

Fotoprotección de preparaciones del virus de la poliedrosis nuclear (VPNAg) en condiciones de campo y laboratorio

Luis F. A. Alves¹
A. Batista Filho²
B. Nilson T. Augusto²

RESUMEN. En una plantación de soya (*Glycine max*) se evaluó el efecto de la hora de aplicación sobre la persistencia de preparaciones de VPNAg, comparando la fotoprotección conferida al patógeno por dos formulaciones. Las aplicaciones se realizaron a las 08:00h y a las 12:00h. Una hora después, así como a los tres y seis días después de la aplicación del virus se recolectaron folíolos de cada una de las parcelas tratadas y con ellos se alimentaron larvas de *Anticarsia gemmatalis*, mantenidas en laboratorio. Bajo las condiciones ambientales prevalientes durante el experimento no hubo relación entre la actividad patogénica de los productos evaluados y la hora de aplicación. La persistencia fue mayor con la formulación del patógeno con respecto al patógeno sin formular. La formulación en aceite emulsionable logró mayor persistencia que la formulación en polvo mojable, determinándose para el aceite emulsionable la mayor reducción en la actividad del patógeno entre los tres y seis días, solamente cuando la aplicación se realizó en el período de mayor incidencia de radiación ultravioleta (12:00h). Para la formulación de polvo mojable la reducción de la actividad ocurrió al tercer día después de la aplicación realizada a las 8:00h, a pesar de tener una menor UV, reduciéndose más para el sexto día. Este resultado coincide con lo observado para esta formulación aplicada a las 12:00h.

Palabras clave: *Anticarsia gemmatalis*, Soya, Virus de la Poliedrosis Nuclear, AgVPN, Formulación, Persistencia

ABSTRACT. Photoprotection of nuclear polyhedrous virus (VPNAg) under field and laboratory conditions.

The effect of the hour of application on the persistence of VPNAg preparations was evaluated on a soybean (*Glycine max*) plantation, comparing the photoprotection conferred by two formulations on the pathogen. The applications were performed at 8:00h and at 12:00h. After one hour, and also three and six days after application of the virus, leaves were collected from each of the treated plots and used as food for *Anticarsia gemmatalis* larvae, maintained in the laboratory. There was no relation between the pathogenic activity of the evaluated products and the hour of application under the prevalent ambient conditions of the experiment. The persistence of the formulated pathogen was greater than the pathogen without formulation. The formulation in oil emulsion achieved greater persistence than the formulation in wettable powder, the greatest reduction in pathogen activity for the oil emulsion was determined between three and six days, only when the application was performed in the period of highest incidence of ultraviolet radiation (12:00h). For the wettable powder formulation the reduction in activity occurred on the third day after the application performed at 8:00h, despite less UV, and was further reduced on the sixth day. This result coincides with the observations of this formulation applied at 12:00h.

Key words: *Anticarsia gemmatalis*, Soja, Nuclear Poliedrosis Virus, AgNPV, Formulation, Persistence.

Introducción

Un ejemplo del uso de virus para el control de plagas es el programa de control de la oruga de la soya, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) mediante VPNAg, desarrollado en Brasil. El Centro Nacional de Pesquisa de Soya de EMBRAPA inició en el decenio de los 70 la evaluación del control de *A. gemmatalis* mediante este virus, y actualmente,

aproximadamente un millón de hectáreas cultivadas con soya en Brasil son tratadas con el virus (Moscardi 1988).

La técnica es sencilla, se recomienda la recolección en el campo y posterior maceración de 50 larvas de *A. gemmatalis* muertas por VPNAg para la aplicación en una hectárea de soya. Los insectos recolecta-

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Cascavel, PR, Brasil, lfaalves@uol.com.br

²Instituto Biológico, Centro Experimental de Campinas. Brasil

dos se almacenan a baja temperatura para evitar su descomposición debido a la proliferación de microorganismos saprofitos (Moscardi 1983).

Una vez aplicados en el campo, los entomopatógenos, incluyendo los virus, son afectados directamente por factores ambientales como la radiación solar que puede inactivarlos. Así, Young y Yearian (1974) y Jaques (1985) afirmaron que la fracción ultravioleta (UV) del espectro solar es el principal factor de degradación de la actividad de los microorganismos porque actúa directamente sobre el ácido nucleico, inactivándolo en las primeras 48 h después de la aplicación.

La formulación de los entomopatógenos tiene el propósito de reducir o eliminar los factores que limitan la eficacia del producto, protegiendo los microorganismos mediante la incorporación de otras sustancias. Además es deseable que el producto formulado pueda ser almacenado en condiciones ambientales, evitando el uso de cámaras frigoríficas, las cuales no siempre están disponibles para los agricultores y encarecen el producto biológico.

Estudios realizados por Moscardi *et al.* (1985, 1989) y Batista Filho *et al.* (1992 a,b) mostraron la viabilidad de formular VPNAg, obteniendo resultados favorables con formulaciones como polvo mojable y aceite emulsionable.

Otra alternativa evaluada es la aplicación del insecticida biológico en las horas de menor incidencia de radiación solar, o sea por la mañana o al final de la tarde, para reducir el impacto inicial sobre el patógeno en el campo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la formulación en la fotoprotección de VPNAg, evaluando la persistencia de distintas preparaciones a la elevada exposición a radiación ultravioleta, bajo condiciones de laboratorio y campo.

Materiales y métodos

Persistencia de la actividad viral en el campo. El experimento fue realizado en el campo experimental del Instituto Biológico en Campinas, Brasil. El área experimental estaba formada por 32 parcelas de 6 m², cultivadas con soja IAC - 8 en estado vegetativo.

Los tratamientos fueron formulaciones de VPNAg: polvo mojable y aceite emulsionable y la forma impura, normalmente utilizada por el agricultor, preparada a partir de larvas de *A. gemmatalis*, muertas por causa del virus. Estas fueron maceradas y filtradas en una suspensión acuosa. Para las aplicaciones se utilizó un

pulverizador de costado (Brudden P5) con barra; asperjando 300 ml de la suspensión por parcela, equivalente a 500 L/ha. En los tratamientos con el patógeno, se utilizó 80 g o ml del producto formulado y 0,12 g de larvas por parcela, para una concentración proporcional a 1 ha. Como testigo se utilizó agua destilada, que fue el medio en el cual se prepararon las suspensiones de los demás tratamientos.

Las aplicaciones fueron realizadas a las 8:00h y a las 12:00h. Inmediatamente después de las aplicaciones se recolectaron 25 folíolos del tercio superior de las plantas, tomadas aleatoriamente de los surcos centrales. Tres y seis días después de la aplicación, a las mismas horas se recolectaron la misma cantidad de folíolos usando la metodología anterior.

Los folíolos recolectados fueron suministrados a larvas de *A. gemmatalis* de tercer instar. Los especímenes utilizados provenían de una cría en laboratorio, realizada en tubos de vidrio (8,5 cm de altura y 2,5 cm de diámetro) tapados con algodón hidrófobo. Los insectos fueron colocados en una cámara de germinación tipo B.O.D. (Fanem) a 25°C y 14 h de fotoperíodo, donde permanecieron 48 h con el alimento suministrado, para garantizar la ingestión del virus. Después fueron transferidos a otros tubos donde se les suministró dieta artificial (Greene *et al.* 1956). Los tubos permanecieron en una sala con temperatura de 25 ± 2°C y 70 ± 5% de HR.

Diariamente se realizaron observaciones de los insectos para registrar la mortalidad. Para confirmar el agente causal de la mortalidad, los insectos fueron examinados mediante un microscopio óptico de contraste de fase.

En el experimento de campo se utilizó un diseño experimental de bloques al azar, con cuatro bloques y cuatro tratamientos para cada hora de aplicación. En la prueba de laboratorio, cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones de 25 insectos, seleccionados al azar. Los datos de mortalidad fueron sometidos a un análisis de varianza y las medias comparadas según la prueba de Tukey al 5%, según un diseño experimental de parcelas subdivididas, con el objetivo de comparar las medias de las variables: efecto de los tratamientos, días y horarios, así como las interacciones tratamiento x días, tratamiento x horas, días x horas, y tratamiento x días x horas. Los valores de mortalidad observada fueron transformados en arcoseno raíz de P/100, donde P= porcentaje de mortalidad.

Los datos climáticos fueron suministrados por la

Sección de Climatología del Instituto Agronómico y la Estación Experimental del Instituto Biológico de Campinas.

Efecto fotoprotector en condiciones de laboratorio.

Utilizando folíolos de soya de la misma plantación se realizó un análisis en el laboratorio. El material recolectado del tercio superior de las plantas fue llevado al laboratorio donde mediante aplicación en el haz, se aplicaron los tratamientos evaluados en condiciones de campo. Se usaron 20 folíolos por tratamiento, y tres repeticiones. Una vez secos los folíolos correspondientes a cada tratamiento se dividieron en dos partes iguales. Una de las partes fue expuesto a la radiación ultravioleta proveniente de una lámpara germicida (253,7 nm) situada a 25 cm de distancia, durante 5 minutos. Inmediatamente, cada uno fue colocado individualmente en tubos de vidrio (2,5 cm de diámetro x 8,5 cm de altura) que contenían una larva de *A. gemmatilis* de 3° instar. Después de consumir los folíolos, los insectos fueron transferidos a frascos iguales, conteniendo dieta artificial (Greene *et al.* 1976) y mantenidos a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 14 h y $70 \pm 5\%$ HR. Para la evaluación de la mortalidad se siguieron los mismos criterios de la prueba anterior. La parte de cada folíolo que no fue irradiada se utilizó como testigo para comparar los efectos de la radiación sobre el virus, en las diferentes formulaciones.

Resultados y discusión

Persistencia de la actividad viral en condiciones de campo. Comparando los valores de mortalidad obtenidos con el virus aplicado a las 8:00h y a las 12:00h, mediante la interacción tratamiento x día x hora de aplicación, no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($F= 0,43$; $P= 0,7866$) o sea, la actividad pa-

togénica de los preparados aplicados por la mañana mostró la misma eficacia que cuando fue aplicado a mediodía.

No obstante, según la interacción significativa tratamiento x día ($F = 15,13$; $P= 0,001$) se encontró, que para ambas horas, la virulencia se redujo en el tratamiento no formulado (macerado), siendo ésta aproximadamente 60% menor con respecto a la actividad original, a los tres días de la aplicación. Este valor no varió a los seis días de exposición en condiciones campo (Cuadro 1). De las dos formulaciones evaluadas, la de polvo mojable fue la que presentó mayor reducción en la actividad (cerca de 10% a los 3 días y entre 40 y 50 % después de seis días de aplicación), mientras que la formulación de aceite emulsionable no fue afectada (Cuadro 1 y 2).

Sin embargo, cuando se comparan la mortalidad causada por cada tratamiento el mismo día de la aplicación, se determinó que la formulación en aceite emulsionable presentó la menor actividad inicial de los tres tratamientos (Cuadro 2). Después de tres días, la mortalidad fue mayor con el virus formulado como polvo mojable (79,73% y 87,79%, para la aplicación a las 8:00h y a las 12:00h, respectivamente). Pero en la primera evaluación, solamente el tratamiento no formulado sufrió reducción en la actividad (60 - 70%) y ambas formulaciones mostraron un comportamiento similar.

En la última evaluación, no hubo diferencia de la eficacia de las formulaciones, las cuales fueron superiores al tratamiento no formulado. Si se compara con la evaluación anterior, la formulación en polvo mojable presentó mayor pérdida de la actividad viral, pero ambas tuvieron un buen desarrollo, ocasionando una mortalidad de casi 40 hasta 50% (Cuadros 1 y 2).

Los datos climáticos registrados durante el expe-

Cuadro 1. Porcentaje de mortalidad promedio de *A. gemmatilis* por VPNAg, aplicado a las 8:00h y 12:00h. Campinas, Brasil.

VPNAg	Porcentaje de mortalidad dda ^a		
	0	3	6
Aplicación 8:00h			
Larvas maceradas	79,00 A a	18,40 B b	5,40 B b
Aceite emulsionable	50,00 B a	64,14 A a	55,78 A a
Polvo mojable	90,00 A a	79,73 A a	54,36 A b
Aplicación 12:00h			
Larvas maceradas	85,70 A a	22,09 C b	21,38 B b
Aceite emulsionable	52,00 B a	55,78 B a	37,98 A a
Polvo mojable	97,00 A a	87,79 A a	48,19 A b

^a medias seguidas por la misma letra mayúscula en la columna y minúscula en la línea no son diferentes significativamente entre si ($\alpha = 0,5$) según Tukey.

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad promedio de *A. gemmatilis* causado por VPNAg en diferentes formulaciones sometidas a radiación ultravioleta (253,7 nm) . Campinas, Brasil.

Preparación	Porcentaje de mortalidad ^a		Reducción de la actividad (%)
	No irradiado	Irradiado	
Larvas maceradas	100 Aa	50 Bb	50
Aceite emulsionable	100 Aa	85 Ab	15
Polvo mojable	95 Aa	70 Ab	25
Testigo	0 Ba	0 Ca	0

^a medias seguidas por la misma letra mayúscula en la columna y minúscula en la línea no son significativamente diferentes entre si ($\alpha = 0,05$) según Tukey.

rimento de campo se presentan en el Cuadro 3. El día 21 se presentó una precipitación de 8,4 mm, pero esta ocurrió antes de la aplicación de los tratamientos a las 8:00h, por lo cual no removió la película asperjada sobre las hojas. La precipitación fue baja durante el periodo, aún con la precipitación mayor el quinto día, lo cual indica que este no fue el factor principal de la reducción de la persistencia del patógeno. Por tanto, la inactivación inicial del virus en el campo (entre la aplicación y el tercer día de evaluación), especialmente para el tratamiento no formulado, se debió a la radiación UV del espectro solar, la cual incidió fuertemente, con aproximadamente 10 h de radiación por día durante las primeras 48 h de exposición y 7 h en el tercer día, con un promedio de 9,5 h de radiación por día, en los primeros tres días de exposición.

Batista Filho *et al.* (1992a,b) también mencionan a la UV como factor de inactivación de VPNAg, dado que en estudios realizados por estos autores no se presentaron lluvias durante las primeras 48 h después de la aplicación y la radiación solar alcanzó valores similares a los de este estudio. A los tres días, la reducción determinada por ellos fue casi de 20% para las formulaciones en polvo mojable y en aceite emulsionable a base de leucita y aceite de soya, respectivamente. Batista Filho (1997), señaló que la persistencia del virus formulado como aceite emulsionable fue menos afectada que la de polvo mojable cuando la lluvia fue de 49 mm/hora. Este mismo autor obtuvo resultados se-

mejantes con respecto a la persistencia de la virulencia del virus cuando evaluó una formulación en aceite emulsionable a base de aceite de maíz.

El efecto fotoprotector del aceite emulsionable fue también evaluado por Alves *et al.* (1992), bajo condiciones de campo, y aunque en los primeros días del estudio la incidencia de luz fue menor a la registrada durante esta investigación (4,75 y 7,13, respectivamente), la reducción en la actividad de la formulación fue aproximadamente 20% menor que la del virus no formulado, confirmando los resultados de este estudio.

Efecto fotoprotector en condiciones de laboratorio.

Las diferentes preparaciones de VPNAg, expuestas a luz germicida fueron afectadas por la radiación UV, determinándose una reducción en la actividad entomopatógena. Sin embargo, las formulaciones en aceite emulsionable y polvo mojable fueron menos afectadas (15 y 26% de reducción, respectivamente) que el virus no formulado (Cuadro 2). Además, el porcentaje de reducción de todos los tratamientos siguió la tendencia observada en el experimento anterior, o sea, la mayor reducción se dio con la suspensión no formulada, seguida de la de polvo mojable y la mayor protección se logró con la formulación en aceite emulsionable. El valor de la reducción en la actividad viral de la formulación en aceite emulsionable fue similar al informado por Alves *et al.* (1997) (16,67%), en un estudio en el cual se expusieron folíolos de soya tratados

Cuadro 3. Condiciones climáticas observadas durante el experimento en Campinas, Brasil.

Día	Temperatura (°C)			Precipitación pluviométrica (mm)	Horas de radiación
	Max.	Min.	Media		
21	25,2	18,6	21,9	8,4	10,9
22	28,2	15,8	22,0	0,0	10,5
23	27,6	16,2	21,9	0,0	7,1
24	24,0	18,2	21,1	0,3	0,0
25	25,4	18,2	21,8	0,2	0,0
26	28,8	17,2	23,0	7,0	3,2
27	30,0	17,0	23,5	2,0	5,0

con VPNAg conteniendo 50% de aceite de soya en su composición.

Se debe resaltar que las condiciones en que se realizó esta prueba son diferentes a las del ambiente natural, pues la radiación es mayor debido al tamaño de la onda emitida por la lámpara germicida (tamaño de onda inferior a la emitida por el sol), mientras en condiciones de campo además de los filtros naturales de la atmósfera, la propia planta puede ofrecer algún nivel de sombra que protege las partículas de la exposición directa a la luz del sol. Debe destacarse que las condiciones en que se realizó esta evaluación del efecto fotoprotector son diferentes a las del ambiente natural porque la radiación incidente es mayor debido a que el tamaño de la onda emitida por la lámpara es menor a la emitida por el sol, además en condiciones de campo la misma planta ofrece un nivel de sombra que protege las partículas del virus de la exposición directa a la luz solar.

Sin embargo, en otro estudio (Batista Filho 1997) en el cual se comparó la protección a la luz UV de la formulación en aceite emulsionable con la actividad del patógeno no formulado en laboratorio, se determinó que la tendencia observada en el laboratorio fue similar a la obtenida en condiciones de campo, siguiendo la misma tendencia en cuanto a la reducción de la eficacia.

Esto confirma los resultados obtenidos en el campo, donde naturalmente la incidencia de la radiación UV proveniente de la luz solar es menor a la producida por la lámpara germicida, también a la de las aplicaciones realizadas a las 12:00h, horario de mayor incidencia de luz solar.

Literatura citada

Alves, LFA;Leitão, AEF; Augusto, NT; Leite, LG; Batista Filho, A.

1992. Utilização de adjuvante protetor contra radiação solar e fagoestimulante em mistura com um vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). Arquivos do Instituto Biológico (Brasil) 59: 23-27.
- Alves, LFA;Batista Filho, A; Augusto, NT. 1997.Efeito do óleo de soja na proteção de vírus de poliedrose nuclear de *Anticarsia gemmatilis* (VPNAg) à radiação ultravioleta em laboratório. Arquivos do Instituto Biológico (Brasil) 64:71-74.
- Batista Filho, A;Alves, LFA; Augusto, NT; Leite, LG;Alves, SB. 1992a. Avaliação da persistência de duas formulações de *Baculovirus anticarsia* em campo e laboratório. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil 21:453-462.
- Batista Filho, A; Alves, SB; Augusto, NT; Cruz, BPB. 1992b. Persistência de duas formulações de *Baculovirus anticarsia* sobre folhas de soja, em condições de campo. Pesquisa Agropecuária Brasileira 7:105-106.
- Batista Filho, A. Desenvolvimento de formulações de *Baculovirus anticarsia*. 1997. Tese de Doutorado. Piracicaba, Brasil, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.86 p.
- Greene, GL; Lepla, NC; Dickerson, WD. 1976. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. Journal of Economic Entomology 69:850-853.
- Jaques, RA. 1985. Stability of insects viruses in the environment. In Viral insecticides for biological control. Maramorosch, K; Sherman, KE. Ed. New York, Academic Press.p. 285-360.
- Moscardi, F; Leite, LG; Zamataro, CEO. 1985. Teste de atividade de formulação pó molhável de *Baculovirus anticarsia* em laboratório. Resultados de Pesquisa da Soja. Londrina,EMBRAPA/CNPSO.p. 125-30.
- Moscardi, F. 1989.Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.84:51-56.
- Moscardi, F; Sosa-Gomez, DR. 1992. Use of viruses against soybean caterpillars in Brazil. In Pest management in soybean. Copping, LG;Green,MB; Rees,RT. Ed. Elsevier Applied Science p. 98-109.
- Young ,SY;Yearian,WC. 1974.Persistence of *Heliothis* NPV on foliage of cotton, soybean and tomato. Environmental Entomology 3:253-255