

F. AGUDELO*

M. ROMANO**

H. WASSINK*

R. CUELLO DE UZCATÉGUI**

Summary

*A nuclear polyhedrosis virus (\bar{x} polyhedra = 1.60 x 1.50 μ) with multiple enveloped nucleocapsids was found infecting *Spodoptera frugiperda* larvae collected in corn (*Zea mays*) plants in Venezuela. A dose of 6×10^6 polyhedra ingested by 7 or 10 day-old larvae caused 100 percent mortality with median lethal time of 4.7 and 7.3 days for each age group respectively*

Introducción

El gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es un insecto de considerable importancia económica en Venezuela (2) con escasa información sobre sus agentes bióticos de control natural (sobre todo microorganismos). Hasta el momento se han mencionado en este país el hongo *Nomuraea* (= *Spicaria*) *rileyi* (10), el protozooario *Nosema laphygmae* (11) y el nematodo *Hexameris* (3) como patógenos de este insecto en condiciones naturales. No existe aún ninguna referencia a virus.

Varias larvas de *S. frugiperda* recolectadas en plantas de maíz (*Zea mays* L.) en varias localidades del Valle de Aragua durante 1981 murieron en el laboratorio al estar siendo criadas en dieta artificial (1). Varios de los cadáveres de esas larvas se tornaron negros con gran desintegración de tejidos. Líquido exudado de estos restos presentaba al ser examinado microscópicamente gran cantidad de cristales poliédricos lo

cual sugería los síntomas típicos de una infección por un virus del tipo poliedrosis nuclear (9).

En este artículo se informa por primera vez la ocurrencia de este tipo de agente infectando a *S. frugiperda* en Venezuela.

Materiales y métodos

Para purificar los poliedros o cuerpos de inclusión (CI) del virus, se colocaron varios cadáveres, que exudaban líquido rico en éstos, en agua destilada y se dejaron descomponer por 8 días a 25°C. La parte sedimentada de esta suspensión fue separada de la fase líquida retirando ésta con una pipeta. El sedimento fue resuspendido en agua destilada, filtrado por gaza estéril y el filtrado centrifugado a 1 600 g por 15 minutos. El precipitado consistió casi enteramente de CI los cuales fueron suspendidos en agua destilada y almacenados a 6°C.

Detalles de forma externa y estructura interna del virus se determinaron usando microscopía electrónica de exploración o de transmisión, respectivamente. Para ésta se hicieron cortes de los CI de la forma siguiente: a una suspensión concentrada de CI se añadió glutaraldehído (2%) en cacodilato bufer 0.1 M pH 6.8 fijándolos por 24 horas a 4°C. Los CI fueron concentrados por centrifugación (400 g. por 5 minutos) y resuspendidos dos veces en cacodilato bufer 0.1 M pH 6.8. Los poliedros se postfijaron por 12 horas con tetraóxido de osmio (2%) en agua destilada, se

¹ Recibido para publicación el 30 de marzo de 1982.

* Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Instituto de Zoología Agrícola. Postgrado en Entomología. Apdo. 4579. Maracay 2101-A. Venezuela.

** Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Apdo. 1827. Caracas, Venezuela.

concentraron por centrifugación a (400 g por 5 minutos), se resuspendieron 2 veces en agua destilada (cada lavado 10 minutos). Los CI ya fijados y concentrados se agregaron a agar al 5% a 50°C y se centrifugaron a 6 000 g por 10 minutos. El bloque de agar con los CI incluidos en él fue cortado en bloques de 1 mm³ y deshidratados en una serie de etanol (30, 50, 70, 90, 100%). Se hicieron dos cambios de óxido de propileno y se infiltraron primero por 24 horas en una mezcla 1:1 de Epon 812 más óxido de propileno y luego en Epon 812 por 24 horas. Todas las operaciones anteriores se hicieron a 4°C. Los CI fueron incluidos en Epon 812 y se polimerizaron a 60°C por 48 horas. Los bloques se cortaron en secciones de 60 a 90 nm (ultramicrotomo Porter-Blum MT2); las secciones se colorearon por 5 minutos a 60°C con acetato de uranilo (5% en agua destilada), se lavaron con agua destilada, se volvieron a colorear por 5 minutos a temperatura ambiente con citrato de plomo (7) y se lavaron de nuevo con agua destilada. Las secciones fueron examinadas y fotografiadas con un microscopio electrónico JEOL JEM 100B a 80 KV.

Para la microscopía electrónica de exploración se colocó una pequeña gota de CI purificados por centrifugación sobre un cubreobjetos circular. La gota se dejó secar al aire en el laboratorio y luego fijada con vapor de formaldehído por 24 horas. Los poliedros en la gota fueron observados y fotografiados con un microscopio electrónico explorador Hitachi S-500 a 20 KV.

La infectividad de los CI para larvas de *S. frugiperda* se determinó administrando éstos a larvas de dos edades (7 y 10 días) criadas en el laboratorio. Cada edad estuvo representada por 20 larvas. Un tercer grupo control sirvió como referencia para determinar cualquier posible infección latente de virus en la colonia de donde provenían los insectos. La dosis de CI que ingirió cada larva fue de 6×10^6 (concentración determinada con una cámara contadora de partículas levy, modificada Neubauer). Para obtener la ingestión de los CI por las larvas se colocó una pequeña gota de éstos con una jeringuilla acoplada a un microdispensador (Microdispensador Hamilton PB 600) sobre un disco de 6 mm de diámetro de hoja tierna de maíz (producido en condiciones interiores de gran limpieza). Una vez que cada gota se secó al aire en el laboratorio se colocó cada disco individualmente en una celda húmeda en la cual se confinó una larva de cada una de las edades utilizadas. Al terminar cada larva de ingerir su disco se traspasó con un pincel estéril a un recipiente individual con dieta artificial. La mortalidad larval se determinó cada 24 horas y en cada caso se diagnosticó la causa de muerte por examen microscópico de los tejidos de los cadáveres. La

temperatura durante el periodo experimental osciló entre 23 a 24°C.

Resultados y discusión

El virus encontrado corresponde al tipo poliedrosis nuclear con viriones envueltos en forma múltiple en membranas dentro del CI (Fig. 1). Este virus es del mismo tipo mencionado por Kuno infectando *S. frugiperda* en Puerto Rico (5). Los CI tenían 4 ó 5 lados con diámetro no uniforme, con una dimensión a través mayor que la otra (Fig. 2). El tamaño osciló de $1.40 \times 1.20 \mu$ a $1.90 \times 1.60 \mu$ ($\bar{x} = 1.60 \times 1.50 \mu$; $n = 20$; $s = 0.80$ y 0.70 para la mayor y menor dimensiones respectivamente).

El virus fue altamente patogénico para larvas de 7 y 10 días de edad. Todas las larvas más jóvenes sucumbieron más rápido que las larvas más desarrolladas (Fig. 3) con tiempos letales medios de 4.7 y 7.3 días para cada grupo respectivamente. Esta diferencia puede interpretarse como un aumento en la resistencia de las larvas mayores a la infección viral probablemente explicable en base a su mayor peso lo cual contribuye a una disminución promedio de la dosis viral por unidad de peso de la larva (4). Susceptibilidad diferencial de larvas de lepidopteros a infecciones con virus de poliedros nuclear son conocidas también en el caso de *Malacosoma distria* (Hubner) (8) y *L. ambdina sonniaria* (Hulst) (6).

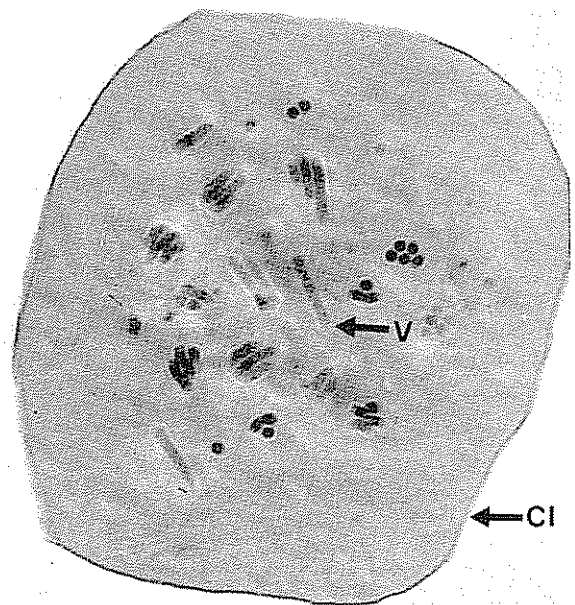


Fig. 1 Corte de cuerpo de inclusión (CI) de virus de poliedrosis nuclear de *S. frugiperda* V = virión (32500 X). Microscopio electrónico de transmisión

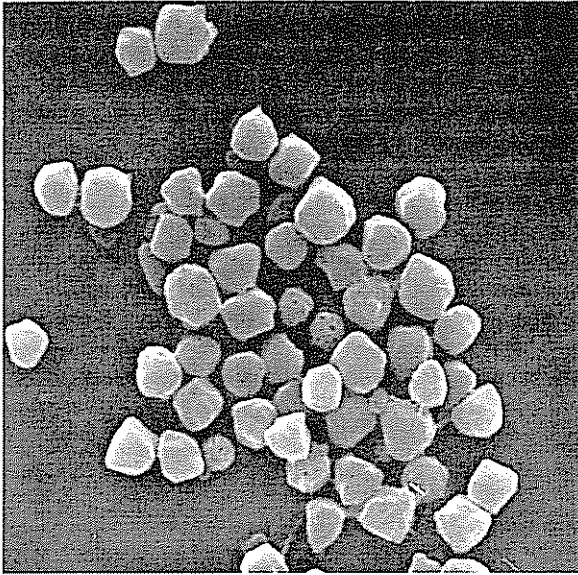


Fig 2 Cuerpos de inclusión de poliedrosis nuclear de *S frugiperda*. vistos con un microscopio electrónico explorador (4300 X).

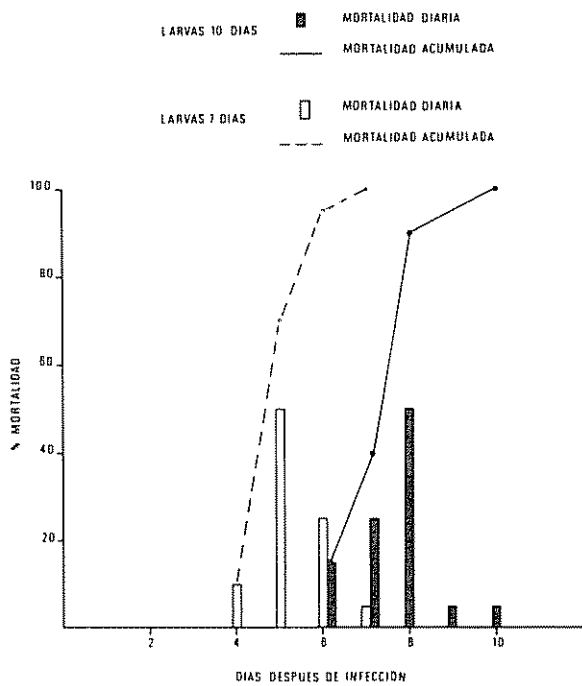


Fig 3. Patogenicidad de una poliedrosis nuclear para larvas de *S frugiperda* de 7 y 10 días de edad.

Es necesario continuar el estudio de este virus para determinar los estados más susceptibles del insecto y el efecto de la infección en la capacidad de la larva para consumir follaje de maíz. Esta información en

adición a pruebas de seguridad para otros organismos no considerados dañinos y capacidad de producción masiva del virus contribuirá al uso de esta poliedrosis como agente de manejo de poblaciones de *S. frugiperda* en Venezuela y otros países.

Resumen

Se halló un virus del tipo poliedrosis nuclear (\bar{x} de los poliedros = $1.60 \times 1.50 \mu$) infectando larvas de *Spodoptera frugiperda* recolectadas en maíz (*Zea mays*) en Venezuela. Una dosis de 6×10^6 poliedros ingeridos por larvas de 7 ó 10 días de edad causó 100 por ciento de mortalidad, con tiempos letales medios de 4.7 y 7.3 días respectivamente.

Literatura citada

1. BOWLING, C.C. Rearing of two lepidopterous pests of rice on a common artificial diet. Annual Entomology Society American 60(6):1215-1216. 1967.
2. CLAVIJO, S. y NOTZ, A. Fluctuaciones poblacionales en maíz de *Spodoptera frugiperda*, *Delphax maidis* y *Dalbulus maidis*, en San Nicolás Estado Portuguesa, Venezuela bajo condiciones de época lluviosa. Boletín Entomología Venezolana N.S. 1(1):1-20. 1978.
3. GUAGLIUMI, P. Las plagas de la caña de azúcar en Venezuela. Tomo II. pp. 569. Ministerio de Agricultura y Cría. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Caracas, Venezuela 1962.
4. IGNOFFO, C.M. Effects of age on mortality of *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* larvae exposed to a nuclear polyhedrosis virus. Journal Invertebrate Pathology 8:279-282. 1966.
5. KUNO, G. A nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* isolated in Puerto Rico. Journal Agriculture of University of Puerto Rico 63:162-169. 1979.
6. MORRIS, O.N. Quantitative infectivity studies on the nuclear polyhedrosis of the western Oak looper, *Lambdina fiscellaria somnaria* (Hulst). Journal Insect Pathology 4:207-215. 1962.
7. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron

- microscopy. *Journal of Cell. Biology* 17:208-212. 1963.
8. STAIRS, G.R. Quantitative differences in susceptibility to nuclear polyhedrosis virus among larval instars of the forest tent caterpillar, *Malacosoma disstria* (Hubner). *Journal Invertebrate Pathology* 7:427-429. 1965.
 9. STEINHAUS, E.A. Principles of insect pathology. McGraw-Hill Book Company, Inc. 1949. 757 p. New York.
 10. TERAN, J. Microorganismos patógenos de insectos plagas. In: *Memorias de las Jornadas Técnicas del Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Maracay, Venezuela. 1976.* pp. 45-48.
 11. WEISER, J. *Nosema laphygmae* ni sp. and the internal structure of the microsporidian spore. *Journal Insect Pathology* 1:52-59. 1959.