



# Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida

**PATRICIA TAMEZ GUERRA\*, VIOLETA ZAMUDIO\*, JOSÉ LUIS MARTÍNEZ CARRILLO\*\*, CRISTINA RODRÍGUEZ-PADILLA\*, REYES S. TAMEZ GUERRA\* Y RICARDO GÓMEZ FLORES\***

Dentro del grupo de los baculovirus, los más importantes en programas de control biológico de insectos plaga de cultivos son los virus de la poliedrosis nuclear (NPV). El NPV con inclusiones múltiples, aislado de *Anagrapha falcifera* (Kirby) (AfMNPV), se puede emplear para el control de varios insectos lepidópteros de importancia agronómica.<sup>1</sup> El NPV, con inclusión simple infectivo a las especies *Heliothis/Helicoverpa* (HzSNPV), es de gran importancia debido a que estos insectos se presentan como plagas polifagas alrededor del mundo. Por lo anterior, uno de los productos biológicos a base de baculovirus es de HzSNPV (Gemstar®). También se ha observado que el empleo de abrillantadores ópticos, del grupo químico de los estilbenes, en combinación con fagoestimulantes, puede potenciar la actividad de algunos baculovirus. En una formulación se pueden combinar el fagoestimulante, el abrillantador óptico y el virus, esta combinación podría ayudar a mejorar la actividad residual, vida de anaquel y manejo de estos productos. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar: 1) la actividad insecticida de diferentes lotes de

AfMNPV sobre *T. ni*, *H. virescens* y *S. exigua*; 2) el efecto del hospedero en la actividad insecticida del AfMNPV; 3) los formulados granulares con y sin abrillantadores ópticos sobre la actividad viral; 4) la estabilidad del AfMNPV almacenado a diferentes temperaturas.

## Material y métodos

### Insectos

La actividad insecticida de AfMNPV se determinó por bioensayos sobre larvas de *Heliothis virescens*, *Spodoptera exigua* y *Trichoplusia ni*, de la cría de insectos del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, empleando la dieta artificial y condiciones de incubación previamente reportadas.<sup>2</sup>

\*Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

\*\*Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO), Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Ciudad Obregón, Son., México.

Correo electrónico: [patamez@hotmail.com.mx](mailto:patamez@hotmail.com.mx), [patamez@uanl.mx](mailto:patamez@uanl.mx)

### Baculovirus

El AfMNPV y el producto comercial empleado como control positivo, Gemstar®, elaborado con baculovirus HzSNPV (patogénico a *Heliothis virescens* y *Helicoverpa zea*), fueron suplidos por el National Center for Agriculture Utilization Research (NCAUR-USDA-ARS) de Peoria, IL, USA, obtenido originalmente de Thermo Trilogy, hoy Certis USA (Columbus, MD, USA).

### Producción in vivo

Se obtuvieron tres lotes de AfMNPV y uno de HzSNPV. La producción se realizó por infección de larvas del cuarto larvario de *H. virescens* o *T. ni*. El número calculado de cuerpos de oclusión (OB) sirvió para determinar las concentraciones necesarias de cada experimento y para poder determinar la concentración letal media (CL<sub>50</sub>). Además se determinó el número de OB del Gemstar® con la ayuda de un hemocitómetro, en un microscopio óptico.

### Formulación

Los ingredientes de la formulación por cada 50ml de agua fueron: 1.0g de lignato de sodio (PC-1307, Westvaco, Charleston Heights, SC), 10.0g de sacarina (Sigma-Adrich, St Louis, MO), 2.0g de carbopol Ultrez® polymer (GF Goodrich, Cleveland, OH), 10.0 ml de aceite de maíz (Maceite®, Promotora de Productos y Mercados Mexicanos, Guadalajara, México) en combinación de 10.0g del fagoestimulante, ya fuera almidón de maíz (Maizena®, Unilever de México, Tultitlán, estado de México, México), pan molido (Bimbo, Monterrey, N. L., México), harina de maíz pregelatinizada (Flour 965; Illinois Central Mills, Paris, IL) o germen de trigo (Nutrisa, Ciudad de México), para dar un total de cuatro combinaciones. Cada combinación se mezcló con agua destilada o con un abrillantador óptico: 0.1g de Tinopal UNPA-GX (Spectrum Chemical Corp., Gardena, CA) ó 0.1ml de Blankophor BBU (Cas #16470-24-9, INC Biomedical Inc., Aurora, OH). Por separado, la lignina se puso en agitación en agua por al menos

una hora (para permitir que los radicales reaccionaran con el agua) y se ajustó el pH a 7.0±0.5 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o NaOH al 0.1%. Aceite, azúcar y carbopol se combinaron a mano, con ayuda de una espátula, y una vez homogénea se agregó el virus (AfMNPV o HzSNPV), la solución de lignina y el abrillantador óptico o agua (según el caso) a la muestra, en agitación constante hasta obtener una masa suave. Posteriormente se procedió la elaboración de los gránulos, como se ha reportado antes.<sup>3</sup>

### Actividad insecticida

La actividad insecticida se determinó como la concentración letal al 50% (CL<sub>50</sub>), usando bioensayos similares a los empleados para la bacteria *B. thuringiensis*, ya que el modo de acción de ambos es muy similar (el agente activo actúa por ingestión), usando la técnica de alimentación con gotas teñidas descrita por Behle *et al.*<sup>4</sup> Las suspensiones virales a evaluar se prepararon con un control sin cuerpos de oclusión (OB) y cinco concentraciones virales en un rango de 1.2x10<sup>3</sup> a 5.0x10<sup>6</sup> OB/ml, las cuales, se ha reportado, conllevan a una mortalidad del 10 al 90%.<sup>4</sup> Para la evaluación del AfMNPV contra *S. exigua*, se emplearon concentraciones de hasta 10<sup>8</sup> OB/ml. Para lograrlo, primero se prepararon soluciones madres a partir del tratamiento, las cuales contenían ~ 2.0x10<sup>9</sup> OB por unidad (gramo en caso de formulado o mililitro en caso de virus sin formular). Las soluciones madres se ajustaron a 1x10<sup>8</sup> OB/ml, y se prepararon en forma de solución teñida. Esta solución contenía colorante en polvo azul para alimentos al 0.4% p/v y azúcar al 2% p/v en agua destilada. A partir de esta solución madre se prepararon las diluciones seriadas, también en solución teñida. De cada dilución se tomaron muestras, con ayuda de una pipeta Pasteur, y de la muestra se depositaron gotitas alrededor de una caja de Petri desechable de cierre hermético (SOLO®) para evitar su evaporación. En el centro de la caja se depositaron larvas neonatas del insecto a evaluar y se dejaron alimentando por cinco minutos. Las larvas que ingirieron la muestra se identificaron por la coloración azul al interior de la larva y se transfirieron individualmente a una copita con dieta artificial. Las larvas se incubaron

a condiciones de  $28 \pm 5^\circ\text{C}$  y  $55 \pm 5\%$  de HR por un período de siete días, realizando conteos de larvas vivas y muertas para los análisis de actividad insecticida en ambas fechas. Cada experimento se realizó tres veces, en días diferentes, y los datos se usaron como repeticiones. Los datos sin transformar se analizaron empleando un análisis de regresión probit (POLO-PC).<sup>5</sup>

#### *Evaluación en campo*

Se evaluó la actividad insecticida de las formulaciones con AfMNPV y HzSNPV, sobre plantas de maíz después de exponerse a radiación solar natural, contra lepidópteros plaga de maíz en un experimento realizado en el Centro de Investigaciones Agrícolas del Noroeste (CIANO) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en Ciudad Obregón, Sonora, en octubre de 2002. El terreno se delimitó por parcelas, donde cada repetición representó un área de  $5\text{m}^2$  y los bloques con los tratamientos, separados entre sí por  $1\text{m}^2$ . Se contó el número de plantas por parcela con daño aparente por *Spodoptera frugiperda* antes de iniciar con la aplicación de los tratamientos. Los tratamientos consistieron en siete formulados elaborados con el virus AfMNPV producido en el laboratorio (lotes 1 y 2 producido en *T. ni* y otro lote producido sobre HzSNPV); tres elaborados con un virus comercial (Gemstar®), un control químico (Avaunt, DuPont, México D.F.) y un control sin aplicar. Ambos virus se aplicaron a razón de  $2.0 \times 10^{12}$  OB/hectárea. Los formulados se seleccionaron con base en los resultados obtenidos en pruebas de laboratorio. El producto químico Avaunt [Indoxacarbol (S)-metil 7-cloro-2 (metoxycarbonil) 4-trifluorometoxifenil -2,5 carbamoil dihidro- 1,2-e-1,3,4 oxadiazina-4a (3H)-carboxilato] (gránulos dispersables, con 300g de ingrediente activo por kilogramo), se aplicó a razón de 100g/hectárea. Los tratamientos se aplicaron de las 8:30 a las 9:30 horas. Los tratamientos consistieron en el virus sin formular, ocho variaciones de virus formulado, un control químico y un control absoluto. Los tratamientos aplicados se identificaron con la clave por el tipo de baculovirus (AfMNPV=Af, HzSNPV=Hz), seguido por el número de lote y el insecto produci-

do (*T. ni*=Tni, *H. virescens* =Hv), por ejemplo, Af1/Tni. No se realizaron infestaciones artificiales con larvas, sólo la infestación natural que se encontró en el terreno de prueba. Después de 24 h de la aplicación de los tratamientos, se contabilizó en número de masas de huevecillos, número de larvas muertas a simple vista y número de plantas dañadas. A las 96 h de la aplicación se contó el total de larvas presentes en cuatro plantas seleccionadas al azar por repetición por tratamiento. Las larvas vivas se transfirieron a dieta artificial y se incubaron hasta completar ocho días. Se registró el porcentaje de mortalidad en cada lectura, el número de pupas y la presencia de enemigos naturales para cada tratamiento. Los datos obtenidos se analizaron por ANOVA.

#### *Vida de anaquel del AfMNPV*

Para evaluar la estabilidad durante el almacenamiento del AfMNPV sin formular o en formulaciones granulares, cada formulado se guardó en bolsas de plástico de cierre hermético (Zip-lock®) a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  y a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  en un refrigerador de laboratorio. Cada mes, hasta completar ocho, se evaluó la actividad insecticida usando sólo una concentración del virus, para evaluar el porcentaje de actividad insecticida remanente (% OAR) y cada tres meses, a los formulados almacenados a temperatura ambiente, se evaluó con seis dosis para calcular la  $CL_{50}$  de la forma antes descrita. Ambas pruebas se realizaron por triplicado en días diferentes y las dosis a evaluar se ajustaron con base en los resultados obtenidos en análisis previos. Además se determinó el contenido de humedad, tomando un gramo de cada formulado, usando un *Infrared moisture determination balance* (A&D Co. Ltd., Japan).

## Resultados

#### *Actividad insecticida*

El lote de AfMNPV producido en *H. virescens* fue significativamente menos activo ( $CL_{50} = 5.6 \times 10^6$  OB/ml; tabla I) que el producto comercial de

HzSNPV (Gemstar®) y el HzSNPV (USDA) producido en *H. virescens* (Hz/Hvs;  $CL_{50}$ =0.7 y 1.4 x 10<sup>5</sup> OB/ml, respectivamente).

Tabla I. Análisis Probit de lotes de AfMNPV, HzSNPV (USDA) y Gemstar® contra larvas de *Heliothis virescens*, en un bioensayo de gota teñida.

Lote <sup>a</sup>	$CL_{50}$ (OB/ml x10 <sup>5</sup> ) (IC <sub>95</sub> ) <sup>b</sup>	Inter	P ± EE
Af1/Hv	0.56 (0.38-0.85)	0.16	1.61 ± 0.11
Hz1/Hv	1.40 (1.00-5.20)	0.28	0.91 ± 0.10
HzG/Hv	0.70 (0.50-1.00)	0.15	0.91 ± 0.08

<sup>a</sup>Af1/Hv, Hz1/Hv y HzG/Hv=lote 1 de AfMNPV, o de HzSNPV del USDA o Gemstar®, los tres producidos en *H. virescens*. Mortalidad del control menor al 16%.

<sup>b</sup> Los valores de  $CL_{50}$  están dados con valores de  $\chi^2$ , con tres grados de libertad, IC<sub>95</sub>=Intervalos de confianza al 95%, Inter= intercepto, P ± EE= Pendiente ± error estándar. Regresión del probit por POLO-PC (5), basado en seis concentraciones por muestra.

El lote de AfMNPV obtenido de USDA mostró una alta actividad contra *T. ni* con una  $CL_{50}$ =3.1x10<sup>4</sup> OB/ml (tabla II).

Tabla II. Análisis Probit de lotes de AfMNPV contra larvas de *Trichoplusia ni*, en un bioensayo de gota teñida.

Lote <sup>a</sup>	$CL_{50}$ (OB/ml x10 <sup>4</sup> ) (IC <sub>95</sub> ) <sup>b</sup>	Inter	P ± EE
AfU	3.1 (1.5-6.3)	0.32	0.93 ± 0.13
Af1/Tni	2.6 (0.2-7.8)	0.29	1.10 ± 0.11
Af2/Tni	3.0 (0.9-68)	0.39	0.80 ± 0.09
Af1/Hv	17.8 (7.5-35)	0.27	0.92 ± 0.12

<sup>a</sup> Af1 y Af2/Tni, lotes 1 y 2 de AfMNPV producidos en *T. ni*; AfU, y Af1/Hv, lotes del USDA y lote 1 producido en *H. virescens*. Mortalidad del control menor al 7%.

<sup>b</sup> Los valores de  $CL_{50}$  están dados con valores de  $\chi^2$  con tres grados de libertad, IC<sub>95</sub>=Intervalos de confianza al 95%, Inter = intercepto, P ± EE = pendiente ± error estándar. Regresión del probit por POLO-PC (5), basado en seis concentraciones por muestra.

A partir de este lote de AfMNPV se elaboraron dos nuevos lotes de AfMNPV usando *T. ni* y *H. virescens*. Los lotes de AfMNPV con *T. ni* mostraron una actividad insecticida muy similar a la del lote original del USDA ( $CL_{50}$  = 2.6 a 3.1 x 10<sup>4</sup> OB/ml), mientras que el lote que se produjo con *H. virescens* mostró menor actividad de una magnitud de un orden ( $CL_{50}$  = 1.8 x 10<sup>5</sup> OB/ml; tabla II).

La actividad insecticida de los diferentes lotes evaluados contra *S. exigua* fue nula ( $CL_{50}$  > 10<sup>8</sup> OB/ml) y no fue posible realizar un análisis Probit.

#### Actividad del AfMNPV en formulaciones granulares

Las formulaciones granulares con fagoestimulantes y abrillantadores ópticos no afectaron negativamente la capacidad insecticida del AfMNPV, ya que no se observaron diferencias significativas en la actividad contra *T. ni* de éstos al compararse con el virus sin formular, con valores de  $CL_{50}$  desde 1.8 x 10<sup>4</sup> hasta 2.1 x 10<sup>5</sup> OB/ml (tabla III).

El lote Af1/Tni mostró menor actividad con dos órdenes de magnitud contra *H. virescens* que contra *T. ni*, como lo muestran los valores de  $CL_{50}$  en las figuras 3 y 4. Sin embargo, no se observaron diferencias contra *H. virescens*, con este lote entre el virus formulado o sin formular con valores de  $CL_{50}$  desde 1.2 hasta 4.5 x 10<sup>6</sup> OB/ml (tabla IV).

Tabla III. Análisis Probit del AfMNPV, formulaciones granulares con o sin abrillantadores ópticos contra larvas de *Trichoplusia ni*, en un bioensayo de gota teñida.

Tratamientos <sup>a</sup>	$CL_{50}$ (OB/ml x10 <sup>4</sup> ) (IC <sub>95</sub> ) <sup>b</sup>	Inter	P ± EE
<b>Almidón</b>			
Af1/Tni	6.6 (0.90-40)	0.35	0.52 ± 0.07
Af2/Tni	1.2 (ND)	0.22	0.94 ± 0.20
Af1/Tni-Tino	6.5 (ND)	0.32	0.60 ± 0.11
<b>Pan molido</b>			
Af1/Tni-B'ph	1.0 (ND)	0.47	0.34 ± 0.07
Af2/Tni-B'ph	9.8 (1.90-54)	0.36	0.52 ± 0.08
Af/Hv-B'ph	7.0 (0.10-32)	0.40	0.43 ± 0.09
<b>Germen</b>			
Af1/Tni-Tino	20 (4.30-160)	0.36	0.53 ± 0.08
Af2/Tni-Tino	5.9 (1.30-17)	0.35	0.68 ± 0.07
Af/Hv	1.8 (0.15-6.4)	0.41	0.41 ± 0.06
Sin formular <sup>b</sup>	2.6 (1.00-7.1)	0.20	1.01 ± 0.13

Los valores de  $CL_{50}$  están dados con valores de  $\chi^2$  con tres grados de libertad, IC<sub>95</sub>=Intervalos de confianza al 95%, Inter =intercepto, P ± EE = pendiente ± error estándar Regresión del probit por POLO-PC (5), con base en seis concentraciones por muestra. Mortalidad del control menor al 8%.

<sup>a</sup>Af1/Tni y Af2/Tni, lotes 1 y 2 de AfMNPV producidos en *Trichoplusia ni*; Af/Hv es lote de AfMNPV producido en *H. virescens*. Tino=Tinopal UNPA-GX y B'ph =Blankophor BBU.

<sup>b</sup>Virus control sin formular y sin abrillantador.

ND -no fue posible determinar el intervalo de confianza.

### Evaluación en campo

En el experimento de campo las plantas contabilizadas por repetición (en dos surcos de 1 x 5 m<sup>2</sup>) fueron de 50-58. Los promedios de plantas dañadas fueron de 12 a 21. El lepidóptero plaga que se presentó en el cultivo fue *S. frugiperda*, y no se observó actividad insecticida contra este insecto en los tratamientos con virus (valores de 0 a 14.6%), a excepción del químico, el cual mostró el control más efectivo después de 48 h de la aplicación de tratamientos (45.5% de mortalidad de larvas, datos no mostrados).

### Vida de anaquel y contenido de humedad de los formulados granulados de AfMNPV durante el almacenaje

Los resultados del bioensayo de dosis única realizados durante ocho meses al AfMNPV mostraron una fuerte pérdida de actividad después de ser almacenados a ~25 ± 2°C, con valores remanentes del 7 al 20% de la actividad original (% OAR) después de cuatro meses.

En contraste, los formulados almacenados a 4°C mostraron un 50% OAR después de cuatro meses y >30% OAR después de ocho meses de almacenado. Los bioensayos de concentración-respuesta realizados con los formulados almacenados

a 25°C mostraron una pérdida de actividad de ~1 logaritmo para el virus sin formular, frente a ~3 logaritmos para el formulado con almidón de maíz con o sin Tinopal UNPA-GX y con pan molido +Blankophor BBU (figura 1).

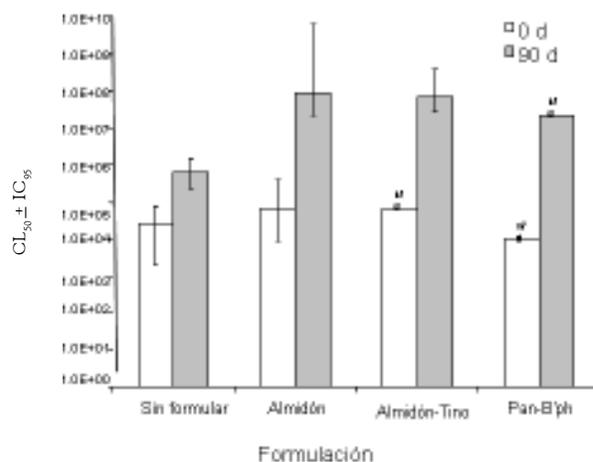


Fig. 1. Vida de anaquel del AfMNPV sin formular y formulado almacenado por 0 y 90 días a 25±2°C.

El promedio de la mortalidad de las larvas control no excedió el 5%. El contenido de humedad de los formulados, evaluado por pérdida de peso con radiación infrarroja, se incrementó del 9.2% al 12.8% después de tres meses de almacenado a 25°C.

### Discusión

Mientras que la mayoría de los baculovirus son patógenos altamente específicos al hospedero, el AfMNPV puede infectar y matar a diferentes lepidópteros de importancia agronómica.<sup>6</sup> Esto permitió producir dos lotes del AfMNPV con larvas de *T. ni* y uno con larvas de *H. virescens*. La actividad insecticida del AfMNPV varió según el hospedero, siendo mayor para *T. ni* y nula para *S. exigua*. Los bioensayos indicaron que el AfMNPV obtenido del USDA no perdió actividad por manejo y envío, después de evaluarlo contra *T. ni*. No se evaluó el HzSNPV contra *T. ni*, ya que este virus sí es específico al hospedero.

En este estudio se evaluó la actividad del AfMNPV después de formularlo con diferentes

Tabla IV. Análisis Probit del AfMNPV lote Af1/Tni en formulaciones con o sin abrillantadores ópticos contra larvas de *Heliothis virescens*, en un bioensayo de gota teñida.

Tratamientos <sup>a</sup>	CL <sub>50</sub> (OB/ml x10 <sup>6</sup> ) (IC <sub>95</sub> ) <sup>b</sup>	Inter	P ± EE
Harina maíz Af1/Tni-Tino	2.7 (1.50-4.3)	0.22	1.36 ± 0.14
Pan molido Af1/Tni-B'ph	4.5 (0.94-16)	0.23	1.06 ± 0.18
Germen Af1/Tni-B'ph	2.2 (1.10-3.8)	0.32	1.12 ± 0.16
Almidón Af1/Tni	1.9 (0.74-3.8)	0.28	0.84 ± 0.11
Sin formular <sup>b</sup>	1.2 (0.59-7.2)	0.30	0.93 ± 0.14

Regresión del Probit por POLO-PC (5), empleando seis concentraciones por muestra. Los valores de CL<sub>50</sub> están dados con valores de X<sup>2</sup> con tres grados de libertad. Mortalidad del control menor al 8%.

<sup>a</sup>Af1/Tni y Af2/Tni, lotes 1 y 2 de AfMNPV producidos en *Trichoplusia ni*; Af/Hv es lote de AfMNPV producido en *H. virescens*. Tino= Tinopal UNPA-GX y B'ph =Blankophor BBU.

<sup>b</sup>Virus control sin formular y sin con abrillantador.

polímeros de uso comestible, como el almidón, la harina de maíz y el gluten, los cuales, durante la producción, quedan en estado de pregelatinización y al mezclarse en agua caliente inducen la retrogradación de los polímeros, durante el cual los azúcares de la cadena formada por el polímero pasa a ser insoluble en agua.<sup>7</sup> Se buscó que durante el proceso AfMNPV quedase atrapado en esta estructura, que no se disolviera o se perdiera fácilmente después de ser aplicado en el cultivo, sino que permaneciese y fuera atractivo a la plaga, la cual podría disolver el formulado después de la ingestión y liberar al virus para que éste iniciara el proceso infeccioso.<sup>8</sup> Además, se ha observado que formulaciones similares, pero microcapsuladas, obtenidas mediante secado por aspersión, permiten la protección a la radiación solar.<sup>9</sup>

Asimismo, se observó que el pan molido, que es más económico que el almidón, el germen o la harina pregelatinizada de maíz, tiene actividad fagoestimulante similar a la de éstos. Sería importante evaluar en el futuro si confiere similar protección solar. Se ha reportado que algunos abrillantadores ópticos pueden fungir no sólo como protectores de la radiación solar, sino que pueden potenciar la actividad de diferentes baculovirus.<sup>10</sup> Sin embargo, en este trabajo no se realizaron infestaciones artificiales del insecto plaga como en previos reportes.<sup>8</sup> Se esperaba que se presentaran especies de *Heliothis/Helicoverpa*, los cuales pueden ser controlados por HzSNPV y AfMNPV. Por el contrario, la plaga que se presentó fue *S. frugiperda* y no hubo control con los formulados, aunque muestreos realizados por Martínez Carrillo en los años subsecuentes (datos sin publicar) indican la actividad residual de los virus.

En esta investigación se observó una pérdida de la viabilidad del AfMNPV en los formulados granulados, mayor a la reportada previamente con formulados microcapsulados.<sup>9</sup> La presencia de agua puede ser un factor muy importante en la pérdida de viabilidad del AfMNPV durante el almacenamiento.<sup>11</sup> La humedad permite el crecimiento de microorganismos, los cuales pueden degradar los compuestos orgánicos presentes en la cubierta viral.<sup>12</sup> Por esto se recomienda que la humedad final de los formulados comerciales sea de ~6%,<sup>13</sup> mien-

tras que los formulados granulados de este estudio mostraron un valor de humedad de ~10%, y el valor se incrementó durante el almacenamiento. Uno de los ingredientes fue el carbopol, un polímero altamente higroscópico. Esto podría ser el factor que permitió la alta humedad y su incremento durante el almacenamiento. En conclusión, el AfMNPV: 1) mostró mayor actividad insecticida contra *T. ni*, seguida por *H. virescens* y nula contra *S. exigua* y *S. frugiperda* (en campo); 2) el hospedero donde se produce puede afectar la actividad del mismo (se recomienda emplear larvas de *T. ni*); 3) el proceso de formulación con matrices fagoestimulantes no afectó su actividad *per se*, los abrillantadores ópticos Tinopal UNPA-GX y Blankophor BBU no incrementaron su actividad al formularlo; 4) los polímeros higroscópicos como el carbopol pudieran afectar su actividad durante el almacenamiento al aumentar la actividad del agua.

## Resumen

El virus de la poliedrosis nuclear con inclusiones múltiples de *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) es un bioplaguicida con potencial para el control de lepidópteros plaga de cultivos en América. Aquí se reporta la actividad insecticida del AfMNPV contra larvas de *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens* y *Spodoptera exigua*, evaluada por ensayo de gota teñida. El AfMNPV producido en *H. virescens* fue significativamente menos activo contra *H. virescens* en comparación con el virus homólogo (HzSNPV). El lote de AfMNPV producido en *T. ni* fue muy activo contra *T. ni*, mientras que el obtenido en *H. virescens* fue menos activo por un logaritmo. La actividad insecticida de AfMNPV contra *S. exigua*, con todos los lotes producidos, fue muy baja ( $LC_{50} > 10^8$  OB/ml). El formulado granular de AfMNPV con lignina en combinación con fagoestimulantes (almidón y harina de maíz, pan molido y germen de trigo) y abrillantadores ópticos (Tinopal UNPA-GX, Blankophor BBU) no afectó su actividad contra *T. ni* y *H. virescens*. El AfMNPV sin formular perdió actividad de ~1 logaritmo después de almacenarlo por 90 días a 25°C, mientras que el formulado con una humedad de ~10% perdió ~3 logaritmos. El formulado almacenado a 4°C mejo-

ró la estabilidad, conservando ~50% de la actividad original (%OAR) después de cuatro meses, y >30% OAR después de ocho meses. Se requieren de más estudios para mejorar la estabilidad durante el almacenaje.

**Palabras clave:** Formulación, Virus de la poliedrosis nuclear, AfMNPV, HzSNPV, *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni*, Abrillantadores ópticos, Bioensayos, Actividad insecticida, Estabilidad durante almacenado, Maíz.

## Abstract

The multicapsid nucleopolyhedrovirus of *Anagrapha falcifera* (AfMNPV) is a potential biopesticide for control of lepidopteran crop pests in the Americas. The insecticidal activity of AfMNPV against *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens*, and *Spodoptera exigua* was evaluated by droplet bioassay. The AfMNPV produced in *H. virescens* was significantly less active against *H. virescens* than the homologous virus (HzSNPV). Batches of AfMNPV produced in *T. ni* were highly active against *T. ni* whereas the batch produced in *H. virescens* showed a lower activity by 1 logarithm against *T. ni*. The insecticidal activity of all batches of AfMNPV against *S. exigua* was very low ( $LC_{50} > 10^8$  OB/ml). Granular formulations with lignin, phagostimulants (cornstarch, cornflour, ground bread, wheatgerm), or optical brightener viral synergists (Tinopal UNPA-GX, Blankophor BBU) did not adversely affect the insecticidal capacity of AfMNPV against neonate *T. ni* or *H. virescens*. Unformulated AfMNPV suffered a -1 logarithm loss of activity when stored for 90 days at 25°C, compared to a -3 logarithm loss of activity in granular formulations with -10% moisture. Storage at 4°C improved stability with 50% of original activity remaining (OAR) after 4 months and >30% OAR after 8 months. Further studies are required to determine how the stability of granular formulations may be improved during storage.

**Keywords:** Formulation, *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus, HzSNPV, *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera exigua*, Phago-

stimulants, Optical brighteners, Bioassay, Insecticidal activity, Storage stability, Maize.

## Agradecimientos

A Trevor Williams por la revisión del escrito; a Gabriela Damas, Sanjuanita Saucedo y Jesús A. Moreno (FCB-UANL, Monterrey) por su apoyo técnico. Este estudio fue apoyado en parte por Paicyt CN-0276 y Conacyt 36815-B

## Referencias

1. Lewis, F. B., & Rollinson, W. D. 1978. Effect of storage on the virulence of Gypsy moth nucleopolyhedrosis inclusion bodies. *J. Econ. Entomol.* 71, 719-22.
2. Wang, P. & Granados, R. R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 135-43.
3. Tamez-Guerra, P., Castro-Franco, R., et al. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* for activity against noctuid larvae using granular formulations (Lepidoptera). *J. Econ. Entomol.* 91, 86-93.
4. Behle, R. W., McGuire, M. R. & Tamez Guerra, P. 2000. Effect of light energy on alkali released virions from *Anagrapha falcifera* NPV. *J. Invertebr. Pathol.* 76, 120-126.
5. LeOra Software 1987. POLO-PC, a User's Guide to PROBIT or LOGIT Analysis. Berkeley, CA.
6. Hostetter, D. L. & Puttler, B. 1991. A new broad host spectrum nuclear polyhedrosis virus isolated from a celery looper, *Anagrapha falcifera* (Kirby) (Lepidoptera: Noctuidae). *Environ. Entomol.* 20, 1480-1488.
7. McGuire, M. R. & Shasha, B. S. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 83, 1813-1817.
8. McGuire, M. R., Tamez Guerra, P., et al. 2001. Environmental stability of entomopathogenic virus formulations. *J. Econ. Entomol.* 94, 1037-1044.
9. Tamez-Guerra, P., McGuire, M. R., et al. 2002. Storage stability of *Anagrapha falcifera*

- (AfMNPV) nucleopolyhedrovirus in spray-dried formulations. *J. Invertebr. Pathol.* 79, 7-16.
10. Dougherty, E. M., Guthrie, P. K. & Shapiro, M. 1996. Optical brighteners provide baculovirus activity enhancement and UV radiation protection. *Biol. Control.* 7, 71-74.
  11. Behle, R. W., Tamez Guerra, P. & McGuire M. R. 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus. *J. Econ. Entomol.* 96, 1066-1075.
  12. Burges, H. D. & Jones, K. A. 1998. In H. D. Burges (ed.) *Formulation of Microbial Biopesticides, Beneficial Microorganisms, Nematodes, and Seed Treatments* (Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers), 33-127.
  13. Hunter-Fujita, F. R., Entwistle, P. F., Evans, H. F. & Crook, N. E. 1998. *Insect Viruses and Pest Management* Chichester, UK: John Wiley & Sons.

Recepción: 24 de junio de 2005

Aceptación: 3 de noviembre de 2005