

# CAPÍTULO 1.

## Caracterización biológica, morfológica y molecular de los aislamientos virales de los PhopGV colombianos

Carlos Espinel, PhD; Xavier Léry, PhD; Laura Villamizar, PhD; Juliana Gómez, cPhD;  
Gloria Barrera, cPhD; Paola Cuartas, cPhD; Alba Marina Cotes, PhD; Jean Louis Zeddám, PhD;  
Miguel López-Ferber, PhD.

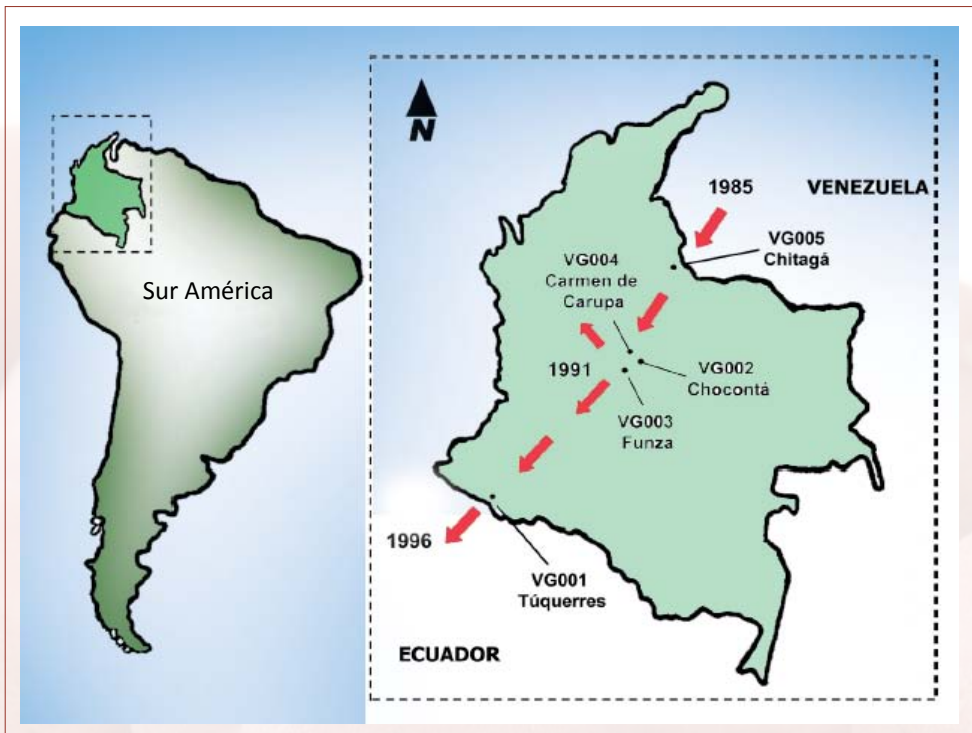
En 1967 se encontró un granulovirus proveniente de una población de la polilla de la papa *P. operculella* en Ceylán (Steinhaus y Marsh, 1967). En los siguientes años se describieron varios aislamientos de este virus en diversas partes del mundo en zonas productoras de papa, donde *P. operculella* estaba presente (Kroschel *et al.*, 1996; Zeddám *et al.*, 1999). Luego de análisis moleculares, estos aislamientos parecieron estar genéticamente relacionados (Vickers *et al.*, 1991) y fueron llamados ‘granulovirus de *P. operculella*’ (PhopGV). Estos aislamientos controlaron las poblaciones de la polilla de la papa sin ser perjudiciales para organismos benéficos. Por tal razón, el uso de insecticidas a base de este PhopGV fue promovido por el Centro Internacional de la Papa (CIP, 1992).

A raíz de la invasión de la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora* a Suramérica, causando pérdidas económicas en tubérculos en campo y en almacenamiento, y ante la ausencia de métodos alternativos de control a los insecticidas químicos, surgió la iniciativa de utilizar aislamientos nativos de PhopGV, ya que podrían también controlar a la especie invasora por pertenecer a la misma familia de *P. operculella*. Corpoica cuenta con cinco aislamientos de granulovirus de *T. solanivora* originarios de las principales zonas paperas de Colombia (Figura 1). Los aislamientos fueron llamados VG001 de Túquerres (Nariño) (suroccidente de Colombia); VG002, VG003 y VG004, provenientes de Chocontá, Funza y Carmen de Carupa, respectivamente (centro de Colombia); y VG005 de Chitagá, Norte de Santander (nororiental de Colombia) (Espinel-Correal *et al.*, 2010). En el presente capítulo se muestra la caracterización biológica y molecular de estos aislamientos.

### MATERIALES Y MÉTODOS

Como primera medida, para la caracterización molecular de los aislamientos colombianos se hizo la purificación viral con el método modificado por gradientes de sacarosa





**Figura 1.** Cinco regiones donde se encontraron los PhopGV aislados de larvas de *T. solanivora*. Las flechas muestran la ruta invasiva del insecto. (Modificado de Espinel-Correal *et al.*, 2010).

(Matthiessen *et al.*, 1978). Como referencia se utilizó el aislamiento No. 1346 de PhopGV, el cual se encuentra registrado en el GenBank, accesión NC004062. Las larvas infectadas se homogeneizaron en agua con SDS 0,1%. Esta suspensión se centrifugó por 5 minutos a 750 x g. El sobrenadante se centrifugó por 20 minutos a 20.000 x g y el sedimento se resuspendió en 1 mL de agua y se ubicó en un gradiente de sacarosa (30% - 70%), el cual se centrifugó a 22.500 x g por 20 minutos. La banda blanca formada por CI se colectó y se resuspendió en 2 mL de agua para ser almacenada a -20 °C para estimar la concentración de CI por densidad óptica a 450 nm. Luego se extrajo el ADN viral, adicionando 25 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 M) en una suspensión de 325 µL de CI con una concentración de 10<sup>10</sup> CI. Posteriormente, el ADN se extrajo dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo y alcohol iso-amílico (24:1). El ADN se precipitó adicionando 3,3 volúmenes de etanol al 100% con acetato de sodio y centrifugación a 12.000 x g por 10 minutos. El sedimento con el ADN se disolvió en Tris-EDTA a 56 °C por 2 horas (Espinel-Correal *et al.*, 2010).

Para el análisis con 11 endonucleasas de restricción (*Bam*HI, *Bst*EII, *Bst*API, *Dra*III, *Hind*III, *Hpa*I, *Mlu*I, *Nde*I, *Nru*I, *Nsi*I y *Sma*I) se siguieron las instrucciones especificadas por el productor (Promega). Posteriormente, se hizo la electroforesis del ADN digerido, usando geles de agarosa al 1% utilizando TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA; pH 8,0) como tampón de migración, y como marcador de peso molecular un lambda DNA/*Hind*III. Los geles se tinturaron con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo un

transiluminador UV. Trabajos previos (Léry *et al.*, 2005) mostraron que dos regiones del genoma de PhopGV fueron variables entre otras, en las regiones localizadas en el cuadro abierto de lectura (ORF) 129 y traslapando los ORF 90 y 91. Se amplificaron por PCR bajo las condiciones establecidas por Espinel-Correal *et al.* (2010).

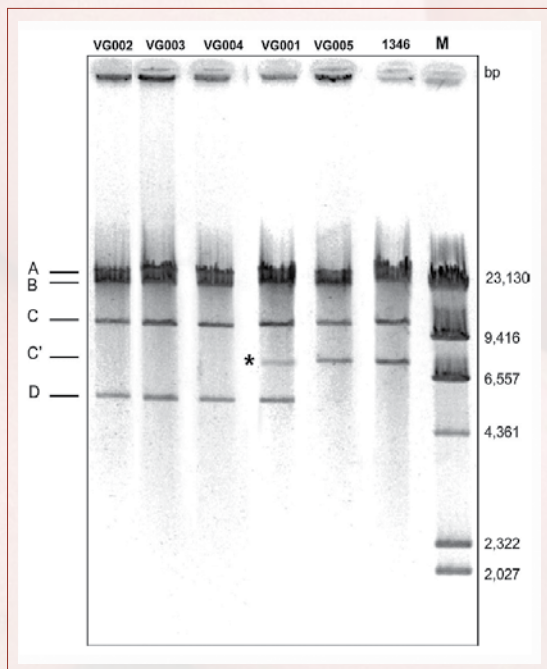
La caracterización de la actividad biológica se realizó por medio de bioensayos mediante la determinación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) sobre ambos hospederos, *T. solanivora* y *P. operculella*. Se utilizó un aislamiento de cada región del país (VG001, VG003 y VG005) y se usó como referencia un aislamiento peruano (Perú 6), debido a que este ha sido usado como principio activo de un bioplaguicida utilizado para el control de *T. solanivora* en papa almacenada. Se aplicaron diluciones de CI purificados (1,5 x 10<sup>5</sup> a 5 x 10<sup>9</sup> CI/2 mL de agua) por un método de pulverización previamente desarrollado (Carrera *et al.*, 2008). Se usaron dos tubérculos por concentración y tres o cinco repeticiones por dosis, cada una consistente en 15 larvas neonatas por tubérculo. Se registró la mortalidad de las larvas y los datos se analizaron utilizando el programa POLO PC y Statplus (Analystsoft).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los perfiles de restricción con endonucleasas fueron muy similares con los perfiles del aislamiento de referencia, indicando que los virus colombianos pueden considerarse como PhopGV. Los tres aislamientos del centro de Colombia (VG002, VG003 y VG004) y el aislamiento VG001 (suroccidente) fueron similares con todas las enzimas, excepto con *Sma*I.

Después de la digestión con *Sma*I, el fragmento D no estaba presente en los aislamientos VG005 y el de referencia 1346. En contraste, un fragmento C se detectó en los mismos aislamientos y en VG001 como banda submolar, pero estuvo ausente en los aislamientos del centro de Colombia (Figura 2).

El aislamiento VG005 (noroeste de Colombia) fue diferente del de referencia en cuatro enzimas: *Nru*I, *Bst*ApI, *Bam*HI y *Nde*I. Los perfiles de restricción con *Nru*I



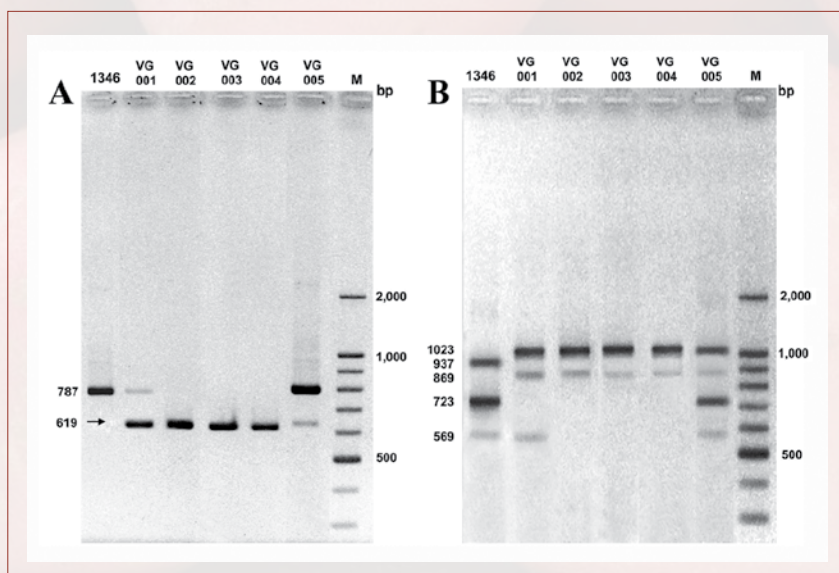
**Figura 2.** Perfiles de restricción con *Sma*I del ADN de los PhopGV colombianos y de referencia 1346. Asterisco indica la banda submolar. M: Marcador. C': nuevo fragmento no presente en el aislamiento de referencia 1346. (Modificado de Espinel-Correal *et al.*, 2010).

fueron homogéneos entre todos los aislamientos colombianos, pero difirieron del 1346. *Bst*ApI reveló la presencia de nuevos fragmentos en los aislamientos colombianos y se encontró una delección en VG001 y en los aislamientos del centro de Colombia. Con *Bam*HI se detectó un nuevo fragmento en los aislamientos colombianos, el cual estuvo ausente en el aislamiento de referencia (1346).

Después de la digestión con *Nde*I se encontraron varias diferencias. En VG001 y aislamientos del centro de Colombia se hallaron delecciones e inserciones en varios fragmentos. Con *Hind*III se encontraron pequeñas delecciones en estos mismos aislamientos.

La presencia constante de bandas submolares podría indicar que estos aislamientos son mezclas de genotipos. La hipótesis se confirmó por amplificación del ADN y la secuenciación de parte de los genes 90-91 y 129. En el caso del virus de referencia (1346), solo fue visible la banda de 787 pb. Para los aislamientos del centro de Colombia, únicamente la banda de 619 pb fue visible, mientras que en VG001 y VG005 dos bandas de 787 pb y 619 pb, en proporciones 10-90% y 90-10% respectivamente fueron visibles, usando los cebadores PhopGV90-1 y PhopGV90-2 (Figura 3A). La secuenciación mostró que la diferencia entre las bandas de 619 pb y 787 pb fue esencialmente debida a una delección en el ORF 90-91.

Luego de usar los pares de cebadores PhopGV 129-1 y PhopGV 129-2 se encontró un patrón más complejo. El aislamiento de referencia generó 3 fragmentos, el más grande de 937 pb, uno a 723 pb y otro a 569 pb. Todos los aislamientos colombianos presentaron un fragmento grande de 1.023 pb. Los aislamientos del sur y norte de Colombia presentaron mayor variabilidad con tres y cuatro marcadores respectivamente, en contraste con los del centro del país, los cuales solo presentaron dos marcadores (Figura 3B).



**Figura 3.** PCR semicuantitativo de los aislamientos colombianos de PhopGV y de referencia 1346. (A) Genes 90-91; (B) Gen 129. M: Marcador. (Modificado de Espinel-Correal *et al.*, 2010).

Aunque los genes de los baculovirus se encuentran en general bien conservados, es muy común observar variaciones entre los genotipos de aislamientos encontrados en diferentes regiones geográficas. Usualmente 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 (Harvey y Volkman, 1983).

### Caracterización biológica

Los aislamientos colombianos presentaron una  $CL_{50}$  entre 1,16 y 6,93 CI/mm<sup>2</sup> sobre *T. solanivora*, y entre 0,8 y 26,2 CI/mm<sup>2</sup> sobre *P. operculella*. El aislamiento de referencia (Perú 6) utilizado como control presentó una  $CL_{50}$  en *T. solanivora* y *P. operculella* de 30,1 CI/mm<sup>2</sup> y 6,6 CI/mm<sup>2</sup>, respectivamente (Tabla 1).

Entre los aislamientos colombianos probados sobre *T. solanivora*, VG003 fue significativamente diferente de VG001 y VG005; de acuerdo con el análisis de potencias, VG001 y VG005 fueron, en su orden, 4 y 3,2 veces más potentes que el aislamiento del centro de Colombia VG003. Además, todos los aislamientos colombianos (VG003, VG005 y VG001) fueron significativamente diferentes del aislamiento Perú 6, con potencias de 4, 16,2 y 19, respectivamente.

Entre los aislamientos colombianos probados en *P. operculella* se encontraron diferencias significativas: VG001 y VG005 fueron 5,8 y 27,7 veces más patogénicos que VG003. Perú

**Tabla 1.** Patogenicidad en ambos hospederos, medidos por la  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  de los PhopGV aislados de *T. solanivora* en Colombia y Perú 6 aislado de *P. operculella*. (Modificado de Espinel-Correal *et al.*, 2010).

Aislamiento	N° de CIs/mm <sup>2</sup> (95%IC')		Pendiente ± SE	$\chi^2$	gl	P
	$CL_{50}$	$CL_{90}$				
VG001 sobre <i>T. solanivora</i>	1,16 (0,34 - 2,78)	379,30 (141,36-1675,25)	0,51 ± 0,06	0,14	3	0,968
VG001 sobre <i>P. operculella</i>	4 (2,60 - 6,07)	1265,6 (450,77-5649,6)	0,55± 0,04	0,39	5	0,078
VG003 sobre <i>T. solanivora</i>	6,93 (4,22-11,37)	423,64 (191,63-1275,45)	0,71 ± 0,07	1,53	6	0,957
VG003 sobre <i>P. operculella</i>	26,19 (17,2 -39,3)	2558,35 (1317,82-5944,00)	0,68 ± 0,04	1,69	5	0,890
VG005 sobre <i>T. solanivora</i>	1,85 (0,71 -4,82)	282,07 (116,49-1024,99)	0,58 ± 0,07	0,41	3	0,936
VG005 sobre <i>P. operculella</i>	0,76 (0,41-1,25)	110,59 (50,41-336,40)	0,62 ± 0,05	0,27	4	0,069
Perú 6 sobre <i>T. solanivora</i>	30,1 (15,33 - 63,48)	13806,38 (3468,89-111218,40)	0,48 ± 0,05	3,73	6	0,712
Perú 6 sobre <i>P. operculella</i>	6,62 (4,5 - 9,48)	258,74 (155,06-491,42)	0,75 ± 0,10	3,73	3	0,803



6, originalmente aislado de este hospedero, fue 4,5 veces más patogénico que VG003. Por el contrario, los aislamientos del suroccidente (VG001) y del nororiente (VG005) fueron más patogénicos que Perú 6, con potencias de 1,3 y 6,2 veces para cada uno.

Los perfiles REN y la secuenciación de las regiones amplificadas por PCR confirmaron que los virus aislados de *T. solanivora* están relacionados con PhopGV. Adicionalmente, este análisis permitió la identificación de tres variantes genotípicas diferentes: la primera, presente en los tres aislamientos del centro de Colombia; la segunda, presente en VG001 (suroccidente de Colombia), ligeramente diferente con el anterior; y la tercera, evidente en el aislamiento del nororiente (VG005), la cual presenta diferencias con todas las enzimas. La secuenciación de las dos regiones variables estableció que estos aislamientos fueron mezclas de genotipos virales.

Uno de los casos más estudiados a nivel mundial ha sido el del granulovirus de *P. operculella*, el cual ha sido ampliamente investigado en términos de diferencias genéticas entre los varios aislamientos de diversos orígenes geográficos (Gómez *et al.*, 2009). Vickers *et al.* (1991), citado por Gómez *et al.* (2009) 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 diferentes y diferencias significativas en la actividad biológica de los aislamientos, aunque no se pudo comprobar que estas diferencias se derivaran de las variaciones genotípicas. Léry *et al.* (1998), citado por Gómez *et al.* (2009), 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. Estos autores atribuyen 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 reportada también por Singaravelu y Ramakrishnan (1998), citado por Gómez *et al.* (2009), 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 bajo condiciones de campo. Este fenómeno pudo ocurrir con el aislamiento VG003 y el resto de aislamientos colombianos, los cuales muestran patrones moleculares diferentes al de la cepa de referencia aislada de *P. operculella*, lo cual sugiere la posible adaptación de estos aislamientos al insecto hospedero *T. solanivora* y a las condiciones ambientales de nuestro país. No obstante, se debe confirmar si estas diferencias genéticas están relacionadas con diferencias fenotípicas

*P. operculella* fue la principal plaga de la papa establecida en el occidente de Suramérica antes de la invasión de *T. solanivora* en 1985. Los aislamientos encontrados en la región estuvieron adaptados al hospedero original. El desplazamiento de éste por la especie invasiva siguió un patrón temporal en el desplazamiento desde Venezuela hasta Colombia.

La invasión de *T. solanivora* es probablemente el resultado de uno o varios eventos de introducciones puntuales (Puillandre *et al.*, 2007). Bajo estas condiciones, probablemente virus no adaptados fueron acarreados durante estos eventos, y las poblaciones de PhopGV adaptados a *P. operculella* fueron sometidas a una presión de selección para replicarse en el hospedero alternativo (*T. solanivora*). Sin embargo, como las dos especies coexisten

en muchas áreas, pudo ocurrir una selección de las poblaciones virales o las variantes genotípicas capaces de replicarse en ambos hospederos (Espinel-Correal *et al.*, 2010).

Cabe resaltar que cada aislamiento colombiano proviene de una larva individual, y el hecho de que en todas las muestras se presentaran mezclas genotípicas sugiere que puede haber interacciones coevolutivas entre diferentes PhopGV en sus hospederos, como también se describen para nucleopoliedrovirus (López-Férber *et al.*, 2003).

Se encontraron diferencias en la patogenicidad entre VG003 y VG005, y estos aislamientos difieren con 10 enzimas de las probadas; pero también se encontraron diferencias en la patogenicidad entre VG001 y VG003, a pesar de que presentan perfiles REN similares. Como la patogenicidad puede tener múltiples orígenes debido a mutaciones puntuales, la adaptación a un hospedero no puede inferirse de los perfiles de restricción del ADN viral (Espinel-Correal *et al.*, 2010).

La patogenicidad de VG003 es complementaria a la de Perú 6 en ambos hospederos (alrededor de 7 para el hospedero original y 27 para el heterólogo), lo que sugiere que VG003 está, de hecho, bien adaptado a *T. solanivora*. Sin embargo, no es el más patogénico sobre ambos (Espinel-Correal *et al.*, 2010).

## CONCLUSIÓN

Se observó una adaptación de los aislamientos de PhopGV sobre *P. operculella* (por el aislamiento Perú 6) y sobre el nuevo hospedero *T. solanivora* (evidenciado en VG003). Los aislamientos mejor adaptados a un hospedero no son los más patógenos sobre este hospedero. Adicionalmente, se constató la flexibilidad de los aislamientos colombianos constituidos por mezclas genotípicas (VG001 y VG005), los cuales son los más eficaces sobre los dos hospederos.

## ANÁLISIS COMPARATIVO DE UN FRAGMENTO DEL GEN *granulina* DEL PHOPGV COLOMBIANO VG003 DE *T. solanivora*.

### Introducción

La familia Baculoviridae se caracteriza por poseer una partícula infectiva denominada virión, la cual se encuentra protegida por una matriz proteica (granulina para granulovirus o poliedrina para nucleopoliedrovirus).

Estudios previos han demostrado la existencia de algunos genes que presentan un alto grado de conservación dentro de los baculovirus, entre ellos los factores de expresión tardíos *lef 8* y *lef 9* y el gen de *granulina/poliedrina* (*gran/polh*). Estos genes son de gran utilidad para la identificación y realización de estudios de diversidad en baculovirus específicos de Lepidópteros (Lange *et al.*, 2004; Jehle *et al.*, 2006.). El gen *gran/polh* ha sido utilizado para la realización de estudios filogenéticos y para la identificación molecular de granulovirus (Lange *et al.*, 2004).

Con el objetivo de continuar con la caracterización molecular de los aislamientos colombianos de PhopGV, y específicamente el aislamiento VG003, la secuencia del gen de



granulina de este virus se comparó con las secuencias del mismo gen de otros baculovirus depositadas en el GenBank.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño de cebadores degenerados, clonaje y secuenciación de granulina*

Para la amplificación del gen completo de granulina se diseñó una pareja de cebadores degenerados, teniendo en cuenta el alineamiento de varias secuencias del gen descritas en el Genbank. Para lo anterior, se utilizó el programa Jellyfish 3.3.1. Las secuencias de los cebadores fueron: Gran-F: 5´-ATGGGATAYAAAYAAWCDYT-3´ y Gran-R: 5´-TYARTANGCBGGDCCVGTRAA-3´. El programa de amplificación consistió en un paso inicial de denaturación a 95 °C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos así: denaturación 30 segundos, anillamiento 52 °C por un minuto y extensión a 72 °C por un minuto. Al final se realizó un paso de extensión a 72 °C por 10 minutos. Para 25 µl de reacción se utilizaron 50-100 ng de ADN genómico, dNTPs 200 µM (Pharmacia Biotech 27-1850, 1860, 1870, 1880), 0,5 µM de cada cebador, MgCl<sub>2</sub> 2,0 mM y tampón de reacción 10 x (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 9,0 0,1% Nonidet). Se adicionaron 2 U de Taq polimerasa (Promega M1665). Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa teñida con SYBR safe (Invitrogen) (Barrera *et al.*, 2009).

Los productos de PCR se clonaron en el plásmido PCR 2.1-TOPO, utilizando el kit de TOPO TA (Invitrogen K4500-01). Se secuenciaron las dos hebras del ADN mediante la utilización de cebadores universales M13 (Barrera *et al.*, 2009).

### *Alineamiento y análisis de la secuencia*

La secuencia de la proteína se dedujo a partir de la secuencia del gen *granulina* del aislamiento nativo del granulovirus VG003 y se comparó con 11 secuencias del mismo gen de granulovirus descritas en la base de datos del Genbank (números de accesoión NC005038, NC005839, NC008168, NC005068, NC002816, NC10240, NC004062, NC002593, AB290316, NC003102 y NC002331) y 5 nucleopoliedrovirus (NC004778, NC003084, NC005906, NC005905 y NC001875), mediante el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1994). Se realizó la construcción de un árbol con análisis UPGMA (1.000 réplicas) en el programa MEGA versión 4 (Tamura *et al.*, 2007).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los productos de la amplificación por PCR con los cebadores degenerados fueron de 746 pb (Figura 4A). Se obtuvo una secuencia de 410 pb del gen. El alineamiento del fragmento secuenciado y sus homólogos del GenBank mostró una identidad del 99% con el mismo gen del granulovirus de *P. operculella* (PhopGV) (NC004062). Las diferencias encontradas consistieron en tres sustituciones en las posiciones 205, 729 y 735 del gen secuenciado.

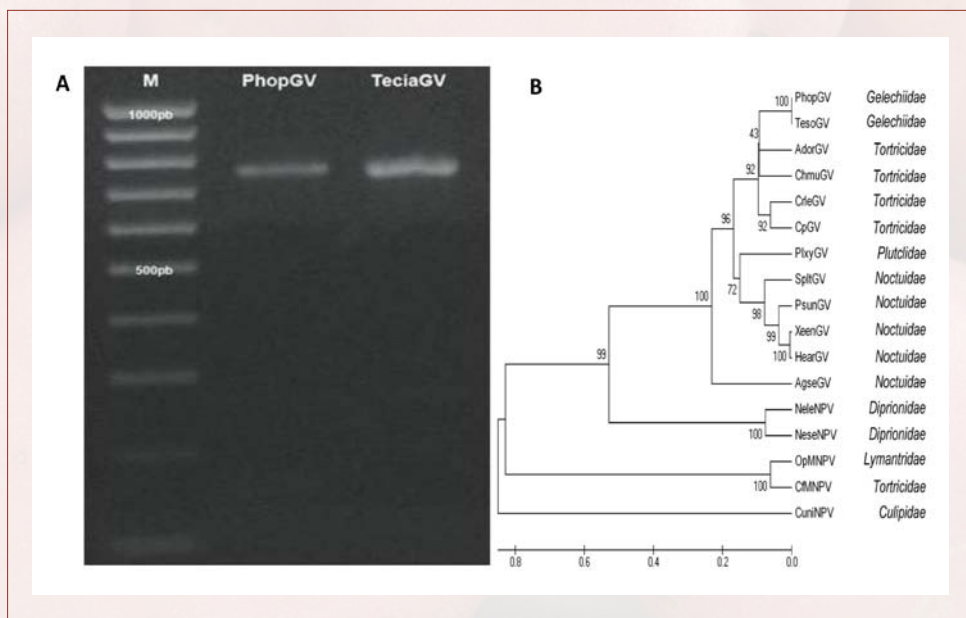
El cambio de A por G en la posición 205 produjo una sustitución no sinónima de los aminoácidos aspartato por asparagina (Barrera *et al.*, 2009).

La comparación previa de un aislamiento peruano de PhopGV con el aislamiento colombiano VG003 mediante perfiles de restricción y amplificación por PCR de regiones variables, demostró variabilidad entre los dos aislamientos en regiones diferentes a la región analizada en este trabajo (Léry *et al.*, 2008). A pesar de las diferencias genéticas encontradas entre los dos aislamientos, se observa una alta similaridad en el gen de *granulina*.

El dendograma construido a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína *granulina* del aislamiento colombiano de granulovirus de *T. solanivora* y 15 secuencias homólogas se observa en la Figura 4B. La topología del árbol muestra dos principales grupos congruentes con la separación de granulovirus y nucleopoliedrovirus de la familia Baculoviridae (NPV y GV). El aislamiento VG003 se ubicó en un mismo brazo junto con baculovirus específicos de la familia de insectos Gelechiidae (Barrera *et al.*, 2009).

Estos virus se encontraron agrupados con baculovirus que infectan la familia Tortricidae, pero separados de los hospederos de la familia Noctuidae (Barrera *et al.*, 2009).

Estos resultados presentaron un alto valor de bootstrapping (96 y 92, respectivamente). La topología del árbol obtenida con el gen de *granulina* fue similar a la topología de árboles reconstruidos con varios genes altamente conservados (Jehle *et al.*, 2006).



**Figura 4.** (A) Gel de agarosa con amplicones del gen *granulina* para los aislamientos virales de *T. solanivora* VG003 y PhopGV; (B) Dendograma basado en el gen *granulina*. El árbol se construyó con el algoritmo UPGMA. En cada nodo se indica el valor de bootstrapping (1.000 réplicas) (Barrera *et al.*, 2009).

# Bibliografía

- Barrera, G.; Cuartas, P.; Villamizar, L.** (2009). Comparative analysis of a granulin fragment of Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. IOBC/ WPRS Bull. 45: 129-132.
- Carrera, M. V.; Zeddám, J. L.; Pollet, A.; Léry, X.; López-Férber, M.** (2008). Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. IOBC/ WPRS Bull. 31: 40-43.
- Centro Internacional de la Papa (CIP).** (1992). Control biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus phthorimaea*. Lima: Boletín de capacitación CIP-2. 43 p.
- Espinel-Correal, C.; Léry, X.; Villamizar, L.; Gómez, J.; Zeddám, J. L.; Cotes, A. M.; López-Ferber, Miguel.** (2010). Biological analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Applied and Environmental Microbiology. 76 (22): 7617- 7625.
- Gómez, J.; Villamizar, L.; Espinel, C.; Cotes, A.** (2009). Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). Revista Corpoica, Ciencia y Tecnología Agropecuaria 10 (2): 152-158.
- Harvey, J.P., Volkman, L.F.** 1983. Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus. Virology. 124: 21-34.
- Jehle, J. A.; Lange, M.; Wang, H.; Hu, Z.; Wang, Y.; Hauschild, R.** (2006). Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. Virology 346: 180-193.
- Lange, M.; Wang, H.; Zhihong, H.; Jehle, J. A.** (2004). Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. Virology 325: 36-47.
- Léry, X.; Villamizar, L.; Espinel, C.; Zeddám, J.; Cotes, A.; Ferber, M.** (2008). Analysis of several Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora*: Detection of a new variable region in the PhopGV genome. IOBC/ Bulletin, 31: 83.
- Léry, X.; Zeddám, J. L.; López-Férber, M.** (2005). Genetic heterogeneity of various PhopGV isolates found on *Phthorimaea operculella*, *Tecia solanivora* and *Symmetrischema tangolias*. In: 10 Th European meeting. Invertebrate pathogens in biological control: present and future. Bary, Italy.
- López-Férber, M.; Simón, O.; Williams, T.; Caballero, P.** (2003). Deffective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. Proceedings of the Royal Society London B: Biological Sciences. 270: 2249-2255.
- Matthiessen, J.; Christian, R.; Grace, T.; Filshie, B.** (1978). Large-scale field propagation and purification of the granulosis virus of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bulletin of Entomological Research. 68: 385-391.
- Puillandre, N.; Dupas, S.; Dangles, O.; Zeddám, J. L.; Capdevielle-Dulac, C.; Barbin, K.; Torres-Leguizamon, M.; Silvain, J. F.** (2007). Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. Biological Invasions. 10(3): 319-333.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties. Nucleic Acid Research 22(22): 4673 - 4680