

Actividad biológica de biopreparados del virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera littoralis* (Boisd.) obtenidos en el hospedador natural y en el alternativo *Spodoptera exigua* (Hübner)

P. B. MARACAJÁ, E. VARGAS OSUNA y C. SANTIAGO-ALVAREZ

Las producciones, en términos de CI/larva, del virus de la poliedrosis nuclear de *Spodoptera littoralis* multiplicado en larvas de *S. littoralis* y *S. exigua*, hospedadores natural y alternativo respectivamente, son del mismo orden de magnitud. Las actividades biológicas del inóculo de partida y de los preparados obtenidos por multiplicación del virus en cada uno de los hospedadores se determinaron sobre larvas del tercer estadio de *S. littoralis*. Las pendientes de las respectivas rectas de regresión log dosis-mortalidad Probit no difirieron significativamente, pero la DL_{50} del inóculo (4802 CI/larva) fue significativamente mayor que las de los productos obtenidos en *S. littoralis* (1323 CI/larva) y en *S. exigua* (1844 CI/larva), sin que existieran diferencias significativas entre estas dos últimas. Según se desprende del cálculo de las potencias relativas, los biopreparados obtenidos en larvas de *S. littoralis* y en *S. exigua* no difieren en virulencia y son significativamente más virulentos (3,63 y 2,60 veces, respectivamente) que el inóculo de partida.

P. B. MARACAJÁ. Becario de CAPES/MEC y Profesor de la UEPB (Brasil).
E. VARGAS OSUNA y C. SANTIAGO-ALVAREZ. Cátedra de Entomología Agrícola. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales. ETSIAM. Universidad de Córdoba. Apartado de Correos 3048. 14080 Córdoba.

Palabras clave: *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, Virus de la Poliedrosis Nuclear, Virulencia.

INTRODUCCION

Los baculovirus, subgrupos A (virus de la poliedrosis nuclear, VPN) y B (virus de la granulosis, VG) de la Familia Baculoviridae, son patógenos exclusivos de artrópodos que infectan a numerosas especies de insectos, principalmente lepidópteros. Ambos grupos destacan por cualidades de interés práctico (especificidad, seguridad de empleo, facilidad de aplicación y estabilidad), que hacen posible su utilización como materias activas de insecticidas microbianos. Este tipo de biopreparados tienden a desplazar a los insecticidas químicos de síntesis en

programas de lucha contra plagas porque respetan a los insectos beneficiosos (GRÖNER, 1986).

Aunque ya existen productos comerciales a base de baculovirus para su empleo en lucha contra plagas (TANADA y KAYA, 1993), la utilización generalizada está condicionada a la superación de algunos obstáculos, tales como su relativamente lenta acción letal y el alto coste de la producción «in vivo» (HUBER, 1986).

Especies próximas taxonómicamente al hospedador original de un baculovirus y susceptibles al mismo han sido propuestas como óptimos hospedadores alternativos

para la multiplicación a gran escala con una mejora en los rendimientos de la producción (MARTIGNONI e IWAI, 1986). Incluso una misma especie puede ser elegida como hospedador para la multiplicación a gran escala de más de un baculovirus con la consiguiente reducción de costes.

La multiplicación de baculovirus en hospedadores, tanto naturales como alternativos, produce modificaciones de su actividad biológica, como ha sido señalado con los VPN de *Choristoneura fumiferana* (STAIRS *et al.*, 1981) y de *Autographa californica* (TOMPKINS *et al.*, 1981), lo que abre la posibilidad de mejorar la virulencia de un inóculo.

El VPN de *Spodoptera littoralis* (VPNSI) presenta buena actividad insecticida en ensayos de laboratorio (SANTIAGO-ALVAREZ y ORTIZ-GARCÍA, 1992) y de campo (MOAWED y ELNABRAWY, 1987) y la cepa de Marruecos de este virus ha mostrado también patogeneidad cruzada para larvas de *S. exigua* (datos no publicados). El objetivo de este trabajo es conocer la influencia de la especie hospedadora, utilizada en la multiplicación del VPNSI, sobre la actividad biológica de los biopreparados obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

El baculovirus utilizado es la cepa de Marruecos del VPN de *S. littoralis* procedente de la Estación de Lucha Biológica de La Minière (INRA, Francia). El inóculo de partida, una suspensión acuosa de $2,9 \times 10^8$ cuerpos de inclusión (CI)/ml, fue obtenido por multiplicación del virus en larvas de *S. littoralis* y purificado por el método de GRIFFITH (1982).

Las larvas de *S. littoralis* y *S. exigua* proceden de las poblaciones mantenidas en condiciones de insectario ($26 \pm 2^\circ$ C; 70 ± 5 % de humedad relativa; fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad) con dieta artificial (SANTIAGO-ALVAREZ, 1977).

Los biopreparados se obtuvieron a partir de larvas de penúltimo estadio de *S. exigua* (L₃) y de *S. littoralis* (L₄) recién mudadas,

individualizadas en cajas de plástico. Para el tratamiento, con dosis del inóculo de partida, se siguió el método descrito por SANTIAGO-ALVAREZ y VARGAS-OSUNA (1988) y para la extracción y purificación del virus el descrito por VARGAS OSUNA *et al.* (1994).

La actividad biológica de los productos virales se determina por bioensayo sobre larvas de tercer estadio de *S. littoralis*, siguiendo el mismo método utilizado para la producción del VPNSI. Para todos los productos se emplea idéntica serie de cuatro dosis, en progresión geométrica de razón 5. A las larvas se les ofrecen discos de alfalfa de 5 mm de diámetro sobre los que se han depositado 2 μ l de la suspensión correspondiente. Se utilizan 30 larvas por repetición y el bioensayo se repite 4 veces.

Los resultados de las mortalidades larvares se someten al análisis de FINNEY (1971) para el cálculo de las ecuaciones de las rectas de regresión log dosis-mortalidad Probit y de las dosis letales medias (DL₅₀). La estimación y comparación de las rectas de regresión se realizan mediante el programa POLO (LeOra Software Inc. Berkeley, CA, USA) basado en el modelo de FINNEY (1971).

Los tiempos letales medios (TL₅₀) se obtienen según la fórmula de BIEVER y HOSSETTER (1971). Los valores se someten a un análisis de la varianza y, en el caso de existir diferencias significativas, las medias se comparan mediante el test LSD.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los porcentajes de mortalidad de las larvas de *S. littoralis* y *S. exigua* en sus respectivos ensayos de producción del VPNSI fueron del 84,42 % y 87,84 %, respectivamente, valores que se consideran apropiados para un buen rendimiento de la multiplicación «in vivo» de baculovirus (SHAPIRO, 1986).

Las producciones, tanto en el hospedador natural como en el alternativo, fueron del mismo orden de magnitud con valores de

$1,37 \times 10^8$ CI/larva y $1,08 \times 10^8$ CI/larva, respectivamente. Estos rendimientos son comparables a los obtenidos en otros sistemas hospedador-baculovirus, como el del VPNSe en larvas de *S. exigua* (SMITS y VLAK, 1988).

En el Cuadro 1 se indican las mortalidades larvarias en los bioensayos de actividad biológica del inóculo de partida y de los biopreparados obtenidos del hospedador natural (VPNSI-SI) y del alternativo (VPNSI-Se). Estos resultados sirvieron de base para la estimación de las respectivas rectas de regresión Probit (Figura 1) que tuvieron un ajuste estadísticamente aceptable, a excepción del producto obtenido de larvas de *S. littoralis* ($\chi^2 = 15,6; 2 \text{ gl}$). Se observa una tendencia creciente de la pendiente de la recta tras la multiplicación del inóculo. Este incremento en la uniformidad de respuesta de las larvas sometidas al tratamiento puede venir motivada por una disminución de la heterogeneidad de virus como consecuencia de su multiplicación «in vivo».

Cuadro 1.-Mortalidad de larvas de *Spodoptera littoralis* tratadas en tercer estadio con el inóculo de partida del VPNSI, el multiplicado en *S. littoralis* (VPNSI-SI) y el multiplicado en *S. exigua* (VPNSI-Se)

Producto	Dosis CI/larva	N	Mortalidad	
			n	%
Testigo	0	81	0	0,00
Inóculo	512	112	27	24,10
	2.560	110	44	40,00
	12.800	109	68	62,38
	64.000	117	96	82,05
VPNSI-SI	512	112	48	42,85
	2.560	106	47	44,33
	12.800	118	100	84,74
	64.000	117	112	95,72
VPNSI-Se	512	117	31	26,49
	2.560	110	63	57,27
	12.800	117	92	78,63
	64.000	118	109	92,37

N: número de larvas tratadas.
n: número de larvas muertas de poliedrosis.

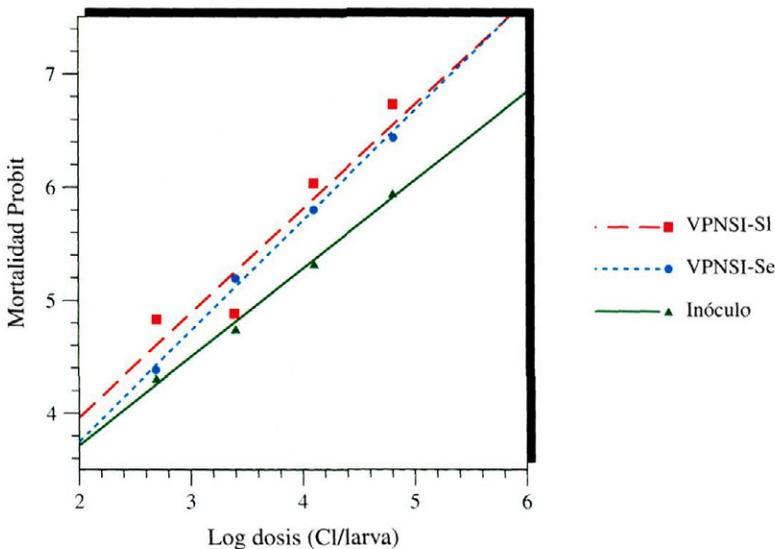


Fig. 1.-Rectas de regresión del inóculo de partida y del VPNSI multiplicado en el hospedador natural (VPNSI-SI) y en el alternativo (VPNSI-Se).

Cuadro 2.—Ecuaciones de regresión de las rectas obligadas a paralelismo, dosis letales medias y potencias relativas de los productos virales

Producto	Ecuaciones rectas de regresión Probit (*)	DL ₅₀ CI/larva	Límites fiduciales (95%)	Potencias relativas	Límites fiduciales (95%)
Inóculo	$Y = 0,89x + 1,73$	4.802	2.589-8.801	1	—
VPNSI-SI	$Y = 0,89x + 2,22$	1.323	643-2.486	3,63	1,53-9,33
VPNSI-Se	$Y = 0,89x + 2,10$	1.844	930-3.340	2,61	1,11-6,51

(*) $y = bx + a$; donde y : mortalidad Probit, x : log dosis.

El test χ^2 de paralelismo para las rectas de regresión estimadas no dio, sin embargo, diferencias significativas, por lo que se procedió a un nuevo ajuste de las rectas con la condición de paralelismo y al cálculo de las respectivas DL₅₀ y sus límites fiduciales (Cuadro 2).

Las DL₅₀ del virus producido en el hospedador natural y en el alternativo fueron similares y significativamente menores que la del inóculo de partida. Según se desprende de los valores de las potencias relativas y límites fiduciales (Cuadro 2), ambos productos virales no difirieron en actividad, pero fueron significativamente más virulentos que el inóculo de partida. El aumento de virulencia tras la multiplicación del virus en ambos hospedadores, se detecta también en los tiempos letales medios (Cuadro 3) que disminuyen de manera significativa con respecto al inóculo, en especial a la dosis de 12.800 CI/larva.

La heterogeneidad de las poblaciones naturales de baculovirus, que ha sido demostrada por la identificación y aislamiento de variantes genotípicas (LEE y MILLER, 1978; SMITH y SUMMERS, 1978; MARUNIAK *et al.*, 1984), puede explicar el incremento de virulencia del VPNSI al haber sido seleccionados los genotipos más virulentos. Este aumento de la virulencia también pueden estar motivado por modificaciones en la estructura morfológica de los cuerpos de inclusión formados, como ha sido demostrado para el VPN de *A. californica* multiplicado en larvas de *S. exigua* (TOMPKINS *et al.*, 1981).

El hospedador alternativo, *S. exigua*, no ha sido determinante en el aumento de la vi-

Cuadro 3.—Actividad biológica en términos de tiempos letales medios (TL₅₀) de cada uno de los productos virales

Dosis (CI/larva)	Producto	TL ₅₀ * (días)
12.800	Inóculo	12,06 a
	VPNSI-SI	7,46 b
	VPNSI-Se	8,52 b
64.000	Inóculo	7,21 a
	VPNSI-SI	6,76 ab
	VPNSI-Se	6,43 b

(*) Medias seguidas por la misma letra, en cada dosis, no difieren significativamente al 5 %.

rulencia, pues se da en igual medida cuando el inóculo se multiplica en el hospedador natural. En la multiplicación de otros baculovirus sobre hospedadores alternativos sólo se ha señalado reducción (STAIRS *et al.*, 1981; MARTIGNONI e IWAI, 1986) o mantenimiento de la virulencia con respecto a la del inóculo (SHAPIRO *et al.*, 1982).

De estos resultados se deriva la posibilidad de mejora, mediante selección biológica, de la actividad insecticida del VPNSI con vistas a su utilización en la lucha contra su hospedador natural, *S. littoralis*.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, a través del Proyecto AGR90-0445, el apoyo económico que ha hecho posible la realización del presente trabajo.

ABSTRACT

MARACAJÁ, P. B.; VARGAS-OSUNA, E. y SANTIAGO-ALVAREZ, C., 1994: Biological activity of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus obtained from natural and alternate, *Spodoptera exigua*, hosts. *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**(2): 495-499.

The productions per larva of the *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus obtained in *S. littoralis* and *S. exigua*, natural and alternate host respectively, were in the same order.

Biological activities of the original inoculum and the viral products obtained from each host were determined on third-instar *S. littoralis* larvae. No significant differences were found between the slopes of the regression lines log dose - Probit mortality. The LD₅₀ of the inoculum (4802 IB/larva) was significantly higher than ones obtained from *S. littoralis* (1323 IB/larva) and from *S. exigua* (1844 IB/larva), that were not significantly different. On the bases of relative potencies, the products obtained from *S. littoralis* and *S. exigua* larvae were significantly more virulent (3,63 y 2,60, respectively) than the original inoculum.

Key words: *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera exigua*, Nuclear polyhedrosis virus, Virulence.

REFERENCIAS

- BIEVER, K. D. y HOSTETTER, D. L., 1971: Activity of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper evaluated at programmed temperatures regimens. *J. Invertebr. Pathol.*, **18**: 81-84.
- FINNEY, D. J., 1971: *Probit analysis*. Cambridge University Press. 333 pp.
- GRIFFITH, I. P., 1982: A new approach to the problem of indentifying baculoviruses. En: *Microbial and viral pesticides* (E. Kurstak, Ed.). Marcel Dekker. New York. Cap. 15. pp. 507-531.
- GRÖNER, A., 1986: Specificity and safety of baculoviruses. En: *The biology of baculoviruses*. Vol. I (R. R. Granados y B. A. Federici, Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. Cap. 9. pp. 177-202.
- HUBER, J., 1986: Use of baculoviruses in pest management programs. En: *The biology of baculoviruses*. Vol. II (R. R. Granados y B. A. Federici, Eds.). CRC Press. Boca Raton, Florida. Cap. 7. pp. 181-202.
- LEE, H. H. y MILLER, L. K., 1978: Isolation of genotypic variants of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.*, **27**: 754-767.
- MARTIGNONI, M. E. e IWAI, P. J., 1986: Propagation of multicapsid nuclear polyhedrosis virus of *Orgyia pseudotsugata* in larvae of *Trichoplusia ni*. *J. Invertebr. Pathol.*, **47**: 32-41.
- MARUNIAK, J. E.; BROWN, S. E. y KNUDSON, D. L., 1984: Physical maps of SFMNPV baculovirus DNA and its genomic variants. *Virology*, **136**: 221-234.
- MOAWED, S. M. y ELNABRAWY, I. W., 1987: Effectiveness of nuclear polyhedrosis virus and insecticides against the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Insect Science and its Application*, **8**: 89-93.
- SANTIAGO-ALVAREZ, C., 1977: *Virus de insectos: Multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus*. Serie Universitaria 43. Fundación Juan March. 99 pp.
- SANTIAGO-ALVAREZ, C. y ORTIZ-GARCÍA, R., 1992: The influence of host plant on the susceptibility of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lep., Noctuidae) larvae to *Spodoptera littoralis* NPV (Baculoviridae, Baculovirus). *J. Appl. Ent.*, **114**: 124-130.
- SANTIAGO-ALVAREZ, C. y VARGAS-OSUNA, E., 1988: Reduction of reproductive capacity of *Spodoptera littoralis* males by a nuclear polyhedrosis virus (VPN). *J. Invertebr. Pathol.*, **52**: 142-146.
- SHAPIRO, M., 1986: In vivo production of baculovirus. En: *The biology of Baculoviruses*. Vol. II (R. R. Granados y B. A. Federici, Eds.) CRC Press. Boca Raton, Florida. Cap. 2. pp. 31-61.
- SHAPIRO, M.; MARTIGNONI, M. E.; CUNNINGHAM, J. C. y GOODWIN, R. H., 1982: Potential use of the salmarsh caterpillar as a production host for nucleopolyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.*, **75**: 69-71.
- SMITH, G. E. y SUMMERS, M. D., 1978: Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases. *Virology*, **89**: 517-527.
- SMITS, P. M. y VLAK, J. M., 1988: Quantitative and qualitative aspects in the production of a nuclear polyhedrosis virus in *Spodoptera exigua* larvae. *Ann. Appl. Biol.*, **112**: 249-257.
- STAIRS, G. R.; FRASER, T. y FRASER, M., 1981: Changes in growth and virulence of a nuclear polyhedrosis virus from *Choristoneura fumiferana* after passage in *Trichoplusia ni* and *Galleria melonella*. *J. Invertebr. Pathol.*, **38**: 230-235.
- TANADA, Y. y KAYA, H. K., 1993: Microbial Control. En: *Insect pathology*. Academic Press. San Diego. Cap. 15. pp. 554-594.
- TOMPKINS, G. J.; VEUGHN, J. L.; ADAMS, J. R. y REICHELDERFER, C. F., 1981: Effects of propagating *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus and its *Trichoplusia ni* variant in different hosts. *Environ. Entomol.*, **10**: 801-806.
- VARGAS-OSUNA, E.; ALDEBIS, H. K.; CABALLERO, P.; LIPA, J. J. y SANTIAGO-ALVAREZ, C., 1994: A newly described *Baculovirus* (Subgroup B) from *Ocnogyna baetica* (Rambur) (Lepidoptera: Arctiidae) in Southern Spain. *J. Invertebr. Pathol.*, **63**: 31-36.