

# "PRODUCCION MASIVA DE *Spodoptera sunia* y *S. exigua*".

*Ing. Agr. Ronald E. Estrada Hurtarte\**

## I. Importancia del Insecto:

Las especies *Spodoptera exigua* y *S. sunia*, constituyen serias plagas en varios cultivos como el algodonero, sandía, melón, okra y tomate en la costa sur de Guatemala. Además, afectan a las crucíferas y cultivos de ornamentales en las áreas del altiplano. Solamente en el cultivo del algodón se estima que como mínimo se invirtió la cantidad de Q.100 por manzana en las 51,000 manzanas que se sembraron durante la temporada 1991/1992, lo que da un estimado de Q.5,100,000/año, en costos de control del complejo *Spodoptera*. (US 1\$ = Q. 5).

En los cultivos de exportación los daños ocasionados por dichas plagas son cuantiosos ya que dañan cosméticamente a los productos y no pueden entrar en el mercado de exportación por no llenar las características de presentación exigidas. Además, la presencia de residuos de plaguicidas químicos utilizados para el control del gusano soldado y prodenia en los productos agrícolas de exportación, es también motivo de rechazo con las pérdidas consiguientes tanto para los agricultores, como para los exportadores.

Para la producción comercial de virus de poliedrosis nuclear (VPN) y para la ejecución de experimentos de campo para desarrollar nuevos productos, se hace necesario contar con suficiente cantidad de larvas de las especies mencionadas; de ahí la importancia de contar con una metodología confiable de producción de larvas en cantidades comerciales.

La información que se presenta aquí procede del laboratorio de "Agrícola El Sol", donde se producen 25,000 larvas semanales para producir VPN-82 y VPN-80, productos que se utilizan comercialmente en Guatemala...

## II. Dietas:

Se utilizan las dietas siguientes:

"Ingrediente"	"Texana"	"Florida"	"Lawson"	"Simple"
Agar	36 g	22 g	20 g	32 g
Harina frijol pinto	226 g	129 g	226 g	533 g
Germen de trigo	100 g	94 g	100 g	--
Levadura de cerveza	64 g	59 g	62 g	80 g
Acido sórbico	2 g	2 g	2 g	2.5 g
Acido ascórbico	7 g	6 g	6 g	8 g
Metil Parabeno	4 g	4 g	4 g	5 g
Formaldehído	2 ml	2 ml	3 ml	5 ml
Vitaminas*	5 g	6 g	8 g	--
Leche en Polvo	--	47 g	50 g	--
Tetraciclina	--	5 g	5 g	--
Agua	1500 ml	1600 ml	1500 ml	1600 ml

\* Ver Apéndice.

Las dietas se preparan poniendo la cantidad especificada de agar en la mitad del volumen de agua a utilizar, se lleva a ebullición y se coloca en un recipiente donde se mantiene en agitación continua mediante batidora eléctrica, agregando de inmediato los ingredientes: Harina de frijol pinto, germen de trigo, levadura de cerveza, y el resto del volumen de agua. Al enfriarse la mezcla y alcanzar los 60° C se agregan los demás ingredientes; la mezcla se vierte en los recipientes de cría larvaria o en azafates para ser partida en fracciones de 10 gramos aproximadamente (Lepla et al., 1977; Shorey y Hale, 1965).

## III. Tipos de metodologías de cría:

La forma más simple de cría de las especies mencionadas se realizó antiguamente, a partir de hojas de las plantas huéspedes; sin embargo, a veces no es posible obtener hojas en ciertas épocas del año y el proceso exige que los residuos de las hojas comidas sean removidos cada dos días por lo menos, y que se administren nuevas hojas hasta que las larvas alcancen el estadio de pupa, lo cual demanda demasiado tiempo y trabajo. Además, al traer hojas del campo, especialmente al final de la estación, se corre al riesgo de introducir agentes patógenos que se desarrollan en el campo en forma natural y producir epizootias incontrolables

en el laboratorio. En consecuencia, la verdadera producción masiva de larvas de lepidópteros sólo fue posible después del desarrollo de dietas artificiales (Lawson, 1975). Las dietas mostradas anteriormente son a base de agar, como coagulante, materiales nutritivos y preservantes, lo cual permite que una vez preparadas y colocadas junto con los huevecillos en recipientes de plástico o de cartón, no sea necesario cambiarlas en vista de que las larvas completan su desarrollo hasta empupar en el interior de la masa dietética. Las pupas son recolectadas y lavadas durante cinco minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, o durante veinte minutos en formalina al 10%. Después son colocadas en recipientes de plástico recubiertos con servilletas de papel hasta que emergen los adultos. Estos son colocados en jaulas de malla metálica de mesh # 8, donde se mantienen alimentándolos con agua azucarada para cópula y oviposición hasta que muere el 60% de los individuos, después de lo cual los adultos remanentes se descartan.

Los huevecillos se recolectan en papel parafinado, que se coloca cubriendo el exterior de las jaulas y donde las hembras ovipositan. El papel parafinado con las masas de huevecillos adheridas es remojado en formalina al 10% durante veinte minutos y luego lavado con agua corriente durante una hora; luego se secan al aire en la sombra para después cortarlo en fracciones conteniendo más o menos veinte huevecillos. Dichas fracciones se colocan prensadas en la tapadera de vasos para helado de 200 ml de capacidad y se mantienen a temperatura de 27°C. A los tres días eclosionan los huevecillos dando lugar a las larvas.

Al alcanzar las larvas el tercer instar se procede a ralear dejando solamente cerca de 15 larvas por recipiente, a los dos días se apartan las que van a dejarse empupar, las cuales se transfieren a recipientes de plástico tapados con tela sostenida con una banda de hule hasta que empupan, con lo cual se reinicia el ciclo.

#### IV. Diagrama de flujo de la cría, dándole más importancia a los puntos críticos.

El control de los microorganismos durante el proceso de cría es el problema más importante que debe solucionarse; por esa circunstancia, el diseño del procedimiento y las instalaciones del laboratorio deben tomar en consideración este punto. Las instalaciones de un laboratorio de cría de *Spodoptera*, teóricamente deberá contar por lo menos con los siguientes espacios de trabajo:

1. Cuarto de mezcla, que es donde se preparan las dietas y se "siembran" los huevecillos en los recipientes de cría larvaria.
2. Cuarto de incubación, que es donde se desarrollan las larvas desde la eclosión de huevecillos hasta la pupación.
3. Cuarto para oviposición de adultos. Los adultos se mantienen en jaulas y se recolectan los huevecillos.
4. Espacio para destapar vasos y recolectar las pupas.
5. Local para almacenar ingredientes para elaboración de dietas.
6. Local para operaciones de laboratorio en general, con mesa de trabajo para hacer experimentos y bio-ensayos para control de calidad.
7. Local para tratamiento, incubación y recuperación de larvas para la producción de virus.

El ingreso al cuarto de incubación en la cría de larvas y al de mezcla de dietas está limitado al personal autorizado para reducir el riesgo de contaminaciones.

En el laboratorio de "Agrícola El Sol" en Guatemala, se utilizan cinco espacios en la cría y uno en la producción de VPN. Los espacios son:

1. Local de mezcla de ingredientes para la dieta.
2. Cuarto de incubación, que a la vez sirve para mantener las jaulas de adultos para oviposición.
3. Espacio para destapar vasos y recolectar las pupas.
4. Bodega para ingredientes, adicionalmente refrigerador y recipientes herméticos que se guardan en el cuarto de mezcla de dietas y bodega para equipo y materiales.
5. El local para laboratorio en general corresponde al de la incubación de larvas infectadas con VPN.

Para mantener mejor control de la contaminación atmosférica se mantienen dos luces, una germicida y otra luz negra continuamente operando en el cuarto de mezcla y el de incubación, cuando no hay personas trabajando en ellos.

**El flujo de materiales y productos es así:**

1. Preparación de dietas mezclando todos los materiales mencionados y colocación en los vasos de desarrollo larvario.
2. Recolección de huevecillos de las jaulas de adultos y desinfección en formalina, lavado con agua corriente y secado al aire, cortado de fracciones de papel conteniendo aproximadamente 15 a 20 huevecillos.
3. Colocación de los papeles con huevecillos en los vasos de desarrollo larvario.
4. Transferencia de los vasos de desarrollo larvario al cuarto de incubación, manteniéndoseles a 27° C hasta que alcancen el cuarto instar; luego se procede al raleo dejando solamente 10 larvas por vaso y se suministra 10 g adicionales de dieta nueva; el 70% de las larvas, se dejan hasta que son aprovechadas para la producción de VPN-82.
5. Aproximadamente el 30%, se pasan a nuevos vasos, se les agregan 10 g de dieta nueva y se cubren con tela, dejándolos hasta que empupan.
6. Las pupas se recolectan y se desinfectan con hipoclorito de sodio al 1% durante cinco minutos, luego se secan y se colocan en vasos sobre servilletas de papel desechables en grupos de 200 pupas. Se puede revisar la proporción de sexos ajustándolo de manera que quede cercano a 1:1.
7. Se colocan los recipientes con pupas en las jaulas de oviposición, las cuales se cubren con papel parafinado por fuera y por arriba. En el interior de las jaulas se dejan recipientes y agua con azúcar; los recipientes tienen tapa perforada para colocar una especie de mecha de servilleta de papel desechable, para que la solución azucarada suba por capilaridad y los adultos puedan alimentarse. Las jaulas se mantienen a 27° C y se aíslan de las hormigas, colocando las patas de las jaulas en recipientes con agua.

8. Cada dos días se revisan las jaulas de adultos, retirando los adultos muertos, cambiando el recipiente de agua azucarada y cambiando papel parafinado para recolectar los huevecillos. A los seis días de haber comenzado la postura, se desechan los adultos remanentes y los huevecillos se procesan para iniciar de nuevo el ciclo de producción.
9. Las larvas que se destinan a la producción de VPN-82, se transfieren a vasos, donde se les administra dieta contaminada con virus de poliedrosis a razón de  $5 \times 10^9$  cuerpos de oclusión poliédricos/litro. Se dejan durante siete días hasta que mueren, después se recolectan los cadáveres y se guardan congelados hasta que se utilizan.
10. Para la producción de VPN-82, las larvas son licuadas en el doble del volumen de agua desmineralizada durante 1 minuto. Luego se cuelean con un colador de malla mosquitera, y se vuelven a pasar por un colador más fino; luego se lleva a volumen conocido, se toma una alicuota de 10 ml, se diluye 10 veces y se hacen varios recuentos de COP en Cámara de Neubauer; después se ajusta el volumen a la concentración de  $1 \times 10^{12}$ /litro.

Se utiliza además el siguiente mobiliario y equipo: tres mesas, cuatro sillas, licuadora, batidora, estufa, mesa de trabajo, azafates para manejar vasos y dieta, recipientes de 20 litros para la formalina, mangueras, cerchas para mantener los papeles parafinados con huevecillos durante el proceso de desinfección, recipientes para agua desmineralizada, filtro de agua, 10 toneles de plástico para almacenar los vasos de cría larvaria previamente desinfectados superficialmente con alcohol, balanza para pesar ingredientes para elaboración de dietas, un microscopio de 1200X, laminillas, cubre-objetos, congelador, refrigerador, recipientes de plástico para lavar vasos, basureros y cronómetro con alarma, dos calentadores de ambiente automáticos con ventilador, dos termómetros de máxima y mínima, un termómetro para líquidos de 0 a 100°C, una estufa y horno eléctrico, lavadora eléctrica de platos, espátulas, tijeras, bandejas, pinzas, cajas de plástico y canastas de plástico.

En el laboratorio trabajan cinco personas como laboratoristas y un ingeniero agrónomo, quienes trabajan a destajo más salario base.

## V. Algunos puntos críticos:

1. Condiciones sanitarias: La primera precaución es utilizar ropa limpia o gabachas de laboratorio para evitar la transferencia de infecciones. Las primeras operaciones de la mañana deben efectuarse en las áreas de mezcla y manejo de huevecillos; luego puede trabajarse en las áreas más contaminadas. Las luces germinicidas deben conectarse al salir de los recintos respectivos para que la atmósfera de los mismos se mantenga lo más limpio posible. Todos los recipientes e instrumentos deben desinfectarse con Lysol y solución de hipoclorito de sodio al 0.25%; las partes de metal deben secarse de inmediato para evitar que se oxiden. Todas las personas que trabajan en el laboratorio deben lavarse las manos con jabón y desinfectarse con alcohol antes de trabajar; las manos se secan con toallas desechables.

Los ingredientes que se compran al granel en el mercado local, como harina de frijol pinto, gérmen de trigo y levadura de cerveza, antes de utilizarlos son mantenidos en el horno a 200°C durante media hora, en bandejas de metal y en capas no mayores de 2 cm de espesor, para reducir al mínimo la carga de inóculo que se introduce a las dietas.

Las jaulas de adultos son lavadas en una lavadora de platos, con agua caliente para evitar la proliferación de micro-organismos o ácaros.

2. Manejo de la colonia: La colonia del laboratorio es de origen local, de la Gomera, Escuintla. Al principio previo a su adaptación a las condiciones de laboratorio, fue necesario llevar a cabo un proceso riguroso de selección en vista que del campo vienen muchas larvas enfermas de Spicaria, enfermedad causada por el hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi*, que afecta a veces hasta el 100% de las larvas presentes en el campo. Además existen otros hongos como *Entomophthora* spp, y virus de poliedrosis y granulosis que se presentan en forma natural en el campo.
3. Sexado: Se puede sexar sabiendo que los machos emergen de la pupa un poco más temprano que la hembras; de esta manera se puede apartar a los adultos para ajustar una proporción de sexos deseada.

4. Control de Calidad: Para producir pupas se tienen en cuenta los criterios siguientes:
  - a) Todos los vasos son inspeccionados en el IV instar.
  - b) Los vasos que contengan al menos una larva de pequeño tamaño o deforme son dejados para la producción de virus.
  - c) Los vasos que contengan crecimiento fungoso, son descartados.
5. Algunos problemas que se presentan con más frecuencia en la producción masiva de *Spodoptera* son:
  - a) Contaminación fungosa en la dieta.
  - b) Muerte de larvas o pupas.
  - c) Larvas de tamaño muy pequeño.
  - d) Huevos no fértiles.

Las masas fungosas de los hongos *Aspergillus* spp matan las larvas, especialmente a las más pequeñas. El hongo aparece en las heces debido a que los agentes preservantes antimicrobianos son destruidos durante la digestión; se favorece por la condensación de humedad dentro de los vasos. Por eso hay que evitar la radiación directa del calor y los cambios bruscos de temperatura en el cuarto de incubación. La contaminación se origina de las esporas que caen sobre la dieta; de ahí que deba protegerse la dieta con papel mientras se seca o enfría previo a su utilización. Debe evitarse tocar la dieta con las manos sucias; jamás deben abrirse vasos contaminados en el interior del cuarto de incubación. Deben desinfectarse a menudo las paredes y piso del cuarto de incubación y de preparación de dietas con cloro, alcohol y Lysol.

Si hay muerte de larvas o pupas puede deberse a contaminación bacteriana o de algún virus; lo más importante es mantener las condiciones de cría sin exceso de humedad o cambios bruscos de temperatura. Las larvas deben presentar siempre aspecto seco y nunca con humedad excesiva. En el caso de las infecciones virales, éstas principian generalmente en uno o dos recipientes, de manera que con vigilancia continua y eliminación pronta del foco de infección, puede evitarse que la misma se disemine a toda la colonia. La presencia de larvas muy pequeñas puede deberse a la presencia de patógenos sub-letales tal como virus o pro-



tozoos. También puede deberse a nutrición deficiente, especialmente por mala mezcla de las vitaminas en la dieta. Los remedios son también eliminación de los focos de infección en forma temprana, aumentar o modificar el contenido de agentes antimicrobianos como el ácido sórbico, formol o metil parabeno y mejorar el proceso de esterilización de huevecillos. Debe revisarse la edad de las vitaminas y las condiciones de almacenamiento, la temperatura de la dieta a la cual se incorporan y el proceso de mezclado. Otra causa puede ser la dieta, especialmente el agar sobrecocinado.

Los huevecillos no fértiles pueden originarse en el mal manejo de las pupas, exponiéndolas al calor o frío excesivo o a períodos demasiado largos de almacenamiento. Otra causa puede ser una inconveniente proporción de sexos, a demasiada o poca luz para favorecer los apareos, o la longitud de onda incorrecta.

## VI. Costo de la cría:

Los insumos más importantes son los que se necesitan para alimentación, mantenimiento de las condiciones ambientales, recipientes, personal, local de trabajo y asistencia técnica. Bajo las condiciones actuales, el costo de los insumos está variando mucho, por lo cual los datos se reportan con validez a la fecha de marzo de 1992 así:

Costo fijo: Incluye alquiler, depreciación de equipo, salarios, prestaciones y honorarios profesionales Q. 5,500.00/mes

Costo variable sobre producción de 100,000 larvas/mes: Incluye dieta, costos de energía eléctrica, compra y lavado de vasos, materiales para desinfección, costos de refrigeración, impuestos, material gastable, bonificaciones. Q. 3,500.00/mes

Costos totales: Q. 8,500.00/mes

Costo unitario de larvas: Q. 0.085/larva

Se utilizan cerca de 50 a 70 larvas por manzana para hacer una aplicación de VPN-82; el costo por manzana es de Q. 5.10, al cual debe agregarse costos de comercialización y utilidad, que llega a un precio de venta de Q.10.00/manzana. La capacidad anual del laboratorio es de alrededor de 25,000 manzanas.

## VII. Utilización Comercial del VPN:

La experiencia comercial de "Agrícola El Sol" data de 1973, cuando se inició como un Agro-servicio en la zona de Tiquisate, Escuintla, en la costa sur de Guatemala. En ese entonces se vendían insumos diversos para los pequeños agricultores, entre los que se incluían semillas de maíz híbrido salvadoreño, rociadoras, plaguicidas y fertilizantes químicos.

Por la relación con un proyecto centroamericano de CIP del algodón, bajo los auspicios de ICAITI, CNA, Academia de Ciencia Americana, PNUD, FAO y la Universidad de California, se entró en relación con la filosofía de MIP en el año 1974. Se condujo un lote demostrativo de Control Integrado de Plagas del Algodonero en la zona de Tiquisate, Escuintla, por tres años consecutivos con resultados altamente satisfactorios, logrando reducir la aplicación de plaguicidas químicos a la tercera parte de lo usual, sin merma de los rendimientos por unidad de área. Al finalizar dicho proyecto se inició a dar asistencia técnica privada a varios productores interesados; fue entonces que se detectó la necesidad de contar con insumos relacionados con la aplicación del MIP en la producción algodonera. Así se comenzó a importar Trichogramas de varias fuentes: El Salvador, México, Colombia y los Estados Unidos. Posteriormente, se entró en arreglos para comercializar la producción de un laboratorio local llamado "Biocontrol" que tenía una capacidad instalada de producir 500 millones anualmente; desafortunadamente, debido a la demanda estacional, no fue posible continuar con esta actividad.

A finales de la década de los ochenta las poblaciones de larvas del complejo *Spodoptera* se tornaron resistentes a prácticamente todos los productos químicos disponibles para su control. Se inició entonces con ayuda del Doctor Franz Lawson de los EEUU, la producción de VPNs que ofrecen una solución efectiva, ambiental y económica a dicho problema. Al inicio fue muy difícil convencer a los productores, ya que los VPNs no dan como resultado la muerte inmediata de las larvas en el campo. Un factor de suma importancia para superar esta situación se debió a la introducción en el mercado algodonero de los productos reguladores del crecimiento como el Júpiter y otros, que actúan lentamente afectando la síntesis de la quitina de las larvas, causando la muerte en varios días. Las grandes compañías invirtieron recursos en educar tanto a productores como al personal de las plantaciones en el uso correcto de estos nuevos productos. Como resultado de ello se logró la aceptación de los VPNs en el mercado.

Actualmente "Agrícola El Sol" produce y vende VPN-80 que es el virus de la poliedrosis del gusano medidor de la alfalfa (*Autographa californica*), que tiene acción sobre varias plagas de lepidópteros y el VPN-82 que controla *Spodoptera sunia* y *S. exigua*. Además, comercializa BST-88 que es un producto de *Bacillus thuringiensis* fabricado en los Estados Unidos y formulado en Guatemala. La producción de VPN-80 y VPN-82 sirve para aplicar 25,000 mz anualmente.

La comercialización de los productos microbianos para el control de plagas agrícolas en Guatemala está sujeta al registro en la DTSV y al control de las autoridades de Salud Pública. Para efectos de registro, se aplican los mismos requisitos exigidos para el registro de plaguicidas químicos.

La promoción de ventas se realiza en el mercado algodonero a través de visitas personales en vista de que los algodoneros solo son alrededor de 30. Para efectuar dichas visitas se trabaja con un vendedor que las planifica y ejecuta de acuerdo a la siguiente secuencia cada año:

1. Exploración. En esta etapa se analiza la lista de los posibles compradores y se prioriza para visitarlos.
2. Pre-acercamiento. Aquí se analiza y planifica las visitas que se realizarán, fijando los objetivos correspondientes.
3. Acercamiento. Se concerta la entrevista para obtener la atención del comprador.
4. Presentación, se analizan los problemas del cliente y se presentan los beneficios de utilizar los productos microbianos.
5. Manejo de las respuestas del cliente hacia una decisión positiva que consiste en lograr un pedido.
6. Cierre de la venta que se materializa en un pedido.
7. Seguimiento y revisión. Se visita el campo para supervisar las aplicaciones y constatar que se hacen correctamente. Además, se hacen muestreos en la plantación para conocer la eficacia del control; en esta actividad es indispensable contar con la presencia del cliente o personal clave de campo, como plagueros y administradores, con quienes se mantiene una estrecha relación de trabajo durante toda la temporada.

Los resultados de este procedimiento son satisfactorios ya que se vende toda la producción anualmente. Es necesario mantener un exigente control de calidad, que se efectúa mediante conteo de partículas virales en el producto comercial, bio-ensayos de laboratorio y visitas al campo.

#### VIII. Temas a investigar sobre las limitantes a la cría de Spodoptera:

1. Uso de materiales locales de calidad estable, tal como harina de haba y otros sustitutos de los materiales actualmente utilizados.
2. Mejores normas de control de la calidad de los insectos.
3. Adaptabilidad de otras especies de importancia económica a la producción de VPNs.
4. Gestión de financiamiento para nuevas empresas de producción.

#### IX. Indicaciones para la aplicación de VPNs.

1. La manera de aplicación es en general similar a la del Bacillus thuringiensis.
2. Los VPNs controlan solamente a las larvas de lepidópteros susceptibles indicadas en las etiquetas respectivas; no son eficaces para el control de otras plagas.
3. Es muy conveniente principiar los tratamientos al aparecer las primeras posturas o larvas pequeñas que se quiera controlar. A diferencia de los insecticidas químicos, los elementos de control biológico deben aplicarse eminentemente PREVENTIVOS.
4. Es necesario mojar bien las hojas puesto que las larvas tienen que ingerir el producto para infestarse. La densidad de 50 a 70 gotas por  $\text{cm}^2$  es recomendable. Se puede aplicar aéreo o con equipo terrestre.
5. Las larvas tardan en morir hasta 10 días, pero ya no hacen daño y producen más virus que ayuda a controlar a la plaga.

6. Se recomienda repetir las aplicaciones cada 3 a 5 días mientras dure la presencia de posturas de las plagas; es indispensable hacer recuentos por lo menos cada 3 días para observar el comportamiento de las larvas y el nivel de daño.
7. Es conveniente aplicar por lo menos de 6 a 10 veces en el curso de la temporada. Se puede mezclar con insecticidas y fungicidas no cúpricos.
8. La aplicación de agentes adherentes y estimulantes del apetito es muy aconsejable para obtener mejores resultados. La calidad del agua debe ser tal que no tenga valores extremos de pH ni desinfectantes o antibióticos.
9. Los VPNs se descomponen rápidamente por los efectos de la luz solar, por lo cual es mejor hacer las aplicaciones en horas de la tarde o muy de mañana.
10. No aplicar si hay amenaza de lluvia fuerte.
11. Está exento de residuos en los productos de exportación.
12. No son tóxicos al hombre o a los insectos benéficos, como polinizadores, depredadores y parasitoides.
13. En control de *Plutella* en brócoli se puede usar VPN-80 alterno con Bt (BST-88). Este último sirve para controlar piéridos.
14. En melón contra prodenia y el gusano soldado en la manera descrita anteriormente a dosificaciones de 50 a 100 cc/manzana de la formulación líquida y 100 g/mz de la formulación en polvo mojable; aplicar cada 3-4 días

desde el estadio de dos hojas verdaderas; al soltar guía, la planta crece hasta 4"/día, y entonces debe aplicarse cada 3 días para mantener cubiertos los nuevos tejidos.

La etapa de polinización y fruto tamaño limón a toronja es muy crítica; después, ya puede seguirse cada cinco o seis días.

15. Un litro de la formulación líquida alcanza para 10-20 manzanas; si se guarda en su hielera, se puede conservar en la costa a temperatura ambiente y a la sombra, pero sin exponerlo a sol directo.
16. Un kilo de la formulación sólida alcanza para tratar 10 manzanas. La formulación sólida no necesita refrigeración pero se recomienda no dejarla en lugares calientes o bajo el sol directo.
17. Una copa bayer (25 cc) de la formulación sólida pesa 20 gramos aproximadamente.

#### X. Bibliografía:

1. LAWSON, F.R. 1975. A Method of Producing Nuclear Polyhedral Viruses of Lepidoptera, Paper given at III Reunión Nacional de Técnicos de Control Biológico en Torreón, Coah. México.
2. LEPPLA, N.C.; VAIL, P.V and RYE. J.R. 1977. Mass rearing and handling techniques for the cabbage looper. USDA Gainesville Fl, U.S.A.
3. SHOREY H.H, y HALE. R.L. 1965. Mass rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. Journal of Economic Entomology Vol. 58, No.3. p522.

## XI. Apéndice:

\* Las vitaminas utilizadas son hidrosolubles de uso veterinario, especialmente para pollos. El contenido se detalla a continuación: 1 kg contiene:

20,000,000 U.I	-----	Vitamina A
5,000,000 U.I.	-----	Vitamina D
5,200 mg	-----	Vitamina E acetato
20,000 mg	-----	Ascorbato de Na (17,780 mg Vit C)
1,500 mg	-----	Vitamina B <sub>1</sub>
2,000 mg	-----	Vitamina B <sub>2</sub> Fosfato de Na
2,000 mg	-----	Vitamina B <sub>6</sub>
20 mg	-----	Vitamina B <sub>12</sub>
20,000 mg	-----	Acido nicotínico
6,500 mg	-----	Calcio pantoténico
400 mg	-----	Acido fólico
3,500 mg	-----	Menadiona de bisulfito sódico (K <sub>3</sub> )