




PRODUCCIÓN SEMI-MASIVA DE UN AISLAMIENTO DEL NUCLEOPOLIEDROVIRUS MÚLTIPLE DE SPODOPTERA FRUGIPERDA

**Eder Gervasio-Rosas, Samuel Pineda-Guillermo, José I. Figueroa de la Rosa, Luis
J. Palma Castillo, Selene Ramos Ortiz y Ana Mabel Martínez-Castillo**

Aceptado: 28 de octubre 2022
Publicado: 31 de diciembre 2022




PRODUCCIÓN SEMI-MASIVA DE UN AISLAMIENTO DEL NUCLEOPOLIEDROVIRUS MÚLTIPLE DE *Spodoptera frugiperda*

Eder Gervasio-Rosas¹, Samuel Pineda-Guillermo¹, José I. Figueroa de la Rosa¹, Luis J. Palma Castillo¹, Selene Ramos Ortiz² y Ana Mabel Martínez-Castillo¹ 

¹Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, 58880, Michoacán, México.

²CONACYT-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: ana.martinez@umich.mx

RESUMEN. El nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) puede ser una potencial alternativa para el control de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), la plaga más importante del maíz. En el presente estudio se evaluó la producción semi-masiva *in vivo* de un aislamiento mexicano del SfMNPV (Sf-MER). Para ello, se utilizaron tres modelos: dos con individualización de larvas (modelos 1 y 2) y uno con un grupo de larvas (modelo 3). Los modelos 1 y 2 se diferenciaron por los tiempos de exposición de las larvas al virus (24 h y exposición continua hasta la muerte, respectivamente) y el sistema de individualización. Se utilizaron larvas de 4º estadio de *S. frugiperda*, las cuales se expusieron a la dieta tratada. Se realizaron tres repeticiones con 50 larvas para cada modelo. La variable para evaluar fue el peso larval previo a la muerte y la producción del virus por larva (CI/larva). Como resultados, no se observaron diferencias en la producción de CI/larva entre los modelos 2 (2.85×10^9) y 3 (2.50×10^9), pero en este último hubo una pérdida de 29% por canibalismo. La producción de éstos dos modelos fue mayor comparado con el modelo 1 (1.96×10^9 CI/larva).

Palabras clave: Baculovirus, control biológico, plagas de maíz, dietas de insecto.

Semi-mass production of an isolate of the multiple nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda*

ABSTRACT. The multiple nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) can be a potential alternative for the control of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), the most important maize pest. In the present study, the semi-massive *in vivo* production of a Mexican isolate of the SfMNPV (Sf-MER) was evaluated. For this, three models were used to produce the virus: two with individualization of larvae (models 1 and 2) and one with a group of larvae (model 3). Models 1 and 2 were differentiated by the exposure times of the larvae to the virus (24 h and continuous exposure until death, respectively) and the individualization system. Fourth instar larvae of *S. frugiperda* were used, which were exposed to the treated diet. Three repetitions with 50 larvae were carried out for each model. The variable to be evaluated were the larval weight prior to death and virus production per larva (OBs/larva). As a result, no differences were observed in the production of OBs/larva between models 2 (2.85×10^9) and 3 (2.50×10^9), but in the latter there was a loss of 29% due to cannibalism. The production of these two models was higher compared to model 1 (1.96×10^9 OBs/larva).

Keywords: Baculoviruses, biological control, maize pests, insect diets.

INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero, es la plaga más importante del maíz, *Zea mays* L. Este insecto es originario de Mesoamérica, pero después de una reciente y, accidental dispersión, su presencia se registra en África, Asia y Australia (Goergen *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2021). El principal método de control contra esta plaga es el uso de insecticidas químicos; sin embargo, su uso excesivo afecta negativamente la salud humana, a los insectos no blanco y al medio ambiente (Wyckhuys *et al.*, 2013). Esta situación ha incrementado la necesidad de estudiar opciones más sustentables para el control de este insecto.

La familia Baculoviridae es la más numerosa y ampliamente estudiada, con aplicaciones en programas de control de plagas agrícolas y forestales (Szewczyk *et al.*, 2006, Williams, 2018). Estos patógenos se caracterizan por ser altamente infectivos y específicos de insectos (Moscardi, 1999).

Un aspecto fundamental para el desarrollo de los baculovirus (BVs) como agentes de control biológico es la optimización y estandarización de sus procesos de producción. Aunado a ello, la explotación comercial de un baculovirus requiere del desarrollo de tecnologías que hagan posible su producción a un costo aceptable (Lasa *et al.*, 2008).

Actualmente, los bioinsecticidas comerciales elaborados a base de BVs se producen con sistema *in vivo*, que involucra masivas cantidades de larvas para inoculación, la cría del huésped durante la replicación del virus y la obtención de los cuerpos de inclusión (CI) (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Lasa *et al.*, 2008). Para la producción masiva del huésped es necesaria la exploración de dietas semi-sintéticas para alimentar al insecto huésped, un punto clave que puede repercutir directamente en la cantidad y calidad del virus producido y en los costos de producción (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Zamora-Avilés *et al.*, 2017).

Otro aspecto importante para considerar es el uso de contenedores con adecuada distribución de los insectos y que mantengan condiciones de temperatura y humedad homogéneas que sean óptimas para el desarrollo de los insectos. Para la reducción de costos, se deben considerar tanto el tamaño de éstos como el tipo de dieta y la densidad de larvas que se introducirán en el sistema (Arrizubieta *et al.*, 2016; Zamora-Avilés *et al.*, 2017). El presente estudio tuvo como objetivo evaluar tres modelos para la producción semi-masiva *in vivo* del SfMNPV en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODO

Cría del insecto. Las larvas de *S. frugiperda* se alimentaron con dieta semisintética modificada de Mihm (1983), la cual se elaboró a partir de sémola de maíz, germen de trigo y levadura. Los adultos se confinaron en cámaras de apareamiento y se alimentaron con una solución de miel al 15%. La cría se mantuvo en una cámara de crecimiento a $26\pm 2^{\circ}\text{C}$, 65% HR y 16:8 (luz: oscuridad).

Replicación del virus. El aislamiento mexicano del SfMNPV (Sf-MER) se obtuvo del laboratorio de Patología de Insectos del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, cuya actividad biológica fue previamente estudiada por García-Banderas *et al.* (2020) y que procede de muestras de suelo colectadas en cultivos de maíz de la Península de Yucatán. Para incrementar el inóculo, se realizó un pase de replicación en larvas de 4o estadio (L4) mediante la técnica de inoculación de la gota (Hughes y Wood, 1981). Las larvas infectadas y muertas con evidentes síntomas del virus se maceraron y purificaron mediante filtración. El virus se cuantificó en una cámara de Neubauer ($10\text{-}4\text{cm}^3$) a $400\times$ con un microscopio con contraste de fases. Finalmente, la suspensión del virus se almacenó a -20°C hasta su uso.

Producción semi-masiva del aislamiento Sf-MER. Los experimentos utilizaron la concentración viral 1×10^9 CI/ml, previamente determinada para causar ~90% de mortalidad. La producción del virus se realizó mediante el uso de la dieta semisintética modificada de Mihm (1983): Agar (14 g), germen de trigo (3.17 g), harina de soja (81 g), levadura (25 g), azúcar (13 g), metilparaben (1 g), ácido ascórbico (4.3 g), ácido acético al 25 % (12 ml), mezcla de vitaminas Vitafort® (1 g), antibiótico (2 g de oxitetraciclina), cloruro de colina (7.3 g) y sales Wesson (5.25g) en 1000 ml de agua fría. Se utilizaron larvas de 4o estadio 12 h después de la ecdisis o muda. A continuación, se describen los modelos utilizados para producción del virus; en los cuales, las larvas se pesaron individualmente antes de ser colocadas sobre la dieta para iniciar el experimento con larvas de peso homogéneo y minimizar que la biomasa del huésped tuviera un efecto sobre la producción viral.

Modelo 1. La dieta se cortó en una lámina de aproximadamente 1.5 cm de ancho por 15 cm de largo y 5 mm de alto, las cuales se colocaron en contenedores de plástico transparente (19 de ancho \times 26 cm de largo). Seiscientos microlitros del inóculo del aislamiento Sf-MER se aplicaron sobre la dieta y se dejó secar por 30 minutos. Posteriormente se introdujeron 50 larvas L4 de *S. frugiperda* con un periodo de ayuno de 12 h. Después de 24 h de consumo de la dieta, las larvas se trasladaron a cajas de cultivo celular de 24 celdas donde continuaron alimentándose con la misma dieta hasta su muerte (5-6 días). Previo a la muerte, las larvas se colocaron en microtubos de 1.5 ml y se preservaron a -20°C . Posteriormente, se procedió a la cuantificación de la producción de CI por larva.

Modelo 2. La dieta se vertió en un contenedor de $\sim 24.5 \times 24.5$ cm con la cantidad suficiente para tener un grosor de ~ 5 mm. Después de su secado, el inóculo se dispersó con una espátula metálica y se dejó secar por una hora. Posteriormente, sobre la dieta se colocó una rejilla de plástico con celdas de $\sim 15 \times 15$ mm provista por el fondo con una malla metálica de acero inoxidable y se colocaron individualmente 50 larvas L4 con las mismas condiciones de ayuno que el sistema anterior. La rejilla se cubrió con una malla metálica para evitar el escape de las larvas y permitir una adecuada ventilación. La colecta de las larvas y cuantificación de la producción de virus se realizaron de la misma forma que en el modelo 1.

Modelo 3. Las condiciones de este tratamiento fueron las mismas que las del modelo 1, con excepción de que las larvas no se retiraron del contenedor hasta 24 h después de alimentarse con la dieta tratada. Después de este tiempo, la dieta tratada con virus se sustituyó por una dieta sin tratar. Las larvas permanecieron en el contenedor alimentándose hasta el momento justo previo a la muerte (5-6 días) y de esta manera poder observar la pérdida por canibalismo.

Análisis de datos. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento con 50 larvas por repetición. Se tomó una muestra al azar que representó el 30% de larvas muertas por repetición para cuantificar la producción del virus. Este proceso se realizó mediante filtración y centrifugación. Los análisis de peso larvario y producción del virus se realizaron con el programa SAS mediante GLM. La separación de medias se realizó mediante la prueba de metodología de mínimos cuadrados ($P \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron diferencias significativas en los pesos ($P \geq 0.05$) iniciales de las larvas de *S. frugiperda* del testigo y las destinadas para los distintos tratamientos, con excepción del modelo 2 cuyos pesos fueron ligeramente mayores (11.41 ± 0.17) comparados con los otros modelos (Cuadro 1). Es probable que el menor peso inicial observado en las larvas destinadas al modelo 3 (10.42 ± 0.22) se reflejó en un mejor peso de éstas previo a la muerte por virus (60.25 ± 10.86); sin embargo, esta disminución no afectó la producción de CI/larva, ya que este tratamiento, al igual que el modelo 2, ofrecieron una mayor productividad de CI/larva (2.50 y 2.85×10^9 , respectivamente) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Promedio de peso inicial y previo a la muerte en larvas de *S. frugiperda* expuestas a los modelos de infección evaluados

Modelos	n	Peso inicial larvas (\pm EE)	
		Testigo	Exposición al virus
1 Individualizadas en celdas, alimento por 24h	150	10.58 ± 0.20 a	10.66 ± 0.20 a
2 Individualizadas con rejilla sobre la dieta, alimento continuo	150	10.50 ± 0.17 a	11.41 ± 0.17 b
3 Mantenidas y alimentadas grupalmente	150	10.41 ± 0.28 a	10.42 ± 0.22 a

Literales dentro de la misma columna, seguidas de la misma letra no difieren significativamente ($P \leq 0.05$).

Cuadro 3. Promedio de peso de larvas de *S. frugiperda* previo a la muerte y producción de CI/larva entre los distintos modelos de infección

Modelos	n		Variable (\pm EE)
1 Individualizadas en celdas, alimento por 24 h	49	Peso/mg ^a	90.64 \pm 5.41 b
2 Individualizadas con rejilla sobre la dieta, alimento continuo	56	Peso/mg ^a	107.04 \pm 7.10 b
3 Mantenido y alimentado grupalmente	20	Peso/mg ^a	60.25 \pm 10.86 a
1 Individualizadas en celdas, alimento por 24 h	44	CI/larva ^b	1.96 $\times 10^9 \pm 8.47 \times 10^7$ a
2 Individualizadas con rejilla sobre la dieta, alimento continuo	54	CI/larva ^b	2.50 $\times 10^9 \pm 9.69 \times 10^7$ b
3 Mantenido y alimentado grupalmente	20	CI/larva ^b	2.85 $\times 10^9 \pm 4.02 \times 10^8$ b

Literales entre los tratamientos seguidos por la misma letra no son significativamente distintos ($P \leq 0.05$). ^aF_{2,106} = 7.42, $P \leq 0.001$; ^bF_{2,106} = 9.86, $P < 0.001$

La producción *in vivo* es el método más utilizado para la producción de los baculovirus (Claus y Sciocco de Cap, 2001; Grzywacz *et al.*, 2013), éste consiste en utilizar los propios huéspedes como biofábricas para la replicación del patógeno. Una de las ventajas que ofrece este sistema es que no se requiere de un equipo altamente tecnificado (Ziemnicka, 2007). El uso de dietas semi-sintéticas y de distintos contenedores juegan un papel importante porque posibilitan la obtención del virus con menor contaminantes y un manejo relativamente más sencillo (Romero *et al.*, 2009).

Los valores de producción viral del presente estudio coincidieron con trabajos que utilizaron larvas de quinto estadio *S. frugiperda* bajo un sistema individualizado: 5.05×10^9 CI/larva (Quintero, 2015) y 2.57×10^9 a 4.64×10^9 CI/mg de larva (Ruíz *et al.*, 2015). Las diferencias entre algunos valores señalados anteriormente se deben a los distintos estadios del insecto utilizados (Ríos-Velasco *et al.*, 2012), a las distintas concentraciones del virus (Arrizubieta *et al.*, 2016), la genética del propio virus (Barrera *et al.*, 2011) y/o a las condiciones climáticas (Luna-Espino *et al.*, 2021). En nuestro estudio observamos que el uso de larvas de cuarto estadio posee la ventaja de tener a una menor contracción del inóculo una alta producción viral.

La productividad del virus en el sistema con individualización de larvas (modelo 2) fue equivalente a la obtenida por la infección en grupo de larvas (modelo 3) con los cuales se obtuvo la mayor productividad; sin embargo, en el último tratamiento se perdió el 29% por canibalismo. Tanto el canibalismo como la necrofagia son un factor adverso que reduce (~25%) la recuperación de larvas de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) infectadas en grupo con su nucleopoliedrovirus homólogo (SeMNPV) (Elvira *et al.* (2010; Zamora-Avilés *et al.*, 2017). Es importante señalar que el sistema de individualización de larvas diseñado en el presente estudio se obtuvo con materiales accesibles y reciclables; sin embargo, aún falta estudios que permitan llevar a escala mayor este tipo de sistemas.

CONCLUSIONES

El uso de un sistema con individualización de larvas permitió una adecuada producción del aislamiento Sf-MER sin el riesgo de la pérdida del material por canibalismo. Aunque este último factor puede afectar la cantidad de virus obtenida por contenedor, es importante realizar futuros estudios que determinen si es una pérdida significativa bajo un sistema a gran escala, considerando que la infección en grupo requiere de una menor mano de obra.

AGRADECIMIENTOS

A la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por los financiamientos otorgados.

LITERATURA CITADA

- Arrizubieta, M., O. Simón, T. Williams and P. Caballero. 2016. Determinant factors in the production of a co-occluded binary mixture of *Helicoverpa armigera* Alphabaculovirus (HearNPV) genotypes with desirable insecticidal characteristics. *Plos One.*, 11, e0164486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164486>
- Barrera, G., O. Simón, L. Villamizar, T. Williams, *et al.* 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>
- Claus, J. D. y A. Sciocco de Cap. 2001. Producción masiva de baculovirus. Pp. 260-312. 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.
- Elvira, S., N. Gorriá, D. Muñoz, T. Williams, *et al.* 2010. A simplified low-cost diet for rearing *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and its effect on *S. exigua* nucleopolyhedrovirus production. *Journal of Economic Entomology*, 103: 17-24. <https://doi.org/10.1603/ec09246>
- García-Banderas, D., F. Tamayo-Mejía, S. Pineda, J. I. Figueroa de la Rosa, *et al.* 2020. Biological characterization of two *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus isolates from Mexico and evaluation of one isolate in a small-scale field trial. *Biological Control*, 149, 104316. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104316>
- Goergen G., P. L. Kumar, S. B. Sankung, A. Togola, *et al.* 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *Plos One*, 11(10), e0165632. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165632>
- Grzywacz, D., D. Moore and J. R. Rabindra. 2013. Mass production of entomopathogens in less industrialized countries. Pp. 519-553. In: J. A. Morales-Ramos, G. M. Rojas and I. D. Shapiro (Eds.). Mass production of beneficial organisms. London. UK. Academic Press.
- Hughes, P. R. and H. A. Wood. 1981. A synchronous peroral 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., T. Williams 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: 42-49 [https://doi.org/10.1603/0022-0493\(2008\)101\[42:ipamci\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0022-0493(2008)101[42:ipamci]2.0.co;2)
- Luna-Espino, J. C., A. M. Martínez-Castillo, S. Ramos Ortiz, S. Pineda, *et al.* 2022. Influence of temperature on occlusion body production in a Mexican isolate of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus. *Biocontrol Science and Technology*, 32: 223-235. <https://doi.org/10.1080/09583157.2021.1990855>
- Mihm, J.A. 1983. Techniques for efficient mass rearing and infestation of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* J.W. Smith, for host plant resistance studies. CIMMYT, México.
- Qi, G-J., J. Ma, J. Wan, Y-L. Ren, S. McKirdy, *et al.* 2021. Source regions of the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) invading Australia. *Insects*, 12:1104. <https://doi.org/10.3390/insects12121104>
- Quintero R. L. M. 2015. Uso de baculovirus como alternativa de control biológico de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo del maíz: una revisión conceptual y de avances en su aplicación. Universidad Abierta y a Distancia Escuela de Ciencias Agrícolas y del Medio Ambiente Especialización en Biotecnología Agrícola Villavicencio. 51 pp.

- Ríos-Velasco, C., G. Gallegos, D. Berlanga, J. Cambero, *et al.* 2012. Mortality and production of occlusion bodies in *Spodoptera frugiperda* larvae (Lepidoptera: Noctuidae) treated with nucleopolyhedrovirus. *Florida Entomologist*, 95: 752-757. <https://doi.org/10.1653/024.095.0326>
- Romero, M. G., E. Romero, D. S. Gómez y E. Willink. 2009. Evaluación de aislamientos de baculovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), plaga clave del maíz en el noroeste argentino. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 86: 7-15.
- Ruíz, C., J. V. Gómez, M. Chaparro, P. Sotelo and L. Villamizar. 2015. Adjusting the conditions of a system for the in vivo production of a nucleopolyhedrovirus of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biotecnol. Apl.*, 32: 4311-4316.
- Szewczyk, B., L. Hoyos, M. Paluszek, I. Skrzecz, *et al.* 2006. Baculoviruses. Re-emerging biopesticides. *Biotecnología Aplicada*, 24: 143-160. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.001>
- Williams, T. 2018. Viruses. Pp: 215-285. *In: Ecology of invertebrate diseases*, A. E. Hajek and D. I. Shapiro-Ilan (Eds.), Wiley, Chichester, Reino Unido.
- Wyckhuys, G. A. K., K. Lu, H. Morales, L. L. Vazquez, *et al.* 2013. Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world. *Biological Control*, 65: 152-167. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.010>
- Zamora-Avilés N., A.M. Martínez, S. Pineda, A. Bravo-Patiño, *et al.* 2017. Cool-textured diets for use in baculovirus Production. *Biocontrol Science and Technology*, 27: 1327-1338. <https://doi.org/10.1080/09583157.2017.1397598>
- Ziennicka, J. 2007. Mass production of nucleopolyhedrovirus of the satin moth *Leucoma salicis* (LesaNPV). *Journal of Plant Protection Research*, 48: 23-48.