



COMBINACIÓN DE UN BACULOVIRUS CON COMPUESTOS BIORRACIONALES PARA EL CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO

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

**Aceptado: 11 de octubre 2021
Publicado: 31 de diciembre 2021**



COMBINACIÓN DE UN BACULOVIRUS CON COMPUESTOS BIORRACIONALES PARA EL CONTROL DEL GUSANO COGOLLERO

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

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. ana.martinez@umich.mx; samuel.pineda@umich.mx; jose.figueroa@umich.mx; ljpalmac@gmail.com;

✉Autor de correspondencia: selene.ramos@umich.mx

RESUMEN. Se evaluó la toxicidad de azadiractina y metoxifenocida, solos y en interacción con el Nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) con una visión futura para el control de este lepidóptero conocido como “gusano cogollero”. Se realizaron bioensayos donde las larvas de tercer estadio se alimentaron con dieta mezclada con un rango de siete dosis de azadiractina: entre 0.316 y 316 mg i.a./kg de dieta y cinco de metoxifenocida: entre 0.0316 y 3.16 mg i.a./kg y. Para las combinaciones del virus con los compuestos se utilizaron tres concentraciones: 5.4×10^2 , 4.62×10^4 y 8.81×10^5 cuerpos de oclusión (c.o./ml), las cuales se inocularon mediante la ingestión de una gota de una suspensión c.o. La inoculación se realizó antes de la exposición a la dieta contaminada con los insecticidas. *S. frugiperda* fue susceptible a todos los compuestos, aunque al considerar los valores de la CL_{50} metoxifenocida provocó la mayor mortalidad (9.3-veces) comparado con azadiractina. La interacción de la concentración más alta del SfMNPV con dos concentraciones de azadiractina provocó un incremento de la mortalidad larvaria. Cuando el SfMNPV se ensayó con metoxifenocida se observó una disminución en la mortalidad comparada con el virus solo en las dos concentraciones más bajas de este insecticida. Los ensayos de combinación de AZA y MET con el SfMNPV mostraron que ambos insecticidas podrían considerarse como agentes potenciadores del SfMNPV

Palabras clave: virus entomopatógenos, patogenicidad, virulencia, mortalidad.

Combination of a Baculovirus with biorational compounds for the control of the fall armyworm.

ABSTRACT. The toxicity of azadirachtin and methoxyphenozide, alone and in interaction with the *Spodoptera frugiperda* Nucleopolyhedrovirus (SfMNPV) was evaluated with a future vision for the control of this lepidopteran called the fall armyworm. Ingestion bioassays were carried out where the third-stage larvae were fed with diet mixed with a range of seven (0.316 to 316 mg a.i./kg of diet) and five concentrations (0.0316 to 3.16 mg a.i. / kg) of azadirachtin and methoxyphenozide, respectively. For the combinations of the virus with the compounds, three concentrations of the pathogen were used: 5.4×10^2 , 4.62×10^4 , and 8.81×10^5 occlusion bodies (o.c./ml), which were inoculated through the drop ingestion method. Inoculation was carried out before exposure to the diet contaminated with the insecticides. *S. frugiperda* was susceptible to all the compounds, although to a greater degree to methoxyphenozide (9.3-fold) compared to azadirachtin. The combination of the highest concentration of SfMNPV with two concentrations of azadirachtin caused an increase in larval mortality. The bioassay of SfMNPV - methoxyphenozide decrease in mortality compared to virus alone in the two lowest concentrations of this insecticide. Combination trials of AZA and MET with SfMNPV could be considered as SfMNPV enhancing agents.

Keywords: entomopathogenic viruses, pathogenicity, virulence, mortality.

INTRODUCCIÓN

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es la plaga más importante del maíz en América Latina (Van Huis, 1981). Para el control de este insecto, los agricultores habitualmente realizan varias aplicaciones de insecticidas sintéticos (Andrews, 1988; Hruska y Gould, 1997). Sin embargo, esto ha ocasionado un impacto negativo en el ambiente y la salud pública (Williams *et al.*, 1999). Entre los métodos alternativos de control de insectos que han recibido mayor atención se encuentran los insecticidas microbiales. La familia Baculoviridae es la más numerosa de todos los grupos de virus patógenos de insectos. Esta familia posee un estrecho rango de huéspedes y una elevada patogenicidad (Hunter-Fujita, 1998).

El Nucleopoliedrovirus múltiple de *Spodoptera frugiperda* (SfMNPV) es un baculovirus que prevalece en las poblaciones naturales del insecto y puede ocasionar epizootias en altas densidades (Garden y Fuxa, 1980). Dichas características han motivado la realización de estudios enfocados al uso del SfMNPV como agente de control de plagas en Estados Unidos, Colombia, Brasil, Argentina (De Oliveira, 1998) y México (Williams *et al.*, 1999; García-Bandera *et al.*, 2020). En el presente estudio se evaluó la combinación del SfMNPV con dos compuestos de bajo impacto ambiental: los reguladores del crecimiento azadiractina y metoxifenocida, con la finalidad de conocer si el patógeno puede interactuar sinérgicamente con estos insecticidas.

MATERIALES Y MÉTODO

Cría del insecto. Las larvas de *S. frugiperda* se alimentaron con dieta semisintética elaborada a partir de sémola de maíz, germen de trigo y levadura. Los adultos fueron confinados 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% de HR y un fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad).

Compuestos ensayados. El SfMNPV fue un aislado silvestre procedente de Nicaragua, caracterizado por Escribano *et al.* (1999). Su multiplicación se realizó en larvas del tercer estadio mediante la técnica de gota (Hughes y Wood, 1981). Las larvas infectadas y muertas se maceraron en una solución de sodio duodecil sulfato (SDS) al 0.1%. La purificación de los cuerpos de ocusión (c.o.) se realizó por centrifugación y un gradiente de sacarosa a 40%. El virus se resuspendió en agua destilada y la cuantificación de los c.o. se realizó en una cámara de conteo Neubauer a 400x en contraste de fases. La suspensión del virus se almacenó a -20°C hasta su uso. Se ensayaron también los siguientes compuestos: Intrepid®, Dow AgroSciences, México (24% metoxifenocida, suspensión concentrada) y Aling®, Sipcam Inagra, Valencia, España (3.2% azadiractina, emulsión concentrada). En adelante, dichos compuestos serán nombrados como MET y AZA, respectivamente.

Bioensayos de susceptibilidad. La toxicidad de AZA y MET en larvas de *S. frugiperda* de tercer estadio (0-8 h después de la ecdisis) se determinó con bioensayos por ingestión. Para esto, se prepararon una serie de siete o cinco concentraciones para MET y AZA, respectivamente, las cuales expresaron en mg de ingrediente activo (i.a.)/kg de dieta: 0.316, 1.0, 3.16, 10, 31.6, 100 y 316 para AZA o 0.0316, 0.1, 0.316, 1.0, 3.16 para MET. Las larvas se colocaron individualmente en celdas de cajas para cultivo de tejidos (24 celdas) provistas de un cubo de aproximadamente 8 g de dieta tratada con los insecticidas. Para cada concentración y compuesto, se realizaron cuatro repeticiones con 10 individuos. A las larvas del testigo (larvas no tratadas) se les ofreció dieta sin los insecticidas. La mortalidad larvaria se registró cada 24 h durante ocho días, considerándose larvas muertas aquellas que no respondieron a pequeños estímulos realizados con unas pinzas entomológicas blandas.

Bioensayos de interacción de AZA y MET con el SfMNPV. Para evaluar la actividad del SfMNPV solo o en interacción con AZA y MET, éste se inoculó mediante el método de la gota. Para este ensayo las concentraciones del virus que se usaron fueron aquellas que teóricamente provocarían una mortalidad de 10, 25 y 50% (5.4×10^2 , 4.62×10^4 y 8.81×10^5 c.o./ml, respectivamente), mismas que se eligieron con base a estudios previos (Mondragón *et al.*, 2007). Se utilizaron larvas de tercer estadio recién mudadas. Con la finalidad de facilitar la ingestión del virus, las larvas fueron puestas en ayuno durante 8 h antes de la inoculación. Una vez que las larvas ingirieron la gota con el virus, éstas se transfirieron individualmente a celdas de cajas de cultivos de tejidos y se les administró un trozo de dieta mezclada con AZA o MET, según correspondiera. La mortalidad se registró cada 24 h durante ocho días. Los datos de mortalidad de los ensayos con dieta tratada con AZA y MET se sometieron a un análisis probit (Finney, 1972) en el programa POLO PC (LeOra Software, 1987).

Los datos de las combinaciones se analizaron mediante un análisis de máxima similitud (prueba G) en el programa SPSS 12.0. En dicho análisis se tomaron los valores correspondientes a la corrección de Yates recomendada para un tamaño de muestra > 200 (Sokal y Rohlf, 1981).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos de susceptibilidad. *Spodoptera frugiperda* fue susceptible a los dos compuestos ensayados. El valor de la CL_{50} de AZA fue significativamente (4.1 veces) mayor que el de MET (Cuadro 1) estos valores se calcularon a las 192 y 96 h después de la exposición de las larvas a los tratamientos, respectivamente.

Cuadro 1. Mortalidad causada por AZA y MET en larvas de *S. frugiperda* en tercer estadio.

Insecticida	Pendiente \pm EE ^a	CL_{50} ^b (i.a./Kg dieta)	L. C. al 95% ^c	χ^2 ^d	g.l ^e
Azadiractina	1.2 \pm 0.12	12.23	7.57 - 19.98	5.35	5
Metoxifenocida	1.9 \pm 0.21	2.96	1.45 - 6.01	5.28	3

^aPendiente de la recta de regresión. ^bConcentración letal media, ^cLímites de confianza, ^dPrueba de chi-cuadrada, ^eGrados de libertad. Los bioensayos se realizaron mediante el método de ingestión de dieta tratada con los insecticidas.

Los anteriores resultados coinciden parcialmente con lo observado por Zamora *et al.* (2008), quienes determinaron que MET fue 1.7 veces más tóxico que AZA en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda* alimentadas con dieta contaminada. La alta toxicidad presentada por MET puede explicarse principalmente por el rápido modo de acción, ya que este compuesto comienza a actuar 24 h después de su ingestión (Smaghe *et al.*, 1995).

Bioensayos de interacción de AZA y MET con el SfMNPV. Dos de las concentraciones del SfMNPV (5.4×10^2 y 4.62×10^4 c.o./ml) incrementaron significativamente la mortalidad larvaria al combinarse con un rango de 10 a 316 mg i.a/kg de dieta de AZA comparado con el SfMNPV solo ($P < 0.001$, para todos los casos) (Figura 1a). Dentro de estas concentraciones de virus, únicamente las combinaciones de 4.62×10^4 c.o./ml + 0.316 mg i.a/kg de dieta ($G = 13.66$, g.l= 1, $P < 0.001$) y 4.62×10^4 c.o./ml + 10 mg i.a/kg de dieta de AZA ($G = 13.57$, g.l= 1, $P < 0.001$) incrementaron significativamente la mortalidad larvaria con relación a AZA sola (Figura 1b).

La combinación de 8.81×10^5 c.o./ml del SfMNPV + AZA provocó un incremento significativo de la mortalidad larvaria en cuatro de las siete concentraciones ensayadas (1, 31.6, 100 y 316 mg i.a/kg de dieta) ($P < 0.009$, para todos los casos) comparado con el SfMNPV solo. En cambio, cuando las combinaciones se compararon con AZA sola, huboun incremento significativo de la mortalidad larvaria en cinco concentraciones (0.316, 1, 3.16, 10y 31.6 mg i.a/kg de dieta) ($P < 0.01$, para todos los casos) (Figura 1c).

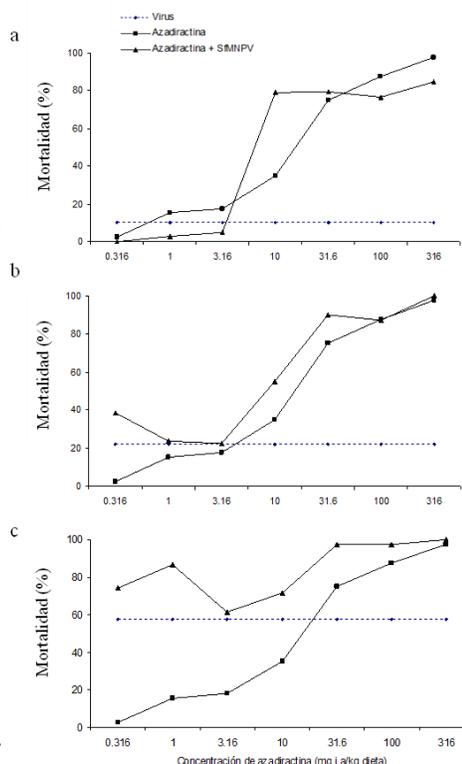


Figura 1. Combinación de SfMNPV con Aling® (azadiractina) en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*. a) 5.4×10^2 c.o./ml, b) 4.62×10^4 c.o./ml y c) 8.81×10^5 c.o./ml.

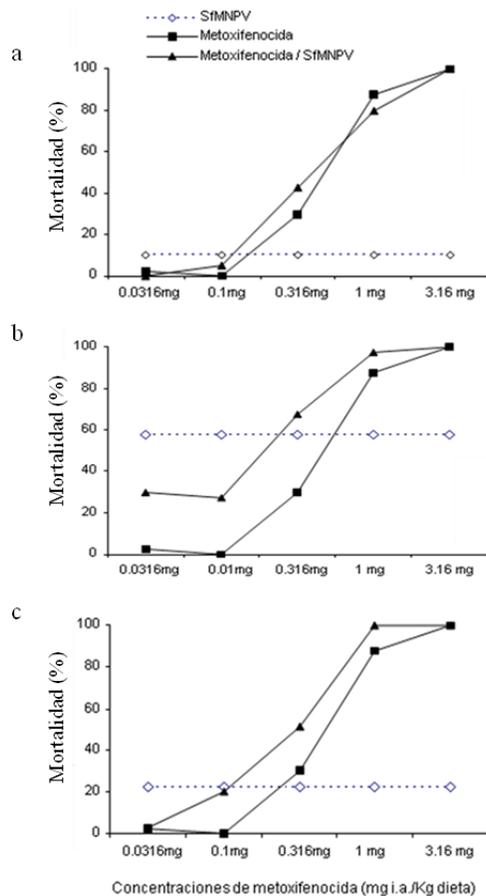


Figura 2. Combinación de SfMNPV con metoxifenocida en larvas de tercer estadio de *S. frugiperda*. a) 5.4×10^2 c.o./ml, b) 4.62×10^4 c.o./ml y c) 8.81×10^5 c.o./ml.

Similar a lo señalado por Cook *et al.* (1996), estos resultados indican una acción sinérgica entre el SfMNPV y AZA. Por ejemplo, sólo en la concentración mayor del SfMNPV se observó un claro efecto sinérgico cuando éste se ensayó con AZA a una concentración de 1 y 31.6 mg i.a./kg de dieta.

Un hecho que resultó interesante fue que en ambas concentraciones se observaron síntomas evidentes de mortalidad larvaria por el SfMNPV y AZA. Posiblemente, el virus logró replicarse en las larvas que sufrieron un retraso en el desarrollo por efecto de este último compuesto. Contrario a lo observado por Shapiro *et al.* (1994), la combinación del SfMNPV con AZA no afectó la virulencia del patógeno. Sin embargo, esto pudo ser debido a las diferentes técnicas de ensayo utilizadas.

La combinación del SfMNPV + MET provocó un incremento significativo de la mortalidad larvaria en varias concentraciones comparado con el SfMNPV solo. Este incremento se observó a partir de 0.316 mg i.a./kg de dieta para las dos concentraciones más bajas del SfMNPV y en la combinación de 1 mg i.a./kg de dieta de MET con la concentración mayor del virus ($P < 0.03$, para todos los casos) (Figuras 2a-c). Con respecto al MET solo, la mortalidad larvaria aumentó en la combinaciones 4.62×10^4 c.o./ml + 0.1 mg i.a./kg de dieta ($G = 6.8$, $g.1 = 1$, $P < 0.001$) (Figura 2b) y 8.81×10^5 c.o./ml + 0.0316, 0.1 o 0.316 mg i.a./kg de dieta ($P < 0.002$, para todos los casos)

(Figura 2c). Sin embargo, en todos los casos el porcentaje de mortalidad fue significativamente menor comparado con el SfMNPV solo. Estos ensayos indicaron que tuvo una mayor influencia de MET en el nivel de mortalidad larvaria de *S. frugiperda*, ya que en la mayoría de los casos no se observaron diferencias entre las combinaciones y el compuesto solo.

CONCLUSIONES

Los ensayos de combinación de AZA y MET con el SfMNPV mostraron que ambos insecticidas podrían considerarse como agentes potenciadores del SfMNPV; sin embargo, esto puede depender de las concentraciones utilizadas. Para confirmar las cualidades de estos insecticidas como agentes sinérgicos en los formulados de baculovirus, se necesitan llevar a cabo más estudios que evalúen su posible influencia en las características intrínsecas del virus (e.g. características estructurales, producción de OBs/larva y viabilidad de las partículas infectivas, entre otros).

AGRADECIMIENTOS

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

LITERATURA CITADA

- Andrews, K. L. 1988. Latin America research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Fla Entomol.*, 71(4): 630-653. <https://doi.org/10.2307/3495022>
- 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(5): 1209-1214. <https://doi.org/10.1093/ee/25.5.1209>
- De Oliveira, M. R. 1998. World survey: South America. In: F. R. Hunter-Fujita, P. F. Entwistle, H. F. Evans y N. E. Crook (Eds.). *Insect viruses and pest management*. Wiley, Chichester, UK. pp. 235-239.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. D. Cave, *et al.* 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J. Econ. Entomol.*, 92(5): 1079-1085. <https://doi.org/10.1093/jee/92.5.1079>
- Finney, L. 1972. *Probit analysis*. Cambridge University Press, London/New York.
- García-Banderas, D., F. Tamayo-Mejía, S. Pineda, J. I. 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. *Biol. Control* (149):104316. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104316>
- Garden, W. A., and J. R. Fuxa. 1980. Pathogens for suppression of the fall armyworm. *Fla. Entomol.*, 63(4): 439-447. <https://doi.org/10.2307/3494527>
- Hruska, A. J. and F. Gould. 1997. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *J. Econ. Entomol.*, 90 (2): 611- 622. <https://doi.org/10.1093/jee/90.2.611>
- Hughes, P. R., and H. A. Wood. 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 37(2): 154-159. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90069-0](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90069-0)
- Hunter-Fujita, F. R., P. F. Entwistle, H. F. Evans and N. E. Crook. 1998. *Insect viruses and pest management*. Wiley, Chichester, UK.
- LeOra Software. 1987. POLO-PC a user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, California.
- Smaghe, G., G. A. Böhm, K. Richter, and D. Degheele. 1995. Effect of nonsteroidal ecdysteroid agonists on ecdysteroid titer in *Spodoptera exigua* and *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.*, 41(11): 971-974. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(95\)00045-v](https://doi.org/10.1016/0022-1910(95)00045-v)
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1981. *Biometry*. Second ed. Freeman, New York.
- Shapiro, M., J. L. Robertson and R. E Webb. 1994. Effect of neem seed extract upon the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) and its nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, 87(2): 356-360. <https://doi.org/10.1093/jee/87.2.356>
- Van Huis, A. 1981. Integrated pest management in the small farmer's maize crop in Nicaragua. *Medelingen landbouwhogeschool Wageningen* 81(6):1-221.
- Williams, T., D. Goulson, P. Caballero, J. Cisneros, *et al.*, 1999. Evaluation of a baculovirus bioinsecticide for small-scale maize growers in Latin America. *Biol. Control* 14(2): 67-75. <https://doi.org/10.1006/bcon.1998.0677>
- Zamora, M. C., A. M. Martínez, M. S. Nieto, M. I. Schneider, *et al.*, 2008. Actividad biológica de algunos insecticidas biorracionales contra el gusano cogollero. *Rev. Fitotec. Mex.*, 31(4): 351-357. <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.351>