

Evaluación en campo del baculovirus PxABV y sinergismo con cepas de *Bacillus thuringiensis* hacia larvas de *Plutella xylostella* en cultivos de *Brassica oleracea*.

V.M. Carrasco-Baeza*¹, L. Pérez-Moreno¹, C. García-Munguía¹, J. Ibarra-Rendón² y M.C. Del Rincón-Castro¹

1 Universidad de Guanajuato, Departamento de Alimentos, km 9 carretera Irapuato-Silao, Apdo. Postal 311, 365000, Irapuato, Guanajuato, México. **2** CINVESTAV Irapuato, km 9.5 Lib. Norte Carretera Irapuato-León, Apdo. Postal 629, 36824, Irapuato, Guanajuato, México. *vm.carrasco@ugto.mx

RESUMEN

El brócoli es una hortaliza con mayor importancia económica a nivel mundial y en el estado de Guanajuato una de las problemáticas de producción es la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella*. Actualmente existen formulaciones comerciales de nucleopoliedrovirus y de *Bacillus thuringiensis* con efectos de control en otras plagas, sin embargo poco se ha reportado en *P. xylostella*. Por ello, el objetivo del estudio fue evaluar formulaciones de PxABV y *B. thuringiensis* para su aplicación en cultivo de brócoli y determinar su efecto en larvas de *P. xylostella*. Se realizó la aplicación de formulaciones líquidas de PxABV y de *B. thuringiensis* en Irapuato y Dolores Hidalgo, Guanajuato; la primer aplicación de PxABV (3.5×10^{12} OBs/ha) y *B. thuringiensis* LBIT-287 (31,818 mg/ha) fue en cultivo de variedad Avenger y se observó mortalidad de 47.37% en larvas de *P. xylostella*; la segunda aplicación de PxABV se realizó en repollo cultivar Escazú y se observó mortalidad de 92.31% con 5×10^{12} OBs/ha; por último, una aplicación de PxABV (2.04×10^{13} OBs/ha) y *B. thuringiensis* cepa LBIT-229 (666.66 g/ha) para cultivo de brócoli variedad Centennial, arrojó 80% de mortalidad en el caso de PxABV solo, a diferencia de 50% obtenido en combinación con *B. thuringiensis*.

Palabras clave: Baculovirus, *Bacillus thuringiensis*, *Plutella xylostella*, brócoli.

ABSTRACT

Broccoli is the most economic important crucifer worldwide, in Guanajuato State main production problem is diamondback moth *Plutella xylostella*. Nowadays market includes nucleopolyhedroviruses and *Bacillus thuringiensis* based commercial formulations with reported efficiency against insect pests however, few data available regarding *P. xylostella*. Within this background, the objective of this study was the application of different formulations of PxABV-LBIV-11 and *B. thuringiensis* in broccoli fields to determine its effect altogether against *P. xylostella* larvae. Different field locations were selected for PxABV and *B. thuringiensis* application formula in Irapuato and Dolores Hidalgo municipalities; first application was PxABV (3.5×10^{12} OBs/ha) and *B. thuringiensis* LBIT-287 (31,818 mg/ha) on Avenger broccoli and 47.37% mortality was observed; second application was performed in Escazú cabbage, PxABV (5×10^{12} OBs/ha) mortality in *P. xylostella* larvae was registered in 92.31%; third application of a mixture of PxABV (2.04×10^{13} OBs/ha) and *B. thuringiensis* LBIT-229 (666.66 g/ha) was on Centennial broccoli and 80% mortality was observed with PxABV alone, in contrast only the 50% of mortality was registered when *B. thuringiensis* was sprayed in combination with the baculovirus treatment.

Keywords: Baculovirus, *Bacillus thuringiensis*, *Plutella xylostella*, broccoli.

INTRODUCCIÓN

El brócoli es una de las hortalizas con mayor importancia económica a nivel mundial, es una planta de cultivo anual cuya inflorescencia de color verde, llamada florete, representa su principal carácter comercial; los diez principales países exportadores de brócoli registraron una producción, en conjunto, de 1 millón 145 mil 263 toneladas y México ocupa el segundo lugar en exportación con 245, 023 ton; en el contexto nacional, se reportó una producción total anual de 631, 511 toneladas de brócoli durante 2019, con valor comercial de 3, 821 billones de pesos; de las cuales, Guanajuato concentró la mayor superficie sembrada con 11, 651 ha y una producción de 147, 601 toneladas, que representan el 23.37% del total producido en el país en este año (Soria *et al.*, 2016; Vivanco-Estrada *et al.*, 2017; SIAP, 2019). Sin embargo, uno de los principales problemas en los sistemas agrícolas de producción de brócoli es la presencia de insectos considerados como plaga, que afectan la estructura de las plantas por el daño foliar que provocan sus larvas al alimentarse de ellas, tal es el caso de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella*, que ocasiona mayores daños y pérdidas económicas en cultivos de crucíferas, en específico: brócoli, esto agravado con la característica de ser uno de los primeros insectos en desarrollar resistencia a los insecticidas químicos de primera elección hasta los de última generación como las diamidas, e incluso a las alternativas de uso con agentes de control biológico; lo cual, resulta en costos elevados de hasta 4-5 billones de dólares al año en todo el mundo (Zalucki *et al.*, 2012; Philips *et al.*, 2014; Webb *et al.*, 2016). Existen en la actualidad diferentes tipos de control que se han implementado para disminuir las poblaciones de *P. xylostella*, dentro de los más utilizados se encuentran el control cultural, control químico y el control biológico; dentro del control cultural, el más utilizado es la irrigación por aspersores y el cultivo de otras especies de crucíferas para que *P. xylostella* tenga otras opciones para su oviposición o fuente de alimento; el control químico con insecticidas, desde los organofosforados, carbamatos y piretroides, hasta los neonicotinoides, lactonas macrocíclicas y diamidas (Gong *et al.*, 2014; Imran, 2018), es el más común de los métodos contra este lepidóptero, pero no ha mostrado eficacia en el control de sus poblaciones, además, los químicos son considerados como una fuente de contaminación al acumularse en suelo y agua, sin mencionar el efecto negativo en las poblaciones de insectos benéficos o enemigos naturales de este lepidóptero (Guo *et al.*, 2013; Agboyi *et al.*, 2016; Bopape *et al.*, 2017). Por lo anterior, dentro del marco de control biológico, aún es factible el desarrollo de formulaciones bioinsecticidas, ya que sigue siendo una necesidad prioritaria para la disminución de diversas poblaciones de insectos plaga presentes en cultivos de crucíferas en el mundo y aunado al hecho de que, en México la producción de brócoli representa una de las mayores fuentes de ingresos y derrama económica en el rubro agrícola y uno de los principales estados productores es Guanajuato, ya que un alto porcentaje del brócoli que se cultiva en esta región está destinado para exportación, esto demanda estándares de calidad e inocuidad que involucran métodos de protección contra plagas, principalmente *P. xylostella*; sin embargo la aplicación indiscriminada de insecticidas químicos supone riesgos a la salud y el desarrollo de resistencia por parte de este insecto, por lo que se hace necesario buscar alternativas a los métodos convencionales como el control biológico con agentes que presenten actividad tóxica hacia este lepidóptero y así obtener resultados favorables en los sistemas de producción agrícola; por esta razón, es relevante la producción de cepas de baculovirus y *Bacillus thuringiensis* como potenciales bioinsecticidas para el diseño de formulaciones adecuadas y su aplicación para el control de poblaciones de *P. xylostella* en cultivos de brócoli.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización del experimento

La etapa experimental del presente estudio se llevará a cabo en condiciones de laboratorio y en condiciones de campo, para la primera fase se realizarán actividades propias en el Laboratorio de Biotecnología Alimentaria y Vegetal de la Universidad de Guanajuato, División Ciencias de la Vida (DICIVA) campus Irapuato-Salamanca, localizada en Ex-Hacienda El Copal, carretera Irapuato-Silao Km 7 en el municipio de Irapuato, Guanajuato, ubicado geográficamente en 20°44'23.1"N 101°20'09.8"O., para la segunda fase se realizarán actividades en campos agrícolas de cultivos de brócoli en los municipios de Irapuato y Dolores Hidalgo, Guanajuato.

Establecimiento de una colonia de *Plutella xylostella* en condiciones de insectario

Se recolectaron ejemplares de larvas y pupas directamente de campo en cultivos de brócoli en la región de El Copal, Municipio de Irapuato, Gto. Las larvas colectadas fueron destinadas como pie de cría en cuarentena y dispuestas en contenedores de plástico con tapa adaptada con tela organza para ventilación y se alimentaron con hojas de brócoli recién cortadas, lavadas y secas; las pupas colectadas fueron dispuestas en cajas de Petri y se mantuvieron en jaulas entomológicas también en fase de cuarentena hasta que emergieron adultos, que fueron alimentados con una solución de miel de maple al 20% durante los días de la semana y al 10% los días viernes, sábado y domingo; a partir de la emergencia de los primeros adultos, se les colocaron hojas de brócoli frescas, limpias y secas dispuestas en contenedores pequeños de plástico y sujetadas con un algodón, esto con el objetivo de proporcionar superficies adecuadas para la oviposición, las hojas con huevecillos se retiraron de la jaula todos los días y se distribuyeron en contenedores plásticos con tapa; posterior a 24 h, se observó eclosión de larvas, a las cuales se les ofrecieron hojas de brócoli como fuente de alimento. Las larvas de segunda generación se mantuvieron durante 5 días hasta que alcanzaron su desarrollo en pupas, y estas fueron colectadas de cada contenedor, dispuestas en cajas de Petri y se comenzaron a distribuir en jaulas entomológicas para establecer el pie de cría definitivo de adultos, a los que, bajo el proceso anteriormente mencionado, se les mantuvo en condiciones de insectario; las hojas de brócoli con huevecillos se distribuyeron en contenedores de plástico con tapa y se les dio manejo de alimentación, limpieza y selección de pupas como reemplazo de los adultos en jaula.

Amplificación masiva de baculovirus P_xNPV *in vivo* utilizando larvas de *Trichoplusia ni* y producción de complejo espora-cristal de *B. thuringiensis*, para su aplicación en campo

La amplificación de baculovirus se realizó por infección directa de larvas de *P. xylostella* en contenedores de plástico con dieta artificial, se inocularon 500 µL de solución que contenía cuerpos de oclusión OBs en una concentración de 1×10^5 OBs /mL, se distribuyó en toda la superficie con un asa de Drigalski previamente esterilizada por calor con mechero de Bunsen y se dejó secar a temperatura ambiente, posterior a esto, se agregaron 150 larvas de 2º instar de *P. xylostella* que se hayan mantenido sin alimento previo a 24 h, los contenedores se cubrieron con sus respectivas tapas (adaptadas con malla de tela organza para ventilación) y se incubaron por 5 días a temperatura ambiente; diariamente se hizo el monitoreo y revisión de cada contenedor colectando las larvas muertas que fueron maceradas con agua destilada estéril (2mL/larva) en un mortero de porcelana, la solución homogenizada se filtró con un tamíz de tela organza para desechar los fragmentos de tejido de larvas, el filtrado obtenido se sometió a centrifugación de 13000rpm durante 15 minutos a 4° C; el sedimento obtenido se resuspendió en 12mL de agua destilada estéril para lavarse y centrifugarse de nuevo con las condiciones mencionadas, una vez obtenidos los filtrados lavados, se almacenaron a 4° C. Para la determinación de la concentración, se realizó una dilución 1:10 para su observación en cámara de Neubauer con microscopio óptico a 40x, se realizó conteo de cuerpos de oclusión OBs en cinco cuadros de la cámara, centro e izquierdo y derecho superiores e inferiores, el total de OBs se multiplicó por una constante 2.5×10^5 y por el factor de dilución para la obtención del número de OBs/mL; para la obtención de complejo espora-cristal de tres cepas de *B. thuringiensis* (LBIT-127, LBIT-287 y LBIT-290), se inició con cultivos en cajas de Petri con agar métodos estándar, se incubaron a 28° C por 24hr y almacenados posteriormente a 4° C. Se prepararon, para cada cepa, 50mL de medio LB (Luria-Bertani) contenido en matraces para ser inoculados y sometidos a incubación orbital a 28° C durante 72-96 hrs, los contenidos de cada matraz fueron monitoreados por observación de una muestra al microscopio 100x para confirmar lisis celular y la presencia de cristales, los contenidos fueron transferidos a tubos de policarbonato y sometidos a centrifugación de 13000rpm, 10 minutos a 4° C. Una vez obtenidos los sedimentos de cada tubo, fueron adicionados con 10mL de agua destilada estéril, homogenizados en vórtex y centrifugados con las mismas condiciones, el sobrenadante se desechó para repetir la adición de agua destilada estéril y repetir los lavados hasta que el sobrenadante se observó claro; al término de los lavados, los tubos se taparon con papel Parafilm®, se congelaron a -20° C y se liofilizaron a -40° C y 120 mT, los liofilizados obtenidos fueron almacenados a 4° C hasta su uso.

Establecer la CL₅₀ de la mezcla del baculovirus P_xNPV y las cepas LBIT 127, LBIT 287 y LBIT 290 de *Bacillus thuringiensis*

Se implementaron bioensayos para la determinación de CL₅₀ de baculovirus P_xNPV y *B. thuringiensis* con stocks de cuerpos de oclusión OBs previamente cuantificados y liofilizado del complejo espora-cristal. Se utilizaron cajas de Petri con dieta artificial y en cada una se inocularon 200µL de cada agente entomopatógeno, para ambos agentes

se manejaron una diluciones seriadas con factor de 0.5. Las dosis de concentración fueron distribuidas con un asa de Drigalski estéril por calor con mechero de Bunsen hasta formar una capa uniforme en la superficie de la dieta artificial, se agregaron 20 larvas de *P. xylostella* de 2° instar y se colocaron, con la tapa, tela de organza y un fragmento de papel para regulación de humedad y se sujetaron por presión con bandas elásticas, también se consideraron cajas Petri con 200 µL de agua destilada estéril en capa de dieta artificial como control negativo; las cajas fueron cubiertas con malla de tela organza y un fragmento de papel para regular humedad, fueron aseguradas por presión con bandas elásticas y después se colocaron todas las cajas en un contenedor de plástico adaptado como cámara de incubación con tapa y malla de tela organza, se dejaron ahí por 5 días y se hizo conteo de larvas muertas a partir del 3er día pos-inoculación.

Diseñar formulaciones diferentes del PxNPV y de complejo spora-cristal de *B. thuringiensis*, polvos humectables y líquidas

Se diseñaron dos tipos diferentes de formulaciones, cada una con ingredientes diversos que contemplaron todos los requisitos y compuestos que debe de tener una mezcla efectiva y óptima para su aplicación a nivel de campo en cultivos de brócoli para el control de poblaciones de *P. xylostella*; de acuerdo a lo reportado por Tamez-Guerra *et al.* (2006). La formulación en presentación de polvos humectables se diseñó con agua destilada estéril 300mL, caolín 500g, talco 50g, ácido naftalen sulfónico 50g, sacarosa 50g y hojas de kale 50g como fagoestimulantes, calcoflúor 0.2g y 7 diferentes concentraciones de solución de extracto crudo de baculovirus PxNPV. Para su preparación, primero se obtuvo la solución de baculovirus PxNPV macerando 150 larvas infectadas en agua destilada estéril, se filtró la solución con un tamíz de tela organza para retirar restos o fragmentos de los insectos, se adicionó el caolín, los fagoestimulantes (deshidratados previamente) y el Tinopal CBS-X, se homogenizó a mano hasta obtener una consistencia semisólida, se colocó en una bandeja de aluminio forrada con papel encerado y se dispersó en una capa fina, se dejó secar por completo a temperatura ambiente y se realizó su trituration con un molino, una vez obtenido el polvo, este se almacenó en frascos opacos de plástico con tapa; para la determinación de concentración se tomó una muestra de 10mg de polvo para diluir en 90µL de agua destilada, se homogenizó en vórtex y se preparó una dilución 1:100 de la cual se tomaron 10µl para su observación en cámara de Neubauer con microscopio óptico 40x para el conteo de los OBs de PxNPV existentes. La formulación de presentación líquida en suspensión se realizó con glicerina 250mL, agua destilada 150mL, hojas de kale 25g y sacarosa 25g, Tinopal CBS-X 0.2g/100mL y como ingrediente activo el concentrado crudo de baculovirus PxNPV. Su preparación consistió en adicionar todos los ingredientes de la siguiente manera: el extracto crudo de PxNPV se adicionó en 150mL de agua destilada estéril, por otro lado el fagoestimulante kale (25g) se deshidrató previamente en mufla a 50° C por 24 h y se trituró, se agregó la sacarosa (25g) y Tinopal CBS-X (1g total); finalmente a esta mezcla se adicionó la glicerina en proporción 1:1 para un volumen total de 500mL y se homogenizó todo el compuesto por agitación para su posterior almacenamiento en frascos de plástico opaco con tapa a temperatura ambiente; para la determinación de la concentración de la suspensión, se realizó una dilución 1:10 y se tomaron 20µl para su observación en cámara de Neubauer con microscopio óptico 40x para el conteo de los OBs de PxNPV existentes (Batista-Filho *et al.*, 2001; Tamez-Guerra *et al.*, 2006).

Aplicaciones en condiciones de campo

Se realizó, por separado, la aplicación de formulaciones líquidas de baculovirus PxNPV y de *Bacillus thuringiensis*, cepa LBIT-287; en un cultivo de brócoli variedad Avenger, ubicado en la localidad Providencia de Pérez, en el municipio de Irapuato, estado de Guanajuato, México; la cual se encuentra en las coordenadas 20°36'58.3"N 101°26'25.0"W a mediana altura de 1721 m sobre el nivel del mar y cuenta con clima templado sub-húmedo. El cultivo tuvo una densidad de siembra de 60, 000 plantas/ha, diseño en tresbolillo y contó con una superficie total de 9557 m² (Fig. 1) previo a la aplicación de la formulación de baculovirus PxNPV, se realizó un conteo de larvas de *P. xylostella* presentes, para ello se eligieron 15 plantas al azar para cada entomopatógeno; posterior al conteo previo, la aplicación de las formulaciones fue realizada con una bomba aspersora a gasolina marca Swissmex modelo Forza 25 (Fig. 2), calibrada previamente; la concentración de baculovirus PxNPV asperjada fue de 9.06x10¹⁰ OBs totales en 2000mL de formulación líquida suspensión, suficientes para cubrir 255 m², área representada por 5 camas y en el caso de la cepa LBIT-287 de *Bacillus thuringiensis* la concentración asperjada fue de 105 mg totales en 656.25 mL de formulación líquida suspensión para cubrir un área de 33m².



Figura 1. Cultivo de brócoli (*B. oleracea* var *italica*) cultivar Avenger F1, superficie total de 9557m².

También se llevó a cabo una segunda aplicación de baculovirus P_xNPV, en un cultivo de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar Escazú, en la localidad San Francisco de la Charca, ejido “El Nido”, en el municipio de Irapuato, estado de Guanajuato, ubicado en las coordenadas 20°40'23.7"N 101°23'15.8"W a una altura de 1720 m sobre el nivel del mar, con clima templado sub-húmedo. El cultivo contó con una superficie total aproximada de 1,032 m², diseño tresbolillo y para esta segunda aplicación de baculovirus P_xNPV se implementó una distribución de bloques completamente al azar con 5 tratamientos y un grupo testigo, todos con un área de 100 m² delimitados con cuerda (Fig. 2) y distribuidos de la siguiente manera: tratamiento 1 de 1x10¹⁰ OBs (a razón de 1x10¹² OBs/ha), tratamiento 2 de 3x10¹⁰ OBs (a razón de 3x10¹² OBs/ha), tratamiento 3 (control), tratamiento 4 de 5x10¹⁰ OBs (a razón de 5x10¹² OBs/ha), tratamiento 5 de 8x10¹⁰ OBs (a razón de 8x10¹² OBs/ha) y por último, tratamiento 6 de 1x10¹¹ OBs (a razón de 1x10¹³ OBs/ha). Previo a las aplicaciones se realizó el conteo correspondiente de larvas de *P. xylostella* presentes en el cultivo (Fig. 3) y la evaluación de daño foliar del mismo, la aplicación se realizó con una bomba automática con motor de gasolina, previamente calibrada y equipada con un marco de aspersión con boquillas de cono.



Figura 2. Distribución de diseño bloques completamente al azar en cultivo de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*), para la aplicación de formulaciones líquidas de baculovirus P_xNPV.



Figura 3. Conteo pre-aplicación, presencia de larvas de 4º Instar de *P. xylostella* (flechas).

Se realizó una 3ª aplicación a nivel de campo en cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivar Centennial, en la localidad Santa Rita, rancho “Los Cuates”, en el municipio de Dolores Hidalgo, Guanajuato, ubicado en las coordenadas 21°22'16.7"N 100°88'08.8"W a una altura de 1982m sobre el nivel del mar, con clima templado sub-húmedo. El cultivo contó con una superficie total aproximada de 80,000 m², diseño sencillo en línea y para esta tercera aplicación de baculovirus PxNPV y Bt se utilizó una concentración de 3.06x10¹⁰ OBs y 981.81mg respectivamente con lo que se cubrió una superficie total de 600 m² representados por 6 camas, cada tratamiento estuvo conformado por 3 repeticiones (3 camas); ambas concentraciones fueron asperjadas por separado con una mochila aspersora manual marca Swissmex de 25lt calibrada con anterioridad y equipada con una boquilla de cono; previo a la aplicación, se realizó un conteo de larvas de *P. xylostella* presentes en 10 plantas al azar por cada cama y que mostraran signos evidentes de daño foliar (Fig. 4); como testigo positivo se implementó la aplicación de un insecticida químico diamida Belt® a razón de 0.05L/ha, además de un testigo negativo conformado solo por agua y coadyuvantes de formulación líquida.



Figura 4. Presencia de larvas de *P. xylostella* de 2º a 3er Instar (izquierda, flechas) y daño foliar (derecha) en cultivo de brócoli variedad Centennial.

Análisis estadísticos

Para los datos obtenidos en los bioensayos de laboratorio, se utilizó el análisis Probit del programa estadístico SPSS, para la determinación de dosis respuesta, analizando la correlación entre la intensidad del estímulo (dosis) y la cantidad de organismos que responden; la cantidad de respuestas podrá ser expresada como una probabilidad binomial por sujeto, y la correlación lineal se estimó entre las desviaciones de la distribución de los datos observados, representada como una dosis efectiva media o DL₅₀, ya que produce el 50% de la mortalidad en los organismos de estudio (Throne *et al.*, 1995). Con los datos obtenidos del muestreo pos-tratamiento en campo de posteriores aplicaciones, se realizó el cálculo del porcentaje de control de larvas de *P. xylostella* utilizando la fórmula de corrección de Abbott por transformación angular del arco seno y posteriormente se realizará un análisis de varianza (ANDEVA) con diseño multifactorial, donde el Factor A serán los días pos-aplicación y el Factor B será la concentración utilizada, además de una prueba de Tukey al 95% de confianza, con el programa Statgraphics Centurion XVII, con lo que se determinó el mejor tratamiento de control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación masiva de baculovirus PxNPV *in vivo* utilizando larvas de *Trichoplusia ni* y producción de complejo spora-cristal de *B. thuringiensis*, para su aplicación en campo

Con la amplificación del baculovirus PxNPV en larvas de 3er Instar de *Trichoplusia ni* (Fig. 5), se obtuvo un total de 50mL de extracto crudo de PxNPV a una concentración de 8.21 x 10¹⁰ OBs/mL, suficientes para la elaboración de 4 formulaciones líquidas en suspensión. En la producción de complejo spora-cristal de *B. thuringiensis*, se

obtuvieron en promedio hasta 6g de liofilizado por cada cepa (LBIT-127, LBIT-287, LBIT-290 y HD-1) cantidad suficiente para el diseño y elaboración de bioensayos para determinación de CL_{50} y la aplicación en condiciones de campo.



Figura 5. Obtención de extracto crudo del baculovirus PxABPV, amplificado *in vivo* en larvas de *Trichoplusia ni* de 3er Instar. a) Plaqueo de concentración PxABPV en dieta artificial, b) Adición de larvas *T. ni* y c) Concentrado macerado de larvas muertas por PxABPV.

Diseñar formulaciones diferentes del PxABPV y de complejo spora-cristal de *B. thuringiensis*, polvos humectables y líquidas

Del total de OB's (8.21×10^{10} en 50mL de extracto crudo) obtenidos en la amplificación de PxABPV, se obtuvo la elaboración de 4 formulaciones en concentración 2.4×10^8 , 4.8×10^8 , 9.9×10^8 y 2×10^9 OBs/mL, en presentación líquida suspensión de 500mL cada una (Fig. 6), para su posterior aplicación en campo.



Figura 6. Formulaciones en presentación líquida suspensión del baculovirus PxABPV para su aplicación en campo en cultivos de brócoli.

Se diseñó la formulación en presentación de polvo humectable (Fig. 7) a razón de 1.724×10^{11} OBs en 153.55g de producto, los cuales serán suficientes para la aplicación en $575m^2$, y para *B. thuringiensis* se obtuvo al momento 6000mg totales de complejo spora-cristal liofilizado, que conformaron también una formulación polvo humectable, para su posterior aplicación en campo contra larvas de *P. xylostella*, con el objetivo de evaluar la interacción de ambos entomopatógenos en conjunto.



Figura 7. Formulaciones en presentación polvo humectable del baculovirus P_xNPV y liofilizados de *B. thuringiensis* LBIT-229 para su aplicación en campo en cultivos de brócoli.

Establecer la CL₅₀ de la mezcla de baculovirus P_xNPV y las cepas LBIT 127, 287 y 290 de *B. thuringiensis* mediante bioensayos.

Se realizaron bioensayos en placa de superficie, para las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas y poder determinar la DL₅₀ por cuantificación de mortalidad de larvas de *P. xylostella* (Fig. 8) y análisis PROBIT (Cuadro 1) de 6 diferentes dosis a una dilución 0.5, seriadas de la siguiente manera: 500, 250, 125, 62.5, 31.25 y 15.5 ng/cm² respectivamente para cada cepa; en el experimento se utilizaron dos testigos, uno positivo con la cepa HD-1 y uno negativo que solamente contenía Tween 80 al 0.02% y Tinopal 0.2% (0.2g/mL).



Figura 8. Signos característicos y mortalidad de larvas de *P. xylostella* infectadas por *B. thuringiensis*, bioensayos.

Los resultados de los bioensayos mostraron que, las 4 cepas evaluadas presentaron una variación de mortalidad de 60 a 65 %, siendo las cepas LBIT-290 y LBIT-229 las de mayor efectividad en larvas de 2º Instar de *P. xylostella* con una CL₅₀ de 179.9 y 173.89 ng/cm² respectivamente; por otro lado, las cepas LBIT-127, con una CL₅₀ estimada de 242.64 ng/cm² y LBIT-287 con 251.73 ng/cm² fueron menos efectivas, en contraste con el testigo positivo, la cepa HD-1 que presentó hasta 90% de mortalidad con una CL₅₀ de 147.22 ng/cm².

Cuadro 1. Parámetros estadísticos de bioensayos con cepas de *B. thuringiensis* para determinación de CL₅₀ en larvas de 2º Instar de *Plutella xylostella*.

| CEPA | IE | Mort% | CL ₅₀ (ng/cm ²) | X ² | L.F. (95%) | | Pendiente (±SE) |
|--|----|-------|---|----------------|------------|---------|--------------------|
| | | | | | Bajo | Alto | |
| LBIT-127 | 20 | 60 | 242.64 | 5.5 | 170.17 | 346.753 | 2.78 ±0.76 |
| LBIT-287 | 20 | 60 | 251.73 | 3.78 | 183.266 | 346.298 | 3.41 ±0.90 |
| LBIT-290 | 20 | 65 | 179.90 | 2.61 | 128.341 | 252.405 | 2.69 ±0.26 |
| LBIT-229 | 20 | 65 | 173.89 | 2.51 | 129.207 | 234.293 | 3.71 ±0.85 |
| HD-1 | 20 | 90 | 147.22 | 3.16 | 105.672 | 205.129 | 2.89 ±0.29 |
| Testigo Tween 80 0.02%+Tinopal 0.2% | 20 | 5 | -- | -- | --- | --- | --- |

Individuos evaluados (IE), Mortalidad (Mort), Concentración letal media (CL₅₀), límites fiduciales (L.F.). Diferentes literales en columna Cepa, indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05) utilizando la prueba de Tukey.

Evaluar a nivel de campo las diferentes formulaciones del P_xNPV y *B. thuringiensis* en cultivos de brócoli y seleccionar la más efectiva.

Se realizaron aplicaciones preliminares del baculovirus P_xNPV y de una cepa de *B. thuringiensis* en condiciones de campo en dos diferentes localidades del municipio de Irapuato, Guanajuato; la primer aplicación de baculovirus y *B. thuringiensis* fue en cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivar Avenger y la segunda aplicación de baculovirus se realizó en cultivo de repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar Escazú; además de una

tercera aplicación de PxNPV y *B. thuringiensis* en cultivo de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) cultivar Centennial.

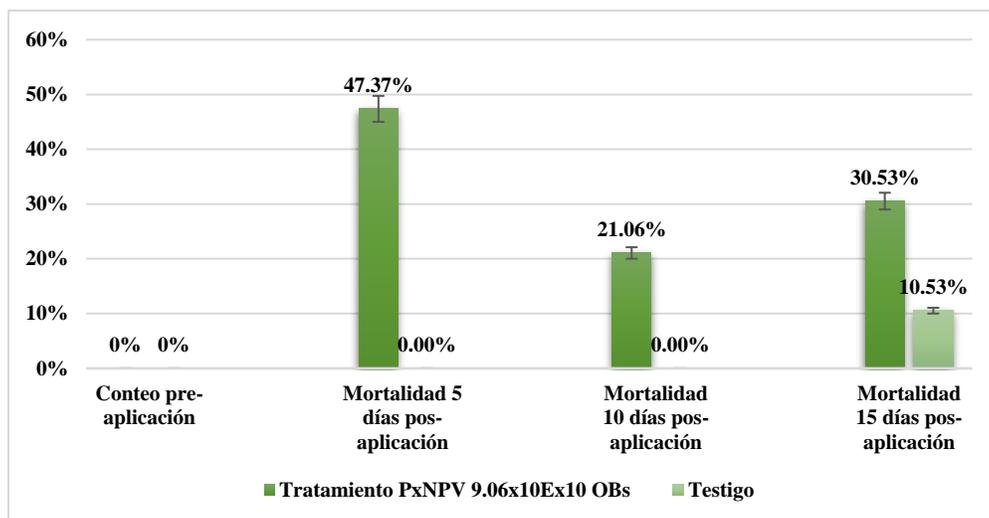


Figura 9. Porcentajes de mortalidad en larvas de *P. xylostella*, obtenidos con formulación líquida de baculovirus PxNPV, 9.06×10^{10} OBs para 255m² de cultivo de brócoli, localidad Providencia de Pérez, Irapuato, Guanajuato.

Cuadro 2. Análisis de varianza (ANOVA) de porcentajes de mortalidad en larvas de *Plutella xylostella* en cultivo de brócoli tratado con baculovirus PxNPV formulación líquida, condiciones de campo, localidad Providencia de Pérez.

| | Tratamiento PxNPV 9.06x10 ¹⁰ OB's | Testigo |
|-------------------------------------|--|---------|
| % Mortalidad 5 días pos-aplicación | 47.37 a | 0.00 c |
| % Mortalidad 10 días pos-aplicación | 21.06 bc | 0.00 c |
| % Mortalidad 15 días pos-aplicación | 30.53 b | 10.53 c |

Diferentes literales por columna en Tratamiento PxNPV y en Testigo indican diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$) utilizando la prueba de Tukey.

En cuanto a la primer aplicación de formulación líquida suspensión de baculovirus PxNPV (Fig. 9), en la localidad Providencia, se observó una variación de mortalidad de 21.06 a 47.37% en los tres conteos realizados pos-aplicación (5, 10 y 15 días); la mayor mortalidad se registró a los 5 días pos-aplicación con 47.37% y la menor, de 21.06% se observó a los 10 días pos-aplicación, ambos en comparación con su grupo testigo que no registró mortalidad; adicional a esto, a los 15 días pos-aplicación se observó un aumento en la mortalidad, registrando 30.53%, sin embargo el grupo testigo observó el mismo fenómeno con 10.53%; por último, el análisis de varianza (Cuadro 2) mostró diferencias significativas entre los 5 y 15 días pos-aplicación con respecto al grupo testigo correspondiente.

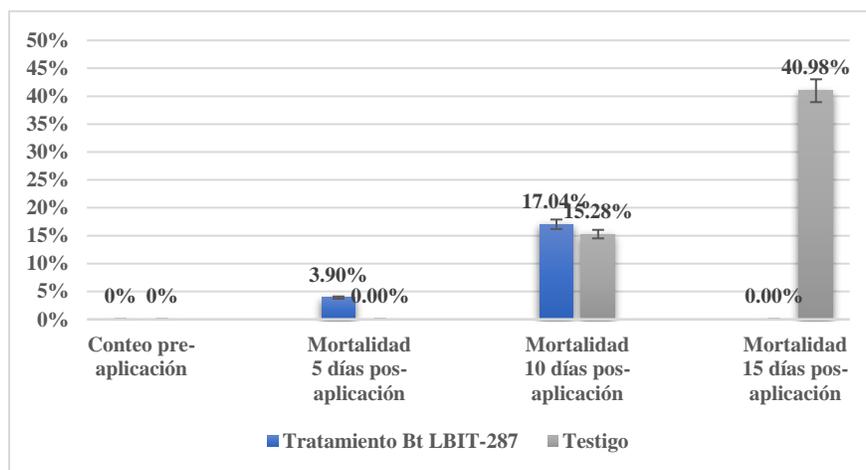


Figura 10. Porcentajes de mortalidad en larvas de *P. xylostella*, obtenidos con formulación líquida de *B. thuringiensis* LBIT-287 105mg totales para 33m² de cultivo de brócoli, localidad Providencia de Pérez, Irapuato, Guanajuato.

Respecto a la aplicación de formulación líquida suspensión de *B. thuringiensis* cepa LBIT-287, en la localidad Providencia (Fig.10), se observó una variación de mortalidad de 3.9 a 17.04% a los 5 y 10 días pos-aplicación, sin embargo, también se observó efecto de mortalidad en el grupo testigo a los 10 y 15 días pos-aplicación siendo en este último el mayor porcentaje con 40.98% en comparación con el tratamiento; aunado a esto, el análisis de varianza no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza (ANOVA) de porcentajes de mortalidad en larvas de *P. xylostella* en cultivo de brócoli tratado con *Bacillus thuringiensis* LBIT-287 formulación líquida, condiciones de campo, localidad Providencia de Pérez.

| | Tratamiento Bt LBIT-287 105mg | Testigo |
|-------------------------------------|-------------------------------|---------|
| % Mortalidad 5 días pos-aplicación | 3.9 c | 0.00 c |
| % Mortalidad 10 días pos-aplicación | 17.04 b | 15.28 c |
| % Mortalidad 15 días pos-aplicación | 0.00 c | 40.98 a |

Diferentes literales por columna en Tratamiento Bt LBIT-287 y en Testigo indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05) utilizando la prueba de Tukey.

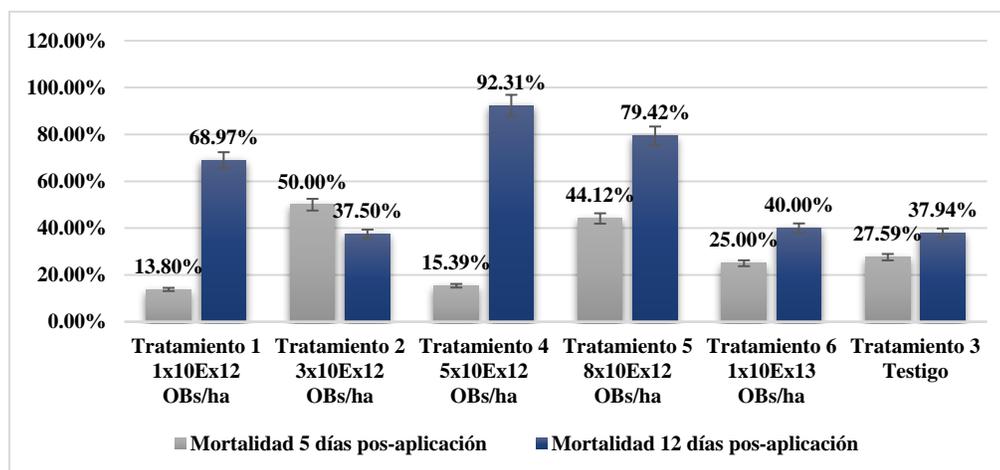


Figura 11. Porcentajes de mortalidad en larvas de *P. xylostella*, obtenidos con formulación líquida de baculovirus PxNPV, 6 tratamientos diferentes en cultivo de repollo, localidad San Francisco de la Charca, Irapuato, Guanajuato.

Para la segunda aplicación de formulación líquida de baculovirus PxNPV en cultivo de repollo, en localidad San Francisco (Fig. 11) se obtuvo una variación de mortalidad de 13.8 a 50% a los 5 días pos-aplicación y de 37.5 a 92.31% a los 12 días; la mayor mortalidad fue de 92.31% con el tratamiento 4 de 5x10¹² OBs/ha a los 12 días pos-aplicación y la menor fue de 13.8% para el tratamiento 1 de 1x10¹² OBs/ha a los 5 días pos-aplicación; por otro lado, los tratamientos 5 y 6, de 8x10¹² OBs/ha y 1x10¹³ OBs/ha respectivamente, registraron una mortalidad considerable de 79.42% y 68.97%, ambos a los 12 días pos-aplicación; el análisis de varianza (Cuadro 4) a los 5 días pos-aplicación no mostró diferencias significativas de los tratamientos 2 y 5 pero estos fueron diferentes de los tratamientos 1, 4 y 6 que a su vez, no mostraron diferencias con el grupo testigo; por último, el análisis a los 12 días pos-aplicación registró diferencia significativa entre el tratamiento 4 y los tratamientos 1, 2, 5 y 6, sin embargo los tratamientos 1 y 5 no mostraron diferencias entre ellos y los tratamientos 2 y 6 compartieron igualdad estadística con el grupo testigo.

Cuadro 4. Análisis de varianza (ANOVA) porcentajes de mortalidad en larvas de *Plutella xylostella* en cultivo de repollo tratado con baculovirus P_xNPV formulación líquida, condiciones de campo, localidad San Francisco de la Charca.

| Tratamiento | % Mortalidad 5 días pos-aplicación | % Mortalidad 12 días pos-aplicación |
|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 1 1x10 ¹² OBs/ha | 13.80 c | 68.97 b |
| 2 3x10 ¹² OBs/ha | 50 a | 37.5 c |
| 4 5x10 ¹² OBs/ha | 15.39 c | 92.31 a |
| 5 8x10 ¹² OBs/ha | 44.12 a | 79.42 b |
| 6 1x10 ¹³ OBs/ha | 25 bc | 40 c |
| 3 Testigo | 27.59 bc | 37.94 c |

Diferentes literales por columna en %Mortalidad indican diferencias significativas entre los tratamientos (P<0.05) utilizando la prueba de Tukey.

Para la tercera aplicación se utilizaron formulaciones de polvo humectable de baculovirus P_xNPV a razón de 6.12x10¹⁰ OBs/30m² y de *B. thuringiensis* cepa LBIT-229 a razón de 2g/30m² en la localidad Santa Rita, se observó una variación de mortalidad de larvas *P. xylostella* de 80 a 26.6% durante los 7 y 14 días pos-aplicación (Fig. 12); en el tratamiento con baculovirus, se registró que, el mayor porcentaje de mortalidad fue a los 7 días pos-aplicación con 80% y el menor fue de 58.82% a los 14 días pos-aplicación; en el caso de la aplicación de *B. thuringiensis* LBIT-229 se registró una variación de mortalidad de 50 a 26.66%, siendo a los 7 y 14 días pos-aplicación respectivamente; en el tratamiento combinación de ambos entomopatógenos se observó variación de mortalidad de 50 a 37.5% a los 7 y 14 días pos-aplicación respectivamente, en comparación con el testigo positivo Dipel®, que demostró una mayor mortalidad de 57.14% a los 7 días pos-aplicación, y que a su vez también disminuyó a 42.85% a los 14 días pos-aplicación; en el caso del testigo negativo conformado por agua y coadyuvantes de formulación, se observó una variación de mortalidad de solo 6.25 a 7.14% a los 7 y 14 días respectivamente.

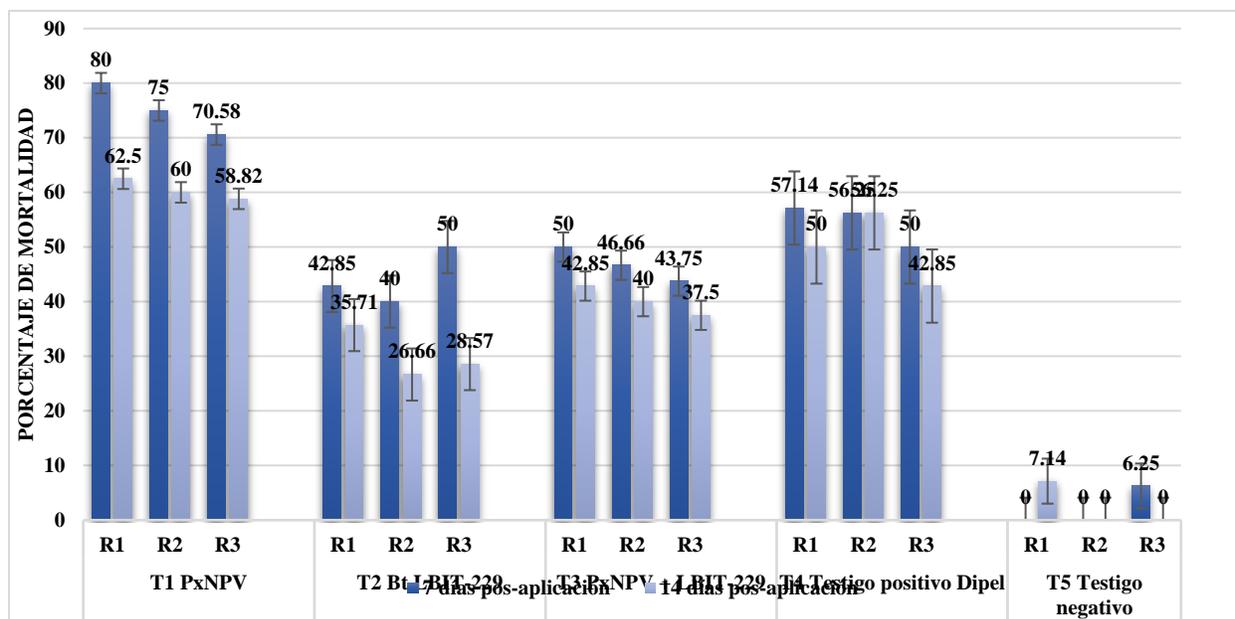


Figura 12. Porcentajes de mortalidad en larvas de *P. xylostella*, obtenidos con formulación polvo humectable de baculovirus P_xNPV y *B. thuringiensis* LBIT-229, en cultivo de brócoli, localidad Santa Rita, Dolores Hidalgo, Guanajuato.

CONCLUSIÓN

En el bajío mexicano la aplicación de formulaciones de baculovirus P_xNPV ha mostrado efectividad para el control de larvas de *Plutella xylostella* en cultivos de brócoli, no así en combinación con *B. thuringiensis*. En la actualidad el uso de entomopatógenos para el control de plagas sigue siendo un área de oportunidad ya que es una práctica que aún no ha alcanzado su auge, esto debido a las tendencias de uso de insecticidas químicos por parte de los productores de crucíferas en la región.

BIBLIOGRAFÍA

- Agboyi, L.K., Ketoh, G.K., Martin, T., Glitho, I.A., Tamo, M. (2016). Pesticide resistance in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations from Togo and Benin. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 36(4): 204-210.
- Batista, Filho, A., Alves, S. B., Augusto, N. T., Pereira, R. M. Alves, L.F. (2001). Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotrop. Entomol.* 30(3): 411-416.
- Bopape, M.J., Nofemela, R.S., Mosiane, M.S., Modise, D.M. (2017). Comparison of Biological and Chemical Control Methods in Suppressing *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on Cabbage in South Africa. Mysore. *J. Agric. Sci. (Special Issue)*: 33-42.
- Del Rincón-Castro, M.C., Ibarra, J.E. (2011). *Entomopathogenic viruses*. Biological Control of Insect Pests, 1st ed. Studium Press, India, 29-64.
- Gong, W., Yan, H.H., Gao, L., Guo, Y.Y., Xue, C.B. (2014). Chlorantraniliprole resistance in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 107(2): 806-814.
- Guo, L., Desneux, N., Sonoda, S., Liang, P., Han, P., Gao, X.W. (2013). Sublethal and transgenerational effects of chlorantraniliprole on biological traits of the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Crop Prot.* 48: 29-34.
- Imran, M. (2018). Economic Insect Pests of *Brassica*. In *Brassica Germplasm: Characterization, Breeding and Utilization*, IntechOpen. pp 107.
- Philips, C.R., Fu, Z., Kuhar, T.P., Shelton, A.M., Cordero, R.J. (2014). Natural history, ecology, and management of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae), with emphasis on the United States. *J. Integr. Pest Manag.* 5(3): D1-D11.
- Soria, E.G., de la Garza Carranza, M.T., Rebollar-Rebollar, S., Martínez, J.H. (2016). La producción de brócoli bajo riego en Guanajuato, México: 1980-2011. *Revista Análisis Económico*, 31(78): 77-91.
- Tamez-Guerra, P., Zamudio, V., Martínez Carrillo, J.L., Rodríguez Padilla, C., Tamez-Guerra, R.S., Gómez Flores, R. A. (2006). Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia UANL*, 9(2).
- Throne, J.E., Weaver, D.K., Chew, V., Baker, J.E. (1995). Probit analysis of correlated data: multiple observations over time at one concentration. *J. Econ. Entomol.* 88(5): 1510-1512.
- Vivanco-Estrada, R.A., Gavi-Reyes, F., Razo-Contreras, D., Sánchez-Rodríguez, E., Coria-Téllez, A. (2017). Incremento de calidad y menor costo de producción de brócoli (*Brassica oleracea* L.) mediante nutrición balanceada vía fertirriego. *Agroproductividad*, 10(9): 15-20.
- Webb, S.E., Niño, A., Smith, H.A. (2016). Manejo de Insectos en Crucíferas (Cultivos de Coles) (Brócoli, Repollo, Coliflor, Col, Col Rizada, Mostaza, Rábano, Nabos). Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de Florida. ENY-481
- Zalucki, M.P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L., Furlong, M.J. (2012). Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Ecol. Entomol.* 105(4): 1115-1129.