

## Obtención de cultivos de brócoli libres de plagas e insecticidas químicos mediante el control biológico con baculovirus

C.J. González-Gutiérrez<sup>1</sup>, V. Braca-Arellano<sup>1</sup>, F. Tamayo-Mejía<sup>2</sup>, y M.C. Del Rincón-Castro.<sup>1,3</sup>

**1** Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. **2** Secretaría de Desarrollo Agroalimentario y Rural, Celaya, Guanajuato. **3** Departamento de Alimentos División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca.

[cdelrincon@ugto.mx](mailto:cdelrincon@ugto.mx)

### RESUMEN

El cultivo de crucíferas es altamente rentable por lo que en México se siembran alrededor de 50 mil ha, de las cuales, 74.42% son de brócoli, 12.45% de col y 7.0% de coliflor. Es por esto, que el brócoli ha tenido un auge importante pues en los últimos treinta años, la superficie sembrada se incrementó a un ritmo de 13.8%. Debido a que la palomilla dorso diamante *Plutella xylostella*, desarrolla resistencia a los insecticidas químicos rápidamente y estos son dañinos para el consumo humano, es importante buscar otras alternativas para su control, como es el control biológico de plagas. Dentro de este encontramos al uso de los Baculovirus. La producción del baculovirus PxNPV se realizó exitosamente en larvas de *T.ni* y *P. xylostella*. Las larvas se colectaron al quinto día, pues en este momento presentaban signos característicos de la infección por nucleopoliedrovirus. Se recomienda utilizar la dosis de  $3 \times 10^{12}$  CO/ha del Baculovirus PxNPV a nivel de campo, para el control de la palomilla dorso de diamante *P. xylostella* como una medida alternativa al uso de insecticidas químicos para producir brócolis orgánicos y seguros para el consumidor.

**Palabras clave:** Baculovirus, brocoli, inocuidad alimentaria.

### ABSTRACT

Cruciferous cultivation is highly profitable, so in Mexico, around 50 thousand ha are planted, of which 74.42% are broccoli, 12.45% cabbage, and 7.0% cauliflower. This is the reason why broccoli has had an important boom because the sown area has increased at a rate of 13.8% in the last thirty years. Because the diamondback moth *Plutella xylostella* develops resistance to chemical insecticides quickly and is harmful for human consumption, it is important to look for other alternatives for their control, such as biological pest control. Within this, we find the use of Baculovirus. The production of the baculovirus PxNPV was carried out successfully in *T.ni* and *P. xylostella* larvae. The larvae were harvested on the fifth day since, at this time, they showed characteristic signs of infection by nucleopolyhedrovirus. It is recommended to use the dose of  $3 \times 10^{12}$  CO/ha of Baculovirus PxNPV at the field level to control the diamondback moth *P. xylostella* as an alternative measure to the use of chemical insecticides to produce organic and safe broccoli for the consumer.

**Keywords:** Baculoviruses, brocoli, food safety

**Área:** Microbiología y Biotecnología

## INTRODUCCIÓN

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *Itálica* Plenck.) es una hortaliza de importancia económica a nivel mundial debido a sus valores alimenticios y medicinales. Tanto las hojas como la inflorescencia (florete) tienen alto valor nutricional por sus contenidos de proteínas, carbohidratos, fibra, calcio y hierro, entre otros. Las crucíferas, principalmente el brócoli, se ven afectadas por consumidores biológicos pues encuentran en ella propiedades nutricionales benéficas para su desarrollo (Vivanco-Estrada *et al.*, 2017; Choque-Cajía *et al.*, 2018; Maldonado-Montalvo *et al.*, 2017).

Se han encontrado como plagas comunes en las crucíferas, los siguientes insectos: palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*), gusano del corazón de la col (*Copitarsia consueta*), gusano falso medidor (*Trichoplusia ni*), gusano peludo (*Estigmene acrea*), pulgón cenizo de la col (*Brevicoryne brassicae*), chinche arlequín (*Murgantia histrionica*), chinche ligus (*Lygus sp.*), mosca de la raíz (*Hylemya sp.*) y minador de la hoja (*Liriomyza sp.*). Estos insectos están en la mayoría de las áreas productoras de México ocasionando daños y pérdidas variables, dependiendo de la zona y las condiciones de cultivo de cada región (Salas-Araiza *et al.*, 2016; CESAVEG, 2019). El control químico ha sido el método en el control de plagas más utilizado porque es fácil, proporciona resultados rápidos y, la mayoría de las veces, efectivos, incluso aunque aumenta el costo de producción, cambia el equilibrio ambiental y puede ser dañino para los humanos (Junior *et al.*, 2018). Debido a que la palomilla dorso diamante, desarrolla resistencia rápidamente, es importante buscar otras alternativas para su control, como es el control biológico de plagas, dentro de este encontramos al uso de los Baculovirus. Estos pertenecen a la familia Baculoviridae y son usados principalmente como plaguicidas biológicos. Los baculovirus tienen un espectro de actividad muy estrecho (a menudo limitado a solo una especie), por lo que se consideran seguros para humanos y otras especies animales. En este trabajo se realizó la formulación de distintas mezclas del baculovirus PxNPV con ingredientes inertes y se evaluó a nivel de invernadero y de campo su actividad como bioinsecticida en el control de *Plutella xylostella*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Mantenimiento de la colonia.

*P. xylostella*, se mantuvo bajo condiciones de insectario tales como temperatura ambiente, con fotoperiodo de 16:8 h luz: oscuridad. Las larvas se mantuvieron en contenedores con hojas de brócoli como alimento hasta el segundo estadio y del tercer estadio hasta las pupas se colocaron en cajas Petri adicionadas con dieta artificial. Las pupas se colocaron en jaulas entomológicas de acrílico de 30 cm x 30 cm, los adultos se alimentaron con jarabe de maíz al 10 % y se les colocaron hojas frescas de brócoli para que depositaran los huevecillos en ella. Una vez que esto ocurrió, estas se pasaron con los huevecillos a contenedores, hasta su eclosión.

### Producción del baculovirus PxNPV.

La amplificación de la cepa viral se llevó a cabo en contenedores de plástico con dimensiones de 25 cm x 15 cm, en donde se colocó dieta artificial, se inocularon 2 mL del extracto crudo de la cepa PxNPV. Posteriormente se colocaron larvas de 3er instar de *T.ni* y *S. frugiperda* independientemente, las cuales fueron incubadas bajo condiciones de insectario en sus dietas correspondientes. Al quinto día posterior a la infección con el virus, las larvas muertas, se colectaron y se trituraron en un mortero de porcelana estéril, con 10 mL de SDS 1%. El homogenizado se filtró con una doble malla de organza, luego el filtrado se centrifugó a 13000 rpm y 4°C durante 15min (Centrifuga Hermle, Z326K). La pastilla se lavó 4 veces con SDS al 1%, seguido de 1 lavado con agua destilada estéril. La pastilla resultante se resuspendió con agua destilada estéril para finalmente almacenar las muestras a 4°C hasta su uso.

### Aplicación en invernadero de la solución emulsificante.

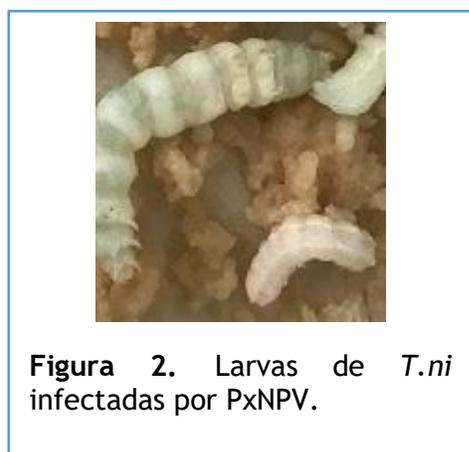
La aplicación de la solución emulsificante se realizó el día 25 de Agosto del 2020 en el invernadero de agronomía de la DICIVA de la Universidad de Guanajuato, se realizó un conteo previo a la aplicación y tres conteos a los 5, 10 y 15 días posteriores a la aplicación. Se usaron seis surcos para cada tratamiento, cada unidad experimental de 30 m<sup>2</sup>. Se usaron como tratamientos la solución emulsificable que contenía una concentración de 3 x 10<sup>12</sup> CO/ ha y un control positivo.

### Evaluación de diferentes concentraciones de P<sub>x</sub>NPV en campo.

La aplicación se realizó en Ejido “El Nido”, Irapuato, Guanajuato. De acuerdo con la ubicación geográfica se encontró una altitud 20.673481 y latitud -101.387070, las características climatológicas según SIAFEG fueron: temperatura, 14 °C; humedad relativa, 75%; velocidad de viento, 8 km/ h y precipitación 0%. Se aplicaron 6 tratamientos con cinco diferentes dosis y un control positivo. Se nombraron los tratamientos para simplificar la ubicación de la siguiente manera: T1, 1 x 10<sup>12</sup> CO/ ha; T2, 3 x 10<sup>12</sup> CO/ ha; T3, control positivo (agua); T4, 5 x 10<sup>12</sup> CO/ha; T5, 8 x 10<sup>12</sup> CO/ ha; T6, 1 x 10<sup>13</sup> CO/ ha. La distribución de los tratamientos se realizó por bloques completamente al azar, cada unidad experimental fue de 25 m<sup>2</sup> con cuatro repeticiones cada una. Cabe destacar que los cuerpos de oclusión del baculovirus P<sub>x</sub>NPV, se formularon con glicerina como vector y Tinopal al 1% como protector solar únicamente. La evaluación de la infestación larval se realizó el mismo día previo a la aplicación, así como a los 5, 8 y 12 días posteriores a la aplicación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Mantenimiento de colonia de *Plutella xylostella*.** El mantenimiento de esta colonia permitió la disponibilidad de larvas, huevecillos y adultos todo el año. A causa de esta temporada en donde las temperaturas superaron los 28 °C, la población mensual de *P. xylostella*, es en promedio de 3200 larvas, 300 adultos y masas de huevecillos (Figura 1).



**Figura 2.** Larvas de *T.ni* infectadas por P<sub>x</sub>NPV.

**Amplificación del baculovirus P<sub>x</sub>NPV.** La producción del baculovirus se realizó por lotes y hasta el momento se produjeron dieciséis, los cuales se fueron nombrando por fecha y lote. Las larvas se recuperaron al quinto día, pues en este momento presentaban signos característicos de la infección por nucleopoliedrovirus, en este tiempo las larvas

estaban más grandes de lo normal y presentan una coloración blanquecina. Posterior a este tiempo, cuando ya muestran una coloración negra es probable que ya no se puedan recuperar, lo anterior nos indica que ya están en la última fase de infección y que la cutícula esta degradada por acción de las quitinasas producidas por efecto del virus, al tocarlas “explotaría” pues el integumento está totalmente degradado. En la figura 2, se pueden observar los signos característicos a una infección por un



**Figura 1.** Colonia de *Plutella xylostella*

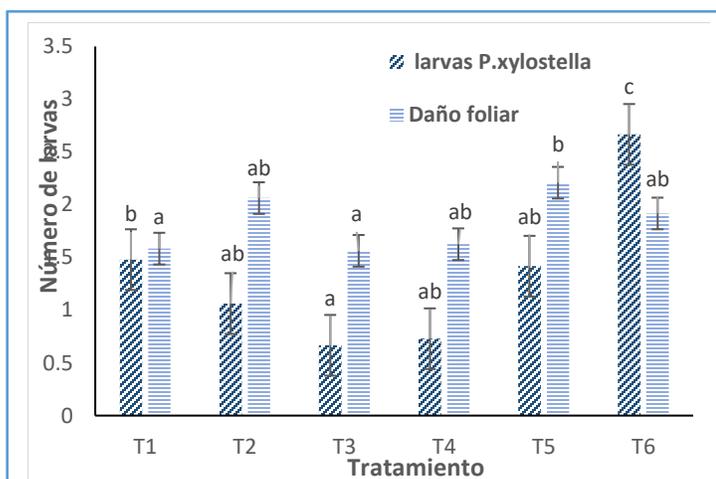
nucleopoliedrovirus, esto coincide con lo descrito por Ibarra *et al.* (2006), donde mencionan que las larvas afectadas no presentan signos durante los primeros días después de la infección *per os*. A medida que pasan los días, su comportamiento cambia, pues son más lentos, dejan de comer y su crecimiento se detiene, además de que se observa un notable cambio de color del integumento y el reblandecimiento de éste, el cual toma un color blanquecino que posteriormente se va oscureciendo, se rompe y libera un fluido que contiene grandes cantidades de CO<sub>2</sub>s.

#### Aplicación en campo de diferentes dosis del baculovirus P<sub>x</sub>NPV en campo.

Los resultados de la evaluación de diferentes dosis en campo (Figura 3) muestran que el daño foliar disminuye a partir de la concentración T2 ( $3 \times 10^{12}$  CO/ ha) y no muestra diferencia estadísticamente significativa a excepción de con T1 ( $1 \times 10^{12}$  CO/ ha) que es una concentración más baja y T6 ( $1 \times 10^{13}$  CO/ ha) concentración más alta, esta última diferencia puede ser debido a que se contaron tres plantas por bloque, número de plantas poco significativas como población de muestreo pues se pudieron haber contado plantas más dañadas. En

contraste, el número de larvas encontradas fue disminuyendo a partir de T2 y no hubo diferencia estadísticamente significativa a excepción de con T1 que como se mencionaba anteriormente, es una concentración más baja que T2 y con T3 que es la formulación líquida sin el baculovirus, esto pudo deberse al acomodo de los bloques, pues el tratamiento quedaba justo en medio de las diferentes dosis del baculovirus P<sub>x</sub>NPV.

Debido a los anteriores se considera que la dosis que se recomienda usar del Baculovirus P<sub>x</sub>NPV a nivel de campo es de  $3 \times 10^{12}$  CO/ha, que es similar a la ya reportada por otros autores para aplicación en campo de otros nucleopoliedrovirus. Por otro lado, Zhu *et al.* (2013), aseveran que el Tinopal, además de proteger a los cuerpos de oclusión de los rayos UV del sol, rompe la membrana peritrófica de quitina de los insectos coadyuvando de esta manera a una infección efectiva a nivel de campo, esto coincide con los resultados realizados en los experimentos de esta investigación, en donde la cantidad de tinopal es directamente proporcional a la mortalidad larval. Por otro lado, en la aplicación en campo (Figura 3), hubo una disminución significativa de población de *Plutella xylostella* al quinto día, que es el tiempo en el que se observa mortalidad *in vitro*, esto refleja que la formulación tuvo una buena adherencia a la planta y protege a los cuerpos de oclusión de las condiciones climatológicas adversas al virus. En el análisis de dosis realizado a campo abierto, se obtuvo como dosis recomendada la  $3 \times 10^{12}$  CO/ha en donde la población larval disminuyó, así como el daño foliar a las plantas asperjadas con este tratamiento se mantuvo. Anteriormente, ya se ha reportado la aplicación de baculovirus contra *Plutella xylostella* a nivel de campo, un granulovirus proveniente de Kenia (PxGV Nya-01) y se encontró que la dosis de  $3.0 \times 10^{13}$  CO/ ha controló a la palomilla dorso diamante en col rizada (Grzywacz *et al.* 2004). Sin embargo, se ha demostrado que los granulovirus son menos infectivos que los nucleopoliedrovirus pues tan solo en este caso, se requiere 10 veces más de inóculo para infectar una hectárea.



**Figura 3.** Número de larvas de *Plutella xylostella* presentes en plantas de brócoli por tratamiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- CESAVEG. (2016). Sanidad Vegetal. 07/Nov/2019, de Comité Estatal de Sanidad Vegetal Sitio web: <http://cesaveg.org.mx/>.
- Choque Cajia, R. M., Vilca Quispe, M. M. 2018. Control de larvas de *Plutella xylostella* (L), *CON Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii* en brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica) cv. Legacy en dos localidades de Arequipa.
- Grzywacz, D., Parnell, M., Kibata, G., Oduor, G., Ogutu, W., Miano, D., & Winstanley, D. 2001. The development of endemic baculoviruses of *Plutella xylostella* (diamondback moth, DBM) for control of DBM in East Africa. In *The Management of Diamondback Moth and other Cruciferous Pests* (Proceedings of the Fourth International Workshop on Diamondback Moth, Melbourne University) (pp. 179-183).
- Júnior, J. C. M., de Sene, R. C. A., Iost, F. H., Thuler, R. T., Torres, J. L. R., Moreira, É. F. A. 2018. evaluation of bacterial isolates in the control of *Plutella xylostella* L. IN BROCCOLI. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 21(2).
- Ibarra, J. E., Del Rincón, M. C., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, R., Galán-Wong, L. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 113-120.
- Maldonado-Montalvo, J., Ramírez-Juárez, J., Méndez-Espinoza, J. A., Pérez-Ramírez, N. 2017. El sistema de producción del brócoli desde la perspectiva del campo social de Pierre Bourdieu. *Estudios sociales (Hermosillo, Son.)*, 27(50), 0-0.
- 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 brocoli (brassica oleracea l.) mediante nutrición balanceada via fertirriego. *AGROProductividad*, 10(9), 15-20.
- Salas-Araiza, M. D., González-Márquez, M. A., Martínez-Jaime, O. A. 2016. Relación del número de individuos de *Brevicoryne brassicae* con la temperatura y con su parasitoide *Diaretella rapae* en brócoli en el Bajío, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(2), 463-469.
- Zhu, Y. C., Lu, H. X., He, D. H., & Yang, Z. R. 2013. Synthesis, fluorescence properties and applications of two novel oxadiazole-based stilbene optical brighteners as UV protectants for insect baculovirus. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 125, 8-12.