplicación sofisticados (JONES *et al.*, 1993). Sin embargo, su uso a escala mayor requiere el suministro de un producto fácil de manejar y de efectividad fiable. Para facilitar esto, una formulación correcta debe:

- estabilizar el virus durante su almacenamiento
- facilitar el manejo del producto por parte del agricultor
- optimizar la aplicación y la ingestión del virus por la plaga tratada
- aumentar la actividad insecticida del patógeno
- maximizar la persistencia ambiental del mismo (JONES *et al.*, 1997)

Hasta cierto punto, la formulación también puede facilitar o mejorar la eficiencia del depósito del producto en el sitio de alimentación de la plaga y por lo tanto existe una relación íntima entre la formulación del producto y su aplicación. Los investigadores pueden seguir instrucciones complejas para la preparación de un formulado durante las evaluaciones de su eficiencia en campo. Sin embargo, para los agricultores esto no es posible. Las necesidades de formulación y aplicación del virus son asuntos que deben ser considerados con anticipación en programas de investigación y desarrollo de potenciales bioinsecticidas.

El lector de este capítulo podrá darse cuenta de que gran parte de la literatura citada viene de muchos años atrás. Hemos intentado incluir toda la literatura relevante de los últimos años pero la verdad es que este tema ha sido poco explorado durante la década de los años 90. Posiblemente esto refleja una disminución del interés en la formulación de baculovirus y el desarrollo de productos de este tipo después de que productos claves como el Elcar[®] fueron desplazados del mercado por los piretroides sintéticos en los años 80 y ahora por la nueva generación de insecticidas, las spinosinas (SPARKS *et al.*, 1998a,b). Quizás las únicas excepciones a este respecto son la tecnología de microencapsulación, el descubrimiento del potencial de los blanqueadores ópticos y el mundo de posibilidades abierto por los baculovirus recombinantes (Capítulo 8).

1.2. La formulación básica y los coadyuvantes

Existen dos aspectos por considerar en la formulación de un baculovirus: 1) la formulación básica o de almacenamiento, en la cual el producto se mantiene estable y se minimiza la pérdida de viabilidad del virus con el tiempo y 2) la formulación aplicable o de tanque, en la cual el producto se prepara en el momento de aplicar el virus en campo.

Para fines de investigación, se puede almacenar el virus durante muchos años en congeladores de baja temperatura sin pérdida significativa de actividad. Sin embargo, para un producto comercial la formulación básica o de almacenamiento tiene que permitir la preparación, distribución, almacenamiento y comercialización del virus, durante el periodo comprendido entre su venta y el uso por el agricultor. Se debe contemplar un periodo de 18 meses o más entre el momento de la producción y el momento de aplicación en campo (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998). Así que la formulación básica debe inhibir el crecimiento de microorganismos contaminantes y mantener la estabilidad física y viabilidad del virus en un cierto intervalo de temperaturas ambientales. Las primeras formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* sufrieron de descomposición y los recipientes almacenados a temperaturas ambientales explotaron debido a la producción de gases. Aún hoy en día, no se recomienda almacenar estos productos a temperaturas bajo cero o encima de 30°C (COUCH Y IGNOFFO, 1981).

Sin duda alguna, el desarrollo de formulaciones de todo tipo de insecticidas biológicos ha estado influido por la industria química. Los bioinsecticidas se diferencian de los insecticidas sintéticos en que son partículas suspendidas en agua o alguna otra sustancia portadora, mientras que los insecticidas convencionales son sustancias disueltas en algún disolvente. No obstante, las percepciones de los agricultores ya están formadas por tantos años de uso de plaguicidas sintéticos con un espectro conocido de ciertos tipos de formulaciones, motivo por el cual se consideran las formulaciones básicas para los baculovirus derivadas de los plaguicidas sintéticos: polvos mojables, emulsiones o suspensiones concentradas, gránulos, polvos y cebos.

Todas estas formulaciones básicas involucran el uso de una sustancia portadora inerte. La temperatura, humedad y pureza de esta sustancia son importantes para la integridad del producto. Se discute más sobre las sustancias portadoras a continuación (Sección 2.2).

En cambio, los coadyuvantes (o mezclas de tanque) son sustancias que se agregan a la formulación básica en el momento de preparar el producto para la aplicación en campo. Se utilizan los coadyuvantes para facilitar la aplicación del producto y el depósito del patógeno en el sitio de alimentación de la plaga y también para aumentar la persistencia del virus en la superficie de las plantas tratadas. Precisamente, dependiendo del tipo de aplicación previsto y del equipo disponible para hacerlo se utilizan unos u otros coadyuvantes. Por ejemplo, aplicaciones de volumen ultrabajo con una tolbera de disco giratorio producen una pulverización con gotas finas, las cuales pueden evaporarse en

el aire antes de entrar en contacto con la superficie de la planta (MATHEWS, 1992). Para contrarrestar este problema se puede adicionar a la formulación un antievaporante o se puede formular el virus en un aceite ligero en lugar de agua.

El comportamiento del insecto plaga y el tipo de cultivo y su estado fenológico son también factores importantes. Por ejemplo, para controlar larvas de *Helicoverpa* o *Heliothis* en algodón se requiere una buena cobertura del cultivo porque se alimentan en el envés de las hojas y en el interior del follaje de la planta; así, para su buen control es necesaria una pulverización de gotas finas que penetren en el follaje y se peguen en el haz y el envés de las hojas; además, la incorporación de surfactantes a la formulación incrementa la proporción de las gotas que se adhieren a la planta y mejoran la extensión de éstas sobre la superficie de la hoja.

1.3. La entrega del virus al insecto plaga

El proceso de aplicación de cualquier insecticida, ya sea químico o biológico, es intrínsecamente ineficiente. Típicamente en aplicaciones por pulverización, sólo el 5% del producto llega a la superficie que se requiere tratar (HIMEL *et al.*, 1990) y de este 5%, sólo una pequeña parte, usualmente menos del 0,1% del producto aplicado, es consumida por la plaga; todo lo demás se desperdicia. Así que el depósito del virus en la superficie de la que se alimenta la plaga es uno de los principales retos a los que nos enfrentamos en el uso de los bioinsecticidas. En el caso de los baculovirus, al actuar por ingestión se requiere una distribución uniforme del producto en el sitio de alimentación del fitófago plaga. En cambio, el insecto puede adquirir los nemátodos y las esporas de hongos que actúan por contacto a través del movimiento del fitófago sobre la superficie de la planta, así que la distribución de estos patógenos es posiblemente menos crítica que la de los virus.

Una aplicación eficiente requiere de equipo apropiado y una formulación adecuada. En la mayoría de los casos, los bioinsecticidas se aplican con equipos diseñados para insecticidas químicos y la conveniencia real de estos equipos para la aplicación de suspensiones de partículas (los cuerpos de inclusión) no se ha estudiado profundamente (STEINKE Y GILES, 1995). En el desarrollo de los bioinsecticidas a base de virus, dirigidos a productores de escasos recursos, el problema no es el uso del equipo correcto sino determinar como utilizar los equipos actualmente disponibles; frecuentemente éstos son los más sencillos, bombas de mochila con boquilla de cono o de abanico etc. operados manualmente.

1.4. Otras maneras de emplear los baculovirus

Este capítulo lo enfocamos específicamente a la formulación y aplicación de los baculovirus como bioinsecticidas. No obstante, existen otros métodos o estrategias

para su uso, incluyendo la inoculación y autodiseminación del virus por el insecto huésped (FALCON, 1975; BEDFORD¹, 1986; JACKSON *et al.*, 1992; VAIL *et al.*, 1993), la manipulación o aprovechamiento de reservorios del virus en el ambiente (POLSON Y TRIPCONEY, 1970; KALMAKOFF Y CRAWFORD, 1982; RICHARDS *et al.*, 1999), el tratamiento de semillas (IGNOFFO *et al.*, 1980) o la distribución manual de insectos muertos por el virus (ENTWISTLE *et al.*, 1983).

2. ¿Cómo se prepara una formulación?

Bajo condiciones de temperatura y humedad aceptables las preparaciones sólidas de virus mantienen bien su infectividad por periodos de varios meses o años.

2.1. Preparados sólidos del virus

El ambiente interno del insecto huésped favorece la retención de la actividad del virus y se pueden secar insectos muertos por virus en un flujo de aire (por ejemplo, en una campana de extracción de gases) a temperaturas normales de laboratorio (20-25°C). Alternativamente, se pueden centrifugar homogenizados de insectos infectados para concentrar el virus en pastillas y dejarlas secar durante la noche (LEWIS, 1981). Preparados sólidos del virus hechos con cualquiera de estos métodos requieren de un paso posterior: moler las pastillas para producir un polvo fino.

Por otro lado, la liofilización es un excelente método para producir preparados sólidos con alta estabilidad. Este proceso comprende la congelación de una suspensión acuosa del virus crudo, parcial o completamente purificado y la deshidratación de la muestra bajo vacío. El polvo seco que resulta del proceso se puede moler y almacenar en recipientes cerrados. Actualmente se utiliza la liofilización en el proceso de producción comercial de los NPV de *Lymantria dispar* (SHAPIRO, 1982), *Orgyia pseudotsugata* (MARTIGNONI, 1978) y *Spodoptera littoralis* (MCKINLEY *et al.*, 1989). Ignoffo (1964) encontró que la resuspensión del NPV de *Trichoplusia ni* se facilitaba agregando una pasta de lactosa a la suspensión del virus antes de la liofilización. Se ha señalado, además, que la liofilización de una mezcla del NPV de *Anticarsia gemmatilis* con leche descremada esterilizada beneficia la estabilidad e infectividad del virus (BATISTA-FILHO *et al.*, 1986). Sin embargo, la liofilización de grandes volúmenes de virus requieren tiempo y puede ser costosa. Por ejemplo, un equipo cuyo coste superior a los 10.000 dólares puede estar fuera del alcance económico de laboratorios con presupuestos limitados.

Una alternativa a la liofilización es el uso de un deshidratador por aspersión, en el cual se secan las gotas de una suspensión acuosa del virus en una corriente de

¹ Este ejemplo trata de un virus no ocluido del escarabajo rinoceronte, *Oryctes* spp. Previamente clasificado como un baculovirus, hoy en día este virus se considera como un virus no clasificado (CRAWFORD, 1994).

aire caliente seco. Esta tecnología se utiliza comúnmente en la industria alimenticia para producir el café instantáneo. La deshidratación por aspersión se empleó en la preparación de los NPV comerciales de *Autographa californica*, *T. ni*, *Helicoverpa zea* y *A. gemmatilis* (JONES *et al.*, 1993; HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998), aunque este proceso parece reducir estabilidad en algunos otros virus (CUNNINGHAM *et al.*, 1978; YOUNG Y YEARIAN, 1986). La incorporación de lactosa a la suspensión por secar puede proteger el virus contra el calor producido en el proceso (LISANSKY *et al.*, 1993).

Una alternativa menos utilizada es la coprecipitación del virus con lactosa. Se agrega acetona a una suspensión de virus con 4-6% de lactosa. El virus y la lactosa precipitan y el precipitado, una vez filtrado y secado al aire, constituye el preparado sólido. Posteriormente, el preparado sólido se reduce a polvo con un molino (DULMAGE *et al.*, 1970; HUNTER *et al.*, 1973). Como se mencionó anteriormente, la lactosa ayuda a la resuspensión del virus en agua, aunque varios autores han señalado que la estabilidad del virus coprecipitado es afectada sobre todo por temperaturas elevadas ($>35^{\circ}\text{C}$) (MCGAUGHEY, 1975; HUNTER *et al.*, 1977; IGNOFFO Y SHAPIRO, 1978; DE OLIVEIRA, 1998).

2.2. Portadores para formulaciones

2.2.1 Formulaciones sólidas

Para producir preparaciones del virus a la concentración de aplicación en campo, en general, se utilizan materiales portadores inertes sin pasos adicionales de dilución con otras sustancias secas. El portador sólido tiene la función de diluir y mantener bien disperso el virus en la formulación así que se requiere una sustancia inerte para el virus, fácil de obtener, de bajo costo y que no sea repelente para el fitófago. Se utilizan los mismos portadores que para las formulaciones sólidas (polvos y gránulos de los insecticidas químicos (Tabla 1); varios de ellos también se emplean en la formulación de *B. thuringiensis* la cual tiene requerimientos fisicoquímicos parecidos a los de los baculovirus (COUCH Y IGNOFFO, 1981). Existe una gran diversidad de arcillas que se pueden utilizar para este propósito aunque se carecen de estudios al respecto.

La conocida formulación en forma de polvo mojable incluye un portador inerte, por ejemplo una arcilla, mezclada con un surfactante como el Tween. Para el control de *Spodoptera littoralis*, *S. exigua* y *H. armigera* se emplea la siguiente formulación: 100 g de larvas infectadas con NPV, liofilizado (seco), 60 g de caolin, 40 g de Neosyl (silica sintética) al cual se ha añadido un surfactante, Ecotas 30 en la relación 50:50 [es decir 20 g silica + 20 g surfactante]. Al momento de preparar la aplicación se agrega un surfactante adicional, por ejemplo Triton X-100 al tanque a una concentración convencional (0,1%) para asegurar la aplicación adecuada del producto (MCKINLEY *et al.*, 1989; JONES *et al.*, 1998).

Medungo *et al.* (1997) probaron diferentes portadores para la formulación de un polvo mojable del NPV de *A. gemmatilis*. Encontraron que las formulaciones con atapulgita, silica amorfa o caolinita mantuvieron su viabilidad después de un año de

almacenamiento aunque hubo una aglomeración de la caolinita y una disminución de sus propiedades mojables. En cambio, en los formulados con bentonita se observó una reducción del 50% en la viabilidad del virus.

Los portadores vegetales o de carbohidrato pueden tener una función adicional al actuar como estimulantes en la alimentación del fitófago (véase la sección de cebos a continuación). Recientemente, Williams *et al.* (1999) probaron el serrín y la arena del mar como portadores para una formulación granular del NPV de *S. frugiperda*. Estas sustancias fueron seleccionadas por ser muy baratas y fáciles de obtener; sin embargo, en pruebas de laboratorio simulando la acción de la lluvia, se observó que el virus se pegó fuertemente al portador; menos del 5% de los OBs fueron liberados en cinco lavados con agua estéril. Ante la duda de que estas sustancias funcionaran bien en campo se decidió formular el virus con azúcar refinado para estimular el consumo del virus por la plaga y, al mismo tiempo, atraer a otros enemigos naturales al punto de aplicación del formulado, el cogollo del maíz (CAÑAS Y O'NEIL, 1998). Sin embargo, la adición de azúcar no mejoró la eficacia del virus por lo que, debido a su alto costo, se decidió no continuar con el uso del azúcar (WILLIAMS *et al.*, 1999).

El uso de formulaciones en polvo es menos común hoy en día por su alto volumen, la necesidad de mantenerlo muy seco y por riesgo para la salud humana por la inhalación de partículas de polvo. Los gránulos no tienen tantos problemas para su manipulación aunque se emplean sólo en situaciones específicas, por ejemplo para el control de cortadores en el suelo (por ejemplo, *Agrotis*) o plagas del maíz (*S. frugiperda*, *Ostrinia nubilalis*) porque el cogollo de la planta actúa como un embudo para dirigir los gránulos hacia la especie fitófaga contra la que se realiza el tratamiento.

2.2.2. Formulaciones líquidas

Sin duda alguna, el portador más común es el agua. En la mayoría de los casos donde el volumen de la aplicación es mediano o mayor, no será necesario adicionar un aceite (Tabla 2). Si el volumen de la aplicación es bajo es muy probable que se requiera mezclar el agua con un aceite para evitar la evaporación de las gotas, el cual es un problema común en climas cálidos. Por lo general, parece que los aceites vegetales son menos dañinos para el virus y más comestibles por los insectos.

La mayoría de estos aceites no son muy volátiles y no presentan gran riesgo de combustión, aunque se recomienda tomar las precauciones necesarias durante la aplicación de pulverizaciones finas o aplicaciones de aerosoles. El uso de aceites como portadores en aplicaciones de ultra bajo volumen fue revisado por Wrigley (1973). En general, los granulovirus son más propicios a la formulación de un concentrado fluido que los nucleopoliedrovirus debido esto, al tamaño de la partícula (YOUNG Y YEARIAN, 1986).

En el control de langostas, se ha tenido buen éxito mediante el empleo de hongos entomopatógenos formulados en aceites vegetales. El propósito de esta formulación fue la formación de un microclima húmedo entre la cutícula del insecto y las gotas de aceite que se depositaron en él, resultando en el incremento de hume-

Tabla 1. Portadores empleados en productos formulados como polvos y gránulos.

Mineral	Vegetal	Carbohidratos
Atapulgita ^a	Salvado (trigo, arroz) ^d	Lactosa ^c
Bentonita	Cáscara de nuez molida ^e	Harina (maíz, arroz, soja) ^f
Polvo de mármol (1095)	Olote molido ^k	Almidón (maíz, patata) ^g
Arena de sílica		Sémola con caolín ^h
Caolinita ^b		
Talco ^c		
Zeolita ⁱ		
Ácido silícico ^j		
Silica amorfa (Aerosil 200) ^j		

^aBell, 1991; ^bMoscardi, 1989; ^cRabindra *et al.*, 1988; Ignoffo y García, 1996; ^dHostetter y Pinnell, 1983; ^eJackson *et al.*, 1992; ^fPrichett *et al.*, 1980; Bell y Romine, 1980; ^gHostetter *et al.*, 1982; ^hConnick *et al.*, 1998; ⁱYatsenko, 1984; Yatsenko *et al.*, 1990; ^jMedugno *et al.*, 1997; los demás ejemplos se encuentran listados por Couch e Ignoffo (1981). ^kEl olote es el corazón de la mazorca del maíz el cual se desecha después de cosechar el grano.

Tabla 2. Aceites portadores utilizados en las formulaciones de bioinsecticida

Sustancia	Concentración (%)	Referencia
Aceite Codacide (para usos agrícolas)	90	Helyer (1993)
Aceite de algodón	45	Topper <i>et al.</i> (1984) Bell (1991)
Aceite de cacahuete	100	Sieglaff <i>et al.</i> (1998)
Aceite de coco	50	Prior <i>et al.</i> (1988)
Aceite de soja	100	Gómez y Rumiatto (1987)
Aceite UVL (ultra bajo volumen)		
[Hoechst]	-	Smith <i>et al.</i> (1978)
Actipron [British Petroleum]	5-50	Entwistle y Evans (1985) Smits <i>et al.</i> (1988)
Diesel ^a	-	Clark y Reiner (1956)
Top Oil (aceite mineral)	45	Smith <i>et al.</i> (1978)

^a En algunos países está prohibido el uso de diesel.

dad que facilitó la germinación de las esporas del hongo (BATEMAN *et al.*, 1993; JENKINS Y THOMAS, 1996).

En la antes Unión Soviética se formuló el NPV de *L. dispar* en un líquido con el 50% de glicerina bajo el nombre Virin-Gyap[®], aunque la popularidad de esta formulación está disminuyendo en favor de los polvos mojables (KANAPATSKAYA *et al.*, 1990).

2.3. Los coadyuvantes

2.3.1. Surfactantes

Los surfactantes se utilizan con tres propósitos: 1) como agentes humectantes o dispersantes para reducir la tensión superficial de las gotas de una aspersión acuosa y facilitar el depósito y retención de las gotas en la superficie de las hojas del cultivo; 2) como esparcidores que facilitan la extensión de cada gota que impacta con la hoja y 3) como emulsionantes que permiten mezclar el aceite con el agua en la producción de formulaciones emulsionables.

En la selección de un surfactante, es importante tomar en cuenta su perfil hidrofílico-lipofílico señalado por su número HLB por sus siglas en inglés (BECHER, 1973). Se supone que la mayoría de los surfactantes actúan simultáneamente como humectantes y esparcidores aunque no es seguro que la expansión de las gotas sobre la superficie de las hojas sea siempre una característica deseable; las hojas que se mojan completamente por medio de la expansión de las gotas no aceptarían gotas adicionales (WIRTH *et al.*, 1991).

Además, la concentración de sustancias fotoprotectoras en la formulación disminuiría con la mayor expansión de las gotas, resultando en una menor protección del virus. Existe una gran diversidad de dispersantes-adherentes comerciales que pueden ser compatibles con los baculovirus siempre y cuando no sean altamente alcalinos (Tabla 4). No obstante, Smith *et al.*, (1978) encontraron que la mortalidad de *H. zea* fue menor en formulaciones de NPV con el surfactante Triton CS-7.

Para superar los problemas de evaporación de las gotas en una pulverización antes de que entren en contacto con el cultivo se puede utilizar una formulación en emulsión, por ejemplo aceite mezclado en agua. Este es un problema común en aplicaciones con bajos volúmenes de agua que, a la vez, requieren la producción de gotas muy finas para lograr una buena cobertura del cultivo. El surfactante apropiado para preparar una emulsión depende del tipo de aceite empleado.

Por ejemplo, para preparar una emulsión con aceite de ricino se requiere un surfactante con HLB de 14, mientras que para el aceite mineral parafínico el valor HLB debe ser de 10 (BECHER, 1973). Prior *et al.* (1988) mezclaron proporciones iguales de agua y aceite de coco con Tween 80 al 0,01% para la aplicación de esporas de *Beauveria bassiana* sensibles a la deshidratación.

Otra opción es adicionar sustancias higroscópicas las cuales atraen y retienen la humedad del aire: glicerina al 1-4% (DOWDEN Y GIRTH, 1953), melaza al 12-25% (YENDOL *et al.*, 1977; PRITCHETT *et al.*, 1980; SHEPHERD *et al.*, 1984) o productos comerciales como Biofilm CMC o Nalco-trol (PFRIMMER, 1979; NORD Y PEPPER,

Tabla 3. Valores HLB¹ y su función en las formulaciones de bioinsecticidas.

Valor HLB	Aplicación	Ejemplos (HLB)
3-6	Emulsión de agua en aceite	SPAN 80 (4,3)
7-9	Agente mojable	SPAN 20 (8,6)
8-18	Emulsión de aceite en agua	PEG 400 mono-oxilato (11,4)
13-15	Detergente	Tween 80 (15,0)
15-18	Solubilizador	Tween 20 (16,7)

¹ Perfil hidro-lipofílico (señalado por sus siglas en inglés)

Tabla 4. Surfactantes utilizados en distintas formulaciones de bioinsecticidas

Sustancia y fabricante	Concentración (%)	Referencia
Adsee (Westrade, Guatemala)	0,06	Williams <i>et al.</i> (1999)
Agral NN (Zeneca)	0,05-0,1	Bourner <i>et al.</i> (1992)
AgralPlus (Zeneca)	0,2-2,0	Williams <i>et al.</i> (1999)
Chevron (Chevron Chemical Co.)	0,05-2,3	Yendol <i>et al.</i> (1977)
Rhoplex B60A (Rohm y Haas)	2,0	Podgwaite <i>et al.</i> (1991)
Teepol	0,05-0,5	Topper <i>et al.</i> (1984)
[Sulfonato alquil secundario de sodio]		Easwaramoorthy y Jayaraj (1991)
Triton X-100	0,03-0,5	Ignoffo <i>et al.</i> (1965)
		Falcon <i>et al.</i> (1968)
		Vail <i>et al.</i> (1971, 1999)
		Chakraborty <i>et al.</i> (1999)
Twæen 20	0,005-0,1	Boyette <i>et al.</i> (1991)
[Monolaiate de sorbitano polioxietileno]		Hernández-Crespo <i>et al.</i> (1999)
Tween 80	0,004-0,33	Vail <i>et al.</i> (1977, 1991)
[Monolaiate de sorbitano polioxietileno]		Huber y Dickler (1977)
		Bell y Romaine (1980)
		Hostetter <i>et al.</i> (1982)
		Bell (1991)
		Inglis <i>et al.</i> (1993, 1996)

1991). Es más conveniente utilizar agua con un humectante en la aplicación de volúmenes mayores donde el uso de un aceite sería costoso o no deseable desde el punto de vista medioambiental.

2.3.2. Adherentes

Como se mencionó anteriormente, varios de los dispersantes-adherentes comerciales son surfactantes que incluyen adherentes. La necesidad de incluir un adherente en la formulación depende de la naturaleza de la superficie de la hoja y del rigor o frecuencia de los lavados por la lluvia (IGNOFFO *et al.*, 1977b) o agua de riego. La abrasión física, por partículas de suelo sopladas por el viento o arrastradas por agua de riego, es otro posible agente responsable de la pérdida del virus de la superficie de las hojas. Algunas sustancias adherentes se indican en la Tabla 5 aunque no todas han sido utilizadas aún con los baculovirus. También se ha utilizado melaza como un adherente aunque es muy soluble en agua (JONES *et al.*, 1997; CHAKRABORTY *et al.*, 1999).

2.3.3. Espesantes

Se utilizan los espesantes para mantener la formulación en una suspensión uniforme. Normalmente estas sustancias son polisacáridos relacionados con el agar por ejemplo Keltose (0,5%) y a veces tienen gomas como la goma Xanthan (0,05-0,1%) o goma Kelzan (0,1-1,1%) adicionadas (SMITH *et al.*, 1978, 1980, 1982). Otros espesantes incluyen la carboximetil celulosa (1-10%) y la hidroximetil celulosa (2%) (McLAUGHLIN, 1967; ANDREWS *et al.*, 1975; COUCH Y IGNOFFO, 1981).

2.3.4. Ligantes

Los ligantes se añaden a los granulados para adherir el virus y los otros componentes de la formulación, al portador y ayudar a la formación correcta de los gránulos. Algunos ligantes utilizados con bioinsecticidas incluyen la hidroxietil [o metil] celulosa al 0,2-0,5% (HENRY, 1971; McLAUGHLIN *et al.*, 1971; BELL Y KANAVAL, 1975; HENRY *et al.*, 1978), la gelatina al 2% (HOSTETTER Y PINNELL, 1983), la glicerina (McLAUGHLIN *et al.*, 1971; AHMED *et al.*, 1973) y el aceite de parafina al 20% (AHMEND *et al.*, 1973).

2.3.5. Los cebos y estimulantes alimenticios

Se utilizan fagoestimulantes y cebos para incrementar la alimentación del fitófago con el fin de que consuma una dosis letal del virus en menos tiempo. Sin duda alguna, la formulación del virus con un fagoestimulante puede resultar en un marcado incremento de la mortalidad del fitófago producida por el virus en comparación con aplicaciones sencillas del virus. Aunque potencialmente es más costoso que una formulación sencilla, el uso de virus con un cebo alimenticio tiene uno o varios propósitos que pueden compensar el costo:

- Frecuentemente en un cebo se requiere menos inóculo que en una aplicación sencilla para lograr el mismo grado de control.
- El inóculo se puede presentar en una forma concentrada lo cual puede disminuir el tiempo letal de la infección (BELL Y KANAVAL, 1978).
- La opacidad de algunos cebos ofrece buenos niveles de protección del virus contra los rayos UV.
- Aumentar la eficiencia de depósito del inóculo en el sitio del que se alimenta el

Tabla 5. Adherentes utilizados en formulaciones de bioinsecticidas.

Sustancia y fabricante	Concentración (%)	Referencia
Agral NN (Zeneca)	0,05-0,1	Smits <i>et al.</i> (1988)
Alcohol polivinilo ^a	0,5	Smith <i>et al.</i> (1978, 1980)
Chevron (Chevron Chemical Co.)	0,05-2,3	Shepard <i>et al.</i> (1984) Nord y Pepper (1991)
Hyvis 150 [Isopolibutanes] (British Petroleum Co.)	0,5	Prior y Ryder (1987)
Leche descremada	0,6-3,8	Huber y Dickler (1977) Glen y Payne (1984)
Nu-film [látex] (Miller Chemical y Fertilizer Co.)	0,1-1,25	Nord y Pepper (1991)
Plyac (Allied Chemical Corp.)	0,015-1,2	Jaques <i>et al.</i> (1977, 1981)
Polietileno y un derivado de polietoxietanol		Livingston <i>et al.</i> (1980) Prichett <i>et al.</i> (1980) Nord y Pepper (1991)
Poliglucina (polipéptido)	0,4	Jankevica y Zarins (1997)
Rhoplex B60A (Rohm y Haas Co.)	0,2-2,0	Podgwaite <i>et al.</i> (1986, 1991) Webb <i>et al.</i> (1990)
Tendal (fabricante no especificado)	0,1	Kolodny-Hirsch <i>et al.</i> (1997)

^a El cloruro polivinilo y el pirrolodono polivinilo pueden también funcionar.

fitófago. Por ejemplo, gránulos aplicados al cogollo del maíz para el control de larvas de *S. frugiperda*.

- El cebo puede atraer a los enemigos naturales de la plaga resultando en mayor grado de control (CAÑAS Y O'NEIL, 1998).

Algunas empresas han desarrollado cebos comerciales para emplear en programas de control de los insectos plaga más importantes (FARRAR Y RIDGWAY, 1994). No obstante, en general, la investigación y el uso de cebos y fagoestimulantes en formulaciones de los baculovirus está notablemente subexplotado. Bartelt *et al.* (1990) encontraron una interacción importante entre diferentes ingredientes de un cebo. Consideraron que azúcares, lípidos y proteínas son componentes esenciales de los "mejores" cebos para larvas de lepidópteros. Así que el cebo desarrollado para tratar con insecticidas químicos al picudo del algodón *A. grandis* funcionó bien en un formulado con un NPV para el control de *Helicoverpa* (ANDREWS *et al.*, 1975) y Coax, desarrollado para *Helicoverpa* en el algodón funcionó bien contra el pirálido barrenador de maíz *Ostrinia nubilalis* (BARTELT *et al.*, 1990). Concentrados acuosos hechos con extractos de la planta huésped pueden funcionar como fagoestimulantes aunque hay pocos estudios sobre su utilidad con los baculovirus. Además, extractos de plantas dañadas pueden actuar como señales para ciertos enemigos naturales atrayéndolos al cultivo tratado con posibles

incrementos de mortalidad de la plaga (TURLINGS *et al.*, 1991; BLAAKMEER *et al.*, 1994; DRUKKER *et al.*, 1995; CHAPMAN *et al.*, 2000).

La cantidad de cebo a aplicar en una pulverización depende del tamaño de gota y su densidad (número de gotas impactadas por área de hoja). Lutterell *et al.* (1982b) observaron un incremento en el control por virus de *Helicoverpa* posterior a la aplicación de los cebos Coax y Gustol a razón de 23,5 g/litro de aspersión (total 1,1 kg/ha) aunque los resultados fueron variables y se recomendaron estudios adicionales. Smith *et al.* (1982) recomendaron la aplicación de 2,66 kg/ha de un cebo basado en soja para control de *Helicoverpa* también en el algodón, mientras que otros han aplicado 11,4 y 56,8 kg/ha de un cebo de *A. grandis* (Tabla 6) con virus (ANDREWS *et al.*, 1975) y 3,36 kg/ha del Coax (BELL Y ROMAINE, 1980) para controlar la misma plaga. Para el control de *Spodoptera* en maíz, Támez-Guerra *et al.* (1998) aplicaron 10 kg/ha de un granulado encapsulado de azúcar, harina de maíz y aceite vegetal.

Los cebos aplicados en pulverización funcionan mejor con un tamaño de gota mayor (STACEY *et al.*, 1977b) mientras que los cebos granulados son más efectivos con mayor concentración de patógeno (LYNCH *et al.*, 1977). Obviamente, los cebos aplicados en pulverización deben ser compatibles con el tipo de boquilla empleado para evitar problemas de bloqueo, o bien se deben utilizar boquillas que produzcan una aspersión gruesa para la aplicación de cebos. Hay evidencia de que los cebos son menos atractivos cuando el insecto se ha alimentado de la planta anteriormente (BARTELT *et al.*, 1990), aunque cabe reiterar que la investigación sobre la eficiencia de los cebos y fagoestimulantes carece de estudios detallados, sobre todo de campo. Algunos cebos y fagoestimulantes que demostraron tener un efecto deseable en pruebas de campo se indican en la Tabla 6. También se encuentra una lista de otras sustancias probadas como cebos sólo en laboratorio en Hunter-Fujita *et al.* (1998).

Recientemente hemos empleado un cebo granulado para probar los efectos de diferentes productos sinérgicos del NPV de *S. frugiperda* en pruebas de campo en México. El cebo consiste en 160 g de harina de maíz, 40 g de fécula de maíz, 16 ml de aceite comestible y 200 ml de agua; se mezclan los ingredientes para producir una pasta que se pasa por un tamiz de alambre y se deja secar sobre papel encerado durante un día. El costo de este cebo es de US\$0.76 /kg peso seco (a precios de los ingredientes del supermercado en México). Este granulado tiene tres ventajas: primero es fácil de preparar incorporando el virus y las sustancias a probar, segundo es fácil de aplicar manualmente a los cogollos del maíz y tercero no desaparece con la lluvia sino que se convierte en una pasta pegada al interior del cogollo de la planta. Durante los días siguientes a la aplicación se observaron larvas de *S. frugiperda* alimentándose exclusivamente de este cebo y los resultados preliminares de los niveles de infección logrados con el NPV en esta formulación son prometedores (J. CISNEROS Y T. WILLIAMS, datos sin publicar).

2.4 Protección ultravioleta

Diferentes baculovirus han sido registrados para el control biológico de distintas plagas de importancia agrícola. Sin embargo, su eficacia en campo y por tanto su

Tabla 6. Cebos y fagoestimulantes utilizados en las formulaciones de bioinsecticidas.

Sustancia	Insecto	Referencia
Cebos		
Coax ^a (Trader Oil Mill Co. EUA)	<i>Helicoverpa</i> spp.	Bell y Kanavel (1978)
harina de semilla de algodón (63,3%)		Bell y Romaine (1980)
sacarosa (25%)		Johnson (1982)
aceite de semilla de algodón (12,3%)		Lutterell <i>et al.</i> (1982a, 1983)
Tween 80 (0,3%)		
Cebo ^a para <i>H. zea</i>	<i>H. zea</i>	Smith <i>et al.</i> (1982)
harina de soja (8%)		
sacarosa (1%)		
aceite de soja (0,5%)		
Triton CS-7 (0,01%)		
Cebo para <i>A. grandis</i>	<i>Helicoverpa</i> spp.	McLaughlin <i>et al.</i> (1971)
Sacarosa (27,3%)		Andrews <i>et al.</i> (1975)
Semilla de algodón (55,9%)		
Glicerina (10,9%)		
Thixin (3,6%)		
Dacagin (3,6%)		
Hidroxixelulosa (1,4%)		
Agua (60%)		
Harina de maíz pregelat. (70g)	<i>H. zea</i>	Tamez-Guerra <i>et al.</i> (2000)
Tween al 10% (50ml)	<i>S. frugiperda</i>	
2-Propanol (200ml)		
Cloruro de calcio al 10% (260ml)		
K-lignato (130g)		
Agua (4 litros)		
Gustol (Sandoz Inc. EUA)	<i>Helicoverpa</i> spp.	Johnson (1982)
		Lutterell <i>et al.</i> (1982a, 1983)

Tabla 6. Continuación. Cebos y fagoestimulantes utilizados en las formulaciones de bioinsecticidas.

Sustancia	Insecto	Referencia
SAN-285 (Sandoz Inc. EUA)	<i>Helicoverpa</i> spp. <i>Cydia pomonella</i>	Pfimmer (1979) Jaques <i>et al.</i> (1981)
Adyuvante viral (Sandoz Inc. EUA)	<i>H. zea</i> <i>Lymantria dispar</i>	Stacey <i>et al.</i> (1977a) Wollam <i>et al.</i> (1978)
Pheast (Miller Chem. Corp. EUA)	<i>Choristoneura rosaceana</i> y otros lepidópteros	Farrar y Ridgway (1994) Li y Fitzpatrick (1999)
<i>Productos cereales</i>		
Salvado de trigo	<i>Agrotis ipsilon</i> <i>Agrotis segetum</i>	Salama <i>et al.</i> (1990) Boumer <i>et al.</i> (1992)
Harina de soja	<i>Heliothis virescens</i>	Bell y Kanavel (1978)
<i>Azúcares</i>		
Sacarosa	<i>H. virescens</i> <i>S. frugiperda</i>	Bell y Kanavel (1978) Williams <i>et al.</i> (1999)
Sacarosa + almidón (1:1)	<i>Anagrapha falcifera</i>	Pingel y Lewis (1997)
Melaza	<i>L. dispar</i> <i>A. ipsilon</i> <i>Helicoverpa</i> spp.	Wollam <i>et al.</i> (1978) Salama <i>et al.</i> (1990) Teakle <i>et al.</i> (1985)
Dextrosa: Levulosa (1:1)	<i>H. zea</i>	Stacey <i>et al.</i> (1977a)
<i>Extractos de plantas</i>		
Cáscara del maíz	<i>H. zea</i> y <i>H. virescens</i>	Allen y Pate (1966) Guerra y Shaver (1969) Bell y Kanavel (1978)
Plantas de maíz	<i>H. virescens</i>	Montoya <i>et al.</i> (1966)
Trigo	<i>H. zea</i>	Stacey <i>et al.</i> (1977a)
Semilla de trébol	<i>H. zea</i>	Stacey <i>et al.</i> (1977a)
Semilla de algodón (extracto alcohólico)	<i>Helicoverpa</i> spp.	Bell y Kanavel (1977)

^a Para evitar el bloqueo de las boquillas, la concentración de harina no debe pasar del 7,5% en las mezclas de tanque en cebos aplicados por aspersión (Hostetter *et al.*, 1982). La cantidad de Tween utilizada por Hostetter *et al.* (1982) fue reducida al 0,004%.

desarrollo comercial, ha sido influida negativamente por la radiación ultravioleta (UV) y el tiempo requerido para causar la muerte del insecto plaga (JAQUES, 1885; IGNOFFO, 1992). La radiación solar, especialmente la radiación ultravioleta con espectro de actividad de 290 a 400 nm, es el factor más destructivo o limitante que afecta la persistencia y/o actividad de los baculovirus (IGNOFFO *et al.*, 1977a). Por tanto, el principal objetivo de utilizar sustancias fotoprotectoras en la formulación de los entomopatógenos es maximizar la persistencia ambiental de los mismos.

Durante varias décadas, diversos compuestos naturales y sintéticos han sido evaluados como protectores solares para entomopatógenos y por su modo de acción pueden ser divididos en sustancias reflejantes, absorbentes, colorantes, cromatóforos, captore de radicales libres y más recientemente, los blanqueadores ópticos.

2.4.1. Blanqueadores ópticos

Los blanqueadores ópticos (blanqueadores fluorescentes), son un grupo de sustitutos del estilbeno que, por su capacidad de absorber la radiación UV y emitir luz en la región azul del espectro visible, son utilizados comúnmente en muchos procesos industriales para dar mayor brillo a pinturas, fibras, ropas, etcétera. Shapiro (1992) describió su uso como protector de radiación para el NPV de *L. dispar* con resultados insólitos: los virus formulados con ciertos blanqueadores mantuvieron el 100% de su viabilidad después de dos semanas de exposición a una fuente de luz UV.

Casi simultáneamente, Shapiro y Robertson (1992) demostraron la capacidad que tienen estos compuestos de potenciar hasta más de dos mil veces la actividad del NPV de *L. dispar*. Poco después, Hamm y Shapiro (1992) describieron el mismo fenómeno en un NPV de *S. frugiperda*. Este grupo de sustancias se patentó bajo la premisa de que el efecto protector de estos compuestos sobre diferentes microorganismos utilizados o factibles de ser utilizados en el control biológico de plagas agrícolas es deseable e incrementa las posibilidades de éxito (SHAPIRO *et al.*, 1992). Los blanqueadores ópticos también pueden potenciar la actividad de otros virus incluyendo los cipovirus (virus de la poliedrosis citoplásmica) y entomopoxvirus en huéspedes homólogos y heterólogos (SHAPIRO Y DOUGHERTY, 1994).

A raíz de estos descubrimientos se han realizado varios estudios con blanqueadores en laboratorio, aunque su capacidad UV-protectora y potenciadora de la efectividad en campo ha sido relativamente poco investigada (Tabla 7). Es importante señalar que no todos los blanqueadores ópticos funcionan como potenciadores de los baculovirus y existe evidencia en la literatura publicada de varios que no exhiben dicho efecto (HAMM, 1999).

2.4.2. Modo de acción

Durante la última década se han creado diferentes hipótesis sobre el modo de acción de los blanqueadores ópticos, todas dirigidas hacia el intestino medio. En estudios con el NPV de *L. dispar*, se encontró que 48 h después del consumo del virus más Tinopal LPW por larvas de *L. dispar* se ocasionaron perturbaciones fisio-

lógicas que incluyeron disminución del pH intestinal, disminución en alimentación y una reducida ganancia de peso (SHEPPARD Y SHAPIRO, 1994; SHEPPARD *et al.*, 1994). En larvas de *T. ni* inoculadas con el NPV de *A. californica*, se observó que el desprendimiento de células infectadas del intestino fue menor en la presencia de Calcofluor M2R (el producto comercial de Tinopal LPW), lo cual resultó en un aumento de la probabilidad de infección (WASHBURN *et al.*, 1998).

Hoy en día el modo de acción de estas sustancias parece ser resuelto. Se ha observado que la quitina en la membrana peritrófica actúa como un andamio para las demás proteínas de la membrana. El blanqueador Calcofluor M2R se liga a la quitina y se liberan las proteínas de la membrana. Esto provoca la inhibición de la formación de la membrana peritrófica en el intestino del insecto correlacionado con un incremento simultáneo en la susceptibilidad del insecto a la infección por baculovirus. También se observó la degradación de la mucina del intestino en la presencia de Calcofluor M2R (WANG Y GRANADOS, 2000).

2.4.3. Acción potenciadora: dosis y tiempo letal

El efecto potenciador se hace más evidente cuando el valor de la dosis letal del virus es alto, en cambio cuando se requieren muy pocos cuerpos de inclusión para lograr una infección letal el grado de potenciación por el blanqueador es mínimo (Tabla 7). Se recuerda que la variación de resultados puede responder al método de bioensayo utilizado. En bioensayos con diferentes blanqueadores formulados con el NPV de *L. dispar*, Argauer y Shapiro (1997) señalaron que los blanqueadores con mayor actividad potenciadora tienden a exhibir la mayor fluorescencia y los de menor actividad menor fluorescencia, aunque la razón de esto permanece desconocida.

Shapiro y Robertson (1992) observaron una reducción en el TL_{50} de 13,9 a 7,1 días después de infectar larvas de *L. dispar* con 1×10^5 OBs/ml de su NPV en presencia de Phorwite AR, Phorwite RKH, Leucophor BS, Leucophor BSB y Tinopal LPW. El TL_{50} del NPV homólogo de *Pseudoplusia includens* se vio reducido de 15,9 a 5,7 días en presencia de Calcofluor M2R al 0,16% (ZOU Y YOUNG, 1996). En pruebas sobre larvas de *H. zea* con cinco cepas de NPV aislados de diferentes huéspedes, Shapiro y Vaughn (1995) observaron una disminución del TL_{50} entre el 4,5 y 34,9% en la presencia de Tinopal LPW al 1%. En cambio, en un estudio reciente se observó un incremento del 42% en el tiempo promedio de muerte de larvas de *S. frugiperda* tratadas con su homólogo NPV y Tinopal LPW al 1% (MARTÍNEZ *et al.*, 2000). El sexo del insecto puede influenciar los resultados, así las larvas hembra de *Choristoneura occidentalis* tratadas con el NPV de *C. fumiferana* en presencia de Blankophor HRS, P167 y Tinopal LPW murieron entre 23 y 39% más rápido que los machos (LI Y OTVOS, 1999a).

2.4.4. Eficiencia como protectores UV

Shapiro (1992) probó en laboratorio 23 blanqueadores pertenecientes a diferentes grupos químicos (estilbenos, oxazoles, pirazoles, ácido naftálico, lactona y coumarina) encontrando que la mejor protección se consiguió con los ácidos disulfónicos de estilbeno. Estos fueron Leucophor BS, Leucophor BSB, Phorwite AR y

Tabla 7. Blanqueadores ópticos con actividad potenciadora de los baculovirus evaluados en laboratorio.

Blanqueador	Factor de potenciación	Huésped, virus	Referencia
Phorwite AR	1225	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Shapiro y Robertson (1992)
Phorwite RKH	1837	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Leucophor BS	967	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Leucophor BSB	417	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Tinopal LPW	1670	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Blankophor BBH	42-214 ^a	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Farrer <i>et al.</i> (1995)
Blankophor RKH	1032	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Argauer y Shapiro (1997)
Blankophor BBH	832	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Blankophor P167	410	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	Dougherty <i>et al.</i> (1996)
Blankophor HRS	92	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Tinopal LPW	1290	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
Tinopal LPW	214	<i>L. dispar</i> , LdMNPV	
	41	<i>T. ni</i> , AcMNPV	
	15 – 1600 ^b	<i>P. includens</i> , PiNPV	
	164-303000	<i>S. frugiperda</i> , SiMNPV	
	115	<i>S. frugiperda</i> , SiMNPV	
	24-58 ^c	<i>A. gemmatilis</i> , AgMNPV	
	12,5	Ag MNPV	
		<i>S. exigua</i> , SeMNPV	Hamm y Chandler (1996)
Tinopal LPW	13,1	<i>H. zea</i> , AiMNPV	Shapiro y Vaughn (1995)
[Calcofluor M2R]	25,3	<i>H. zea</i> , HaMNPV	
	2,1	<i>H. zea</i> , GmMNPV	
	50	<i>H. zea</i> , AcMNPV	
	8,7	<i>H. zea</i> , HzSNPV	
Tinopal LPW	4,3	<i>H. virescens</i> , AiMNPV	Vail <i>et al.</i> (1996)
	2,9	<i>H. zea</i> , AiMNPV	
	13,6	<i>S. exigua</i> , AiMNPV	
	7,8	<i>T. ni</i> , AiMNPV	
Blankophor RKH	1,7	<i>C. occidentalis</i> ,	Li y Otvos (1999b)
Blankophor BBH	2,8	CiMNPV	
Blankophor P167	3,1	CiMNPV	
Blankophor HRS	3,6	CiMNPV	
Tinopal LPW	2,1	CiMNPV	

^a depende del estadio de la larva; ^b depende de la formulación; ^c depende del grado de resistencia de la cepa del insecto.

Tinopal LPW, todos con efectos dosis-dependientes obteniéndose protección del NPV de *L. dispar* hasta del 100% para una concentración del 1% de blanqueador.

Con el objeto de evaluar la actividad UV protectora de Tinopal LPW (blanqueador fluorescente 28), Dougherty *et al.* (1996) investigaron dos sistemas virus-huésped, el NPV de *L. dispar* sobre su huésped homólogo y el NPV de *A. californica* sobre *T. ni*. Muestras de virus, con o sin blanqueador, fueron expuestas a radiación UV simulada, durante periodos de tiempo comprendidos entre 0,5 y 120 minutos y posteriormente por bioensayos y comparando las CL_{50} s. Los resultados demostraron que el blanqueador ofrece protección a los virus frente a la desactivación por UV y, además, potencia la actividad insecticida.

2.4.5. Experimentos de campo

La tecnología en protectores UV e incremento de infectividad de los baculovirus ocasionado por algunos blanqueadores ópticos, así como su inclusión como coadyuvantes en formulados de patógenos de insectos es una área en desarrollo y motivo de actuales investigaciones de campo. La mortalidad de *Pseudoplusia includens* producida por virus en un cultivo de soja aumentó desde 17,3 hasta 39,4% en larvas de segundo estadio y desde 32,1 hasta 55,2% en larvas de cuarto estadio mediante la aplicación del NPV con Calcofluor M2R al 1% (Zou y YOUNG, 1996). Hamm *et al.* (1994) encontraron que se producía una potenciación del NPV de *S. frugiperda* aplicado en cultivos de maíz, cuando se añade el blanqueador Tinopal LPW, sin embargo, en este mismo estudio la variable: volumen de agua aplicada, también tuvo un efecto potenciador en la mortalidad por virus de magnitud similar.

Webb *et al.* (1994a,b) señalaron que también tienen actividad potenciadora Blankophor BBH y Phorwite AR al aplicarlos solos sobre poblaciones con incidencia natural de NPV o tratadas con una formulación comercial del NPV de *L. dispar* (Gypchek®) a dosis bajas y recomendadas. Ambas sustancias provocaron una mortalidad significativamente mayor y una reducción también significativa en el TL_{50} . Contrariamente, en aplicaciones aéreas del Gypchek® con Blankophor BBH (0,5%), Thorpe *et al.* (1999) no encontraron ningún efecto potenciador y atribuyeron los resultados negativos a una reducida deposición de blanqueador de 0,03 a 0,2 g/cm², mientras que en laboratorio fue necesaria una cantidad de 1,5 g/cm² de blanqueador, para causar una mortalidad >90% sobre larvas de segundo estadio. Resultados similares fueron descritos para AcMNPV y el Calcofluor M2R aplicado contra *H. zea* sobre algodón (VAIL *et al.*, 1999) donde la persistencia del producto fue muy baja después de una lluvia simulada. En contraste, Webb *et al.* (1994b) detectaron una persistencia de entre 28 a 40% de Blankophor BBH sobre el follaje de robles seis meses después de la aplicación.

2.4.6. Otras sustancias fotoprotectoras

El conocimiento del impacto de la radiación UV en la estabilidad e inactivación de los virus entomopatógenos, ha estimulado la evaluación de diversos compuestos naturales y sintéticos como protectores solares durante varias décadas (Tabla 8). En un estudio pionero, Jaques (1971) encontró que fue retenida 75% de la actividad

Tabla 8. Sustancias publicadas como protectoras de radiación UV para los baculovirus.

Sustancia	Conc.	Referencia
REFLEJANTES		
Óxido de aluminio	-	Ignoffo y Batzer (1971)
Dióxido de titanio	-	Topper <i>et al.</i> (1984), Bull <i>et al.</i> (1976)
ABSORBENTES		
Carbón activado	1 kg/ha	Ignoffo <i>et al.</i> (1991)
Carbón negro	1-5%	Ignoffo <i>et al.</i> (1991), Bull <i>et al.</i> (1976)
Tinta India	1-5%	Krieg <i>et al.</i> (1980)
Naftaleno negro (Buffalo Black)	-	Ignoffo y Batzer (1971)
Ácido <i>p</i> -aminobenzóico (PABA)	5%	Dunkle y Shasha (1989)
Benzil-cinamato	3%	Shapiro <i>et al.</i> (1983)
Rojo congo	0,5-1%	Dunkle y Shasha (1989), Shapiro (1989), Ignoffo <i>et al.</i> (1991)
Ácido fólico	1%	Shapiro (1985), Dunkle y Shasha (1988)
Sulfato de lignina	8,5%	Martignoni y Iwai (1985)
Shade (Sandoz Inc. USA)	0,25-6%	Injac (1977), Shapiro <i>et al.</i> (1983), Martignoni y Iwai (1985)
Blanqueadores ópticos	0,1-1%	Ver Tabla 7
ANTIOXIDANTES		
<i>n</i> -Propil-galato	0,001%	Ignoffo y García (1994)
Ácido ascórbico	0,1%	Ignoffo y García (1994)
Feniltiocarbamida	0,0068%	Ignoffo y García (1994)
ENZIMAS OXIDATIVAS		
Calatasa	0,04%	Ignoffo y García (1994)
Peroxidasa	0,38%	Ignoffo y García (1994)
AMINOÁCIDOS		
Triptófano	0,003%	Ignoffo y García (1995)
Tirosina	0,05%	Ignoffo y García (1995)
OTRAS SUSTANCIAS		
Albúmina de huevo	3%	Jaques (1971, 1972)
Leche (polvo)	1-5%	Jaques (1971)
Levadura	3-5%	Jaques (1971)
Melaza	10-25%	Shapiro <i>et al.</i> (1983), Topper <i>et al.</i> (1984), Martignoni e Iwai (1985)
Hidrolizado de soja	5%	Jaques (1971)

viral de un NPV de *T. ni* con la adición de tinta India, carbón vegetal, levadura, leche peptonizada o hidrolizado de soja, después de 40 o 60 minutos de exposición, mientras que con el virus solo tuvo lugar una pérdida total de la actividad del virus en menos de 10 minutos. En campo la combinación de albúmina de huevo y tinta India produjeron el mayor efecto protector conservando el 95% de la actividad viral original después de 17 días. Años después, Shapiro y Robertson (1990) describieron seis tintas como protectores UV efectivos (verde Lissamine, amarillo acridina, azul alcali, mercurocromo y rojo congo) destacando a este último como un excelente protector UV.

Las observaciones de que las preparaciones de virus no purificado mantuvieron una mayor actividad y menor sensibilidad a la radiación UV que las preparaciones purificadas (DAVID Y GARDINER, 1966; IGNOFFO Y SHAPIRO, 1978), dieron pie a experimentos dirigidos a evaluar compuestos involucrados en diferentes procesos metabólicos. Con algunos de ellos se obtuvieron resultados interesantes como por ejemplo con adenina, guanina, ácido úrico (SHAPIRO, 1984), triptofano, tirosina (IGNOFFO Y GARCÍA, 1995) y vitaminas del complejo B, de las cuales las más efectivas fueron el ácido fólico y la riboflavina con factores de protección UV de 3,3 y 3,4 al 1% (SHAPIRO, 1985). El nivel de protección UV de estos compuestos estuvo directamente correlacionado con el espectro de absorción.

Shapiro *et al.*, (1983) señalaron que las melazas, Shade® (un polímero leucocianidin poliflavonoide), el cebo Coax y compuestos derivados del ácido p-aminobenzóico son buenos protectores a una concentración de 5%, mientras que Martignoni y Iwai, (1985) señalaron que el Tinopal DCS y Raymix en polvo (lignosulfonato) dieron igual o mayor protección UV que el producto comercial Shade. Sólo hay que recordar que estos últimos autores no estaban conscientes del efecto potenciador de los blanqueadores ópticos. Aunque menos estudiadas, algunas sustancias antioxidantes, como propil galato, ácido ascórbico y feniltiocarbamida, ofrecen 50% de protección contra la radiación UV a bajas concentraciones de 0,01, 0,068 y 1,0 mg/ml respectivamente (IGNOFFO Y GARCÍA, 1994). Muchas de las sustancias que en laboratorio han demostrado posibilidades de éxito, no se han probado en campo.

La formulación en polvo del H₂SNPV fue evaluada en laboratorio con y sin carbón activado, Shade y talco como portadores. Después de 24 h de exposición a la luz UV, no se observaron diferencias en actividad entre los testigos sin irradiación y los dos formulados de los protectores más talco, mientras que el virus solo fue casi completamente desactivado. El formulado con Shade pero sin talco incrementó la persistencia del virus dos veces (no significativo), mientras que el talco solo, incrementó la persistencia del virus cinco veces lo que resultó ser un factor significativo (IGNOFFO Y GARCÍA, 1996).

2.5. Otros potenciadores de los baculovirus

Aunque el potencial ofrecido por los blanqueadores es prometedor, existen otras sustancias y compuestos que exhiben efectos potenciadores a los baculovi-

rus. Las ventajas de adicionar estos compuestos a la formulación del virus incluyen la posibilidad de reducir la dosis y el tiempo requeridos para matar la plaga huésped. Sin embargo, sustancias potenciadoras pueden ampliar el rango de huéspedes de un baculovirus y hace necesario estudios dirigidos a determinar la seguridad ambiental de tales formulaciones (SHAPIRO Y DOUGHERTY, 1994).

2.5.1. Enzimas

Desde hace muchos años varios estudios han señalado que ciertos granulovirus pueden incrementar la infectividad de los nucleopoliedrovirus en un factor de alrededor de diez veces en bioensayos de laboratorio (TANADA, 1959; TANADA Y HUKUHARA, 1971; TANADA *et al.*, 1975; HARA *et al.*, 1976; ZHU *et al.*, 1989; GOTO, 1990). El factor potenciador fue identificado como una metaloproteasa, llamada enhancina, localizada en los cuerpos de inclusión del granulovirus, la cual afecta la integridad de la quitina que forma parte de la membrana peritrófica del insecto (GIJZEN *et al.*, 1995; LEPORE *et al.*, 1996; WANG Y GRANADOS, 1997, 1998). Sin embargo, los estudios de campo utilizando mezclas de virus son muy escasos. Hunter-Fujita *et al.*, (1997) observaron que larvas de *S. littoralis* inoculadas con mezclas de un NPV y un GV sobrevivieron más que las larvas testigos aunque las larvas con infecciones mixtas se alimentaron menos. Los valores de la CL_{50} del NPV de *L. dispar* fueron reducidos hasta 5,4 veces en la presencia de la enzima quitinasa (1%), probablemente debido a la degradación de la membrana peritrófica por la enzima (SHAPIRO *et al.*, 1987). Recientemente se ha señalado que proteínas estructurales de un entomopoxvirus pueden aumentar hasta 10 veces la infectividad de un NPV de *Bombyx mori* (MITSUHASHI *et al.*, 1998).

2.5.2. El ácido bórico

Tratando de encontrar nuevas sustancias sinergistas Shapiro y Bell (1982) evaluaron 14 ácidos orgánicos e inorgánicos en combinación con el NPV de *L. dispar* sobre larvas de segundo estadio de la misma especie. De todas ellas sólo el ácido bórico (pH 5,0) y el ácido sórbico (pH 3,0) potenciaron la actividad del virus. En bioensayos sobre dieta semisintética y plántulas de roble, la adición de ácido bórico al 0,1 y 0,25% no tuvieron efecto, mientras que a concentraciones de 0,5% se potenció la actividad del virus 2 veces y al 1% hasta 11 veces. Así mismo, Chaudhari (1992) alimento con discos de hoja, tratados con NPV más ácido bórico a larvas del segundo estadio de *S. litura*. La mortalidad debida al virus aumentó desde 33,7%, con virus solo, hasta un 57,7 y 63,7% con mezclas del virus y ácido bórico a 0,5 y 1%, respectivamente. Los valores del TL_{50} también se redujeron desde 153 h, con virus solo, hasta 97 h con la mezcla.

En estudios de laboratorio con diferentes concentraciones del NPV de *A. gemmatilis* y ácido bórico, incorporado a una dieta semisintética, se obtuvieron valores de la CL_{50} de $1,52 \times 10^5$ OBs/ml, para el virus solo y $7,95 \times 10^2$ OBs/ml para la mezcla que contenía 0,045g de ácido bórico por 100 ml de dieta. A una concentración de 250 OBs/ml de dieta el TL_{50} se redujo de 13,6 días con virus solo a 7,4 días con virus más ácido bórico a la concentración de 0,001% (MORALES *et al.*, 1997).

En estudios recientes de campo con el NPV de *S. frugiperda* hemos observado un incremento sustancial (20%) en la mortalidad por virus en bloques de maíz tratados con el virus más el ácido bórico al 1%. Pruebas adicionales indicaron que el ácido bórico no afectó a las poblaciones de enemigos naturales en el cultivo al 1 o al 4% (PÉREZ, CISNEROS Y WILLIAMS, datos sin publicar). Cabe mencionar que el ácido bórico es una sustancia económica y también existe evidencia de su efecto potenciador a la actividad de *B. thuringiensis* (MORRIS *et al.*, 1995). Es posible que estos ácidos actúen como factores de estrés fisiológico para el insecto incrementando con ello su susceptibilidad a los entomopatógenos.

2.5.3. Azadiractina (Nim)

La adición de los extractos de semilla de nim (0,1 a 1%) al NPV de *L. dispar* no afectó significativamente los valores de la CL_{50} , aunque las larvas inoculadas con la mezcla exhibieron una mortalidad por infección viral más rápida que la observada en larvas inoculadas con virus solo (SHAPIRO *et al.*, 1994). En bioensayos con dieta semisintética y follaje natural se han señalado incrementos del 30 al 40% de la mortalidad de las larvas tratadas con LdMNPV más azadiractina, además de una muerte significativamente más rápida, con respecto a las larvas tratadas con virus o azadiractina solos. Así mismo, encontraron que el efecto potenciador fue más pronunciado en biosayos sobre follaje que sobre dieta semisintética (Cook *et al.*, 1996). Una posible explicación a esto es que la larva no puede evitar consumir la azadiractina ya que los triterpenos pueden ser absorbidos dentro de la hoja (SAXENA, 1989). Murugan *et al.* (1998) encontraron un aumento de la mortalidad de las larvas de *H. armigera* inoculadas con su NPV homólogo cuando se añaden extractos de la semilla de nim y la hoja de *Vitex negundo*, una planta medicinal con propiedades insecticidas.

2.5.4. Insecticidas biológicos y químicos

Parcelas de algodón tratadas con *B. thuringiensis* + AcMNPV + un fagoestimulante para el control de *Helicoverpa* produjeron un mayor rendimiento que las parcelas tratadas únicamente con los patógenos (BELL Y ROMINE, 1980). Otros autores han señalado el mismo fenómeno (IGNOFFO Y MONTOYA, 1966; JAKES 1972; LUTWAMA Y MATANMI, 1988; JAKES *et al.*, 1989). En cambio, mezclas del NPV de *Anagrapha falcifera* con *B. thuringiensis* no provocaron un aumento significativo en la mortalidad de larvas de *S. frugiperda*, *H. zea* u *Ostrinia nubilalis* en laboratorio (PINGEL Y LEWIS, 1999).

Larvas de *H. zea* inoculadas con su virus homólogo (HzSNPV) mezclado con un virus heterólogo (AcMNPV) murieron con una dosis menor y en menos tiempo que larvas tratadas con cada virus por separado (ARNE Y NORDIN, 1995). Se carecen de estudios de campo sobre el uso de los entomopatógenos en combinación.

Peters y Coaker (1993) señalaron un incremento en la infección observada por el granulovirus homólogo de *Pieris brassicae* sobre larvas de diferentes edades cuando el virus fue aplicado en mezcla con concentraciones bajas de un piretroide y de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*. El incremento de la potencia de las mezclas

que contienen bajas concentraciones del piretroide fue de una magnitud 10^3 y 10^{10} para larvas de segundo y cuarto estadio, respectivamente. Otros autores han señalado interacciones sinergistas entre entomopatógenos e insecticidas sintéticos, aunque en tales trabajos la exposición a uno y otro agente de control no fue simultánea (McVay *et al.*, 1977; SAVANURMATH Y MATHAD, 1981).

Jaques y Morris (1981) revisaron la literatura sobre los efectos de mezclas de entomopatógenos e insecticidas sintéticos hasta 1980. Estudios más recientes incluyen el de Chaudhari (1989), quien examinó el efecto de insecticidas y fertilizantes con el virus de *Diacrissia obliqua*, mientras que otros han evaluado mezclas contra noctuidos cortadores (RUD Y BELLONCIK, 1984; SALAMA Y MOAWED, 1988) o contra otras plagas comunes (MOHAMED *et al.*, 1983; MATHAI *et al.*, 1986; SATHIAH *et al.*, 1990).

2.6. La tecnología de microencapsulación

La formulación de los baculovirus dentro de microcápsulas de algún polímero puede ser tecnológicamente compleja, aunque en esta década se han publicado procesos más sencillos basados en el uso de almidones. La principal ventaja de la microencapsulación es que se mantiene el virus y los otros componentes de la formulación en contacto íntimo, lo cual puede ser particularmente deseable para el buen funcionamiento de los protectores contra la radiación UV. Además, a través de la microencapsulación, se puede optimizar el uso del inóculo y los otros coadyuvantes en la formulación.

El proceso de encapsulación involucra tres fases: i) disolución del material encapsulante en un disolvente, ii) adición del baculovirus y otros componentes de la formulación y iii) solidificación del material y procesamiento para la producción de las microcápsulas. Cuando el disolvente empleado es orgánico (tolueno, derivados del petróleo, etc.) se hace una pulverización fina de la mezcla para evaporar el disolvente y dejar el material seco y encapsulado. Se logra la solidificación del alginato de calcio o del kappa-carragenan inyectándolos en una solución de cloruro de calcio (50 mM) o cloruro de potasio (300 mM), respectivamente. Estas sustancias son polisacáridos sulfatados de algas marinas que se utilizan en la industria alimenticia para espesar helados, licuados de leche, etc. Se han empleado los dos polisacáridos para encapsular nematodos, bacterias y otros microorganismos para inocular suelos y para otros propósitos (KAYA Y NELSEN, 1985; TREVORS, 1991; LACKEY *et al.*, 1993).

Más sencillo y de efectividad comprobada es la encapsulación en almidón de *B. thuringiensis* y el NPV de *Helicoverpa* (IGNOFFO *et al.*, 1991). A escala de laboratorio, Dunkle y Shasha (1988) encapsularon *B. thuringiensis* de la siguiente manera. Mezclaron 2 g de aceite de maíz con 25 g de almidón de maíz pregelatinizado en polvo. Adicionaron 60 ml de agua destilada fría (2°C) la cual contenía el *B. thuringiensis* en suspensión, obteniéndose una buena mezcla. Rápidamente, se formó una masa gelatinosa la cual se dejó reposar durante 30 minutos a 20-25°C. De esta manera, la masa adquirió una consistencia gomosa y se procesó en una licuadora

con 25 g de almidón de maíz perlado. Las partículas producidas se pasaron por un tamiz de malla 14 (diámetro 1,41 m). Se dejaron secar las partículas al aire durante 24 h y posteriormente fueron separadas en diferentes tamaños por medio de tamices. Para obtener almidón pregelatinizado se cocina el almidón en agua, las partículas se inflan y después se seca y se pulveriza. Dunkle y Shasha (1988) utilizaron un almidón pregelatinizado comercial. Gillespie *et al.* (1994) produjeron gránulos de harina pregelatinizada con melazas, hojas de plantas y cloruro de calcio, encontraron que la alimentación de larvas de *O. nubilalis* fue mayor con gránulos a partir de melazas y hojas, mientras de los gránulos que contenían cloruro de calcio, no se alimentaron.

Recientemente, se probaron la gelatina, pectina, quitina, alginato de calcio y almidón de maíz para la encapsulación de *B. thuringiensis* en gránulos. Pruebas de persistencia de actividad en laboratorio, adherencia del formulado a la planta y palatabilidad de los gránulos al insecto, indicaron que la gelatina y pectina eran los encapsulantes más adecuados, mientras que la quitina fue la menos apropiada (MORALES-RAMOS *et al.*, 1998).

Es importante tener presente que el proceso de encapsulación no debe afectar la viabilidad del virus (algunos procesos incluyen disolventes orgánicos o soluciones alcalinas) y que el material capsular debe ser fácilmente degradado en el intestino del insecto. Así mismo, el tamaño de las partículas producidas debe ser compatible con el método de aplicación y, además, debe tener un costo asumible. Los cuerpos de inclusión del virus se adhieren fuertemente al follaje por lo que es necesario confirmar que la formulación encapsulada se comporta de la misma manera. Detalles de otros procesos de microencapsulación de entomopatógenos se encuentran en los siguientes artículos: Knudsen *et al.* (1990, 1991); Pereira y Roberts (1990, 1991).

El uso de harinas y almidones aplicados directamente como granulados o como gránulos pulverizables parecen ser prometedores para la formulación de *B. thuringiensis* y también para los baculovirus (McGUIRE Y SHASHA, 1990; TÁMEZ-GUERRA *et al.*, 1996, 1998). Una formulación de NPV con harina de maíz pregelatinizada y ligato disminuyó sustancialmente la pérdida de actividad por la luz UV y la acción de la lluvia (TÁMEZ-GUERRA *et al.*, 2000).

3. La vida de almacenamiento

Entre la producción del formulado y el momento de aplicación, hay un periodo durante el cual el producto no debe experimentar pérdida significativa en la viabilidad del virus, descomposición de otros componentes de la formulación ni cambios importantes en la composición física del mismo como por ejemplo, sedimentación o agregación de virus en suspensiones, o endurecimiento de polvos. Para un producto comercial, este lapso de tiempo puede ser de meses o años; la vida de almacenamiento de los insecticidas químicos es casi siempre entre dos y cuatro años (RHODES, 1993). Parece evidente que sería deseable el almacenamiento del pro-

ducto a temperaturas bajas para prolongar su viabilidad, aunque esto raramente es posible en la práctica. En los países tropicales donde potencialmente existen mercados grandes para los baculovirus bioinsecticidas, es común depositar los agroquímicos en almacenes a 35-40°C durante períodos largos.

En este sentido, los baculovirus se consideran entre los "mejores" entomopatógenos ya que se pueden almacenar preparaciones secas en obscuridad a temperaturas ambientales de 20 a 25°C durante varios años. Por ejemplo, el producto comercial TM BioControl-1® para el control de *Orgyia pseudotsugata* tiene una vida de almacenamiento de 5 años en condiciones de temperaturas frescas (MARTIGNONI, 1978). En cambio, Kaupp y Ebling (1993) señalaron que el Virtuss® del Canadá, un producto liofilizado y molido para el control de *Orgyia leucostigma*, perdió el 46% de su infectividad después de 2 años de almacenamiento a 4°C. Peor aun, una preparación liofilizada del granulovirus no purificado de *Plodia interpunctella* perdió el 90% de su actividad durante 4 meses a 22°C y el 98% de su actividad a 45°C, en el mismo período (COWAN *et al.*, 1986).

El recipiente del producto debe estar bien cerrado para mantener la humedad lo más baja posible, preferentemente por debajo del 5% (BURGES Y JONES, 1997). Recipientes no bien cerrados permitirán la entrada de humedad y de oxígeno a la formulación. La humedad permite el crecimiento de microorganismos contaminantes y la presencia de oxígeno puede causar la oxidación de compuestos en la formulación y la formación de radicales libres que desactivan el virus (IGNOFFO Y GARCÍA, 1994; JONES Y BURGES, 1997, 1998). En el caso de un granulovirus de *Pieris brassicae*, el virus mantuvo mayor infectividad cuando fue almacenado como una suspensión acuosa que cuando lo fue como un polvo seco (DAVID, 1978).

Cherry *et al.* (1994) examinaron la estabilidad del virus de *S. littoralis* almacenado en diferentes aceites minerales y vegetales. A baja temperatura no se detectaron diferencias entre los dos grupos de aceites, aunque en pruebas posteriores a 26°C se observó una pérdida significativa en la infectividad del virus después de 15 meses en aceite de cacahuete comparado con virus en aceite mineral (A.J. Cherry, datos sin publicar). Una formulación del NPV de *A. gemmatilis* en aceite de soja con un emulsivo, perdió el 50% de su actividad en un año mientras que en un formulado de polvo mojable no se observó pérdida significativa en el mismo período (BATISTA-FILHO *et al.*, 1991).

Existen variaciones importantes en la composición de ácidos lipídicos y el grado de saturación de diferentes aceites vegetales. Aceites con ácidos grasos no saturados son más propensos a deteriorarse por reacciones con el oxígeno. Se puede adicionar antioxidantes como el α -tocoferol para retardar este proceso (CHERRY *et al.*, 1994; MOORE *et al.*, 1995, 1996). La estabilidad en campo de un NPV de *Helicoverpa armigera* producido en cultivo de células fue menor que un virus comercial de *H. zea* (GemStar®, Thermo Trilogy Corp. EUA) producido en insectos. La producción masiva de los baculovirus en cultivos de células está todavía en desarrollo y se espera una mejora de la potencia e integridad física del virus producido *in vitro* en un futuro (CHAKRABORTY *et al.*, 1995). No obstante, el virus incluido producido *in vitro* puede funcionar adecuadamente en el campo, aunque se

requiere mayor dosis porque el virus producido *in vitro* tiene menos nucleocápidas en cada cuerpo de inclusión (THORPE *et al.*, 1998). No se sabe si la vida de almacenamiento del virus producido *in vitro* es parecida a la del virus producido *in vivo*.

3.1. Control de la contaminación por microorganismos

En la naturaleza, los cadáveres de insectos muertos por baculovirus son rápidamente colonizados por microorganismos saprófagos que a corto plazo, no tienen gran impacto sobre la viabilidad de los virus incluidos (JAQUES Y HUSTON, 1969). Esto posiblemente es debido a la presencia de una membrana externa del cuerpo de inclusión que resiste el ataque por las proteasas bacterianas (GIPSON Y SCOTT, 1975). Sin embargo, a largo plazo, el mantenimiento de la viabilidad del virus se ve severamente afectado por la presencia de saprófagos (PENG *et al.*, 1999).

Los contaminantes principales de los baculovirus producidos *in vivo* son los microorganismos colonizadores del intestino del insecto (principalmente *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*) y los saprófagos oportunistas (principalmente *Bacillus cereus* y *B. sphericus*). También, a partir de las preparaciones de baculovirus se pueden aislar diversas especies de bacterias asociadas con humanos (PODGEWAITE *et al.*, 1983). Estas probablemente vienen del personal involucrado en el proceso de producción y aunque ocurren en menor abundancia comparado con los otros grupos de bacterias, se debe llevar a cabo el control de éstos y de *B. cereus* debido a la existencia de posibles cepas patógenas para el hombre.

En una planta piloto de producción de NPV de *Spodoptera littoralis* en Egipto, se observaron entre 10^6 y 10^9 bacterias (unidades de formación de colonias)/ml de suspensión de virus. No se pudo disminuir sustancialmente la presencia de estas bacterias en preparados de virus después de varios pasos de centrifugación, motivo por el cual se recomendó cosechar larvas muertas por virus antes de que se produzca la invasión de bacterias contaminantes. Otra alternativa, es intentar limpiar la contaminación de muestras de virus por filtración y centrifugación diferencial, pero ésta no parece ser muy eficiente (GRZYWACZ *et al.*, 1997).

Se ha señalado que el uso de centrifugas con rotores zonales disminuyó drásticamente la contaminación bacteriana de los NPV de *Neodiprion sertifer* y de *Helicoverpa* (CUNNINGHAM Y ENTWISTLE, 1981; IGNOFFO Y COUCH, 1981). Sin embargo, se perdió el 27% del virus durante el proceso y los equipos utilizados no se encuentran fácilmente fuera de los laboratorios de virología especializados.

Las autoridades responsables del registro de los bioinsecticidas casi siempre especifican que la presencia de microorganismos contaminantes en el producto no deberá pasar de un umbral determinado. El crecimiento de tales microorganismos se puede controlar agregando una o más sustancias bacteriostáticas a la formulación de almacenamiento (Tabla 9).

La mayoría de los microorganismos tienen un pH óptimo cercano a valores neutrales o ligeramente alcalinos. El pH mayor a 9,0 afecta la integridad de los cuerpos de inclusión del virus y también el pH muy ácido (menor a pH 4,0). No obstante, un pH entre 4,0 y 6,0 puede ser efectivo para inhibir el crecimiento de la mayo-

ría de los microorganismos sin mayores efectos sobre la viabilidad del virus (BURGES Y JONES, 1997). Smirnov *et al.* (1962) ajustaron el pH de un NPV del tentredínido *Neodiprion swainei*, agregando ácido sulfúrico (1M) y mezclando bien la suspensión del virus, mientras que Medungo *et al.* (1997) adicionaron ácido clorhídrico para obtener un pH de 5,5 en formulaciones de polvos mojables del NPV de *A. gemmatilis*.

4. Aspectos de seguridad

Se sabe que los baculovirus son altamente específicos para sus huéspedes pero se debe tener en cuenta el papel de otros factores de seguridad en la aplicación de estos virus en el campo. Como se mencionó anteriormente, se debe controlar la abundancia de microorganismos contaminantes en la formulación y asegurar la ausencia de posibles patógenos a humanos.

Ciertas especies de insectos tienen pelos o setas defensivas que son altamente irritantes para la piel, los ojos, o por inhalación. Esta característica es común en larvas de lepidópteros de las familias Lymantriidae, Limacodidae y algunas especies de Thaumetopoeidae y Lasiocampidae. La mayoría de los pelos urticantes presentes en preparados de larvas infectadas se puede eliminar por medio de una filtración. No obstante, cualquier material biológico que contiene proteínas es potencialmente alergeno por contacto o por inhalación. Las autoridades que registran los bioinsecticidas frecuentemente solicitan datos sobre los posibles riesgos alérgicos de un entomopatógeno u otros componentes de la formulación comercial.

Tabla 9. Inhibidores de microorganismos contaminantes durante el almacenamiento.

Sustancia	Concentración	Función
Sorbato de potasio o ácido sórbico	0,1%	Inhibidor de levaduras y hongos
Paraben metílico	0,3%	Inhibidor de bacterias, levaduras y hongos
Benzoato de sodio	0,3%	Inhibidor de levaduras y hongos
Propionato de sodio/calcio/potasio	0,5%	Inhibidor de bacterias, levaduras y hongos
Benlate (benomil) [Du Pont]	0,05%	Antifúngico
Tween 20 ó Tween 80	0,02%	Inhibición de germinación de esporas de hongos
EDTA (sal disódica del ácido etildiaminatetraacético)	5mM	Inactivación de enzimas
Antibióticos		
Aureomicina	0,1%	Inhibición de bacterias y protozoarios
Estreptomicina	0,03%	Inhibición de bacterias
Bufers de bajo pH (4.0-6.0)		
Fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$)	-	Hunter-Fujita <i>et al.</i> (1998)
Tris (Trizema)	-	Johnson y Lewis (1982)
Salino		

Obviamente, los coadyuvantes deben ser inócuos para el hombre y para otros organismos que no son objeto del tratamiento y no deben tener efectos fitotóxicos para el cultivo. Con el uso de los coadyuvantes desarrollados para la industria agroquímica, este no es un problema, porque son ampliamente probados en muchos cultivos y, con los coadyuvantes naturales como la leche, melazas, almidones etc. tampoco existe riesgo de toxicidad aunque raramente son evaluados por sus efectos sobre el crecimiento del cultivo (EDGINGTON *et al.*, 2000).

Recientemente se ha señalado que el comportamiento de los insectos polinizadores se ve afectado por aplicaciones del blanqueador óptico Tinopal CBS. En experimentos preliminares se ha observado una tendencia por parte de abejas y abejorros, a rechazar flores tratadas con esta sustancia. Esto se ha atribuido a un cambio marcado en su apariencia en la parte ultravioleta del espectro, la cual es utilizada por los himenópteros en la selección de flores. Debido a esto, se recomendaron estudios detallados para determinar los riesgos asociados con el uso de estas sustancias a escala comercial (GOULSON *et al.*, 2000).

5. Formulación y registro de un bioinsecticida

Para registrar un bioinsecticida para uso comercial, las autoridades piden un conjunto de datos relativos a la naturaleza y eficiencia del producto y los posibles riesgos para el hombre y el ambiente. La formulación del producto puede afectar a los riesgos esperados. El término riesgo se define por el grado de peligro del material multiplicado por el grado de exposición.

$$\text{riesgo} = \text{peligro} \times \text{exposición}$$

Por ejemplo, la Comisión Europea pide los siguientes datos para registrar un bioinsecticida

- Identidad del microorganismo y del producto formulado
- Propiedades biológicas del microorganismo y las propiedades técnicas del producto
- Información adicional sobre el organismo y el producto
- Detalles de la aplicación del producto en campo
- Métodos analíticos (para la cuantificación de la actividad del microorganismo)
- Eficiencia del producto en el control del insecto plaga
- Datos sobre la toxicidad, patogenicidad e infectividad del organismo y del formulado
- Presencia de residuos en alimentos tratados con el microorganismo y con el formulado
- Comportamiento y persistencia del organismo y del formulado en el medio ambiente
- Estudios ecotoxicológicos
- Evaluación de riesgos para el medio ambiente

Obviamente, para obtener los beneficios de usar un insecticida biológico, las demás sustancias de la formulación no deberán tener toxicidad para los humanos o efectos detrimentales para otros organismos presentes en el cultivo, sobre todo contra los enemigos naturales de la plaga. Normalmente éste no es un problema con las bajas concentraciones de surfactantes y las características inertes de los adherentes aplicados en pulverizaciones. Sin embargo, la aplicación de grandes volúmenes de aceites, sobre todo de aceite mineral, puede ser nocivo para la actividad de los enemigos naturales, además de provocar posibles problemas de fitotoxicidad. En cambio, la formulación de polvos, polvos mojables o productos aplicados como aerosoles puede incrementar la exposición al producto por inhalación.

6. La aplicación del virus

Casi sin excepción, la aplicación de los baculovirus se hace con equipos convencionales diseñados para los insecticidas sintéticos. Sin embargo, para mantener su viabilidad es necesario tener en cuenta las características que diferencian a los químicos de los virus, tales como su capacidad para aguantar esfuerzos cizallantes dentro del equipo, la sensibilidad al pH, al calor y la distribución deseada de los depósitos en el cultivo.

El proceso de aplicación involucra una serie de pasos secuenciales y la eficiencia de cada uno de éstos depende en gran parte de la eficiencia del paso anterior.

Mezclado

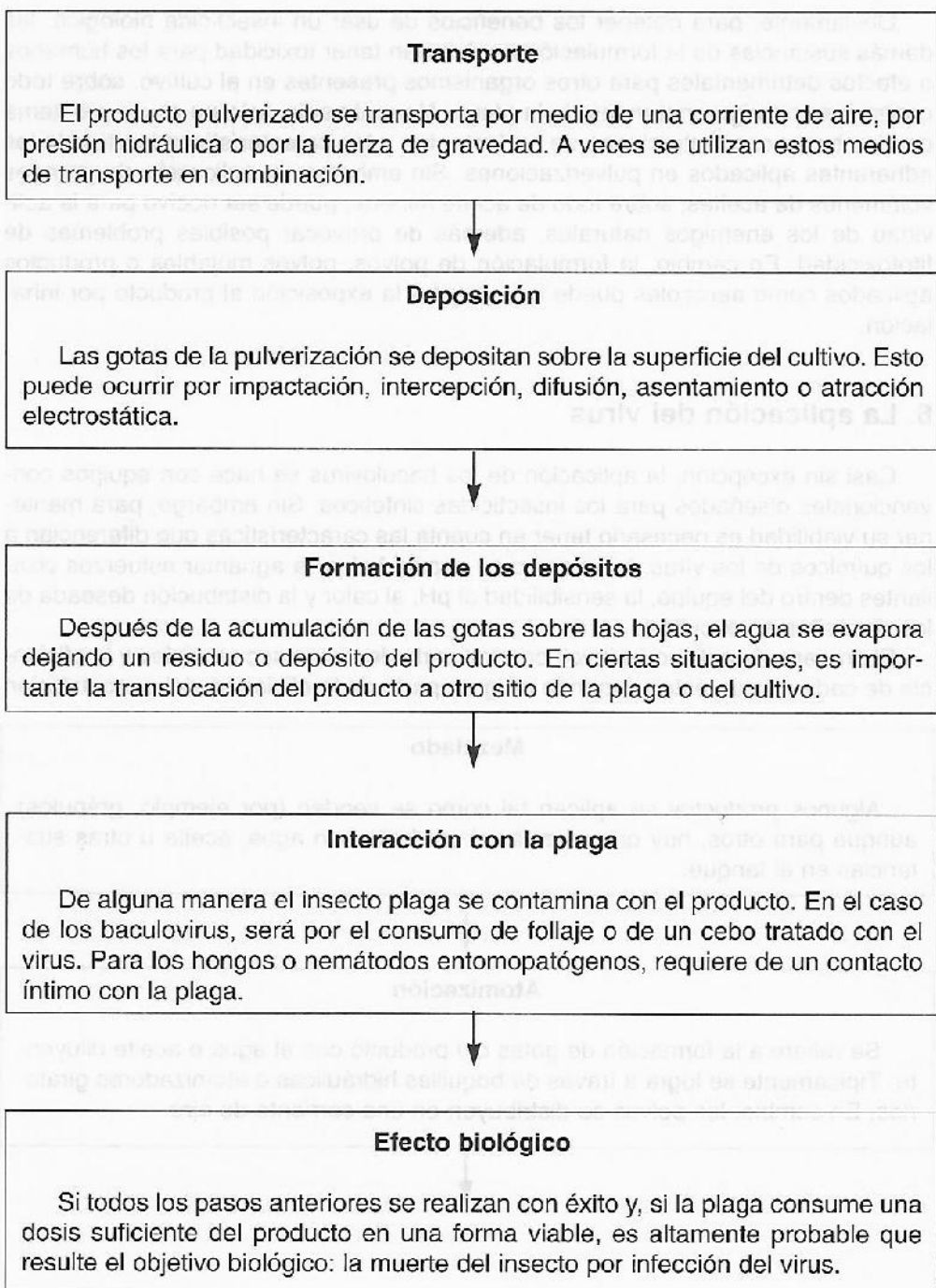
Algunos productos se aplican tal como se venden (por ejemplo, gránulos) aunque para otros, hay que mezclar el producto con agua, aceite u otras sustancias en el tanque.



Atomización

Se refiere a la formación de gotas del producto con el agua o aceite diluyente. Típicamente se logra a través de boquillas hidráulicas o atomizadores giratorios. En cambio, los polvos se distribuyen en una corriente de aire.





6.1. Gotas

Los parámetros más comunes para medir las gotas de una aspersión son, el diámetro de la mediana volumétrica (vmd por sus siglas en inglés) y el diámetro de la mediana numérica (nmd en inglés). El vmd se define como el diámetro correspondiente a la mediana del volumen de las gotas [describe el punto mediano de la curva acumulada del porcentaje del volumen presente en las gotas, por cada clase de tamaño, y la abundancia de éstas en la pulverización (Tabla 10)], mientras que el nmd corresponde al diámetro de la mediana numérica de las gotas. De esta manera, el nmd da mayor énfasis a las gotas más pequeñas debido a su abundancia en la pulverización mientras que el vmd relaciona la cantidad de la aspersión con la abundancia de las gotas. Por ejemplo, unas pocas gotas grandes pueden representar una proporción elevada del volumen total de la pulverización, mientras que las gotas más finas son abundantes aunque no representan gran parte del volumen aplicado. La relación entre estos dos parámetros (vmd/nmd) indica el rango de tamaños de gota en la pulverización; cuando el tamaño de gota es uniforme, los valores de la relación se acercan a 1,0. Sin embargo, medir la distribución de tamaños de gotas resulta un trabajo laborioso si no se cuenta con equipos de análisis de imágenes computarizadas (MATHEWS, 1992).

Existe una relación entre el tamaño de gota, el volumen total de la aplicación y el insecto objeto del tratamiento. Las gotas más finas se utilizan para controlar insectos voladores o insectos sobre la superficie del follaje sin importar la incidencia de gotas que flotan por el viento, mientras que las gotas grandes se utilizan para aplicaciones al suelo o cuando es importante evitar el desplazamiento de la pulverización por corrientes de aire. Las pulverizaciones finas representan un balance entre una buena cobertura del cultivo y una pérdida reducida por el viento.

Otro factor importante por considerar es el grado de evaporación de las gotas durante el proceso de transporte hacia el cultivo. Como se mencionó anteriormente, se pueden emplear aceite o mezclas de agua y aceite, o agua con antievolaporantes para obviar este problema. Por ejemplo, los depósitos de una aplicación aérea (18,7 litros/ha) de *B. thuringiensis* formulado con melaza fue de 276 μm vmd comparado con 160 μm vmd sin melaza resultando en el doble de depósito del patógeno en el centro de árboles de pino (STELZER *et al.*, 1975). Thorpe *et al.* (1999)

Tabla 10. Clasificación de una pulverización en base al tamaño de gota.

	Diámetro de la Mediana Volumétrica (μm)									
	0	50	100	150	200	250	300	350	400	>500
Tipo de Pulverización	aerosol	neblina	Pulverización fina	Pulverización mediana				Pulverización gruesa		

también observaron un incremento importante en el depósito de un NPV de *L. dispar* formulado con melaza: la aplicación aérea de una pulverización sin melaza produjo gotas de 56,8 μm de diámetro en el momento del impacto, una densidad de 5,5 gotas/ cm^2 y un volumen de 6,9 nanolitros/ cm^2 de follaje blanco, en cambio una formulación con melaza resultó en un diámetro promedio de gota de 107,5 μm , una densidad de 4,4 gotas/ cm^2 y un volumen de depósito de 16,6 nanolitros/ cm^2 .

Thorpe *et al.* (1999) agregaron un marcador fluorescente en la pulverización y tomaron fotografías de los depósitos fluorescentes sobre el follaje tratado para determinar el tamaño de las gotas. Otros autores han empleado películas o tarjetas con superficies sensibles al agua colocándolas en puntos estratégicos en el follaje del cultivo (SMITH *et al.*, 1980; SPEIGHT *et al.*, 1992; PODGWAITE *et al.*, 1992). Por supuesto, es necesario calibrar estos sistemas de medición de las gotas atrapadas; por ejemplo, con referencia a gotas atrapadas en cajas Petri con silicona líquida, la cual mantiene las gotas en su forma esférica.

La duración de vida de una gota de agua se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{tiempo (segundos)} = \frac{d^2}{80 \Delta T}$$

donde d es el diámetro (μm) de la gota y ΔT es la diferencia de temperatura entre un termómetro seco y un termómetro húmedo (AMSDEN, 1962), que mide el grado de humedad ambiental, mientras que la distancia de caída de una gota de agua por la fuerza de gravedad antes de su completa evaporación es:

$$\text{distancia (cm)} = \frac{1.5 \times 10^{-3} d^4}{80 \Delta T}$$

Tales factores son de mayor importancia en zonas tropicales o zonas áridas. De esta fórmula se puede deducir que la vida funcional de las gotas aumenta marcadamente con un incremento de diámetro (Tabla 11). Obviamente, la velocidad del viento tiene gran impacto sobre la vida y distribución de las gotas de una pulverización (JOHNSON *et al.*, 1974; KILLICK, 1990).

Para los insecticidas químicos, se reconoce que la eficiencia de un ingrediente activo es inversamente proporcional al tamaño de las gotas: las gotas pequeñas funcionan mejor (ADAMS *et al.*, 1990). Se ha comprobado la misma tendencia con *B. thuringiensis* (BRYANT Y YENDOL, 1988; MACZUGA Y MIERZEJEWSKI, 1995) y en estudios de laboratorio Smith *et al.* (1977a) señalaron que se logró mayor control de *H. zea* en soja con gotas pequeñas (90 μm vmd), de una suspensión concentrada del nucleopoliedrovirus ($1,27 \times 10^{10}$ OBs/litro) y con alta densidad de gotas por área de hoja (>35 gotas/ cm^2). En cambio, en algodón, el NPV de *Helicoverpa* aplicado por pulverización con cebo funcionó mejor con mayor tamaño de gota (STACEY *et al.*, 1977b). Smith *et al.* (1980) también registraron que gotas grandes con un cebo

Tabla 11. Vida y distancia de desplazamiento de gotas de agua en aire inmóvil (MATHEWS, 1992).

	Diámetro inicial de gota		
	50 μm	100 μm	200 μm
20°C, HR 80% ($\Delta T = 2,2$)			
Duración de vida (seg)	12,5	50	200
Distancia de caída (m)	0,12	6,7	81,7
30°C, HR 50% ($\Delta T = 7,7$)			
Duración de vida (seg)	3,5	14	56
Distancia de caída (m)	0,032	1,8	21

funcionaron mejor que gotas pequeñas con otros coadyuvantes en bioensayos con *H. zea*.

Varios autores han señalado una pérdida importante de partículas de entomopatógenos en las gotas de una pulverización. En estudios con *B. thuringiensis* y partículas fluorescentes, se ha calculado que entre el 40 y el 97% de las partículas desaparecen de las gotas por razones desconocidas (HIMEL *et al.*, 1965; MORRIS, 1977). En varios estudios no publicados se ha observado el mismo fenómeno que en los baculovirus y se sospecha que no es debido a la pérdida de partículas durante la caída (transporte) de la pulverización sino que está relacionado con el comportamiento de las partículas durante el proceso de formación de las gotas dentro de la boquilla (HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998).

Otra observación intrigante es que las gotas más finas contienen desproporcionalmente mayor número de partículas (ejemplos en HUNTER-FUJITA *et al.*, 1998). La mayoría de estos estudios utilizaron boquillas centrífugas de las tipo disco giratorio (ver a continuación), aunque se ha notado que un aumento en la presión operativa (a 552 kPa) de una boquilla hidráulica (TX-1) resultó en un 10,8% menos de *B. thuringiensis* en las gotas, comparado con gotas producidas a menor presión (138 kPa) (SMITH *et al.*, 1977b). La importancia del tamaño de gota y el comportamiento de los cuerpos de inclusión en gotas de aspersión es un campo muy poco estudiado todavía.

6.2. Dosis y volumen de la aplicación

La dosis de la aplicación depende de la infectividad del virus, el estado de las larvas plaga y los hábitos alimenticios del insecto por controlar, entre otros factores. Se requiere una variedad de suposiciones para poder estimar la dosis de aplicación de una suspensión de baculovirus en campo, pero para llegar a una cifra inicial se puede seguir el ejemplo a continuación. Se supone que el periodo clave de infección será en las 48 h posteriores a la aplicación del virus.

Área de hoja consumida por la plaga en su estadio objetivo
(e.g. 2^{do} estadio) durante 48 h

• 10 mm²

DL ₉₅ del estadio objetivo estimada por medio de la técnica de disco de hoja (véase el Capítulo 6)	50 OBs
Incluir un factor de pérdida de viabilidad del virus en el campo durante 48 h, por ejemplo 2x	$50 \times 2 = 100$ OBs
Estimar el porcentaje de la aspersión que cae sobre el follaje objetivo (no sobre el suelo, otra vegetación y los tallos del cultivo, etc.), por ejemplo el 66% e incrementar la dosis para tomar en cuenta esta pérdida	$100 \div 0,66 = 150$ OBs
Densidad de cuerpos de inclusión deseada /mm ² de hoja	$150 \div 10 = 15$
Número de mm ² en una hectárea	1×10^{10}
Área de follaje del cultivo en una hectárea (depende del tipo de cultivo y su estado fenológico), por ejemplo 3,5 veces mayor que el área de suelo que ocupa la planta.	$3,5 \times (1 \times 10^{10}) = 3,5 \times 10^{10}$
Dosis de aplicación (OBs/ha)	$15 \times (3,5 \times 10^{10}) = 5,25 \times 10^{11}$

Esto representa una cifra guía para poder planificar experimentos de campo o de invernadero con diferentes dosis de aplicación. De la misma manera se puede calcular una estimación preliminar del volumen de la aplicación:

Densidad de gotas en cada 10 mm ² de follaje	6
Gotas por hectárea de área de follaje	$6 \times (3,5 \times 10^{10}) = 2,1 \times 10^{11}$
Aumento para tomar en cuenta el porcentaje de la pulverización que cae sobre el follaje blanco (66%)	$(2,1 \times 10^{11}) \div 0,66 = 3,2 \times 10^{11}$
Tamaño de gota producida por el equipo de aplicación	90 μ m (=0.09 mm) diámetro
Volumen de una gota de 0,09 mm de diámetro (el volumen de una esfera es $\frac{4}{3}\pi r^3$) es:	$\frac{4}{3} \times 3,14 \times 0,045^3 = 3,82 \times 10^{-4}$ mm ³
1 mm ³ = 1 μ l y hay 10 ⁶ μ l en cada litro entonces el volumen de cada gota en litros es:	$3,82 \times 10^{-4} \div 10^6 = 3,82 \times 10^{-10}$
El volumen total de la aplicación será:	
<i>volumen de la gota x número de gotas por hectárea</i>	$(3,82 \times 10^{-10}) \times (3,2 \times 10^{11}) = 122$ litros/ha

En general, los agricultores utilizan volúmenes mínimos para realizar la aplicación de agroquímicos con fines de gastar más tiempo aplicando el producto y menos tiempo llenando el tanque y mezclando la formulación (CHAPPLE *et al.*, 1996). Sin embargo, los bioinsecticidas tienden a funcionar mejor con mayor volumen de aplicación.

Para el control de *Helicoverpa* en algodón, Chapman e Ignoffo (1972) encontraron que doblando el volumen de la aplicación de 94 a 187 litros/ha se obtenía el mismo aumento en la mortalidad de la plaga que al duplicar la dosis del virus aplicado.

Hamm *et al.* (1994) aplicaron un nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* con un blanqueador óptico (Tinopal LPW) a cultivos de maíz en 234, 468 y 936 litros de agua/ha. El volumen de la aplicación tuvo mayor efecto en el porcentaje de infección observado en larvas de *S. frugiperda*, que la concentración del blanqueador, probablemente porque las grandes cantidades de agua transportaron el virus hasta el fondo del cogollo de la planta donde la plaga se alimenta.

Recientemente, en un experimento de campo en maíz, nosotros hemos observado el mismo efecto; se aplicaron 200 equivalentes de larvas ($1,2 \times 10^{12}$ OBs) del NPV de *S. frugiperda* en 300 y 800 litros de agua por hectárea con una bomba de mochila o en una formulación de granulado (Figura 1). Dos días después de la aplicación se observó mayor porcentaje de infección en el tratamiento de 800 litros/ha y en el granulado que en la aplicación de 300 litros/ha.

En cambio, Vail *et al.* (1999) aplicando un NPV de *Anagrapha falcifera* con blanqueadores ópticos, para el control de *H. zea* en algodón, en volúmenes de 94 a 1590 litros/ha, no observaron diferencias significativas, en función de la mortalidad de la plaga, debidas al volumen de la aplicación o a la presencia del blanqueador óptico; sin embargo, no se sabe la razón por la cual se obtuvieron estos resultados.

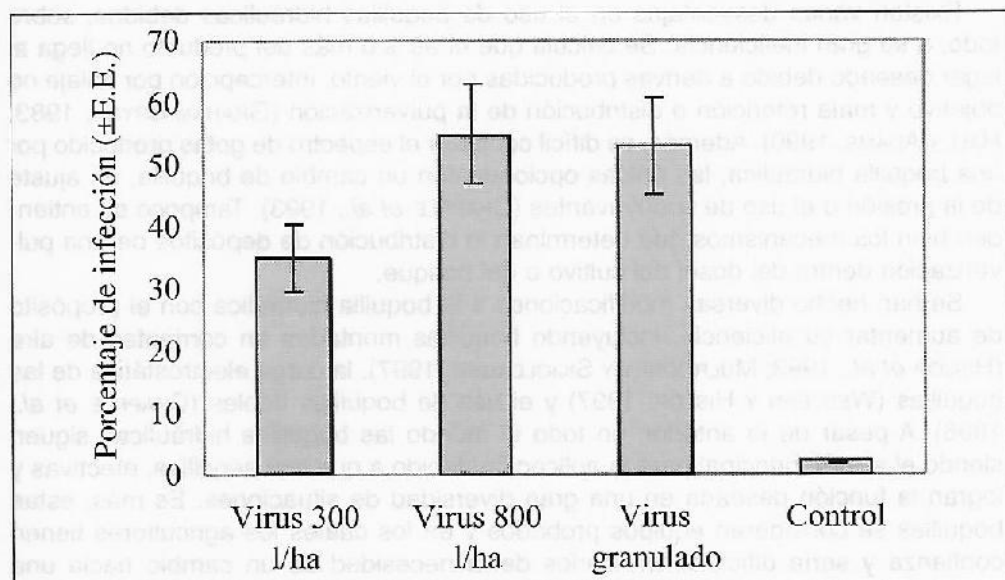


Figura 1. El efecto de aplicar el virus en diferentes volúmenes de agua (300 o 800 litros/ha) comparado con una formulación de gránulos. Porcentaje de infección por virus en larvas de *S. frugiperda* colectadas 2 días después de la aplicación del virus. Las larvas fueron criadas en dieta semisintética para determinar la incidencia de la infección (AGUILA, CISNEROS Y WILLIAMS, datos sin publicar).

En otro estudio, la aplicación de volúmenes de 625 o 1000 litros/ha de un NPV comercial de *S. exigua* (Spod-X[®], Thermo Trilogy, anteriormente Biosys, EUA), con una bomba de mochila, dio buenos resultados para la protección de hortalizas (KOLODNY-HIRSCH *et al.*, 1997). En varios estudios en Japón se han aplicado diferentes baculovirus utilizando grandes volúmenes de agua: de 700 litros/ha en morera (TOMITA *et al.*, 1972), 1000 litros/ha en cultivos de col (AKUTSU, 1971) hasta 2000 litros/ha en un cultivo de té (SATO *et al.*, 1986). Sin embargo, Chapple *et al.* (1996) señalaron que, en la gran mayoría de los casos, los límites de volumen de aplicación eran entre 100 y 500 litros de agua por hectárea que es el máximo aceptable por los agricultores.

6.3. Equipos y boquillas

Los equipos utilizados para la aplicación de bioplaguicidas son en su mayor parte boquillas hidráulicas que producen una pulverización en forma de abanico plano o cono hueco. Las boquillas de abanico plano se utilizan principalmente en las grandes bombas montadas detrás de tractores para tratar mayores superficies de cultivo, mientras que las boquillas de cono hueco se encuentran en bombas de mochila, en pequeños equipos de tractor y para aplicaciones aéreas. Las boquillas de impacto o de yunque, que operan a baja presión y producen gotas grandes (mayores que 250 μm vmd), son mayormente utilizadas para la aplicación de herbicidas.

Existen varias desventajas en el uso de boquillas hidráulicas debidas, sobre todo, a su gran ineficiencia. Se calcula que el 99% o más del producto no llega al lugar deseado debido a derivas producidas por el viento, intercepción por follaje no objetivo y mala retención o distribución de la pulverización (GRAHAM-BRYCE, 1983; HALL Y ADAMS, 1990). Además, es difícil controlar el espectro de gotas producido por una boquilla hidráulica; las únicas opciones son un cambio de boquilla, un ajuste de la presión o el uso de coadyuvantes (CHAPPLE *et al.*, 1993). Tampoco se entienden bien los mecanismos que determinan la distribución de depósitos de una pulverización dentro del dosel del cultivo o del bosque.

Se han hecho diversas modificaciones a la boquilla hidráulica con el propósito de aumentar su eficiencia, incluyendo boquillas montadas en corrientes de aire (HISLOP *et al.*, 1993; MULROONEY Y SKJOLDAGER, 1997), la carga electrostática de las boquillas (WESTERN Y HISLOP, 1997) y el uso de boquillas dobles (CHAPPLE *et al.*, 1996). A pesar de lo anterior, en todo el mundo las boquillas hidráulicas siguen siendo el sostén principal para la aplicación debido a que son sencillas, efectivas y logran la función deseada en una gran diversidad de situaciones. Es más, estas boquillas se consideran equipos probados y en los cuales los agricultores tienen confianza y sería difícil convencerlos de la necesidad de un cambio hacia una nueva tecnología diseñada para la aplicación de bioinsecticidas (CHAPPLE Y BATEMAN, 1997).

Las boquillas de presión de aire se utilizan para aplicaciones en árboles, huertas y viñas, aunque a nuestro entender, su uso en la aplicación de bioinsecticidas

ha sido mínimo. Las boquillas centrífugas, del tipo de disco giratorio o jaula giratoria, se emplean frecuentemente para aplicaciones de ultra bajo volumen. Las gotas finas producidas por este tipo de equipo, requieren un portador que permita que no se evaporen en el momento de la pulverización, típicamente aceite mineral como el Actipron (British Petroleum) o aceite vegetal, los cuales permiten la aplicación de volúmenes mínimos por hectárea; por ejemplo, se aplicaron 2,1 litros/ha a pequeños pinos con un Micro-Ulva (Micron Sprayers Ltd, Reino Unido) que producía gotas de 60 μm vmd (CORY Y ENTWISTLE, 1990), mientras que Cunningham y Entwistle (1981) consideraron que aplicaciones de aproximadamente 7×10^9 OBs de NPV en 1,0 a 1,5 litros/ha fueron adecuadas para el control del tentredínido *Neodiprion sertifer*, una plaga forestal. Gómez y Rumiatto (1987) abordaron el control de poblaciones de *A. gemmatilis* en soja mediante aplicaciones aéreas de NPV en 5 litros/ha de aceite de soja. Dubois *et al.* (1993) aplicaron *B. thuringiensis* en diferentes volúmenes (2,3 a 7,0 litros/ha) por aplicación aérea con boquillas giratorias (Micronair AU5000) para el control de *L. dispar* en un bosque de robles. Ellos notaron que la dispersión y la deposición del producto son función del volumen de aplicación.

6.4. Patrones de aplicación en espacio y tiempo

Aparte de saturar el ambiente de la plaga con una alta concentración del virus, existen otras maneras de emplear los baculovirus con la finalidad de controlar insectos fitófagos. Los patrones de espacio incluyen la distribución manual de cadáveres de insectos muertos por virus o aplicaciones en puntos dispersos, los cuales actúan como focos para iniciar epizootias locales en poblaciones de la plaga, aunque la dispersión de virus desde el punto de introducción requiere alta densidad de población del fitófago (BIRD Y BURK, 1961; FUXA Y RICHTER, 1994). Otra posibilidad es la de tratar surcos alternados de un cultivo y esperar la dispersión natural del virus (ENTWISTLE *et al.*, 1983). Recientemente, Richards *et al.* (1999) observaron que la vegetación inferior de brezo (*Calluna vulgaris*) en una plantación de pinos servía como un reservorio importante para un NPV de *Orgyia antiqua*. Las larvas de este insecto se alimentaron del brezo, se infectaron y posteriormente se desplazaron al pino donde murieron. La posibilidad de aplicar el virus a un cultivo en un sistema de policultivos o cultivos intercalados para controlar una especie polífaga ha sido muy poco investigada.

En comparación, se puede aplicar una baja concentración del virus y esperar hasta que ocurra la muerte de los insectos infectados y la transmisión del virus a los supervivientes, de esta manera se ahorra virus y se reduce el costo de la aplicación, aunque por la demora entre la aplicación y el control efectivo de la población plaga, esta estrategia sólo es utilizable en cultivos forestales o cultivos que son tolerantes a la defoliación (WOODS Y ELKINTON, 1987; STERLING *et al.*, 1988; DOYLE Y ENTWISTLE, 1988). Otra estrategia poco investigada ha sido el uso de aplicaciones frecuentes de una baja concentración de virus, la cual puede ser factible para agricultores de pequeña escala (ENTWISTLE Y EVANS, 1985).

Tanto los patrones espaciales como los temporales dependen de cómo se produzca la amplificación del virus y posteriormente su dispersión y transmisión por medio de la población infectada del huésped (VASCONCELOS *et al.*, 1996; GOULSON, 1997) y, por supuesto, este fenómeno es único para los agentes patógenos y parásitos de control biológico.

7. Recomendaciones para estudios futuros

Finalmente, aprovechamos esta oportunidad para señalar brevemente lo que nosotros pensamos acerca de los principales campos de estudio que merecen más atención por parte de los investigadores. Primero sería el uso de formulaciones con cebos y fagoestimulantes. Los resultados prometedores con Elcar®, el NPV de *Helicoverpa*, no han sido aprovechados en el desarrollo de otros productos, con excepción de Gypcheck® que se formula con melaza en el momento de su aplicación, cuando pueden actuar como un antievaporante y fagoestimulante.

En segundo lugar, los estudios de campo con agentes potenciadores. Desde su descubrimiento en 1992, el número de estudios de formulaciones de baculovirus con blanqueadores ópticos ha sido mínimo. Igual ocurre con otros potenciadores tales como el ácido bórico. Con todo lo anterior predecimos que estas sustancias tienen el potencial para convertir un baculovirus de un agente de control moderado, en un producto con posibilidades comerciales, con un grado de actividad aceptable para los agricultores (~85% de mortalidad de la plaga).

En tercer lugar, existe suficiente evidencia de que las suspensiones de entomopatógenos no se comportan de la misma manera que las soluciones de insecticidas químicos y, por lo tanto, se requieren estudios sistemáticos y detallados sobre el comportamiento de los baculovirus en pulverizaciones, desde el momento de la formación de la gota hasta su deposición sobre el follaje del cultivo.

Finalmente y hablando del futuro, no se puede negar el desarrollo de los virus recombinantes, a lo cual no nos hemos referido anteriormente porque se han aplicado en experimentos de campo sumamente controlados y con la misma tecnología que los baculovirus silvestres. Sin embargo, dados los riesgos potenciales percibidos (ver los Capítulos 8 y 10), es posible que su comercialización ocurra por medio de formulaciones especiales con vistas a disminuir la proporción de infecciones secundarias, por ejemplo, la co-oclusión del recombinante sin el gen de la poliedrina dentro de los cuerpos de inclusión de un virus silvestre (WOOD *et al.*, 1994). En todos sus aspectos, la formulación y aplicación de esta nueva generación de productos queda por investigar.

8. Agradecimiento

Este trabajo ha recibido el apoyo del proyecto SIBEJ99-0501047.

9. Bibliografía

- ADAMS, A.J., A.C. CHAPPLE Y F.R. HALL. 1990. *Droplet spectra for some agricultural fan nozzles with respect to drift and biological efficiency*, p. 156-169. En: L. E. Bode, J. L. Hazen y D. G. Chasin (ed.), *Pesticide formulations and application systems*. American Society for Testing of Materials ASTM/STP 1078, Philadelphia, USA.
- AHMED, S.M., M.V. NAGAMMA Y S.I. MAJUMDAN. 1973. *Studies in granular formulations of Bacillus thuringiensis Berliner*. Pestic. Sci. **4**:19-23.
- AKUTSU, K. 1971. *Control of the common cabbage worm Pieris rapae crucivora Boisduval by a granulosis virus*. Japan Appl. Entomol. Zool. **15**:56-62 (en japonés con resumen en inglés).
- ALLEN, G.E. Y T.L. PATE. 1966. *A potential role of a feeding stimulant used in combination with a nuclear polyhedrosis virus of Heliothis*. J. Invertebr. Pathol. **8**: 129-131.
- AMSDEN, R.C. 1962. *Reducing the evaporation of sprays*. Agric. Aviat. **2**:95.
- ANDREWS, G.L., F.A. HARRIS, P.P. SIKOROWSKI Y R.E. McLAUGHLIN. 1975. *Evaluation of Heliothis nuclear polyhedrosis virus in a cotton seed oil bait for control of Heliothis virescens and H. zea on cotton*. J. Econ. Entomol. **68**:87-90.
- ARGAUER, R. Y M. SHAPIRO. 1997. *Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus*. J. Econ. Entomol. **90**:416-420.
- ARNE, C.N. Y G.L. NORDIN. 1995. *Enhancement of indices of viral infection by simultaneously administering Helicoverpa zea and Autographa californica nuclear polyhedrosis viruses to larval Helicoverpa zea (Boddie)*. J. Invertebr. Pathol. **66**:18-24.
- BARTELT, R.J., M.R. MCGUIRE Y D.A. BLACK. 1990. *Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): additives to a starch-based formulation for Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. **19**:182-189.
- BATEMAN, R.P., M. CAREY, D. MOORE Y C. PRIOR. 1993. *Oil formulations and entomopathogenic fungi infect desert locusts at low humidities*. Annals Appl. Biol. **122**:145-152.
- BATISTA-FILHO, A., S.B. ALVES, N.T. AUGUSTO Y B.P.B. CRUZ. 1991. *Estabilidade de formulações de Baculovirus anticarsia oleo emulsionável e pó moível em condições de laboratório*. Arquivos Instit. Biol. São Paulo **58**:17-20.
- BATISTA-FILHO, A., B.P.B. CRUZ Y D.A. OLIVEIRA. 1986. *Estudios preliminares relacionados ao emprego da liofilização como proceso de preservação de Baculovirus anticarsia*. Biológico **51**:263-269.
- BEDFORD, G.O. 1986. *Biological control of the rhinoceros beetle (Oryctes rhinoceros) in South Pacific by baculovirus*. Agric. Ecosyst. Environ. **15**:141-147.
- BELL, M.R. 1991. *Effectiveness of microbial control of Heliothis spp. developing on early season wild geraniums: field and cage tests*. J. Econ. Entomol. **84**:851-854.
- BELL, M.R. Y R.F. KANAVEL. 1975. *Potential of bait formulations to increase effecti-*

- veness of nuclear polyhedrosis virus against the pink bollworm. J. Econ. Entomol. **70**:389-391.
- BELL, M.R. Y R.F. KANAVEL. 1977. Field tests of a nuclear polyhedrosis virus in a bait formulation for control of pink bollworm and *Heliothis* spp. in cotton in Arizona. J. Econ. Entomol. **70**:625-629.
- BELL, M.R. Y R.F. KANAVEL. 1978. Tobacco budworm: development of a spray adjuvant to increase effectiveness of a nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. **71**:350-352.
- BELL, M.R. Y C.L. ROMINE. 1980. Tobacco budworm field evaluation of microbial control in cotton using *Bacillus thuringiensis* and a nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. J. Econ. Entomol. **73**:427-430.
- BETCHER, P. 1973. The emulsifier, p. 65-92. En: W. Van Valkenburg (ed.), Pesticide formulations. Marcel Dekker Inc., NY.
- BIRD, F.T. Y J.M. BURK. 1961. Artificially disseminated virus as a factor controlling the European spruce sawfly, *Diprion hercyniae* (Htg.) in the absence of introduced parasites. Canadian Entomol. **93**:228-238.
- BLAAKMEER, A., J.F.B. GEERLIET, J.J.A. VAN LOON, M.A. POSTHUMUS, T.A. VAN BEEK Y A.E. DE GROOT. 1994. Comparative headspace analysis of cabbage plants damaged by two species of *Pieris* caterpillars: consequences for in-flight host location by *Cotesia* parasitoids. Entomol. Exp. Appl. **73**:175-182.
- BOURNER, T.C., E. VARGAS-OSUNA, T. WILLIAMS, C. SANTIAGO-ÁLVAREZ Y J.S. CORY. 1992. A comparison of the efficacy of nuclear polyhedrosis virus and granulosis virus in spray and bait formulations for the control of *Agrotis segetum* in maize. Biocontr. Sci. Technol. **2**:315-326.
- BOYETTE, C.D., P.C. QUIMBY, W.J. CONNICK, D.J. DAIGLE Y F.E. FULGHAM. 1991. Progress in the production formulation and application of mycoherbicides, p.209-222. En: D.O. TeBeest (ed.), Microbial control of weeds. Chapman & Hall, NY.
- BRYANT, J.E. Y W.G. YENDOL. 1988. Evaluation of the influence of droplet size and density of *Bacillus thuringiensis* against gypsy moth larvae (Lepidoptera: Lymantriidae). J. Econ. Entomol. **81**:130-134.
- BULL, D.L., R.L. RIDGWAY, V.S. HOUSE Y N.W. PRYOR. 1976. Improved formulations of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. **69**:731-736.
- BURGES, H.D. Y K.A. JONES. 1997. Formulation of bacteria protozoa and viruses. p. 33-127. En: H. D. Burges (ed.), Formulation of microbial biopesticides: beneficial micro-organisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Acad. Pubs., Dordrecht.
- CAÑAS, L.A. Y R.J. O'NEIL. 1998. Applications of sugar solutions to maize and the impact of natural enemies on fall armyworm. Internat. J. Pest Managemt. **44**:59-64.
- CLARK, E.C. Y O.E. REINER. 1956. The availability of certain proprietary adjuvants for use with the polyhedrosis viruses of insects. J. Econ. Entomol. **49**:703-704.
- CONNICK, W.J., D.J. DAIGLE, A.B. PEPPERMAN, K.P. HEBBAR, R.D. LUMSDEN, T.W. ANDERSON Y D.C. SANDS. 1998. Preparation of stable granular formulations containing *Fusarium oxysporum* pathogenic to narcotic plants. Biol. Contr. **13**:79-84.

- COOK, S.P., R.E. WEBB Y K.W. THORPE. 1996. *Potential enhancement of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus with triterpen azadirachtin*. Environ. Entomol. **25**:1209-1214.
- CORY, J.S. Y P.F. ENTWISTLE. 1990. *The effect of time of spray application on infection of the pine beauty moth, Pannolis flammea (Den. and Schiff.) (Lep.: Noctuidae) with nuclear polyhedrosis virus*. J. Appl. Entomol. **110**:235-241.
- COUCH, T.L. Y C.M. IGNOFFO. 1981. *Formulation of insect pathogens*, p. 621-634. En: H. D. Burges (ed.), Microbial control of insect pests and plant diseases. Academic Press, London.
- COWAN, D.K., P.V. VAIL, M.L. KOK-YOKOMI Y F.E. SCHREIBER. 1986. *Formulation of a granulosis virus of Plodia interpunctella (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae): efficacy, persistence and influence on oviposition and larval survival*. J. Econ. Entomol. **79**:1085-1090.
- CRAWFORD, A. 1994. *Nonoccluded baculoviruses*, p. 133-139. En: R. G. Webster y A. Granoff (ed.), Encyclopedia of virology. Academic Press, N.Y.
- CUNNINGHAM, J.C. Y P.F. ENTWISTLE. 1981. *Control of sawflies by baculovirus*, p. 379-408. En: H. D. Burges (ed.), Microbial control of insect pests and plant diseases. Academic Press, London.
- CUNNINGHAM, J.C., W.J. KAUPP, G.M. HOUSE, J.R. MCPHEE Y P. DE GROOT. 1978. *Aerial application of spruce budworm baculovirus: tests on virus strains, dosages and formulations in 1977*. Canadian Forest Service Inform Report FPM-X-3.
- CHAKRABORTY, S., A. KANHAISINGH, P. GREENFIELD, S. REID, C. MONSOUR Y R. TEAKLE. 1995. *In vitro production of wild-type Heliothis baculoviruses for use as biopesticides*. Aust. Biotechnol. **5**:82-86.
- CHAKRABORTY, S., C. MONSOUR, R. TEAKLE Y S. REID. 1999. *Yield, biological activity and field performance of a wild-type Helicoverpa nucleopolyhedrovirus produced in H. zea cell cultures*. J. Invertebr. Pathol. **73**:199-205.
- CHAPMAN, A.J. Y C.M. IGNOFFO. 1972. *Influence of rate and spray volume of a nucleopolyhedrosis virus on cotton of Heliothis in cotton*. J. Invertebr. Pathol. **20**:183-186.
- CHAPMAN, J.W., T. WILLIAMS, A.M. MARTÍNEZ, J. CISNEROS, P. CABALLERO, R.D. CAVE Y D. GOULSON. 2000. *Does cannibalism in Spodoptera frugiperda reduce the risk of predation?* Behav. Ecol. Sociobiol. **48**:321-327..
- CHAPPLE, A.C. Y R.P. BATEMAN. 1997. *Application systems for microbial pesticides: necessity not novelty*, p. 181-190. En: H. F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs., Farnham, UK.
- CHAPPLE, A.C., R.A. DOWNER Y F.R. HALL. 1993. *The effect of spray adjuvants on swath patterns and droplet spectra*. Crop Protec. **12**:579-590.
- CHAPPLE, A.C., R.A. DOWNER, T.M. WOLF, R.A. TAYLOR Y F.R. HALL. 1996. *The application of biological pesticides: limitations and a practical solution*. Entomoph. **41**:465-474.
- CHAUDHARI, S. 1989. *Combination effect of baculovirus of Diacrisia obliqua Walker with doses of insecticides and fertilizers on larval virosis*. Indian J. Entomol. **49**:515-519.

- CHAUDHARI, S. 1992. *Formulation of nuclear polyhedrosis virus of Spodoptera litura with boric acid*. Indian J. Entomol. **54**:202-206.
- CHERRY, A.J., M.A. PARNELL, D. SMITH Y K.A. JONES. 1994. *Oil formulation of insect viruses*. En: P. H. Smits (ed.), *Proceedings of microbial control of pests, 4th European meeting*. Bull. Internat. Org. Biol. Contr. **17**:254-257.
- DAVID, W.A.L. 1978. *The granulosis virus of Pieris brassicae L. and its relationship with its host*. Adv. Virus Res. **22**:111-161.
- DAVID, E.A.L. Y B.O.C. GARDINER. 1966. *Persistence of a granulosis virus of Pieris brassicae on cabbage leaves*. J. Invertebr. Pathol. **8**:180-183.
- DE OLIVEIRA, M.R.V. 1998. South America, p. 339-355. En: F. R. Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans y N. E. Crook (ed.), *Insect viruses and pest management*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- DOUGHERTY, E.M., K.P. GUTHRIE Y M. SHAPIRO. 1996. *Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection*. Biol. Contr. **7**:71-74.
- DOWDEN, P.B. Y H.B. GIRTH. 1953. *Use of a virus to control European pine sawfly*. J. Econ. Entomol. **46**:525-526.
- DOYLE, C.J. Y P.F. ENTWISTLE. 1988. *Aerial application of mixed virus formulations to control joint infestations of Panolis flammea and Neodiprion sertifer on lodgepole pine*. Annal. Appl. Biol. **113**:119-127.
- DRUKKER, B., P. SCUTAREANU Y M.W. SABELIS. 1995. *Do anthocorid predators respond to synomones from Psylla-infested pear trees under field conditions?* Ent. Exp. Appl. **77**:193-203.
- DUBOIS, N.R., R.C. REARDON Y K. MIERZEJEWSKI. 1993. *Field efficacy and deposit analysis of Bacillus thuringiensis, Foray 48B against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*. J. Econ. Entomol. **86**:26-33.
- DULMAGE, H.T., A.J. MARTINEZ Y J.A. CORREA. 1970. *Recovery of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper Trichoplusia ni by coprecipitation with lactose*. J. Invertebr. Pathol. **16**:80-83.
- DUNKLE, R.L. Y B.S. SHASHA. 1988. *Starch-encapsulated Bacillus thuringiensis: a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens*. Environ. Entomol. **17**:120-126.
- DUNKLE, R.L. Y B.S. SHASHA. 1989. *Response of starch-encapsulated Bacillus thuringiensis containing ultraviolet screens to sunlight*. Environ. Entomol. **18**:1035-1041.
- EASWARAMOORTHY, S. Y S. JAYARAJ. 1991. *Influence of spray fluid volume and purity on the effectiveness of a granulosis virus infecting sugar-cane borer Chilo infuscatellus Sneller*. Trop. Pest Managmt. **37**:134-137.
- EDGINGTON, S., H. SEGURA, W. DE LA ROSA Y T. WILLIAMS. 2000. *Photoprotection of Beauveria bassiana: testing simple formulations for control of the coffee berry borer*. Int. J. Pest Managmt. **46**:169-176.
- ENTWISTLE, P.F., P.H.W. ADAMS, H.F. EVANS Y C.F. RIVERS. 1983. *Epizootiology of a nuclear polyhedrosis virus (Baculoviridae) in European spruce sawfly (Gilpinia hercyniae): spread of disease from small epicentres in comparison with spread of baculovirus diseases in other hosts*. J. Appl. Ecol. **20**:473-487.
- ENTWISTLE, P.F. Y H.F. EVANS. 1985. *Viral control*, p. 347-412. En: I. Kerkut y L. I.

- Gilbert (ed.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford.
- FALCON, L.A. 1975. *Patterns of use as they influence virus levels in the environment: chemical controls, biological controls and application methods*, p. 134-137. En: M. D. Bethesda, M. Summers, R. Engler, L. A. Falcon y P. Vail (ed.), *Baculoviruses for insect pest control*. EPA-USDA Working Symposium, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- FALCON, L.A., W.R. KANE Y R.S. BETHELL. 1968. *Preliminary evaluation of a granulosis virus for control of the codling moth*. J. Econ. Entomol. **61**:1208-1213.
- FARRAR, R.R. Y R.L. RIDGWAY. 1994. *Comparative studies of the effects of nutrient based phagostimulants on six lepidopterous insect pests*. J. Econ. Entomol. **87**:44-52.
- FARRAR, R.R., R.L. RIDGWAY, S.P. COOK, K.W. THORPE Y R.E. WEBB. 1995. *Nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): potency and effects of selected adjuvants on insect feeding behavior*. J. Entomol. Sci. **30**:417-428.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1994. *Distance and rate of spread of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus released into soybean*. Environ. Entomol. **23**:1308-1316.
- FUXA, J.R. Y A.R. RICHTER. 1997. *Repeated reversion of resistance to nucleopolyhedrovirus by Anticarsia gemmatalis*. J. Invertebr. Pathol. **71**:159-164.
- GIJZEN, M., P. ROELVINK Y R. GRANADOS. 1995. *Characterization of viral enhancing activity from Trichoplusia ni granulosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **65**: 289-294.
- GILLESPIE, R.L., M.R. MCGUIRE Y B.S. SHASHA. 1994. *Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera: Pyralidae)*. J. Econ. Entomol. **87**:452-457.
- GIPSON, I. Y N.A. SCOTT. 1975. *An electron microscope study of effects of various fixatives and this section enzyme treatments of a nuclear polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **26**:171-179.
- GLEN, D.M. Y C.C. PAYNE. 1984. *Production and evaluation of codling moth granulosis virus for control of Cydia pomonella in the United Kingdom*. Annals Appl. Biol. **104**:87-98.
- GÓMEZ, S.A. Y M. RUMIATTO. 1987. *Controle da lagato da soja pelo Baculovirus anticarsia aplicado via aérea com melaco e óleo de soja*. Com. Tec. EMBRAPA Dourados No. 30, 8pp.
- GOTO, K.C. 1990. *Enhancement of a nuclear polyhedrosis virus (NPV) infection by a granulosis virus (GV) isolated from the spotted cutworm, Xestia c-nigrum L. (Lepidoptera: Noctuidae)*. Appl. Entomol. Zool. **25**:135-137.
- GOULSON, D. 1997. *Wipfelkrankheit: modification of host behaviour during baculoviral infection*. Oecologia **109**:219-228.
- GOULSON, D., A.M. MARTÍNEZ, W.O.H. HUGHES Y T. WILLIAMS. 2000. *Effects of optical brighteners used in biopesticide formulations on the behavior of pollinators*. Biol. Contr. **19**:232-236.
- GRAHAM-BRYCE, I.J. 1983. *Pesticide research for the improvement of human welfare*.

- En: P. Dolye y T. Fujita (ed.), Pesticide chemistry: human welfare and environment. Volume 1, Synthesis and structure-activity relationships. Pergamon Press, NY.
- GRZYWACZ, D., D. MCKINLEY, K.A. JONES Y G. MOAWAD. 1997. *Microbial contamination in Spodoptera littoralis nuclear polyhedrosis virus produced in insects in Egypt*. J. Invertebr. Pathol. **69**:151-156.
- GUERRA, A.A. Y T.N. SHAVER. 1969. *Feeding stimulants from plants for larvae of the tobacco budworm and bollworm*. J. Econ. Entomol. **62**:98-100.
- HALL, F.R. Y A.J. ADAMS. 1990. *Microdroplet application for determination of comparative topical and residual efficacy of formulated permethrin to two populations of diamondback moth (Plutella xylostella L.)*. Pestic. Sci. **28**:337-343.
- HAMM, J.J. 1999. *Interactions in entomology: enhanced infectivity of entomopathogenic viruses by fluorescent brighteners*. J. Entomol. Sci. **34**:8-16.
- HAMM, J.J. Y L.D. CHANDLER. 1996. *Effects of a nuclear polyhedrosis virus and a fluorescent brightener on colonies of Spodoptera exigua (Hubner)*. J. Entomol. Sci. **31**:355-362.
- HAMM, J.J., L.D. CHANDLER Y H.R. SUMNER. 1994. *Field tests with a fluorescent brightener to enhance infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus*. Florida Entomol. **77**:425-437.
- HAMM, J.J. Y M. SHAPIRO. 1992. *Infectivity of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus enhanced by a fluorescent brightener*. J. Econ. Entomol. **85**:2149-2152.
- HARA, S., Y. TANADA Y E.M. OMI. 1976. *Isolation and characterization of a synergistic enzyme from the capsule of a granulosis virus of the armyworm P. unipuncta*. J. Invertebr. Pathol. **27**:115-124.
- HELYER, N. 1993. *Verticillium lecanii for control of aphids and thrips on cucumber*. IOBC/WPRS Bulletin, Working Group: Integrated control in glasshouses, Pacific Grove USA, pp.63-66.
- HENRY, J.E. 1971. *Experimental application of Nosema locustae for control of grasshoppers*. J. Invertebr. Pathol. **18**:389-394.
- HENRY, J.E., E.A. OMA Y J.A. ONSAGER. 1978. *Relative effectiveness of ULV spray applications of spores of Nosema locustae against grasshoppers*. J. Econ. Entomol. **71**:629-632.
- HERNÁNDEZ-CRESPO, P., R.S. HAILS, S.M. SAIT, B.M. GREEN, T.M. CARTY Y J.S. CORY. 1999. *Response of hosts of varying susceptibility to a recombinant baculovirus insecticide in the field*. Biol. Contr. **16**:119-127.
- HIMEL, C.M., H. LOATS, G.W. BAILEY. 1990. *Pesticide sources to the soil and principles of spray physics*, p. 7-50. En: H. H. Cheng (ed.), Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modelling. Soil Science Society of America Book Series No. 2, Madison, Wisconsin, USA.
- HIMEL, C.M., L. VAUGHN, R.P. MISCUS Y R.P. MOORE. 1965. *A new method for spray deposit assessment*. US Forestry Service Research Note PSW 87.
- HISLOP, E.C., N.M. WESTERN Y B.K. COOKE. 1993. *Experimental air-assisted spraying of young cereal plants under controlled conditions*. Crop Protec. **12**:193-199.

- HOSTETTER, D.L. y R.E. PINNELL. 1983. *Laboratory evaluation of plant-derived granules for bollworm control with virus*. J. Georgia Entomol. Soc. **18**:155-159.
- HOSTETTER, D.L., D.B. SMITH, R.E. PINNELL, C.M. IGNOFFO Y G.H. MCKIBBEN. 1982. *Laboratory evaluation of adjuvants for use with Baculovirus heliothis virus*. J. Econ. Entomol. **75**:1114-1119.
- HUBER, J. Y E. DICKLER. 1977. *Codling moth granulosis virus: its efficiency in the field in comparison with organophosphorous insecticides*. J. Econ. Entomol. **70**:557-561.
- HUNTER, D.K., S.J. COLLIER Y D.F. HOFFMANN. 1973. *Effectiveness of a granulosis virus of the Indian meal moth as a protectant for stored inshell nuts: preliminary observations*. J. Invertebr. Pathol. **22**:481-485.
- HUNTER, D.K., S.J. COLLIER Y D.F. HOFFMANN. 1977. *Granulosis virus of the Indian meal moth as a protectant for stored in-shell almonds*. J. Econ. Entomol. **70**:493-494.
- HUNTER-FUJITA, F.R., P.F. ENTWISTLE, H.F. EVANS Y N.E. CROOK. 1998. *Insect viruses and pest management*. John Wiley y Sons, Chichester, UK. 620 p.
- HUNTER-FUJITA, F.R., S. VASILJEVIC, K.A. JONES Y A. CHERRY. 1997. *Effects of mixed infections with GV and NPV on the biology of the Egyptian cotton leafworm, Spodoptera littoralis*, p. 271-278. En: H. F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs. Farnham UK.
- IGNOFFO, C.M. 1964. *Production and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from larvae of Trichoplusia ni (Hubner) reared on a semi-synthetic diet*. J. Insect Pathol. **6**:318-326.
- IGNOFFO, C.M. 1992. *Environmental factors affecting persistence of entomopathogens*. Florida. Entomol. **75**:516-525.
- IGNOFFO, C.M. Y O.F. BATZER. 1971. *Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus*. J. Econ. Entomol. **64**:850-853.
- IGNOFFO, C.M., A. CHAPMAN Y A. MARTIN. 1965. *The nuclear polyhedrosis virus of Heliothis zea (Boddie) and Heliothis virescens (Fabricus) III Effectiveness of the virus against field populations of Heliothis on cotton, corn and grain sorghum*. J. Invertebr. Pathol. **7**:227-235.
- IGNOFFO, C.M. Y T.L. COUCH. 1981. *The nucleopolyhedrosis virus of Heliothis species as a microbial insecticide*, p. 330-362. En: H. D. Burges (ed.), Microbial control of insect pests and plant diseases. Academic Press, London.
- IGNOFFO, C.M. Y C. GARCÍA. 1994. *Antioxidant and oxidative enzyme effects on the inactivation of inclusion bodies of the Heliothis baculovirus by simulated sunlight-UV*. Environ. Entomol. **23**:1025-1029.
- IGNOFFO, C.M. Y C. GARCÍA. 1995. *Aromatic/Heterocyclic amino acids and the simulated sunlight-ultraviolet inactivation of the Heliothis/Helicoverpa baculovirus*. Environ. Entomol. **24**:480-482.
- IGNOFFO, C.M. Y C. GARCÍA. 1996. *Simulated sunlight-UV sensitivity of experimental dust formulations of the nuclear polyhedrosis virus of Helicoverpa/Heliothis*. J. Invertebr. Pathol. **67**:192-194.

- IGNOFFO, C.M., C. GARCÍA, D.L. HOSTETTER Y R.E. PIMENTELL. 1980. *Transplanting: a method of introducing an insect virus into an ecosystem*. Environ. Entomol. **9**:153-154.
- IGNOFFO, C.M., C. GARCÍA Y S.G. SAATHOFF. 1977b. *Sunlight stability and rain-fastness of formulations of Baculovirus heliothis*. Environ. Entomol. **26**:1470-1474.
- IGNOFFO, C.M., D.L. HOSTETTER, P.P. SIKOROWSKI, G. SUTTER, Y.W.M. BROOKS. 1977a. *Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus, and protozoan by an ultraviolet source*. Environ. Entomol. **6**:411-415.
- IGNOFFO, C.M. Y E.L. MONTOYA. 1966. *The effects of chemical insecticides and insecticidal adjuvants on a Heliothis nuclear-polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **8**:409-412.
- IGNOFFO, C.M. Y M. SHAPIRO. 1978. *Characteristics of baculovirus preparations processed from living and dead larvae*. J. Econ. Entomol. **71**:186-188.
- IGNOFFO, C.M., B.S. SHASHA Y M. SHAPIRO. 1991. *Sunlight ultraviolet protection of the Heliothis nuclear polyhedrosis virus through starch-encapsulation technology*. J. Invertebr. Pathol. **57**:134-136.
- INGLIS, G.D., M.S. GOETTEL Y D. L. JOHNSON. 1993. *Persistence of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana on phylloplanes of crested wheatgrass and alfalfa*. Biol. Contr. **3**:258-270.
- INGLIS, G.D., D.L. JOHNSON Y M.S. GOETTEL. 1996. *Effect of bait substrate and formulation on infection of grasshopper nymphs by Beauveria bassiana*. Biocontr. Sci. Technol. **6**:35-50.
- INJAC, M. 1977. *Protection of the granulosis virus (Baculovirus) of the fall webworm (Hyphantria cunea Drury) from ultraviolet light*. Zastita Bilja **28**:311-317.
- JACKSON, D.M., G.C. BROWN, G.L. NORDIN Y D.W. JOHNSON. 1992. *Autodissemination of a baculovirus for management of tobacco budworms (Lepidoptera: Noctuidae) on tobacco*. J. Econ. Entomol. **85**: 710-719.
- JANKEVICA, L. Y I. ZARINS. 1997. *Biological control of Malacasoma neustria L. population with Latvian isolate of nuclear polyhedrosis virus*, p.285-288. En: H. F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Farnham, UK.
- JAQUES, R.P. 1971. *Tests on protectants for foliar deposits of a polyhedrosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **17**:9-16.
- JAQUES, R.P. 1972. *Control of the cabbage looper and the imported cabbage worm by viruses and bacteria*. J. Econ. Entomol. **65**:757-760.
- JAQUES, R.P. 1985. *Stability of insect viruses in the environment*, p. 285-360. En: K. Maramorosch y K.E. Sherman (ed.), Viral insecticides for biological control. Academic Press, Orlando, USA.
- JAQUES, R.P. Y F. HUSTON. 1969. *Tests on the microbial decomposition of polyhedra of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper, Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. **14**:289-290.
- JAQUES, R.P., J.E. LAING, C.R. MACLELLAN, M.D. PROVERBS, K.H. SANDFORD Y R. TROTTER. 1981. *Apple orchard tests on the efficacy of the granulosis virus of the codling moth, Laspeyresia pomonella (Lep.: Olethreutidae)*. Entomoph. **26**:111-118.

- JAKES, R.P., D.R. LAING Y H.E.L. MAW. 1989. *Efficacy of mixtures of microbial insecticides and permethrin against the cabbage looper (Lepidoptera: Noctuidae) and the imported cabbageworm (Lepidoptera: Pyralidae)*. Canadian Entomol. **121**: 809-820.
- JAKES, R.P., C.R. MACLELLAN, K.H. SANDFORD, M.D. PROVERBS Y E.A.C. HAGLEY. 1977. *Preliminary orchard tests on control of codling moth by granulosis virus*. Canadian Entomol. **109**:1079-1081.
- JAKES, R.P. Y O.N. MORRIS. 1981. *Compatibility of pathogens with other methods of pest control and with different crops*, p. 695-716. En: H. D. Burges (ed.), Microbial control of insect pests and plant diseases. Academic Press, London.
- JENKINS, N.E. Y M.B. THOMAS. 1996. *Effect of formulation and application method on the efficacy of aerial and submerged conidia of Metarhizium flavoviridae for locust and grasshopper control*. Pestic. Sci. **46**:299-306.
- JOHNSON, D.R. 1982. *Suppression of Heliothis spp. on cotton by using Bacillus thuringiensis, Baculovirus heliothis, and two feeding adjuvants*. J. Econ. Entomol. **75**:207-210.
- JOHNSON, D.R., K.A. HUNTINGDON Y W.J. KING. 1974. *Micrometeorological and operational factors affecting ultra-low volume spray application of insecticides onto cotton and other crops*. Agric. Meteorol. **13**:39-57.
- JOHNSON, T.B. Y L.C. LEWIS. 1982. *Evaluation of Rachaplasia ou and Autographa californica nuclear polyhedrosis viruses in suppressing black cutworm damage to seedling corn in the greenhouse and field*. J. Econ. Entomol. **75**:401-404.
- JONES, K.A. Y H.D. BURGESS. 1997. *Product stability: from experimental preparation to commercial reality*, p. 163-172. En: H. F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs, Farnham, UK.
- JONES, K.A. Y H.D. BURGESS. 1998. *Principles of formulation and application*. En: H. D. Burges (ed.), Formulation of microbial biopesticides: beneficial micro-organisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Acad. Pubs., Dordrecht.
- JONES, K.A., A.J. CHERRY, D. GRZWACZ Y H.D. BURGESS. 1997. *Formulation: is it an excuse for poor application?*, p. 173-180. En: H. F. Evans (ed.), Microbial insecticides: novelty or necessity? British Crop Protection Council Symposium Proceedings No. 68, BCPC Pubs, Farnham, UK.
- JONES, K.A., A. WESTBY, P.J.A. REILLY Y M.J. JEGGER. 1993. *The exploitation of micro-organisms in the developing countries of the tropics*, p. 343-370. En: D. G. Jones (ed.), Exploitation of micro-organisms. Chapman y Hall, London.
- JONES, K.A., B. ZELAZNY, U. KETUNUTI, A. CHERRY Y D. GRZWACZ. 1998. *South-east Asia and the western Pacific*, p. 244-257. En: F. R Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans y N. E. Crook (ed.), Insect viruses and pest management. John Wiley y Sons, Chichester, UK.
- KALMAKOFF, J. Y A.M. CRAWFORD. 1982. *Enzootic control of Wiseana spp. in a pasture environment*, p. 435-448. En: E. Kurstak (ed.), Microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, NY.
- KANAPATSKAYA, V.A., I.T. KOROL Y I.A. ZARNISH. 1990. *Novaya forma virusnogo pre-*

- parata Virin-GYaP*, p.345-351. En: V. F. Samserov (ed.), *Biologicheskii metod zashorty rastenij tezisy dokladov nauchno-proizvodstvennoj konferencii*, Minsk, 18-19 de abril de 1990. (en ruso).
- KAUPP, W.J. y P.M. EBLING. 1993. *Effect of mechanical processing and long-term storage on biological activity of Virtuss*. Canadian Entomol. **125**:975-977.
- KAYA, H.K. y C.E. NELSEN. 1985. *Encapsulation of sternemematid and heterorhabditid nematodes with calcium alginate: a new approach for insect control and other applications*. Environ. Entomol. **14**:572-574.
- KILLICK, H.J. 1990. *Influence of droplet size, solar ultraviolet light and protectants, and other factors on the efficacy of baculovirus sprays against Panolis flammea (Schiff.) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Crop Protec. **9**:21-28.
- KNUDSEN, G.R., D.J. ESCHEN, L.M. DANDURAND y Z.G. WANG. 1991. *Method to enhance growth and sporulation of pelletized biocontrol fungi*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:2864-2867.
- KNUDSEN, G.R., J.B. JOHNSON y D.J. ESCHEN. 1990. *Alginate pellet formation of a Beauveria bassiana (Hyphomycetes) isolate pathogenic to cereal aphids*. J. Econ. Entomol. **83**:2225-2228.
- KOLODNY-HIRSCH, D.M., T. SITCHAWAT, T. JANSIRI, A. CHENRCHAIVACHIRAKUL y U. KETUNUTI. 1997. *Field evaluation of a commercial formulation of the Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus for control of beet armyworm on vegetable crops in Thailand*. Biocontr. Sci. Technol. **7**:475-488.
- KRIEG, A., A. GRONER, J. HUBER y M. MATTER. 1980. *The effect of medium and long-wave ultraviolet rays (UV-B and UV-A) on insect-pathogenic bacteria and viruses and their influence by UV-protectants*. Nachr. Deutsch. Pflanzen. **32**:100-105.
- LACKEY, B.A., A.E. MULDOON y B.A. JAFFEE. 1993. *Alginate pellet formation of Hirsutella rhossilis for biological control of plant parasitic nematodes*. Biol. Contr. **3**:155-160.
- LEPORE, L.S., P.R. ROELVINK y R.R. GRANADOS. 1996. *Enhancin, the granulosis virus protein that facilitates nucleopolyhedrovirus (NPV) infections, is a metalloprotease*. J. Invertebr. Pathol. **68**:131-140.
- LEWIS, F.B. 1981. *Control of the gypsy moth by a baculovirus*, p. 363-377. En: H. D. Burges (ed.), *Microbial control of insect pests and plant diseases*. Academic Press, London.
- LI, S.Y. y S.M. FITZPATRICK. 1999. *Feeding stimulant added to Bacillus thuringiensis based insecticides enhances activity against Choristoneura rosaceana (Lepidoptera: Tortricidae)*. Canadian Entomol. **131**:451-453.
- LI, S.Y. y I.S. OTVOS. 1999a. *Differential mortality between male and female Choristoneura occidentalis (Lepidoptera: Tortricidae) larvae exposed to a baculovirus with or without optical brighteners*. Canadian Entomol. **131**:65-70.
- LI, S.Y. y I.S. OTVOS. 1999b. *Optical brighteners enhance activity of nuclear polyhedrosis virus against Western Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae)*. J. Econ. Entomol. **92**:335-339.
- LISANSKY, S.G., R.J. QUINLAN y G. TASSONI. 1993. *The Bacillus thuringiensis production handbook*. CPL press, Newbury, UK.

- LIVINGSTON, J.M., P.J. McLEOD, W.C. YEARIAN Y S.Y. YOUNG. 1980. *Laboratory and field evaluation of a nuclear polyhedrosis virus of the soybean looper Pseudoplusia includens*. J. Georgia Entomol. Soc. **15**:194-199.
- LUTTERELL, R.G., W.C. YEARIAN Y S.Y. YOUNG. 1982a. *Mortality of Heliothis spp. larvae treated with Heliothis zea nuclear polyhedrosis virus spray adjuvant combinations on cotton and soybean*. J. Georgian Entomol. Soc. **17**:447-453.
- LUTTERELL, R.G., W.C. YEARIAN Y S.Y. YOUNG. 1983. *Effect of spraying adjuvants on Heliothis zea (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus efficacy*. J. Econ. Entomol. **76**:162-167.
- LUTTERELL, R.G., S.Y. YOUNG, W.C. YEARIAN Y D.L. HORTON. 1982b. *Evaluation of Bacillus thuringiensis-spray adjuvant-viral insecticide combinations against Heliothis spp. (Lepidoptera: Noctuidae)*. Environ. Entomol. **11**:783-787.
- LUTWAMA, J.J. Y B.A. MATANMI. 1988. *Efficacy of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki and Baculovirus heliothis foliar applications for suppression of Helicoverpa armigera (Hubner) (Noctuidae) and other lepidopterous larvae on tomato in South-Western Nigeria*. Bull. Entomol. Res. **78**:173-179.
- LYNCH, R.E., L.C. LEWIS, E.C. BERRY Y J.F. ROBINSON. 1977. *European corn borer: granular formulations of Bacillus thuringiensis for control*. J. Econ. Entomol. **70**:389-391.
- MACZUGA, S.A. Y K.J. MIEREJEWSKI. 1995. *Droplet size and density effects of Bacillus thuringiensis kurstaki on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae*. J. Econ. Entomol. **88**:1376-1379.
- MARTIGNONI, M.E. 1978. *Virus in biocontrol: production, activity and safety*, p. 140-147. En: M. H. Brooks, R. W. Stark y R. W. Campbell (ed.), The Douglas-fir tussock moth: a synthesis. USDA Forest Service Technical Bulletin 1585 Washington, DC.
- MARTIGNONI, M.E. Y P.J. IWAI. 1985. *Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of Douglas-fir Tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) baculovirus*. J. Econ. Entomol. **78**:982-987.
- 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 Mesoamerica?* Biol. Contr. **17**:174-181.
- MATHAI, S., M.R.G.K. NAIR Y N. MOHANDAS. 1986. *Joint action of nuclear polyhedrosis virus (NPV) and insecticides against the rice swarming caterpillar Spodoptera mauritia (Boisduval)*. Indian J. Plant Protec. **14**:13-17.
- MATHEWS, G.A. 1992. *Pesticide application methods*. 2nd Edition, Longman Pubs. London.
- MCGAUGHEY, W.H. 1975. *A granulosis virus for Indian meal moth control in stored wheat and corn*. J. Econ. Entomol. **68**:346-348.
- MCGUIRE, M.R. Y B.S. SHASHA. 1990. *Sprayable self-encapsulating starch formulations for Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. **83**:1813-1817.
- MCKINLEY, D.J., G. MOAWAD, K. JONES, D. GRZYWACZ Y C. TURNER. 1989. *The development of a nuclear polyhedrosis virus for control of Spodoptera littoralis*

- (Boisd) in cotton, p. 93-100. En: M. B. Green y D. J. de B. Lyon (ed.), Pest management in cotton. Ellis Horwood, Chichester, UK.
- McLAUGHLIN, R.E. 1967. *Development of the basic principle for boll weevil control II Field cage tests with a feeding stimulant and the protozoan Mattesia grandis*. J. Invertebr. Pathol. **18**:304-305.
- McLAUGHLIN, R.E., G. ANDREWS Y M.R. BELL. 1971. *Field tests for the control of Heliothis spp. with a nuclear polyhedrosis virus included in a boll weevil bait*. J. Invertebr. Pathol. **18**:304-305.
- McVAY, J.R., R.T. GUDAUSKAS Y J.D. HARPER. 1977. *Effects of Bacillus thuringiensis-nuclear polyhedrosis virus mixtures on Trichoplusia ni larvae*. J. Invertebr. Pathol. **29**:367-372.
- MEDUGNO, C.C., J.M. G. FERRAZ, A.H.N. MAIA Y C.C.L. FREITAS. 1997. *Evaluation of a wettable powder formulation for the nuclear polyhedrosis virus of Anticarsia gemmatilis (Lep.: Noctuidae)*. Pestic. Sci. **51**:153-156.
- MITSUHASHI, W., Y. FURUTA Y M. SATO. 1998. *The spindles of an entomopoxvirus of Coleoptera (Anomala cuprea) strongly enhance the infectivity of a nucleopolyhedrovirus in Lepidoptera (Bombyx mori)*. J. Invertebr. Pathol. **71**:186-188.
- MOHAMED, A.I., S.Y. YOUNG Y W.C. YEARIAN. 1983. *Susceptibility of Heliothis virescens (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to microbial agent-chemical pesticide mixtures on cotton foliage*. Environ. Entomol. **12**:1403-1405.
- MONTAYA, E.L., C.M. IGNOFFO Y R.L. MCGARR. 1966. *A feeding stimulant to increase effectiveness of and a field test with a nuclear-polyhedrosis virus of Heliothis*. J. Invertebr. Pathol. **8**:320-324.
- MOORE, D., R.P. BATEMAN, M. CAREY Y C. PRIOR. 1995. *Long-term storage of Metarhizium flavoviridae conidia in oil formulations for the control of locusts and grasshoppers*. Biocontr. Sci. Technol. **5**:193-199.
- MOORE, D., O.K. DOURO-KPINDOU, N.E. JENKINS Y C.J. LOMER. 1996. *Effect of moisture content and temperature on storage of Metarhizium flavoviridae conidia*. Biocontr. Sci. Technol. **6**:51-61.
- MORALES, L., F. MOSCARDI, R. SOSA-GÓMEZ, F.E. PARO Y I.L. SOLDORIO. 1997. *Enhanced activity of Anticarsia gemmatilis Hüb. (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus by boric acid in the laboratory*. An. Soc. Entomol. Brasil **26**:115-120.
- MORALES-RAMOS, L.H., M.R. MCGUIRE Y L.J. GALÁN-WONG. 1998. *Utilization of several biopolymers for granular formulations of Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. **91**:1109-1113.
- MORRIS, O.N. 1977. *A method of visualizing and assessing deposits of aerially sprayed insect microbes*. J. Invertebr. Pathol. **22**:115-121.
- MORRIS, O.N., V. CONVERSE Y P. KANAGARATNAM. 1995. *Chemical additive effects on the efficacy of Bacillus thuringiensis Berliner subsp. kurstaki against Mamestra configurata (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Econ. Entomol. **88**:815-824.
- MOSCARDI, F. 1989. *Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, Anticarsia gemmatilis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **84**:51-56.

- MULROONEY, J.E. Y L. SKJOLDAGER. 1997. *Evaluation of an air-assisted ground sprayer for control of boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) and beet army-worm (Lepidoptera: Noctuidae)*. Southwest. Entomol. **22**:315-322.
- MURUGAN, K., S. SIVARAMAKRISHNAN, N.S. KUMAR, D. JEYABALAN Y S.S. NATHAN. 1998. *Synergistic interaction of botanicals and biocides nuclear polyhedrosis virus on pest control*. J. Sci. Industr. Res. (India) **57**:732-739.
- NORD, J.C. Y W.D. PEPPER. 1991. *Rain fastness of insecticide deposits on loblolly pine foliage and the efficacy of adjuvants in preventing wash off*. J. Entomol. Sci. **26**:287-298.
- PENG, F., J.R. FUXA, A.R. RICHTER Y S.J. JOHNSON. 1999. *Effects of heat-sensitive agents, soil type, moisture and leaf surface on persistence of Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus*. Environ. Entomol. **28**:330-338.
- PEREIRA, R.M. Y D.W. ROBERTS. 1990. *Dry mycelium preparations of entomopathogenic fungi*. J. Invertebr. Pathol. **56**:39-46.
- PEREIRA, R.M. Y D.W. ROBERTS. 1991. *Alginate and cornstarch mycelial formulations of entomopathogenic fungi Beauveria bassiana and Metarhizium anisopliae*. J. Econ. Entomol. **84**:1657-1661.
- PETERS, S.E.O. Y T.H. COAKER. 1993. *The enhancement of Pieris brassicae (L.) (Lep., Pieridae) granulosis virus infection by microbial and synthetic insecticides*. J. Appl. Ent. **116**:72-79.
- PRIMMER, T.R. 1979. *Heliothis spp.: control on cotton with pyrethroids, carbamates, organophosphates and biological insecticides*. J. Econ. Entomol. **72**:593-598.
- PINGEL, R.L. Y L.C. LEWIS. 1997. *Field persistence of a multiple nucleopolyhedrovirus of the celery looper, Anagrapha falcifera, on sweet corn silks*. J. Invertebr. Pathol. **69**:282-284.
- PINGEL, R.L. Y L.C. LEWIS. 1999. *Effect of Bacillus thuringiensis, Anagrapha falcifera multiple nucleopolyhedrovirus and their mixture on three lepidopteran corn ear pests*. J. Econ. Entomol. **92**:91-96.
- PODGWAITE, J.D., R.B. BRUEN Y M. SHAPIRO. 1983. *Microorganisms associated with production lots of the nuclear polyhedrosis virus of the gypsy moth Lymantria dispar*. Entomoph. **28**:9-16.
- PODGWAITE, J.D., R.C. REARDON, D.M. KOLODNY-HIRSCH Y G.S. WALTON. 1991. *Efficacy of ground application of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus product Gypcheck*. J. Econ. Entomol. **84**:440-444.
- PODGWAITE, J.D., R.C. REARDON, G.S. WALTON, L. VENABLES Y D.M. KOLODNY-HIRSCH. 1992. *Effects of aerially applied Gypcheck on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) populations in Maryland woods*. J. Econ. Entomol. **85**:1136-1139.
- PODGWAITE, J.D., P. RUSH, D. HALL Y G.S. WALTON. 1986. *Field evaluation of a nuclear polyhedrosis virus for control of redheaded pine sawfly (Hymenoptera: Diprionidae)*. J. Econ. Entomol. **79**:1648-1652.
- POLSON, A. Y D. TRIPCONY. 1970. *A virus disease of the lucerne caterpillar Colias electro Linn*. Phytophylactica **2**:17-20.
- PRICHETT, D.W., S.Y. YOUNG Y W.C. YEARIAN. 1980. *Efficacy of baculoviruses against*

- field populations of fall webworm, Hyphantria cunea (Drury)*. J. Georgia Entomol. Soc. **15**:332-336.
- PRIOR, C., P. JOLLANDS Y G. LE PATOUREL. 1988. *Infectivity of oil and water formulations of Beauveria bassiana (Deuteromycotina: Hypomycetes) to the cocoa weevil pest Pantorhytes plutus (Coleoptera: Curculionidae)*. J. Invert. Pathol. **52**:66-72.
- PRIOR, C. Y K. RYDER. 1987. *Effect of low volume copper sprays with polisobutene sticker on mango blossom blight (Glomerella cingulata) in Dominica*. Trop. Pest Managemt. **33**:350-352.
- RABINDRA, R.J., C. MUTHAIAH Y S. JAYARAJ. 1988. *Laboratory evaluation of the CDA formulation of nuclear polyhedrosis virus against Heliothis armigera (Hbn.)*. J. Entomol. Res. **12**:332-336.
- RHODES, D.J. 1993. *Formulation of biological control agents*, p. 411-439. En: D. G. Jones (ed.), *Exploitation of micro-organisms*. Chapman & Hall, London.
- RICHARDS, A., J. CORY, M. SPEIGHT Y T. WILLIAMS. 1999. *Foraging in a pathogen reservoir can lead to local host population extinction: a case study of a Lepidoptera-virus interaction*. Oecologia **118**:29-38.
- RUD, E.R. Y S. BELLONCIK. 1984. *Efficacy of combinations of polyhedrosis viruses and permethrin against the white cutworm Euxoa scandens (Riley) (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Econ. Entomol. **77**:989-994.
- SALAMA, H.S., S. MOAWAD, R. SALAH Y M. RAGAEI. 1990. *Field tests on the efficiency of baits based on Bacillus thuringiensis and chemical insecticides against the greasy cutworm Agrotis ypsilon in Egypt*. Anz. Schad. Pflanzen. Umwelt. **63**:33-36.
- SALAMA, H.S. Y S.M. MOAWED. 1988. *Joint action of nuclear polyhedrosis virus and chemical insecticides against the black cutworm, Agrotis ipsilon (Hubn.)*. Acta Biol. Hung. **39**:99-107.
- SATHIAH, N., S. JAYARAJ Y R.J. RABINDRA. 1990. *Laboratory evaluation of combined efficacy of nuclear polyhedrosis virus and insecticides against Heliothis armigera larvae*. Entomon. **15**:117-119.
- SATO, T., N. OHO Y S. KODOMORI. 1986. *Utilization of granulosis viruses for controlling leafrollers in tea fields*. Jap. Agric. Res. Quart. **19**:171-175.
- SAVANURMATH, C.J. Y S.B. MATHAD. 1981. *Efficacy of fenitrothion and nuclear polyhedrosis virus combinations against the armyworm Mythimna (Pseudaletia) separata (Wlk.) (Lepidoptera: Noctuidae)*. Z. Ang. Entomol. **91**:464-474.
- SAXENA, R.C. 1989. *Insecticides from neem*, p. 110-135. En: J. T. Amason, B. J. R. Philgene y P. Morand (ed.), *Insecticides of plant origin*. ACS Symposium 387, Amer. Chem. Soc., Washington DC.
- SHAPIRO, M. 1982. *In vivo mass production of insect viruses*, p. 463-492. En: E. Kurstak (ed.), *Microbial and viral pesticides*. Marcel Dekker, NY.
- SHAPIRO, M. 1984. *Host tissues and metabolic products as ultraviolet screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus*. Environ. Entomol. **13**:1131-1134.
- SHAPIRO, M. 1985. *Effectiveness of B vitamins as UV screens for the gypsy moth*

- (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nucleopolyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* **14**:705-708.
- SHAPIRO, M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* **82**:548-550.
- SHAPIRO, M. 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrovirus. *J. Econ. Entomol.* **85**:1682-1686.
- SHAPIRO, M. 1995. Radiation protection and activity enhancement of viruses, p. 153-165. *En*: F. R. Hall y J. W. Barry (ed.), Biorational pest control agents: formulation and delivery. ACS Symposium Series 595, Amer. Chem. Soc., Washington DC.
- SHAPIRO, M. Y R.A. BELL. 1982. Enhanced effectiveness of *Lymantria dispar* (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nucleopolyhedrosis virus formulated with boric acid. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **75**:346-349.
- SHAPIRO, M. Y E.M. DOUGHERTY. 1994. Enhancement in activity of homologous and heterologous viruses against the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) by an optical brightener. *J. Econ. Entomol.* **87**:361-365.
- SHAPIRO, M., E.M. DOUGHERTY Y J.J. HAMM. 1992. Compositions and methods for biocontrol using fluorescent brighteners. U.S. Patent No. 5,124,149.
- SHAPIRO, M., A. POH Y R.A. BELL. 1983. Ultraviolet protectants of the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nucleopolyhedrosis virus. *Environ. Entomol.* **12**:982-985.
- SHAPIRO, M., H.K. PREISLER Y J.L. ROBERTSON. 1987. Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) by chitinase. *J. Econ. Entomol.* **80**:1113-1116.
- SHAPIRO, M. Y J.L. ROBERTSON. 1990. Laboratory evaluation of dyes as ultraviolet screens for the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* **83**:168-172.
- SHAPIRO, M. Y J.L. ROBERTSON. 1992. Enhancement of gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) baculovirus activity by optical brighteners. *J. Econ. Entomol.* **85**:1120-1124.
- SHAPIRO, M., J.L. ROBERTSON Y R.E. WEBB. 1994. Effect of neem seed extract upon the gypsy moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*) and its nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* **87**:356-360.
- SHAPIRO, M. Y J.L. VAUGHN. 1995. Enhancement in activity of homologous and heterologous baculoviruses infectious to cotton bollworm. *J. Econ. Entomol.* **88**:265-269.
- SHEPHERD, R.F., I.S. OTVOS, R.J. CHORNEY Y J.C. CUNNINGHAM. 1984. Pest management of Douglas-fir tussock moth (*Lepidoptera: Lymantriidae*): prevention of a Douglas-fir tussock moth outbreak through early treatment with a nuclear polyhedrosis virus by ground and aerial applications. *Canadian Entomol.* **116**:1533-1542.
- SHEPPARD, C.A. Y M. SHAPIRO. 1994. Physiological and nutritional effects of a fluo-

- rescent brighteners on nuclear polyhedrosis virus-infected Lymantria dispar (L.) larvae (Lepidoptera: Lymantriidae).* Biol. Contr. 4:404-412.
- SHEPPARD, C.A., M. SHAPIRO Y J.L. VAUGHN. 1994. *Reduction of midgut luminal pH in gypsy moth larvae (Lymantria dispar L.) following ingestion of nuclear or cytoplasmic polyhedrosis virus/fluorescent brighteners on natural and artificial diets.* Biol. Contr. 4:412-420.
- SIEGLAFF, D.H., R.M. PEREIRA Y J.L. CAPINERA. 1998. *Microbial control of Schistocerca americana (Orthoptera: Acrididae) by Metarhizium flavoviridae (Deuteromycotina): instar dependent mortality and efficacy of ultra low volume application under greenhouse conditions.* J. Econ. Entomol. 91:76-85.
- SMIRNOFF, W.A., J.J. FETTES Y W. HALIBURTON. 1962. *A virus disease of Swaine's jack pine sawfly Neodiprion swaini Midd. sprayed from an aircraft.* Canadian Entomol. 94:477-486.
- SMITH, D.B., D.L. HOSTETTER Y C.M. IGNOFFO. 1977a. *Laboratory performance specifications for a bacterial (Bacillus thuringiensis) and a viral (Baculovirus heliothis) insecticide.* J. Econ. Entomol. 70:437-441.
- SMITH, D.B., D.L. HOSTETTER Y C.M. IGNOFFO. 1977b. *Ground spray equipment for applying Bacillus thuringiensis suspension on soybeans.* J. Econ. Entomol. 70:633-637.
- SMITH, D.B., D.L. HOSTETTER Y C.M. IGNOFFO. 1978. *Formulation and equipment effects on application of a viral (Baculovirus heliothis) insecticide.* J. Econ. Entomol. 71:814-817.
- SMITH, D.B., D.L. HOSTETTER, R.E. PINNELL Y C.M. IGNOFFO. 1980. *Laboratory formulation comparisons for a bacterial (Bacillus thuringiensis) and a viral (Baculovirus heliothis) insecticide.* J. Econ. Entomol. 73:18-21.
- SMITH, D.B., D.L. HOSTETTER, R.E. PINNELL Y C.M. IGNOFFO. 1982. *Laboratory studies of aerial adjuvants: formulation development.* J. Econ. Entomol. 75:16-20.
- SMITS, P.H., I.P. RIETSTRA Y J. VALK. 1988. *Influence of application techniques on the control of Aphis gossypii by a low volume electrostatic rotary atomiser and a high volume hydraulic sprayer.* Entomoph. 34:417-428.
- SPARKS, T.C., G.D. THOMPSON, H.A. KIRST, M.B. HERTLEIN, L.L. LARSON, T.V. WORDEN Y S.T. THIBAUT. 1998a. *Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents on tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae.* J. Econ. Entomol. 91:1277-1283.
- SPARKS, T.C., G.D. THOMPSON, H.A. KIRST, M.B. HERTLEIN, J.S. MYNDERSE, J.R. TURNER, T.V. WORDEN. 1998b. *Fermentation-derived insect control agents: the spinosyns*, p. 171-188. En: F. R. Hall y J. J. Menn (ed.), *Methods in biotechnology, biopesticides: use and delivery.* Humana Press, Totowa, NJ.
- SPEIGHT, M.R., P.M. KELLY, P.H. STERLING Y P.F. ENTWISTLE. 1992. *Field application of a nuclear polyhedrosis virus against the brown-tail moth, Euproctis chrysorrhoea (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae).* J. Appl. Entomol. 113:295-306.
- STACEY, A.L., W.C. YEARIAN Y S.Y. YOUNG. 1977a. *Evaluation of Baculovirus heliothis with feeding stimulants for control of Heliothis larvae on cotton.* J. Econ. Entomol. 70:779-784.

- STACEY, A.L., S.Y. YOUNG Y W.C. YEARIAN. 1977b. Baculovirus heliothis: *effect of selective placement of Heliothis on mortality and efficacy in directed sprays on cotton*. J. Georgian Entomol. Soc. **12**:167-173.
- STEINKE, W.E. Y D.K. GILES. 1995. *Delivery systems for biorational agents*, p. 80-94. En: F. R. Hall y J. W. Barry (ed.), *Biorational pest control agents: formulation and delivery*. ACS Symposium Series 595, Amer. Chem. Soc., Washington DC.
- STELZER, M.J., J. NEISESS Y C.G. THOMPSON. 1975. *Aerial applications of a nucleopolyhedrosis virus and Bacillus thuringiensis against the Douglas fir tussock moth*. J. Econ. Entomol. **68**:269-272.
- STERLING, P.H., P.M. KELLY, M.R. SPEIGHT Y P.F. ENTWISTLE. 1988. *The generation of secondary infection cycles following the introduction of nuclear polyhedrosis virus to a population of the brown-tail moth, Euproctis chrysorrhoea L. (Lep.: Lymantriidae)*. J. Appl. Entomol. **106**:302-311.
- TÁMEZ-GUERRA, P., R. CASTRO-FRANCO, H. MEDRANO-ROLDÁN, M.R. MCGUIRE, L.J. GALÁN-WONG Y H.A. LUNA-OLVERA. 1998. *Laboratory and field comparisons of strains of Bacillus thuringiensis for activity against noctuid larvae using granular formulations (Lepidoptera)*. J. Econ. Entomol. **91**:86-93.
- TÁMEZ-GUERRA, P., M.R. MCGUIRE, R.W. BEHLE, J.J. HAMM, H.R. SUMNER Y B.S. SHASHA. 2000. *Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from Anagrapha falcifera (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Econ. Entomol. **93**:210-218.
- TÁMEZ-GUERRA, P., M.R. MCGUIRE, H. MEDRANO-ROLDÁN, L.J. GALÁN-WONG, B.S. SHASHA Y F.E. VEGA. 1996. *Sprayable granule formulations for Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. **89**:1424-1430.
- TANADA, Y. (1959) *Synergism between two viruses of the armyworm Pseudaletia unipuncta (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae)*. J. Insect Pathol. **1**:215-231.
- TANADA, Y., R.T. HESS Y E.M. OMI. 1975. *Invasion of nuclear polyhedrosis virus in the midgut of the armyworm Pseudaletia unipuncta and the enhancement of a synergistic enzyme*. J. Invertebr. Pathol. **26**:99-104.
- TANADA, Y. Y T. HUKUHARA. 1971. *Enhanced infection of nuclear polyhedrosis virus in larvae of the armyworm Pseudaletia unipuncta, by a factor in the capsule of a granulosis virus*. J. Invertebr. Pathol. **17**:116-126.
- TEAKLE, R.E., J.M. JENSEN Y J.C. MULDER. 1985. *Susceptibility of Heliothis armigera (Lepidoptera: Noctuidae) on sorghum to nuclear polyhedrosis virus*. J. Econ. Entomol. **78**:1373-1378.
- THORPE, K.W., S.P. COOK, R.E. WEBB, J.D. PODGWAITE Y R.C. REARDON. 1999. *Aerial application of the viral enhancer Blankophor BBH with reduced rates of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrovirus*. Biol. Contr. **13**:209-216.
- THORPE, K.W., J.D. PODGWAITE, J.M. SLAVICEK Y R.E. WEBB. 1998. *Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) control with ground-based hydraulic applications of Gypcheck, in vitro-produced virus and Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. **91**:875-880.

- TOMITA, I., Y. KOJIMA Y H. TANABE. 1972. *Studies on microbial control of the injurious insect of mulberry field. I. Infectivity of polyhedrosis virus to larvae of Leuproctis similis and its control*. Bull. Aichi Agric. Exper. Stn. **D(3)**:69-76 (en japonés con resumen en inglés).
- TOPPER, C., G. MOAWAD, D. MCKINLEY, M. HOSNY, K. JONES, J. COOPER, S. EL-NAGAR Y M. EL-SHEIK. 1984. *Field trials with a nuclear polyhedrosis virus against Spodoptera littoralis on cotton in Egypt*. Trop. Pest Managemt. **30**:372-378.
- TREVORS, J.T. 1991. *Respiratory activity of alginate-encapsulated Pseudomonas fluorescens cells introduced into the soil*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **35**:416-419.
- TURLINGS, T.C.J., J.H. TUMLINSON, F.J. ELLER Y W.J. LEWIS. 1991. *Larval damaged plants: source of volatile synomones that guide the parasitoid Cotesia marginiventris to the micro-habitat of its hosts*. Entomol. Exp. Appl. **58**:75-82.
- VAIL, P.V., W. BARNETT, D.C. COWAN, S. SIBBETT, R. BEEDE Y J.S. TEBBETS. 1991. *Codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) control on commercial walnuts with a granulosis virus*. J. Econ. Entomol. **84**:1448-1453.
- VAIL, P.V., T.J. HENNEBERRY Y M.R. BELL. 1977. *Cotton leaf perforator: effect of a nuclear polyhedrosis virus on field populations*. J. Econ. Entomol. **70**:727-728.
- VAIL, P.V., D.F. HOFFMANN Y J.S. TEBBETS. 1993. *Autodissemination of Plodia interpunctella (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) granulosis virus by healthy adults*. J. Stor. Prod. Res. **29**:71-74.
- VAIL, P.V., D.F. HOFFMANN Y J.S. TEBBETS. 1996. *Effects of a fluorescent brightener on the activity of Anagrapha falcifera (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus to four noctuid pests*. Biol. Contr. **7**:121-125.
- VAIL, P.V., D.F. HOFFMANN Y J.S. TEBBETS. 1999. *Influence of fluorescent brighteners on the field activity of the celery looper nucleopolyhedrovirus*. Southwest. Entomol. **24**:87-98.
- VAIL, P.V., T. WHITAKER, H. TOBA Y A.N. KISHABA. 1971. *Field and cage tests with polyhedrosis virus for control of the cabbage looper*. J. Econ. Entomol. **64**:1132-1136.
- VASCONCELOS, S.D., J.S. CORY, K.R. WILSON, S.M. SAIT Y R.S. HAILS. 1996. *Modified behaviour in baculovirus-infected lepidopteran larvae and its impact on the spatial distribution of inoculum*. Biol. Contr. **7**:299-306.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1997. *An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancin*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:6977-6982.
- WANG, P. Y R.R. GRANADOS. 1998. *Observations of the presence of the peritrophic membrane in larval Trichoplusia ni and its role in limiting baculovirus infection*. J. Invertebr. Pathol. **72**:57-62.
- WANG, P. Y R. R. GRANADOS. 2000. *Calcofluor disrupts the midgut defense system of insects*. Insect Biochem. Mol. Biol. **30**:135-143.
- WASIBURN, J.O., B.A. KIRKPATRICK, E. HAAS-STAPELTON Y L.E. VOLKMAN. 1998. *Evidence that the stilbene-derived optical brightener M2R enhances Autographa californica M nucleopolyhedrovirus infection of Trichoplusia ni and Heliothis virescens by preventing sloughing of infected midgut epithelial cells*. Biol. Contr. **11**:58-69.
- WEBB, R.E., N.H. DILL, J.D. PODWAITE, M. SHAPIRO, R.L. RIDWAY, J.L. VAUGHN, L.

- VENABLES, R.J. ARGAUER. 1994a. *Control of third and fourth instar gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) with Gypcheck combined with a stilbene disulfonic acid additive on individual shade trees*. J. Entomol. Sci. **29**:82-91.
- WEBB, R.E., J.D. PODGWAITE, M. SHAPIRO, K.M. TAMAN Y L.W. DOUGLAS. 1990. *Hydraulic spray application of Gypcheck as a homeowner control tactic against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae)*. J. Entomol. Sci. **25**:383-393.
- WEBB, R.E., M. SHAPIRO, J.D. PODGWAITE, R.L. RIDWAY, L. VENABLES, G.B. WHITE, R.J. ARGAUER, D.L. COHEN, J. WITCOSKY, K.M. KESTER Y K.W. THORPE. 1994b. *Effect of optical brighteners on the efficacy of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus in forest plots with high or low levels of natural virus*. J. Econ. Entomol. **87**:134-143.
- WESTERN, N.M. Y E.C. HISLOP. 1997. *Reducing spray drift using electrostatically charged hydraulic nozzles*. Aspect. Appl. Biol. **48**:209-216.
- WILLIAMS, T., D. GOULSON, P. CABALLERO, J. CISNEROS, A.M. MARTÍNEZ, J.W. CHAPMAN, D.X. ROMAN Y R.D. CAVE. 1999. *Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small scale maize growers in Latin America*. Biol. Contr. **14**:67-75.
- WIRTH, W., S. STORP Y W. JACOBSEN. 1991. *Mechanisms controlling leaf retention of agricultural spray solutions*. Pestic. Sci. **33**:411-420.
- WOLLAM, J.D., W.G. YENDOL Y F.B. LEWIS. 1978. *Evaluation of aerially applied nucleopolyhedrosis virus for suppression of the gypsy moth Lymantria dispar L.* USDA Northeastern Forest Experimental Station, Forestry Service Paper NE-396 Broomall, PA.
- WOOD, H.A., P.R. HUGHES Y A. SHELTON. 1994. *Field studies of the co-occlusion strategy with a genetically altered isolate of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*. Environ. Entomol. **23**:211-219.
- WOODS, S.A. Y J.S. ELKINTON. 1987. *Bimodal patterns of mortality from nuclear polyhedrosis virus in gypsy moth (Lymantria dispar) populations*. J. Invertebr. Pathol. **50**:151-157.
- WRIGLEY, G. 1973. *Mineral oils as carriers for ultra-low-volume (ULV) spraying*. PANS **19**:54-61.
- YATSENKO, V.G. 1984. *Primenenie virusnogo preparat Virin-ENSh v borbe s neparnym shelkopryadom v sadakh lesostepnoi zony Ukrainy*, p. 91-96. En E. V. Orlovskaya (ed.), Itogi i prespektivy proizvodstva i primeneniya virusnykh preparatov v selskom i lesnom khozyastve.
- YATSENKO, V.G., A.G. RUDNEV, V.L. VASILEVA, V.I. TRUSOV, N.A. BOZHKO Y V.S. KARAVAEV. 1990. *Effektivnost i bezopastnost novykh preparativnykh form Virin-NSh protiv neparnogo shelkopryada v sadakh*, p. 126-127. En: N. N. Urakov (ed.), II Simpozium Stran-Chlenov SEV po mikrobnym pestitsidam, 15/19 octubre 1990, Protivno SSRR Tezisy Dokladov, Moskva.
- YENDOL, W.G., R.C. HEDLUND Y F.B. LEWIS. 1977. *Field investigations of a baculovirus of the gypsy moth*. J. Econ. Entomol. **70**: 598-602.
- YOUNG, S.Y. Y W.C. YEARIAN. 1986. *Formulation and application of baculovirus*, p. 157-179. En: R.R. Granados y B.A. Federici (ed.), The biology of baculoviruses Vol. II. CRC Press, Boca Raton, FL.

ZHU, Y., T. HUKUHARA Y Y. TANADA. 1989. *Location of a synergistic factor in the capsule of a granulosis virus of the armyworm Pseudaletia unipuncta*. J. Invertebr. Pathol. **54**:49-56.

ZOU, Y. Y S.Y. YOUNG. 1996. *Use of fluorescent brightener to improve Pseudoplusia includens (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus activity in the laboratory and field*. J. Econ. Entomol. **89**:92-96.