


ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE UN NUCLEOPOLIEDROVIRUS PARA EL CONTROL DEL "GUSANO COGOLLERO" EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Roberto Andrés-Carachure, Samuel Pineda-Guillermo, José Isaac Figueroa de la Rosa, Selene Ramos-Ortiz, Luis Jesús Palma-Castillo y Ana Mabel Martínez-Castillo 

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Km. 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, C. P. 58880, Michoacán, México.

 Autor de correspondencia: ; amabel_66@hotmail.com

RESUMEN. El presente estudio tuvo el objetivo de determinar la actividad biológica de un aislado del nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (SfMNPV), colectado en México (Sf - MER), sobre larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio. Además, se determinó la productividad del patógeno en larvas del mismo estadio. Para ello, se realizaron bioensayos independientes para determinar la concentración letal cincuenta (CL₅₀) y el tiempo medio para morir (TMM) mediante la técnica de contaminación por gota. Para estimar la CL₅₀ se utilizaron cinco concentraciones (rango entre 9765 y 4×10^7 cuerpos de inclusión (CI)/mL) y para el TMM se utilizaron dos concentraciones (4.07×10^7 y 3.2×10^8 CI/mL), esta última concentración se utilizó para evaluar la productividad del virus. Se estimó una CL₅₀ de 1.20×10^6 CI/mL. Después que las larvas se inocularon con la mayor concentración, el TMM fue menor (188 h) comprado con la concentración más baja (197 h). Se estimó una producción de CI por larva de $1.52 \times 10^8 \pm 1.04 \times 10^7$. En conclusión, las larvas de *S. frugiperda* fueron altamente susceptibles al aislado Sf - MER y éste fue altamente productivo (CI por larva). La velocidad de acción dependió de la concentración utilizada.

Palabras clave: Plagas, baculovirus, patogenicidad, virulencia, productividad.

Biological activity of a nucleopoliedrovirus for the control of the fall armyworm in laboratory conditions

ABSTRAC. The present study was aimed to determine the biological activity of an isolate of the multiple nucleopolyhedrovirus *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (SfMNPV), collected in Mexico (Sf - MER), on fourth instar *S. frugiperda* under laboratory conditions. In addition, the productivity of the pathogen was determined in the same instar larvae. For this, independent bioassays were carried out to determine the mean lethal concentration (LC₅₀) and the mean time to die (MTD) using the droplet-feeding method. Five concentrations (range between 9765 and 4×10^7 occlusion bodies (OBs/mL) were used to estimate the LC₅₀ and two concentrations to determine the TMM (4.07×10^7 and 3.2×10^8 OBs/mL), the latter concentration was used to evaluate the virus productivity. A LC₅₀ of 1.20×10^6 OB/mL was estimated. After larvae were inoculated with the highest concentration, the MTD was lower (188 h) than to the lowest concentration (197 h). A OBs production per larva of $1.52 \times 10^8 \pm 1.04 \times 10^7$ was estimated. In conclusion, *S. frugiperda* larvae were highly susceptible to the Sf - MER isolate and it was highly productive (OBs per larva). The speed of action depended on the concentration used.

Keywords: Pests, baculovirus, pathogenicity, virulence, productivity.

INTRODUCCIÓN

El "gusano cogollero" del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), es la plaga más importante del maíz. El principal método para controlar esta plaga es el uso de insecticidas químicos, aunque su uso indiscriminado ha provocado el desarrollo de resistencia a varios de los compuestos utilizados (Ahmad y Arif, 2010). Esta situación ha incrementado la necesidad de estudiar opciones ecológicamente más aceptables para el control de insectos. Una alternativa es el uso de virus entomopatógenos, entre los que destaca el género *Alfabaculovirus* (Baculoviridae). El

nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* (SfMNPV) es un *Alfabaculovirus* que ha sido aislado de poblaciones del gusano cogollero en Estados Unidos de América, Nicaragua, Colombia, Argentina (Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2011) y México (Rios-Velasco *et al.*, 2011). Algunos de estos aislados han sido evaluados bajo condiciones de campo en el sureste de México para el control de *S. frugiperda* (Williams *et al.*, 1999), lo cual ha resultado en niveles importantes de mortalidad larvaria combinado con una mortalidad significativa del parasitismo natural (Armenta *et al.*, 2003).

La patogenicidad, virulencia y la productividad de las partículas infectivas de los baculovirus son los parámetros más importantes que se deben determinar para conocer sus características insecticidas. Estudios recientes han indicado que un aislado del SfMNPV colectado en una zona agrícola de México (Sf-MER) tiene una alta actividad insecticida y puede ser utilizado para el control del gusano cogollero (García-Banderas, 2016; Hernández-Camargo, 2019). Sin embargo, para validar su uso como un agente de control biológico, se requieren más estudios que determinen su actividad en estadios larvarios que aún no han sido evaluados. Tal es el caso de estadios larvarios más avanzado, los cuales pueden ser utilizados como modelo de estudio para la replicación del virus con fines de producción masiva. Debido a ello, el presente estudio está enfocado en evaluar la actividad biológica del Sf-MER (patogenicidad y virulencia) y determinar su productividad en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODO

Cría del insecto. Las larvas y adultos de *S. frugiperda* fueron confinadas en una cámara de crecimiento marca Lumintell ICP-19 (Biotécnica del Bajío S. A. de C. V., Celaya, Gto.), mismas que fueron programadas para obtener las siguientes condiciones: 26 ± 2 °C, 65 % de HR y un fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad). Los adultos fueron alimentados con una solución de miel al 15 %. Como sustrato de oviposición se colocó papel de estraza, el cual se reemplazó cada dos días.

Procedencia del SfMNPV y su replicación. Se utilizó un aislado del SfMNPV procedente de muestras de suelos colectadas en Mérida, Yucatán, México (Sf-MER). Este aislado fue proporcionado por el Dr. Trevor Williams (Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz). La extracción de los virus se basó en la metodología propuesta por Richards y Christian (1999). Para la replicación del virus fueron empleadas larvas de *S. frugiperda* de cuarto estadio (8-12 h después de la ecdisis), éstas se colocaron individualmente en celdas cilíndricas (2 cm²) de cajas para cultivo de tejido de 24 celdas. Cada celda contenía un trozo de dieta de ~ 1 cm³ tratado uniformemente con 15 µl de una concentración de ~ 1×10^8 CI/mL de cada aislado del virus. Después de tres días, las larvas se colocaron en otras cajas con dieta libre del virus. Las larvas se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales descritas para la cría y se observaron diariamente hasta la manifestación de los síntomas de la infección. Estas larvas se maceraron y los CI se purificaron por filtración con el uso de dos mallas finas; una de 120 y otra de 80 micras. La cuantificación de los CI se realizó en una cámara de Neubauer Improved (Hawskley, Lancing, Reino Unido) a 40x con un microscopio con contraste de fases Olympus BX41. La suspensión viral se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Determinación de la concentración letal media (CL₅₀). Las larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* (0-8 horas después de la ecdisis) se inocularon con la técnica de contaminación por gota de Hughes y Wood (1981). Para ello, el virus se resuspendió en agua destilada + colorante artificial azul (McCormick®, Inc, Estados Unidos) a 0.01 % volumen/volumen y 15 % de una solución de sacarosa como fagoestimulante. Se utilizaron cinco concentraciones (9765, 78125, 6.25×10^5 , 5×10^6 y 4×10^7 CI/mL). Cada concentración se dispersó en pequeñas gotas sobre cajas Petri. Las

larvas que ingirieron la gota en un periodo de 10 min se transfirieron individualmente a cajas para cultivo de tejido de 24 celdas provistas con dieta semisintética libre del virus. Los bioensayos se mantuvieron en una cámara ambiental a 25 °C y 65 % de humedad relativa. Se realizaron cuatro repeticiones de 24 individuos por cada concentración, así mismo 24 larvas por concentración como testigo, las cuales se trataron solamente con agua destilada + colorante artificial azul + la solución de sacarosa. La mortalidad de las larvas se registró cada 24 h a partir del tercer día después de la inoculación del virus durante ocho días. Los datos de mortalidad causada por cada aislado ensayado se sometieron a un análisis probit (Finney, 1972).

Determinación del tiempo medio de mortalidad (TMM). Para determinar el TMM se utilizaron dos concentraciones del aislado Sf-MER (3.2×10^8 y 4.07×10^7 CI/mL). La inoculación de las larvas de cuarto estadio (0-8 horas después de la ecdisis) se realizó por medio de técnica de inoculación de la gota explicada anteriormente, pero en este caso la mortalidad se registró cada 12 h a partir del tercer día post-inoculación. El TMM se calculó con el programa GLIM (Generalized Linear Interactive Modeling, Numerical Algorithms Group 1993) con una distribución de sobrevivencia Weibull (Aitkin *et al.*, 1989), donde se excluyeron a los individuos vivos (Farrar y Ridgway, 1998) con el sensor Weibull (w) $w=1$. Se realizaron cuatro repeticiones con 12 individuos.

Producción de OBs por larva. La productividad del aislado Sf-MER se estimó con las larvas que procedieron del ensayo del TMM a la concentración de 3.2×10^8 CI/mL. Una vez que las larvas presentaron síntomas evidentes de la infección, se transfirieron a microtubos estériles de 1.5 mL. Los virus se conservaron a -20 °C hasta el conteo de los CI. Para determinar la cuantificación de éstos, las larvas se homogenizaron en 400 μ L de agua destilada. Para eliminar los restos celulares, se realizaron dos filtrados a través de una tela de muselina. El número de CI por larva se estimó por triplicado mediante el conteo en una cámara de Neubauer. Para el conteo de los CI se seleccionaron al azar el 50 % ($n= 48$) de las larvas tratadas y que murieron por virus. Se realizó una prueba de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene ($P > 0.05$); debido a que se violaron los supuestos del análisis, incluso después de la transformación a Ln, se aplicó la prueba no-paramétrica de U-Mann – Whitney. Los análisis se realizaron en el programa estadístico SPSS versión 15.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la CL_{50} y TMM. Las larvas de cuarto estadio *S. frugiperda* fueron susceptibles al Sf-MER con un valor de la CL_{50} de 1.20×10^6 CI/mL (CL al 95 %.: $2.9 \times 10^5 - 5.62 \times 10^6$ CI / mL) a las 204 h post-infección y con los siguientes valores de la recta de regresión: $b = 0.54 \pm 0.062$; $a = -3.30 \pm 0.38$. El grado de heterogeneidad fue menor al tabulado ($\chi^2 = 5.41$) con 3 grados de libertad. En el bioensayo del TMM observó una mortalidad larvaria gradual (Figura 1) e inversamente proporcional con respecto a la concentración utilizada (Figura 2), es decir, cuando las larvas se inocularon con la mayor concentración (3.2×10^8 CI/mL) el valor del TMM fue significativamente menor con respecto al valor obtenido con la concentración menor (4.0×10^7 OBs/mL) (Análisis Weibull, $\alpha = 1.96$). El valor de la CL_{50} de larvas de cuarto estadio del presente estudio fue mayor que lo reportado por Martínez *et al.* (2003) (3.1×10^5 CI/mL) y Ríos-Velasco *et al.* (2012) (4.3×10^5 CI/mL) y menor que el obtenido por Escribano *et al.* (1999) (1.66×10^7 CI/mL) para larvas expuestas a un virus nicaragüense (SfNIC, Martínez *et al.*, 2000; Escribano *et al.*, 1999) y mexicano (Ríos-Velasco *et al.*, 2012).

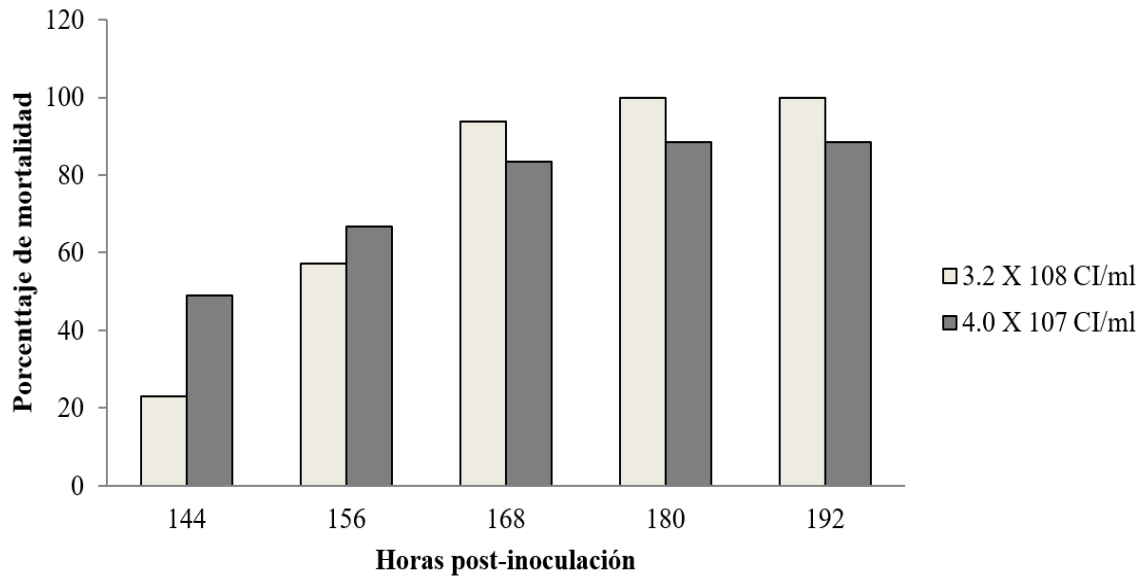


Figura 1. Porcentaje de mortalidad acumulada larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* inoculadas con dos concentraciones del aislado Sf-MER.

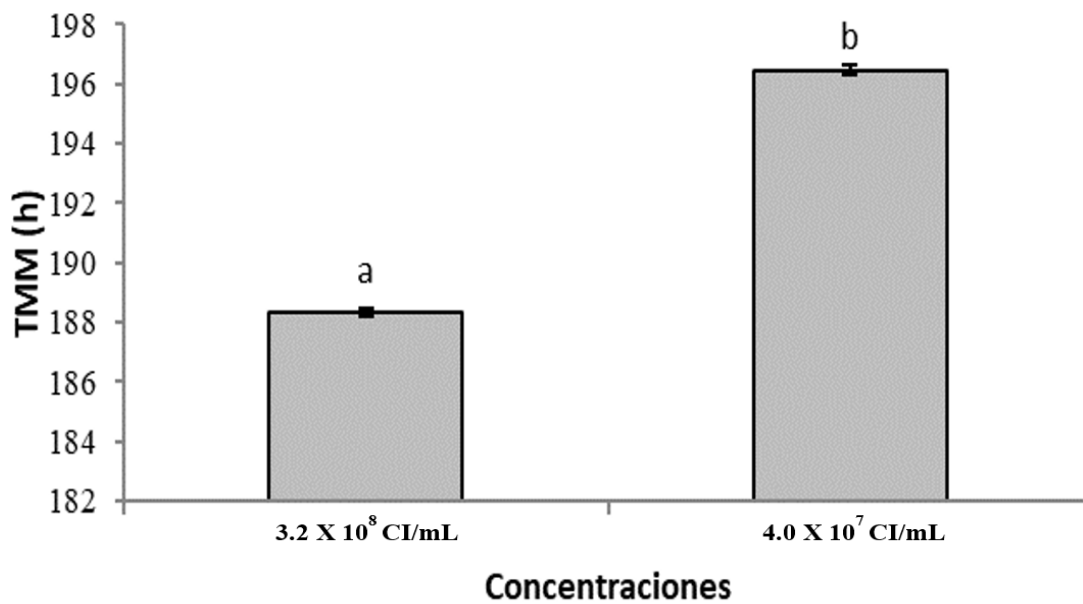


Figura 2. Tiempo medio de mortalidad (TMM) calculado para larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* inoculadas con dos concentraciones del SfMNPV-MER. Las columnas encabezadas con la misma letra no difieren significativamente (Análisis Weibull, $\alpha = 1.96$).

La razón de la variabilidad en las características insecticidas de los aislados de SfMNPV geográficamente diversos podría estar relacionada con cambios genéticos (Escribano *et al.*, 1999; Barrera *et al.*, 2011) o por la variación en la respuesta del huésped (Cabodevilla *et al.*, 2011). El TMM (188

y 197 h) se incrementó significativamente conforme al incremento de la concentración del virus, lo refleja la disminución de la tasa de virulencia cuando el hospedero es expuesto a una menor concentración. Cabe señalar que la velocidad de acción de un determinado genotipo de baculovirus mantiene una estrecha relación con la producción de CI/larva. En términos biológicos, un mayor tiempo letal permitiría obtener una mayor cantidad de tejidos infectados y, por consecuencia, una mayor producción de CI (Barrera *et al.*, 2011).

Producción de OBs por larva. El peso de las larvas previas a la muerte fue significativamente menor en aquellas que se trataron con el virus (35.3 ± 2.14 , $n = 90$) comparado con las larvas del testigo (151 ± 4.32 , $n = 48$) (U de Mann-Whitney = 0.5, $P < 0.001$). Con larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda* ($n = 43$) se logró obtener una producción de $1.52 \times 10^8 \pm 1.04 \times 10^7$ CI por larva. La producción media de CI por mg fue de $5.27 \times 10^6 \pm 4.54 \times 10^5$. La producción de CI por larva obtenida en el presente estudio es menor que la reportada por Gervasio-Rosas (2019) en larvas de *S. frugiperda* inoculadas en el cuarto estadio y alimentadas con tres distinta dietas (1.96×10^9 , 2.50×10^9 y 2.85×10^9 CI/larva). Esta diferencia se relaciona con las diferencias en el peso corporal, lo cual se ha establecido se correlaciona positivamente con la producción de CI por larva (Lasa *et al.*, 2009). En general, Sciocco de Cap (2001) mencionó que los parámetros de productividad (CI/larva o mg/larva) son muy sensibles tanto a las la dosis de CI, la duración de la infección, la tasa de crecimiento, el aumento de peso total durante el período de infección, el peso final al morir y condiciones ambientales, lo que podría explicar algunas de las diferencias observadas entre estos estudios.

CONCLUSIONES

Las larvas de *S. frugiperda* fueron altamente susceptibles a la infección del aislado Sf-MER, debido a ello, éste puede ser considerado como una alternativa para el control de la plaga. Así mismo, el aislado Sf-MER fue altamente productivo en larvas de cuarto estadio de *S. frugiperda*; sin embargo, esta productividad podría modificarse al considerar otros parámetros como la nutrición de insecto huésped, condiciones ambientales y los contenedores utilizados para su cría, entre otros factores. Cabe señalar que el presente estudio contribuye a la exploración de la actividad biológica de los virus nativos para su uso como bioinsecticidas contra el gusano cogollero. Sin embargo, se requieren más estudios que determinen sus características insecticidas en condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el financiamiento del estudio.

LITERATURA CITADA

- Ahmad, M. and I. Arif. 2010. Resistance of beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to endosulfan, organophosphorus and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Crop Protection*, (29): 1428-1433. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2010.07.025>
- Aitkin, M., D. Anderson, B. Francis and J. Hinde. 1989. *Statistical Modelling in GLIM*. Clarendon, Oxford, UK. ISBN 0-19-852204-5
- Armenta, R., A. M. Martínez, J. W. Chapman, R. Magallanes, D. Goulson, P. Caballero, R. D. Cave, J. Cisneros, J. Valle, V. Castillejos, D. I. Penagos, L. F. García and T. Williams. 2003. Impact of a nucleopolyhedrovirus bioinsecticide and selected synthetic insecticides on the abundance of insect natural enemies on maize in southern Mexico. *Journal of Economic Entomology*, 96: 649-661. <https://doi.org/10.1093/jee/96.3.649>

- Barrera, G., O. Simón, L. Villamizar, T. Williams and P. Caballero. 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biological Control*, 58: 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.04.009>
- Berretta, M. F., M. L. Rios and A. Sciocco de Cap. 1998. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71: 280-282. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4731>
- Blanco, C. A., J. G. Pellegaud, U. Nava-Camberos, D. Lugo-Barrera, P. Vega-Aquino, J. Coello, A. P. Terán-Vargas and J. Vargas-Camplis. 2014. Maize pests in Mexico and challenges for the adoption of integrated pest management programs. *Journal of Integrated Pest Management*, 5(4): 1-9. <https://doi.org/10.1603/IPM14006>
- Cabodevilla, O., I. Ibañez, O. Simón, R. Murillo, P. Caballero and T. Williams. 2011. Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*, 56: 184-192. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.10.007>
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. D. Cave, J. W. Chapman and P. Caballero. 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *Journal of Economic Entomology*, 92: 1079-1085. <https://doi.org/10.1093/jee/92.5.1079>
- Farrar, R. R. and R. L. Ridgway. 1998. Quantifying time-mortality relationships for nuclear polyhedrosis viruses when survivors are present. *Environmental Entomology*, 27: 1289-1296. <https://doi.org/10.1093/ee/27.6.1289>
- Finney, L. 1972. *Probit analysis*. Cambridge University Press, London/New York. <https://doi.org/10.1002/bimj.19720140111>
- García-Banderas, D. 2016. *Actividad biológica de tres nucleopoliedrovirus sobre distintas poblaciones mexicanas del gusano cogollero, Spodoptera frugiperda J. E. Smith*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 62 pp.
- Gervasio-Rosas, E. 2019. *Producción semi-masiva de un baculovirus y uso de fotoprotectores en sus formulados para el control del gusano cogollero Spodoptera frugiperda J. E. Smith*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México 64 pp.
- Hernández-Camargo, A. 2019. *Actividad biológica de tres nucleopoliedrovirus sobre distintas poblaciones mexicanas del gusano cogollero, Spodoptera frugiperda J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae)*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México 61 p.
- Hughes, P. and H. Wood. 1981. A synchronous per oral technique for the bioassay of insect viruses. *Journal of invertebrate Pathology*, 37: 154-159. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90069-0)
- Lasa, R., Williams, T. and P. Caballero. 2008. Insecticidal properties and microbial contaminants in a *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV, Baculoviridae) formulation stored at different temperatures. *Journal of Economic Entomology*, 101(1), 42-49. DOI: 10.1603/0022-0493(2008)101[42:IPAMCI]2.0.CO;2
- Martínez, A. M., O. Simón, T. Williams, and P. Caballero. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomological Experimentalist et Applicata*, 109: 139-146. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00100.x>

- Richards A. R., and P. D. Christian. 1999. A rapid bioassay screen for quantifying nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in the environment. *Journal of Virological Methods* 82: 63-75. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00080-4)
- Rios-Velasco, C., D. I. Berlanga-Reyes, G. Gallegos-Morales and M. C. Del Rincón-Castro. 2012. Characterization of baculovirus isolates obtained from soil by restriction fragment patterns. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 4546-4549. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.161>
- Sciocco de Cap, A. 2001. Biología y patogénesis de los baculovirus. Pp. 47-67. In: Caballero, P., M. López-Ferber y T. Williams (eds.) *Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas*. Phytoma. Valencia, España.
- Williams, T., D. Goulson, P. Caballero, J. Cisneros, A. M. Martínez, J. W. Chapman, D. X. Roman and R. D. Cave. 1999. Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small scale maize growers in Latin America. *Biological Control*, 14: 67-75. <https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0677>