

## ARTÍCULO CIENTÍFICO

### Comparison of the efficacy and yield of three native granulovirus over *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae

#### ABSTRACT

*Tecia solanivora* is one of the most limiting potato pests and the use of granulovirus constitutes a promissory alternative for its control. A biopesticide based on a granulovirus isolate from Peru is manufactured in Colombia, for controlling the pest under storage conditions. In a previous work, three native granulovirus from *T. solanivora* larvae from the localities of Chocontá, Mosquera and Carmen de Carupa of the Cundinamarca department were isolated. These native strains could be better adapted to both the host and the environmental conditions of the country. In the present work the three native isolates of granulovirus were evaluated formulated and unformulated under laboratory conditions by using a bioassay and were compared with the Peruvian strain. The formulated native viruses presented the highest efficacy with results between 88% and 100%, while the Peruvian isolate obtained 88%. These results were significantly different from the obtained with the unformulated virus isolates, for which the efficacy ranged between 36% and 86% for native isolates and was 59% for the Peruvian strain. The concentration of occlusion bodies (OB) produced per milligram of larva tissue was measured and no significant differences between the isolates were observed. The average yield was  $4.4 \times 10^7$  OB/mg larvae. Results allowed to select the native isolate from Mosquera (Cundinamarca) for a future biopesticide development for presenting the highest virulence levels.

**Keywords:** Tortricidae, moth, potato, biopesticide, baculovirus.

Radicado: 20 de abril de 2009  
Aprobado: 23 de junio de 2009

<sup>1</sup> Microbióloga Industrial. Investigadora profesional asistente. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. jagomez@corpoica.org.co

<sup>2</sup> Química farmacéutica Ph.D. Investigador Ph.D. asistente. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. lvillamizar@corpoica.org.co

<sup>3</sup> Biólogo M.Sc. Investigador máster asistente. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. cespinel@corpoica.org.co

<sup>4</sup> Bióloga Ph.D. Directora Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. acotes@corpoica.org.co

### Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Juliana Gómez<sup>1</sup>, Laura Villamizar<sup>2</sup>, Carlos Espinel<sup>3</sup>, Alba Marina Cotes P.<sup>4</sup>

#### RESUMEN

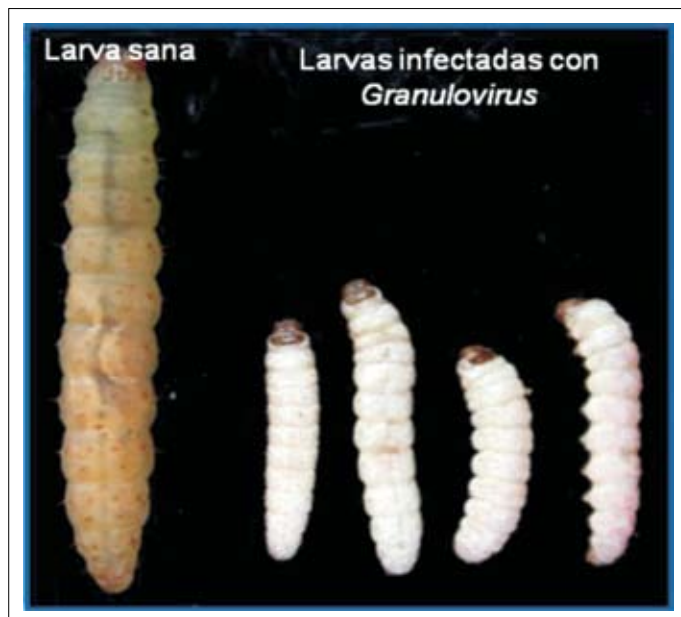
*Tecia solanivora* es una de las plagas más limitantes del cultivo de la papa, para cuyo control el uso de granulovirus constituye una alternativa promissoria. Para el control de la plaga en condiciones de almacenamiento, en Colombia se produce un bioplaguicida en polvo a base de un granulovirus aislado en Perú a partir de larvas de *Phthorimaea operculella*. En un trabajo previo se aislaron tres granulovirus nativos provenientes de larvas de *T. solanivora* de los municipios de Chocontá, Mosquera y Carmen de Carupa en el departamento de Cundinamarca, los cuales podrían estar mejor adaptados al insecto y a las condiciones ambientales del país. En el presente trabajo, los tres aislamientos de granulovirus se evaluaron mediante un bioensayo en laboratorio utilizándolos formulados y sin formular y teniendo como patrón de comparación la cepa peruana. Los virus nativos formulados presentaron eficacias entre 88% y 100%, mientras que para el aislamiento peruano se obtuvo 88%. Estos resultados fueron significativamente diferentes de los obtenidos con los aislamientos sin formular, para los cuales la eficacia estuvo entre 36% y 86% para los aislamientos nativos y, 59% para el aislamiento peruano. También se comparó la cantidad de cuerpos de inclusión (CI) producidos por miligramo de larva con cada uno de los aislamientos, entre los que no se encontraron diferencias significativas. El rendimiento promedio fue de  $4,4 \times 10^7$  CI/mg de larva. Los resultados permitieron seleccionar el aislamiento nativo proveniente de Mosquera (Cundinamarca) para el futuro desarrollo de un bioplaguicida por presentar los mayores niveles de virulencia.

**Palabras clave:** Tortricidae, polilla, papa, bioplaguicida, baculovirus.

#### INTRODUCCIÓN

LOS GRANULOVIRUS (GV), pertenecientes al género baculovirus, han sido estudiados por ser eficientes patógenos de artrópodos, especialmente de insectos y por presentar cuerpos de inclusión (CI) proteicos que los hacen resistentes a las condiciones ambientales (Caballero *et al.*, 2001). El virus actúa como un insecticida estomacal, cuando las larvas ingieren las partículas virales. Las larvas infectadas por granulovirus presentan síntomas característicos como la presencia de una coloración blan-

ca del tegumento (figura 1) y pérdida del apetito hasta el cese de la alimentación. La muerte se produce por desintegración de los tejidos y órganos; en este caso el tegumento se vuelve muy frágil y se rompe con facilidad liberando el contenido líquido con millones de cuerpos de inclusión (CI) (Niño y Notz, 2000a).



**Figura 1.** Larvas de *Tecia solanivora*

En varios países del mundo se ha descrito la presencia de un virus de la granulosis (PhopGV) infectando larvas de la polilla de la papa *P. operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), especie estrechamente relacionada con *T. solanivora* (Vickers *et al.*, 1991; Zeddám *et al.*, 1999). En este sentido, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en el Perú desarrolló un bioplaguicida a base de un aislamiento viral que se aplica a la semilla de papa en condiciones de almacenamiento para el control de *P. operculella*. La aplicación de este producto ocasiona hasta 98% de mortalidad de las larvas de la polilla (CIP 1992). Por otra parte, en Venezuela en 1992, se hallaron en el estado de Mérida larvas de *T. solanivora* afectadas por un granulovirus, el cual se aisló y está siendo estudiado con miras al desarrollo de una alternativa de control de la plaga (Niño y Notz, 2000b). En Colombia, en el año 2000 Corpoica se enfrentó al reto de producir un bioplaguicida a base de uno de estos granulovirus para responder a la emergencia sanitaria causada por la polilla guatemalteca *T. solanivora*. Inicialmente se obtuvo la cepa de PhopGV proveniente del Perú, se adaptó la tecnología de formulación desarrollada por el CIP y se realizó un ajuste tecnológico del producto, el cual se encuentra registrado ante el Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Villamizar *et al.*, 2005a).

Aunque el PhopGV puede infectar larvas de otras polillas como *T. solanivora*, la búsqueda y aislamiento de cepas nativas de granulovirus a partir de larvas de *T. solanivora* se planteó como objetivo de una investigación anterior, gracias a la cual actualmente se cuenta con tres aislamientos nativos provenientes de los municipios de Chocontá, Mosquera y Carmen de Carupa ubicados en el departamento de Cundinamarca (Villamizar *et al.*, 2005b). Dichos aislamientos probablemente se encuentran mejor adaptados a su insecto hospedero *T. solanivora* y a las condiciones ambientales de Colombia, lo cual podría resultar en un control más eficiente de la plaga.

Considerando estas ventajas y con miras a continuar con el desarrollo de un bioplaguicida a base de granulovirus para el control de *T. solanivora* para ser aplicado en condiciones de campo, el objetivo del presente estudio fue comparar los tres aislamientos nativos de granulovirus obtenidos en el departamento de Cundinamarca, teniendo en cuenta parámetros como eficacia y productividad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cría del insecto

Las larvas empleadas en los bioensayos se obtuvieron de la cría de *Tecia solanivora* del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica. Esta fue mantenida sobre dieta natural (tubérculos de papa variedad pastusa) en un cuarto de bioensayos a una temperatura de  $22 \pm 2$  °C y humedad relativa de  $75 \pm 5\%$ .

### Aislamientos de granulovirus

Los tres granulovirus evaluados fueron aislados a partir de larvas de *T. solanivora* en el departamento de Cundinamarca (Colombia) durante el 2004 y fueron conservados en solución salina estéril a  $-70$  °C en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Corpoica (Villamizar *et al.*, 2005b). Los aislamientos virales fueron codificados como VG002 (aislado en el municipio de Chocontá), VG003 (aislado en el municipio de Mosquera) y VG004 (aislado en el municipio de Carmen de Carupa). Como cepa de referencia se evaluó un aislamiento de granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú donado por el CIP, codificado como VG001, el cual fue mantenido bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

### Producción y purificación viral

La producción del virus empleado en los bioensayos se realizó mediante la inoculación tanto de posturas de *T. solanivora* como de tubérculos de papa pastusa, con suspensiones de cada uno de los aislamientos en estudio.

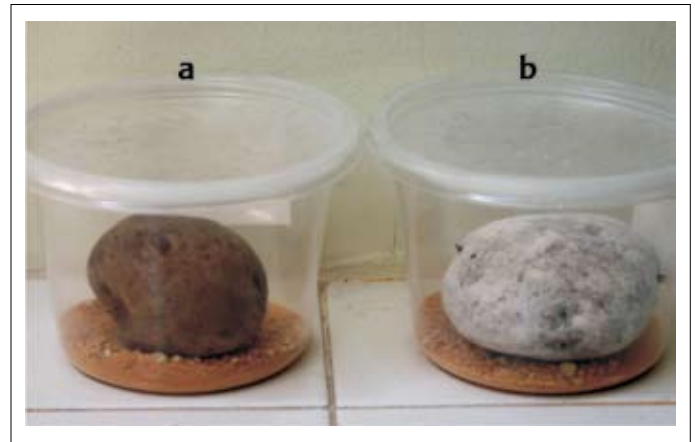
Al cabo de 20 días, se colectaron las larvas infectadas y se maceraron en SDS al 0,1%. La suspensión obtenida se filtró en tres capas de velo suizo estéril y se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se centrifugó a 15000 rpm durante 1 hora y el sedimento obtenido se resuspendió en 2 mL de tampón Tris-HCl (pH 6,0) y se centrifugó sobre un gradiente de glicerol de 30% - 80% (v/v) a 15000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la banda blanca que contenía el virus y se lavó dos veces en buffer Tris-HCl. La concentración de la suspensión de cuerpos de inclusión purificados se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro, usando una curva de calibración previamente estandarizada adaptando la metodología descrita por Matthiessen y colaboradores (1978).

### Determinación de la eficacia de tres aislamientos nativos de granulovirus

Se comparó la eficacia de los tres aislamientos nativos y la cepa peruana formulados de la misma forma que el producto semicomercial elaborado en Corpoica y sin formular. El bioensayo se desarrolló siguiendo el Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica-Corpoica, para la evaluación de la eficacia del bioplaguicida a base del granulovirus de *P. operculella* para el control de la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora*. Este método se encuentra validado y registrado por el Instituto Colombiano Agropecuario como un control de calidad de dicho bioplaguicida (Biotécnica, 2004).

De cada aislamiento se prepararon suspensiones virales ajustadas cada una a una concentración de  $1 \times 10^8$  CI/mL en un volumen de 50 mL. Estas suspensiones se entregaron a la planta de producción de baculovirus de Corpoica para su formulación en forma de polvo para espolvoreo, el cual presentó una concentración final de  $10^5$  CI/g. Como una forma de determinar si el proceso de formulación tuvo algún efecto sobre los aislamientos, estos se evaluaron sin formular utilizando la suspensión viral ajustada a  $10^5$  CI/mL, concentración equivalente a la obtenida en el producto formulado ( $10^5$  CI/g).

Los tratamientos de virus formulado se inocularon de la siguiente manera: se tomaron tres tubérculos de papa variedad pastusa y se colocaron en una bolsa de polietileno de alta densidad que contenía el producto, utilizando la dosis recomendada (5 g de producto por kg de papa). La bolsa se agitó vigorosamente hasta obtener un cubrimiento total de los tubérculos (figura 2b). Los tratamientos de virus sin formular se inocularon sumergiendo los tubérculos durante tres minutos en la suspensión viral y dejándolos secar durante 1 hora en cabina de flujo laminar.



**Figura 2.** Unidad experimental con tubérculo tratado con aislamientos virales sin formular (a) y formulados (b)

Posteriormente, cada tubérculo se colocó en un recipiente plástico de 16 onzas que contenía arena estéril en el fondo (unidad experimental) (figura 2) y sobre cada tubérculo se colocaron cuidadosamente 15 larvas neonatas de *T. solanivora*. Se contó con un testigo positivo, tanto para los aislamientos formulados como sin formular, en el cual los tubérculos se trataron con el producto o la suspensión viral del aislamiento peruano VG001; adicionalmente se contó con un testigo absoluto que consistió en tubérculos sin ningún tratamiento. Los recipientes se mantuvieron en un cuarto de bioensayos a  $22 \pm 2$  °C y una humedad relativa de 70%. El diseño experimental fue completamente al azar con tres unidades experimentales por tratamiento.

Pasados 25 días se realizó un análisis destructivo de todos los tubérculos, determinando el número de larvas muertas o desaparecidas, larvas sanas, larvas vivas con síntomas y pupas; los individuos se clasificaron dentro de dos grupos: muertos (larvas vivas con síntomas de infección, larvas muertas y larvas desaparecidas) y vivos (pupas y larvas sanas). La eficacia se calculó mediante la fórmula de Schneider – Orelly (Zar, 1999):

$$\text{Eficacia (\%)} = (b - k) / (100 - k) \times 100$$

Donde b es la mortalidad (%) en el tratamiento y k es la mortalidad (%) del testigo absoluto.

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (Anova) y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) mediante el programa estadístico Statistix versión 1.0.

### Estimación de la producción de cuerpos de inclusión

Como otro parámetro de selección de los aislamientos de granulovirus se tomó en cuenta la productividad, es decir, la cantidad promedio de cuerpos de inclusión producidos

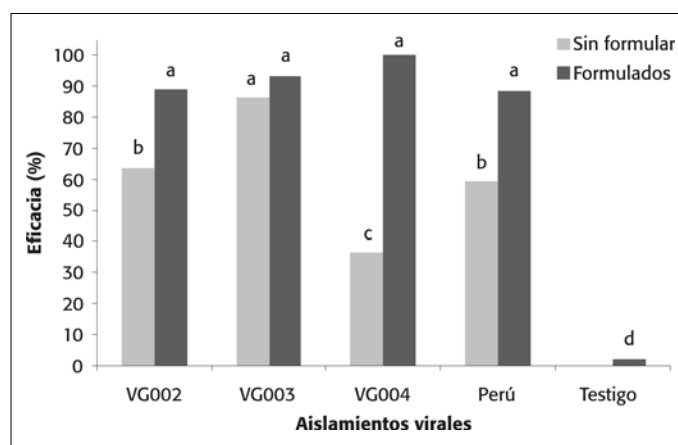
por miligramo de peso larval. Para cada aislamiento seleccionado se tomaron 10 larvas de *T. solanivora* infectadas y con cada una se preparó una suspensión viral de la siguiente manera: para cada suspensión se tomó una larva infectada de peso conocido, la cual se maceró y se llevó a un volumen de 10 mL con suero fisiológico estéril. Cada suspensión se pasó por papel filtro con el fin de retirar los tejidos de la larva. A partir del filtrado obtenido se hicieron diluciones y se leyó la absorbancia de la dilución adecuada en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y se calculó la concentración de la suspensión madre (CI/mL). A partir de ésta se calculó la cantidad de cuerpos de inclusión producidos por miligramo de larva utilizando el peso de éstas y la dilución empleada. El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y se aplicó un Anova (95%) mediante el programa Statistix versión 1.0, con el fin de detectar diferencias entre los rendimientos de los aislamientos virales. Como un parámetro de comparación, este mismo procedimiento se llevó a cabo también para la cepa de granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de la eficacia de tres aislamientos nativos de granulovirus

La eficacia promedio determinada con el bioensayo en el cual se evaluó la actividad de los diferentes aislamientos de granulovirus formulados y sin formular fue de 86,2%, 63,6%, 36,4% y 59,1% para los aislamientos VG003 (Mosquera), VG002 (Chocontá), VG004 (Carmen de Carupa) y la cepa de referencia del Perú, respectivamente, cuando se utilizaron sin formular y de 93,2%, 88,7%, 100% y 88,7% para los aislamientos VG003, VG002, VG004 y la cepa de referencia del Perú, respectivamente, cuando se sometieron al proceso de formulación estandarizado en la planta de producción semicomercial de baculovirus de Corpoica (figura 3).

La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) detectó diferencias significativas entre los tratamientos formulados y sin formular para los aislamientos virales VG002, VG004 y la cepa de referencia del Perú, siendo significativamente mayor la eficacia obtenida cuando los virus se sometieron al proceso de formulación (figura 3). Este resultado sugiere que posiblemente los auxiliares de formulación empleados para elaborar el producto tuvieron un efecto sobre las larvas de *T. solanivora*, ya sea causando su muerte o aumentando la susceptibilidad al virus. Dicho efecto podría deberse a la presentación del producto en forma de polvo que además tiene un tamaño de partícula muy pequeño (100  $\mu\text{m}$ ) (Villamizar *et al.*, 2005a), lo cual pudo producir el taponamiento de



**Figura 3.** Eficacia de los aislamientos de granulovirus formulados y sin formular, sobre larvas de *Tecia solanivora*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey 95%

los espiráculos de las larvas impidiendo su respiración y en consecuencia causando la muerte. Este taponamiento también podría haber generado una disminución de la tasa respiratoria de los insectos, debilitándolos y por ende haciéndolos más susceptibles a la infección (McVean *et al.*, 2002).

Resultados similares fueron reportados por Mascarín y Alves (2007), quienes determinaron la eficacia en condiciones de laboratorio de un aislamiento de granulovirus sobre larvas de *P. operculella* formulado como un polvo seco, evaluando también la acción del talco empleado para la formulación. En dicho estudio se observó que el diluyente en polvo del producto sin virus causó 60% de mortalidad de las larvas y cuando se mezcló con el virus a una concentración de  $5 \times 10^8$  CI/g, se obtuvo 100% de mortalidad, lo cual indica un posible efecto sinérgico entre el talco y el virus.

Araque y García (1999) reportaron también que las larvas de primer instar de *T. solanivora* son susceptibles al contacto con polvos finos, los cuales causan deshidratación del insecto. Este efecto pudo haberse presentado también con los aislamientos formulados evaluados en el presente estudio, debido a que la formulación presenta muy baja humedad (< 5%) y contiene silicatos que se caracterizan por su capacidad para absorber agua (APHA 2005). En consecuencia, los formulados posiblemente generaron un estrés evaporativo en las larvas, fenómeno que ha sido reportado como fundamental en la respiración de los insectos y por lo tanto en la sobrevivencia de los mismos (Meyer, 2002).

El análisis estadístico también detectó diferencias significativas entre la eficacia de los aislamientos sin formular. Los aislamientos VG002, VG003 y VG004 fueron estadísticamente diferentes entre sí y los aislamientos VG003 y

VG004 presentaron diferencias con respecto a la cepa de referencia del Perú, siendo significativamente mayor la eficacia del aislamiento VG003 (figura 3). Estos resultados indican que posiblemente este virus presenta mayor virulencia sobre larvas de *T. solanivora* que los demás aislamientos nativos y la cepa del Perú, lo cual puede deberse a una mejor adaptación tanto al hospedero como a las condiciones ambientales de la región.

La adaptación de los baculovirus a su hospedero ha sido reportada por Hodgson y colaboradores (2002) en su estudio sobre la selección diferencial de genotipos de virus de la poliedrosis de la polilla de los pinos *Panolis flammea* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Noctuidae). Estos autores mencionan que diferentes aislamientos de baculovirus pertenecientes a la misma especie pueden infectar a un mismo insecto hospedero; sin embargo, sólo aquellos que se encuentren mejor adaptados a las condiciones brindadas por el insecto hospedero se mantendrán en éste. Dentro de los factores que afectan la adaptación de los baculovirus se encuentran la especificidad de la respuesta inmune del hospedero, las interacciones entre diferentes genotipos presentes en el hospedero y las interacciones entre los aspectos ecológicos del patógeno y del ambiente. Dichos factores influyen positiva o negativamente el rendimiento, la tasa de mortalidad y la virulencia de los diferentes aislamientos (Hodgson *et al.*, 2002, Dennehy *et al.*, 2006).

Por otra parte, las diferencias en la virulencia de los tres aislamientos nativos podrían estar asociadas a variabilidad genotípica. Dicha variabilidad se encuentra registrada por Léry y colaboradores (2008), quienes determinaron mediante un análisis con endonucleasas de restricción las diferencias genotípicas de cinco aislamientos del granulovirus de *P. operculella* obtenidos a partir de larvas de *T. solanivora* en Colombia, incluyendo los tres aislamientos evaluados en el presente estudio (VG002, VG003 y VG004). Estos autores encontraron que los tres aislamientos provenientes de la región de Cundinamarca presentan un perfil de restricción diferente comparado con aislamientos del Perú, Ecuador y Túnez, debido a la presencia de una región variable en el gen 90-91, que posiblemente es una modificación específica y única de los aislamientos colombianos.

Generalmente, el hallazgo de diferentes aislamientos de baculovirus en distintas regiones geográficas a partir de un mismo insecto hospedero ha resultado en cepas de virus que tienen el mismo origen, pero que debido a su adaptación a las diferentes condiciones, tanto del insecto como del ecosistema, han sufrido pequeñas variaciones genotípicas que pueden resultar en grandes diferencias en cuanto a su virulencia respecto a la cepa

original (Rezapanah *et al.*, 2008). Las variaciones genéticas en poblaciones de baculovirus han sido detectadas a varias escalas ecológicas entre regiones geográficas; también se han encontrado diferencias en la patogenicidad entre los aislamientos de diferentes regiones y entre genotipos derivados del mismo aislamiento (Hodgson *et al.*, 2001).

Uno de los casos más estudiados mundialmente ha sido el del granulovirus de la polilla de la papa *P. operculella*, el cual ha sido ampliamente investigado en cuanto a diferencias genéticas entre los diferentes aislamientos de diversos orígenes geográficos. Vickers y colaboradores (1991) compararon 14 aislamientos del PhopGV de ocho regiones del mundo usando endonucleasas de restricción y utilizando bioensayos para comparar la actividad biocontroladora. Se encontraron tres genotipos distintos y diferencias significativas en la actividad biológica de los aislamientos, aunque no se pudo comprobar que dichas diferencias se derivaran de las variaciones genotípicas. Léry y colaboradores (1998) en su estudio sobre la heterogeneidad genética de diferentes aislamientos de PhopGV describen que la mayoría de granulovirus aislados en condiciones de campo consisten en mezclas de variantes genéticamente heterogéneas. En dicho estudio se encontró que existen muchas variantes del virus nativo original aislado en Túnez, las cuales se demostraron por la presencia de diferentes fragmentos en los perfiles obtenidos usando endonucleasas de restricción. Estos autores atribuyeron las variaciones a una adaptación del aislamiento original a las condiciones proporcionadas o a una recombinación entre el aislamiento original y otras cepas de granulovirus endógenas del hospedero, situación descrita también por Singaravelu y Ramakrishnan (1998), quienes atribuyeron las variaciones genotípicas de un solo aislamiento de baculovirus al proceso de recombinación entre un pequeño número de variantes del virus que coinfectan la larva hospedero en condiciones de campo.

La variabilidad genética entre aislamientos también ha sido determinada en granulovirus de otras especies de insectos. Rezapanah y colaboradores (2008) registraron que diferentes aislamientos del granulovirus de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) de diferentes regiones de Irán presentan pequeñas variaciones genéticas entre ellos, las cuales resultan en diferencias en la actividad biológica (concentración letal media). Subramanian y colaboradores (2008) también compararon diferentes granulovirus aislados de la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) y el análisis por endonucleasas de restricción reveló que los aislamientos estaban muy cercanamente relacionados pero no eran idénticos.

### Estimación de la producción de cuerpos de inclusión

Se determinó la cantidad promedio de cuerpos de inclusión producidos por miligramo de tejido larval para los tres aislamientos nativos y la cepa del Perú. El análisis de varianza (95%) no detectó diferencias significativas entre los aislamientos. Este resultado indica que la productividad, es decir, la cantidad de cuerpos de inclusión por miligramo de tejido de las larvas o por larva producidos y liberados por el insecto hospedero (Hodgson *et al.*, 2002) fue igual para todos los aislamientos en larvas de *T. solanivora* con un promedio de  $4,4 \times 10^7$  CI/mg de peso larval y  $1,0 \times 10^9$  CI/larva (tabla 1).

**Tabla 1.** Producción de cuerpos de inclusión de los aislamientos de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*

Aislamientos	Productividad (CI/mg)	Promedio CI/larva
VG002	$4,7 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$
VG003	$4,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^9$
VG004	$4,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$
Perú	$4,1 \times 10^7$	$9,0 \times 10^8$

La productividad es un parámetro muy importante en la investigación de baculovirus y ha sido ampliamente estudiada por varios autores con el fin de determinar características esenciales de los aislamientos virales para ser utilizados en formulaciones de insecticidas biológicos (Vázquez *et al.*, 2002; Arends *et al.*, 2005). En el caso específico del granulovirus de *P. operculella* se han realizado algunas investigaciones como la de Matthiessen y colaboradores (1978), quienes mediante observaciones al microscopio electrónico registraron que un equivalente larval (una larva de *P. operculella*) correspondía a  $4,0 \times 10^9$  CI. En un estudio, Zeddám y colaboradores (2003) determinaron la producción de granulovirus en larvas de las polillas *P. operculella* y *T. solanivora* muertas por la infección viral en laboratorio; encontraron que la producción fue de  $2,4 \times 10^9$  CI/larva y de  $1,3 \times 10^8$  CI/mg para *T. solanivora*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación en cuanto a la producción de cuerpos de inclusión por larva, la cual presentó un valor promedio de  $10^9$ . Esto podría indicar que para los

granulovirus aislados a partir de larvas de las polillas de la papa, el mayor rendimiento encontrado corresponde a este valor, concordando con lo reportado por Hodgson y colaboradores (2001), quienes concluyeron que para la mayoría de larvas de lepidópteros infectadas por virus de la familia Baculoviridae, el rendimiento promedio obtenido es de  $10^9$  CI en larvas de último instar.

La productividad de un virus en el tejido de su hospedero se ve afectada por muchos otros factores como el tiempo letal y la virulencia (Kamiya *et al.*, 2004). Cherry y colaboradores (2002) evaluaron entre otros factores, la producción de partículas virales de un granulovirus sobre larvas de la polilla dorso de diamante *P. xylostella*. En este estudio encontraron que a pesar de la alta patogenicidad de este aislamiento sobre las larvas de la polilla reflejada en la dosis letal media, se obtuvieron menores rendimientos debido a la reducción de los tiempos de mortalidad. Al igual que el tiempo letal, la dosis proporcionada a las larvas, el aumento de su peso y el tamaño inicial son factores que pueden afectar la productividad viral, obteniéndose menores rendimientos cuando el insecto se infecta con altas concentraciones. Este hecho se debe a que la muerte ocurre más rápidamente y de esta forma el virus dispondrá de menos tiempo para replicar sus estructuras (CI) en el hospedero (Boucias *et al.*, 1980; Shao-Hua *et al.*, 1998; Hodgson *et al.*, 2001).

### CONCLUSIONES

Los aislamientos de granulovirus nativos presentaron una alta eficacia sobre larvas *T. solanivora* en condiciones de laboratorio y la formulación potenció la actividad insecticida, lo cual indica que el bioplaguicida a base de dichos virus constituye una alternativa promisoriosa para el control de la plaga. El aislamiento VG003 proveniente del municipio de Mosquera (Cundinamarca) fue seleccionado para continuar con el desarrollo de la formulación por presentar la mayor eficacia.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Colciencias por el apoyo financiero de este trabajo.



## REFERENCIAS

- American Pharmaceutical Association (APHA). 2005. Handbook of pharmaceutical excipients. 5ª. ed. London, UK, 918 p.
- Araque C, García J. 1999. Manual integrado de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (povolny). Corpoica, Pronatta, Bogotá, 44 p.
- Arends H, Winstanley D, Johannes J. 2005. Virulence and Competitiveness of *Cydia pomonella* Granulovirus Mutants: Parameters that do not match. *Journal of General Virology* 86: 2731-2738.
- Biotécnica. 2004. Manual de procedimientos operativos estándar del laboratorio de control de calidad de bioplaguicidas (Análisis físico-químico de baculovirus). Corpoica, Laboratorio de Control Biológico, Mosquera Colombia.
- Boucias D, Johnson D, Allen G. 1980. Effects of Host Age, Virus Dosage and Temperature on the Infectivity of a Nucleopolyhedrosis Virus against Velvet Bean Caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Larvae. *Environmental Entomology* 9(1):59-61.
- Caballero P, López-Ferber M, Williams T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra, Editorial Phytoma, España, 517 p.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 1992. Control Biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus Phthorimaea*. Boletín de Capacitación CIP-2. Lima, Perú, 19 p.
- Cherry A, Osae M, Djegui D. 2002. Relative Potency, Yield and Transmission of a Kenyan Isolate of *Plutella xylostella* Granulovirus in a Population of Diamondback Moth from Benin, West Africa. En: Memorias del primer simposio internacional de mejoramiento del control biológico de *Plutella xylostella*. Cirad (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) Montpellier, Francia. En: <http://dbm2002.cirad.fr/papiers/cherry.doc> (Consulta: marzo de 2009).
- Dennehy J, Friedenberg N, Holt R, Turner P. 2006. Viral Ecology and the Maintenance of Novel Host Use. *The American Naturalist* 167(3): 429-439.
- Hodgson D, Vanbergen A, Watt A, Hails R, Cory J. 2001. Phenotypic Variations Between Naturally Co-Existing Genotypes of a Lepidopteran Baculovirus. *Evolutionary Ecology Research* 3:687-701.
- Hodgson D, Vanbergen A, Watt A, Hartley S, Hails R, Cory J. 2002. Differential Selection of Baculovirus Genotypes Mediated by Different Species of Host Food Plant. *Ecology Letters* 5:512-518.
- Kamiya K, Zhu J, Murat M, Laviña-Caolili B, Ikeda M, Kobayashi M, Kawamura S. 2004. Cloning and Comparative Characterization of three Distinct Nucleopolyhedroviruses Isolated from The Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biological Control* 31:38-48.
- Léry X, Abol-Ela S, Giannotti J. 1998. Genetic Heterogeneity of *Phthorimaea operculella* Granulovirus: Restriction Analysis of Wild-Type Isolates and Clones Obtained in vitro. *Acta Virologica* 42:13-21.
- Léry X, Villamizar L, Espinel C, Cotes A, Zeddám J, López-Ferber M. 2008. Analysis of Several Colombian *Phthorimaea operculella* Granulovirus Isolated from *Tecia solanivora*: Detection of a New Variable Region in the PhopGV Genome. *Insect pathogens and Insect Parasitic Nematodes*. IOBC/wprs Bulletin 31:83.
- Matthiessen J, Christian R, Grace T, Filshie K. 1978. Large-Scale Field Propagation and the Purification of the Granulosis Virus of the Potato Moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bulletin of Entomological Research* 68:385-391.
- Mcvean R, Sait S, Thompson D, Begon M. 2002. Dietary Stress Reduces the Susceptibility of *Plodia interpunctella* to Infection by a Granulovirus. *Biological Control* 25(1):81-84.
- Meyer J. 2002. Insect Physiology. Respiratory System. Department of Entomology NC State University. En: <http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/tutorial/respire.html> (Consulta: mayo de 2009).
- Mascarin G, Alves S. 2007. Baculovirus: mayor inimigo da traça-d-batata. *Revista Associação Brasileira da Batata, ABBA. Batata Show* 18:(7). En: [http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista18\\_010.htm](http://www.abbabatatabrasileira.com.br/revista18_010.htm). (Consulta: agosto de 2009).
- Niño L, Notz A. 2000a. Desarrollo y sintomatología de larvas de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) infectadas por un virus granulosis nativo. *Boletín Entomológico de Venezuela* 15(1):29-38.
- Niño L, Notz A. 2000b. Patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado de Mérida, Venezuela. *Boletín Entomológico de Venezuela* 15(1):39-48.
- Rezapanah M, Shojai-Estabragh S, Huber J, Jehle J. 2008. Molecular and Biological Characterization of New Isolates of *Cydia pomonella* Granulovirus from Iran. *Journal of Pest Science* 81:187-191.
- Shao-Hua C, Hong-Liang S, Zuo-Hu L. 1998. Effect of Temperature Oscillation on Insect Cell Growth and Baculovirus Replication. *Applied and Environmental Microbiology* 64(6):2237-2239.
- Singaravelu B, Ramakrishnan N. 1998. Characterization of a Granulosis Virus from the Castor Semilooper, *Achaea janata* L. *Journal of Invertebrate Pathology* 71:227-235.
- Subramanian S, Rabindra R, Sithanatham S. 2008. Genetical and Biological Variations among *Plutella xylostella* Granulovirus Isolates. *Phytoparasitica* 36(3):220-230.
- Vázquez J, Zeddám J, Tresierra A. 2002. Control Biológico del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfVPN en Iquitos, Perú. *Folia Amazónica* 13(1-2):25-39.
- Vickers J, Cory J, Entwistle, P. 1991. DNA Characterization of eight Geographic Isolates of Granulosis Virus from the Potato Tuber Moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 57:334-342.
- Villamizar L, Zeddám J, Espinel C, Cotes A. 2005a. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV. *Revista Colombiana de Entomología* 31(2):127-132.
- Villamizar L, Cotes A, Grijalba E, Torres L, Espinel C, Gómez J. 2005b. Reconocimiento de aislamientos nativos del virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. En: Resúmenes XXXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología: 84.
- Zar J. 1999. *Biostatistical analysis*. 4a. ed. Prentice Hall. New Jersey, pp. 663.
- Zeddám J, Pollet A, Mangoendiharjo H, Ramadhan T, López-Ferber M. 1999. Occurrence and Virulence of a Granulosis Virus in *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations in Indonesia. *Journal of Invertebrate Pathology* 74 48-54.
- Zeddám J, Vázquez R, Vargas Z, Lagnaoui A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas* 29:657-665.