

HALLAZGO DE UN CYPOVIRUS EN UNA COLONIA DE *Diatraea magnifactella* Dyar (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) ESTABLECIDA EN LABORATORIO

Mariel Guadalupe Rosas-Herrera¹, Alicia Fonseca-González², Adriana Gabriela Trejo-Loyo^{3*},
Laura Patricia Lina-García^{2*}, Víctor Manuel Hernández-Velázquez^{2*} y Verónica Obregón-
Barboza²✉

¹Facultad de Ciencias Biológicas, ²Centro de Investigación en Biotecnología, ³Centro de Investigaciones Biológicas, *Cuerpo Académico de Fitopatología y Entomología. Av. Universidad 1001. Col. Chamilpa. Cuernavaca, Morelos, México. C. P. 62209.

✉Autor de correspondencia: veronica.obregon@uaem.mx

RESUMEN. En el presente trabajo se da a conocer el hallazgo de un *Cypovirus* en una Colonia del barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea magnifactella* Dyar, 1911, establecida en el laboratorio de Control Biológico del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del estado de Morelos, cuyo objetivo es la evaluación de entomopatógenos para su control. En la generación 22^a se detectaron por primera vez síntomas como son pérdida del apetito, alargamiento del ciclo, deformaciones en pupas y adultos, así como disminución de la fertilidad, los cuales provocaron una merma en la producción de insectos. El *Cypovirus* fue confirmado al disectar una larva con retardo en el crecimiento y obtener su intestino, el cual presentó una apariencia lechosa característica de la infección por estos virus. Se realizó una preparación fresca de una porción del intestino y se observó la presencia de cuerpos de oclusión refringentes. Se probó un método no invasivo para eliminar la infección sin tener que sacrificar toda la colonia, que consistió de un proceso de selección a partir de la formación de parejas de reproducción y la técnica de tinción de Buffalo Black en meconias, los cuales en conjunto permitieron eliminar la forma activa del CPV.

Palabras clave: Plaga, Buffalo Black, entomopatógenos, dieta meridiana.

Finding out a Cypovirus in a colony of *Diatraea magnifactella* 1911 (Lepidoptera: Crambidae) established in laboratory

ABSTRACT. In the present work we report the discovery of a Cypovirus in a Colony of the sugarcane borer, *Diatraea magnifactella* Dyar, 1911, established in the Biological Control laboratory (Biotecnology Research Center of the Autonomous University of Morelos State) whose objective is the evaluation of entomopathogens for its control. In generation 22nd, symptoms such as loss of appetite, elongation of the life cycle, deformations in pupae and adults, as well as decreased fertility were detected for the first time, which caused a decrease in insect production. Cypovirus was confirmed by dissecting a larvae with slowly growth and obtaining its intestine, which presented a milky appearance characteristic of the infection by these viruses. A fresh preparation of a portion of the intestine was performed and the presence of refractive occlusion bodies was observed. A noninvasive method was used to eliminate the infection without sacrificing the whole colony, which consisted of the formation of reproduction pairs and the Buffalo Black staining technique in meconium, which together allowed delete the active form of CPV.

Keywords: Pest, Buffalo Black, entomopathogens, meridian diet.

INTRODUCCIÓN

Las crías de insectos permiten obtener cantidades suficientes de insectos que son utilizadas tanto para fines comerciales como experimentales en varias áreas de la ciencia (Cohen, 2001). Entre las especies más utilizadas experimentalmente están los lepidópteros de importancia económica, como lo es *Diatraea magnifactella*, un barrenador de los tallos de la caña de azúcar.

Para establecer las colonias en laboratorio se recomienda coleccionar en campo huevos y/o larvas de los primeros estadios, para que se adapten rápidamente a la dieta suplementada y a las condiciones del laboratorio (Chacón-Castro *et al.*, 2009). Una vez en laboratorio deben ser cuarentenados durante una generación para detectar si desarrollan signos o síntomas característicos

de parasitoides y entomopatógenos. Sin embargo, algunos entomopatógenos como los virus pueden ser transmitidos verticalmente a la descendencia (*trans ovum* o transovarialmente) y además pueden ocasionar infecciones crónicas que son difíciles de observar en la cuarentena. Por lo cual, si no se toman las medidas adecuadas, éstos podrían transmitirse de forma latente de generación en generación y eventualmente, bajo algunas condiciones de estrés, activarse (Allen, 1980).

Existen reportes de que las enfermedades crónicas en lepidópteros mantenidos en condiciones de laboratorio ocasionadas por virus entomopatógenos (VEs) del género *Cypovirus* (CPVs) causan efectos debilitantes que generan disminución en la fertilidad, estrés general y, eventualmente, la muerte (Allen, 1980; Simmons y Sikorowski, 1973; Sikorowski y Thompson, 1979). Estos VEs constituyen un gran problema cuando son activados por algún factor desencadenante, ya que debido a los efectos que ocasionan y a que pueden ser transmitidos transovarialmente en la población (Sikorowski *et al.*, 1973; Mery y Dulmage, 1975), las colonias infectadas por CPVs son prácticamente inútiles para propósitos de investigación.

Los CPVs son muy patogénicos y solamente infectan el sistema digestivo de los insectos, ocasionando un síntoma conocido como “intestino lechoso”, ya que los intestinos se observan blancos por la acumulación de los cuerpos de oclusión (COs) de estos virus. La infección de los CPVs es crónica y difícil de identificar a menos que el insecto sea sacrificado y se observen los intestinos.

En el laboratorio de Control Biológico de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), se estableció una colonia del barrenador de los tallos de la caña de azúcar, *Diatraea magnifactella* Dyar, con el fin de evaluar entomopatógenos como potenciales agentes de control biológico (Lina *et al.*, 2010). Los insectos fueron colectados y se cuarentenaron por una generación. Sin embargo, a finales del 2013 (generación 22^a), se observaron larvas de diferentes estadios con síntomas tales como menor talla y peso, pérdida del apetito, pupas deformes y adultos con diferentes grados de deformaciones en alas, lo cual sugirió una posible infección por virus. En el presente trabajo de investigación se reporta por primera vez la infección de un CPVs en una colonia de *D. magnifactella* mantenida en condiciones de laboratorio y se prueba una estrategia para eliminar la infección sin tener que destruir la colonia.

MATERIALES Y MÉTODO

La colonia de *D. magnifactella* establecida en el laboratorio es mantenida a una temperatura de 27 °C ± 2, 70 % ± 10 de humedad relativa y un fotoperiodo de 12:12 h (luz: oscuridad). Las larvas son confinadas de forma individual y alimentadas con dieta merídica. Los adultos son alimentados con miel al 15 %.

En la generación 22^a de la colonia, se detectó un incremento en el porcentaje de huevos inviábiles, así como la presencia de varias larvas pequeñas (comparadas con larvas de la misma edad) (Fig. 1A). Una de estas larvas se disectó, la preparación en fresco de una sección del tubo digestivo, cuya parte posterior tenía una apariencia lechosa, se observó al microscopio óptico en contraste de fases.

Método de tinción de la meconia con la técnica del Buffalo Black. Este colorante tiñe proteínas de color azul o negro, por lo tanto tiñe los COs de los VEs. Esta técnica se ha utilizado para identificar CPVs en la meconia de adultos de *Heliothis* spp. y *Helicoverpa zea* (Sikorowski *et al.*, 1971; Inglis *et al.*, 2003). Se depositaron 10 µL de agua destilada estéril sobre un portaobjetos, se realizó el frotis de una fracción de la meconia de ambos progenitores de cada pareja reproductiva, distribuyéndola homogéneamente en el portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente se sumergió en la solución de Buffalo Black (1.5 % en una solución de ácido acético glacial al 40 %) y se incubó a 40-45° C durante 5 min. Enseguida se lavó la preparación durante

10 segundos con agua destilada, se dejó secar y se observó al microscopio óptico en 40 y 100 X (Evans y Shapiro, 1997).

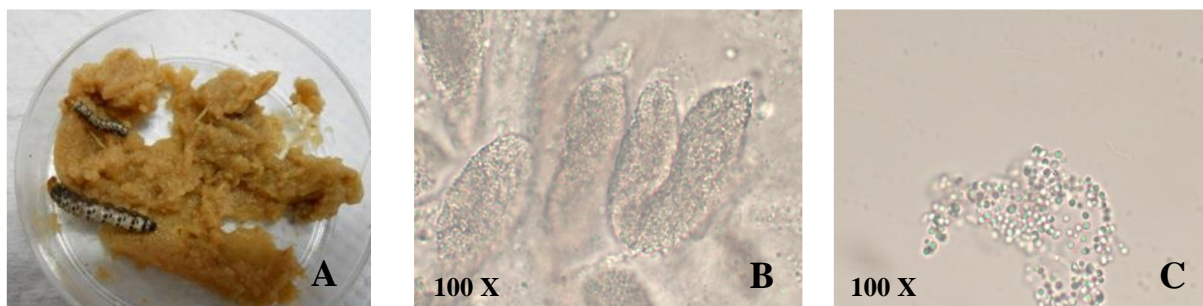


Figura 1. A) Larva pequeña de *Diatraea magnifactella* que presentó COs. Muestra en fresco de un intestino blanco en contraste de fases. B) Células hipertrofiadas llenas de COs refringentes. C) Célula en proceso de lisis liberando COs refringentes de forma hexagonal.

Proceso de selección para eliminar el CPV de la colonia de *D. magnifactella*. Se seleccionaron pupas que no presentaron bajo peso, ni menor tamaño ni deformaciones y se determinó el sexo de las mismas de acuerdo al protocolo descrito por Rincón y López-Ávila (2004). Enseguida se desinfectaron superficialmente de acuerdo al protocolo de Mery y Dulmage, 1975. Las pupas hembras se depositaron en grupos de 50 en los recipientes de emergencia. Las pupas macho se colocaron individualmente en recipientes de plástico.

De los adultos emergidos, se seleccionaron aquellos que no presentaron deformaciones en alas y se formaron parejas de acuerdo al protocolo de Allen (1980), éstas fueron transferidas a botes de reproducción. Se colectaron las meconias, así como las masas de huevos (diariamente), identificándolos respecto a la pareja de reproducción de la cual procedían.

Las masas de huevos se desinfectaron superficialmente con formalina al 15 % (Sikorowski *et al.*, 1973). Cuando las larvas neonatas emergieron, se transfirieron de dos en dos a cajas de Petri de 60 mm de diámetro conteniendo un trozo de dieta meridica de cerca de 3 cm³ y se sellaron con parafilm. Transcurridas dos semanas, se transfirieron individualmente a cajas con dieta fresca, cambiando la misma semanalmente hasta la fase de pupa. Todo el ciclo se mantuvo en las condiciones de insectario antes mencionadas y el proceso de selección se realizó en tres generaciones consecutivas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el intestino de la larva disectada, se observó la presencia de células hipertrofiadas llenas de COs refringentes de varios tamaños, característicos de los CPVs (Figs. 1B y C). Lo anterior coincide con las observaciones realizadas por Marzban *et al.* (2013), en larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) infectada con HaCPV. Aún cuando los primeros síntomas de la infección por CPVs se observaron en los lotes de huevos y larvas, también se observaron síntomas de efectos debilitantes de un CPV en las pupas y adultos, tales como pupas deformes, adultos con tallas inferiores al promedio, con diferentes grados de deformidades en las alas o que no lograron emerger y hembras que depositaban pocas masas de huevos y/o masas con huevos inviables (Fig. 2). Estos síntomas coinciden con los presentados en diferentes estadios de lepidópteros tales como *Bomby. Morix* Linnaeus, 1758, *Alsophila pometaria* Harris, 1841 y *Limantria (=Porthetria) dispar* (Linnaeus, 1758) (Neilson, 1964; Vail *et al.*, 1969; Magnoler, 1974; Allen, 1980; Bellonick, 1996).

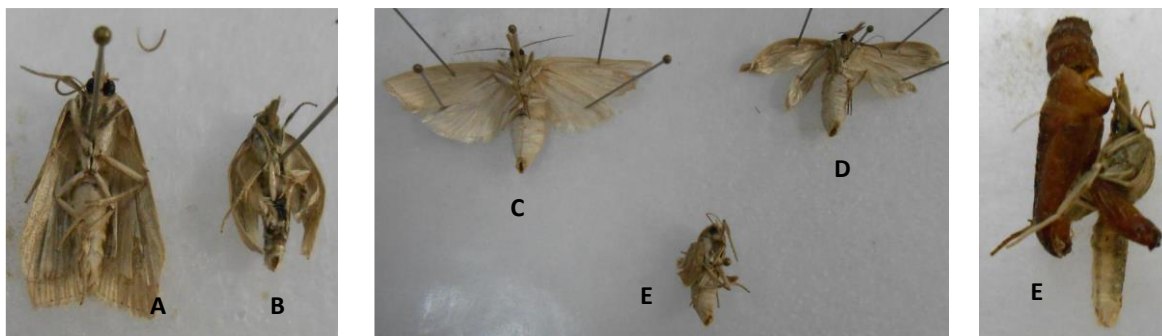


Figura 2. Adultos de *D. magnifactella*. A) Hembra de tamaño normal. B) Micro-hembra. C) Adulto normal. D y E) adultos deformes. F) Adulto que no logró emerger.

Dado que los CPVs son patógenos crónicos, cuyos síntomas son difíciles de identificar, y que son transmitidos verticalmente (*trans-ovum* o *trans-ováricamente*) (Bellonick y Mori, 1998), aunado a que pueden permanecer de forma latente y ser transmitidos generación tras generación sin que el insecto hospedero presente síntomas (Fuxa *et al.*, 2002), se recomienda la eliminación completa de la colonia y empezar un pie de cría libre de CPVs (Allen, 1980; Gouli *et al.*, 2011). Sin embargo, Allen (1980) recomienda realizar un protocolo de selección de parejas de reproducción durante varias generaciones, como un método para intentar eliminar un patógeno crónico. Por tal motivo se aplicó el protocolo propuesto por Allen, aunado a un método no invasivo para detectar COs de CPV en la meconia de los integrantes de las parejas de reproducción.

Proceso de selección de los adultos de *D. magnifactella*. El proceso de selección se realizó en tres generaciones consecutivas, descartándose para la siguiente generación las oviposturas de las parejas cuyas meconias dieron positivo a la presencia de COs mediante la tinción de Buffalo Black o las de aquellas parejas que aun siendo negativas, sus oviposturas fueron inviables. En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos.

En el primer proceso de selección se identificaron parejas que dieron negativo a la técnica de tinción, aun así presentaron masas de huevos inviables. Esto puede ser explicado por el hecho de que los CPVs ocasionan infecciones crónicas con efectos debilitantes como la disminución de fertilidad, en adultos de lepidópteros (Ignoffo y Adams, 1966; Vail *et al.*, 1969). En el segundo proceso, solamente una pareja dio positivo a la presencia de COs, lo que sugiere que en el proceso anterior se eliminó el virus en forma activa o, al menos, aquellos individuos que presentaron la infección con mayor grado de intensidad. En este caso también hubo parejas que aun siendo negativas mostraron pérdida de fertilidad o de viabilidad. En el tercer proceso de selección, todas resultaron negativas a la presencia de COs en las meconias y solamente dos presentaron huevos inviables.

Cuadro 1. Resultados del proceso de selección de parejas de reproducción de *D. magnifactella*.

Generación	Parejas de reproducción formadas	Meconias positivas a la tinción con Búfalo Black (Fig. 3)
23 ^a	22	10
24 ^a	34	1
25 ^a	37	0

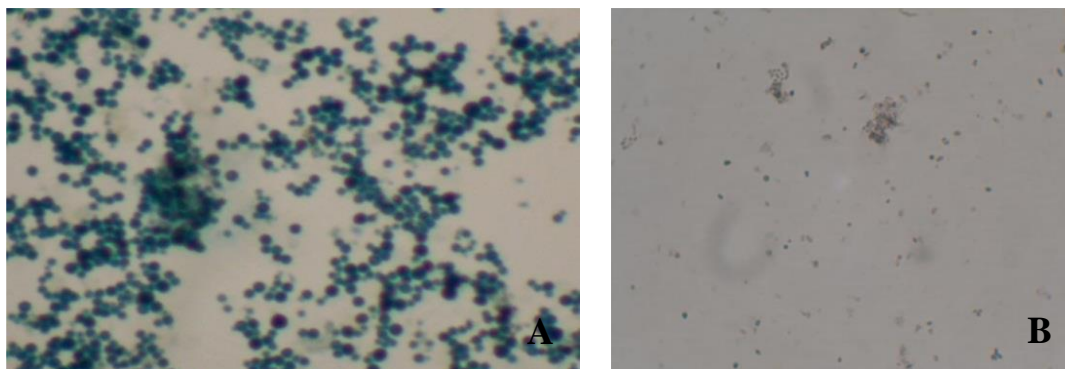


Figura 3. Meconias observadas en 100X teñidas con Buffalo Black, se observan COs característicos de CPVs. A) Pareja 21 de la generación 23ª. B) Pareja 27 de la generación 24ª.

CONCLUSIÓN

Los resultados nos permitieron corroborar que la patología gruesa observada en los diferentes estados de desarrollo, era ocasionada por un CPV. Cabe resaltar que este trabajo constituye el primer reporte de una colonia de *D. magnifactella*, infectada con un CPV. Los resultados obtenidos también sugieren que el proceso de selección con pares de reproducción en conjunto con un método no invasivo como lo es la tinción de las meconias con Buffalo Black, fueron efectivos para eliminar la forma activa del CPV. Sin embargo, es importante destacar que se ha reportado que los CPVs ocasionan infecciones latentes, en las cuales el virus no se está replicando en las células del hospedero y por lo tanto no se detecta la infección ni ocasiona la enfermedad (Fuxa *et al.*, 2002) pero si el insecto es expuesto a ciertas condiciones de estrés, el virus se puede activar.

Literatura Citada

- Allen, G. E. 1980. Impact of diseases on insects and procedures for detecting and eliminating them from cultures prior to release for biological control. Pp. 221–232. *In: Proceedings of the V International Symposia of Biological Control of Weeds, Brisbane, Australia.*
- Bellonick, S. 1996. Interactions of cytoplasmic polyhedrosis viruses with insects. Pp. 233–296. *In: Advances in Insect Physiology.* Vol. 26. Academic Press.
- Bellonick, S. and K. Mori. 1998. Cypoviruses. Pp. 337–369. *In: L. K. Miller and L. A. Ball. (Eds.) The insect viruses.* Plenum. New York.
- Chacón-Castro, C., Garita, R. C., Vaglio, C. C. y V. V. Villalba. 2009. Desarrollo de una metodología de crianza en laboratorio del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) como posible hospedante de insectos biocontroladores de interés agrícola. *Tecnología en marcha*, 22(4): 28–37.
- Cohen, A. C. 2001. Formalizing insect rearing and artificial diet technology. *American Entomologist*, 47: 198–206.
- Evans, H. and M. Shapiro. 1997. *Manual of the techniques in insect pathology.* Lawrence Lacey. Viruses.
- Fuxa, J. R., Richter, A. R., Ameen, A. O. and B. D. Hammock. 2002. Vertical transmission of TnsNPV, TnCPV, AcMNPV and possibly recombinant NPV in *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 79: 44–50.
- Gouli, V. V., Gouli, S. Y., Parker, B. L., Skinner, M. and M. V. Shternshis. 2011. New technology of mass-production of hyphomycetous fungi for plant protection. Pp. 211–217. *In: Proceedings of international conference for IPM: Strates and tactics*, Institute of plant protection. Minsk.
- Ignoffo, C. M. and J. R. Adams, 1966. A cytoplasmic-polyhedrosis virus, Smithiavirus pectinophora sp. of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Saunders). *Journal of Invertebrate Pathology*, 8: 59–66.

- Inglis, G. D., Lawrence, A. M. and P. P. Sikorowski. 2003. The use of meconia to nondestructively detect sublethal infections in Heliothines (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*, 96(2): 272–279.
- Lina-García, L., Obregón-Barboza, V., Sosa-Pliego, Y., Acevedo-Avilés, M., Martínez-Monrroy, A. G., Trejo-Loyo, A. G. y L. Díaz-Corro. 2010. Establecimiento de la cría de *Diatraea magnifactella* en condiciones de laboratorio. Pp. 467–469. In: V. M. Coria A., M. B. N. Lara Ch., G. Orozco G., H. J. Muñoz F. y R. M. Sánchez. (Eds.). *Memoria del XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico*, Uruapan, Michoacán, México.
- Magnoler, A. 1974. Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on larval and postlarval stages of the gypsy moth *Porthetria dispar*. *Journal of Invertebrate Pathology*, (23): 263–274.
- Marzban, R., He, Q., Zhang, Q. and X. X. Liu. 2013. Histopathology of cotton bollworm midguth infected with *Helicoverpa armigera* cytoplasmic polyhedrosis virus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4): 1231–1236.
- Mery, C. R. and H. T. Dulmage. 1975. Trasmisión, diagnosis and control of cytoplasmic polyhedrosis virus in colonies of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Insect Pathology*, 26: 75–79.
- Neilson, M. M. 1964. Effects of a cytoplasmic polyhedrosis on adult Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*, (7): 306–314.
- Rincón, D. F. y A. López-Ávila. 2004. Dimorfismo sexual en pupas de *Tecia solanivora* (Polvony) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista CORPOICA*. 5(1): 41–42.
- Sikorowski, P. P., Broome, J. R. and G. L. Andrews. 1971. Simple methods for detection of cytoplasmic polyhedrosis virus in *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 17: 451–452.
- Sikorowski, P. P., Andrews, G. L. and J. R. Broome. 1973. *Trans-ovum* transmission of a cytoplasmic polyhedrosis virus of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 21: 41–45.
- Sikorowski, P. P. and A. C. Thompson. 1979. Effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on diapausing *Heliothis virescens*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 33: 66–70.
- Simmons, C. L. and P. P. Sikorowski. 1973. A laboratory study of the effects of cytoplasmic polyhedrosis virus on *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 22: 369–371.
- Vail, P. V., Hall, I. M. and D. Gough. 1969. Influence of a cytoplasmic polyhedrosis on various developmental stages of the cabbage looper. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14: 263–274