

**RECONOCIMIENTO,
SELECCIÓN Y
EVALUACIÓN
DE AISLAMIENTOS
NATIVOS
DE VIRUS DE LA
GRANULOSIS
PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO
DE LA POLILLA
GUATEMALTECA
DE LA PAPA**



COLCIENCIAS
COLOMBIA



GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Laura Fernanda Villamizar. Q.F., M.Sc. Investigadora¹

Carlos Espinel Correal. M.Sc. Investigador¹

Erika Grijalba. Q.F. Investigadora¹

Lisette Torres. B.Sc. Investigadora¹

Alba Marina Cotes. Ph.D. Investigadora¹

Aristóbulo López-Ávila. Ph.D. Investigador²

Gloria Patricia Barrera. M.Sc. Investigadora³

Jean Louis Zeddám. Ph.D. Investigador⁴

Lorena Herrera. Estudiante de pregrado¹

Juliana Gómez. Estudiante de pregrado¹

AUXILIARES DE TÉCNICO

Juan Alberto Arias

Gabriela Perdomo

Claudia Mesa

Rubén Molina

EDITORES

Laura Fernanda Villamizar

Carlos Espinel Correal

Juliana Gómez

Alba Marina Cotes

BOLETÍN TÉCNICO 2001. 5

1. Laboratorio de Control Biológico.
CORPOICA. C.I. Tibaitatá. Km 14 vía
Mosquera (Cundinamarca). A.A. 240142 Las
Palmas, Parque Central Bavaria, Bogotá.

2. Laboratorio de Entomología. CORPOICA.
C.I. Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera
(Cundinamarca). A.A. 240142 Las Palmas,
Parque Central Bavaria, Bogotá.

3. Laboratorio de Recursos Genéticos
y Biotecnología Animal. CORPOICA.
C.I. Tibaitatá. Km 14 vía Mosquera
(Cundinamarca). A.A. 240142 Las Palmas,
Parque Central Bavaria, Bogotá.

4. Institut de Recherche pour le Développement.
A.A.17012184, Quito (Ecuador).

ISBN: 958-8210-87-9

© CORPOICA

PRODUCCIÓN EDITORIAL

Diagramación, impresión y encuadernación



www.produmedios.com

Tel.: 288 5338 - Bogotá, DC

Impreso en Colombia

Printed in Colombia

CONTENIDO

Introducción _____	5
Recolección de larvas en las diferentes zonas paperas del país _____	10
Determinación de la posible presencia de granulovirus en muestras de larvas colectadas en campo _____	12
Propagación de los virus provenientes de las larvas colectadas en campo _____	14
Caracterización de los virus nativos _____	15
Actividad biocontroladora de los aislamientos nativos seleccionados _____	16
Desarrollo de la infección viral en larvas de <i>T. solanivora</i> tratado con los diferentes aislamientos de baculovirus nativos _____	18
Bibliografía _____	24



INTRODUCCIÓN

La importancia del cultivo de papa en Colombia es indudable por muchas razones, dentro de las que se destacan las 180.000 ha cultivadas, su utilización en la canasta familiar y la generación de empleo que representa. Sin embargo, este cultivo es atacado por un gran número de insectos plaga y enfermedades que afectan la producción, dañan la calidad y demeritan el producto.

Dentro de las plagas más importantes se destacan las polillas de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) y *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) por el impacto causado al cultivo. Las larvas de estos insectos causan daños severos a los tubérculos, tanto a nivel de campo como en almacenamiento, pudiendo causar pérdidas hasta del 100% de la cosecha.

La polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*) fue descrita por primera vez en Guatemala en 1973 por Dalibor Povolny (Araque y García, 1999) con base en unos especímenes enviados de Guatemala y ha sido reportada en Costa Rica, Guatemala, Panamá, Honduras, Venezuela, Colombia y Ecuador (Sotelo, 1997).

En 1983 se dispersó de su centro de origen hasta Suramérica debido a la importación de semilla de papa proveniente de Costa Rica hacia el estado de Táchira (Venezuela). En este país se encuentra en tres de los cuatro estados más importantes en cuanto a producción de papa. En 1985 se constató su presencia en el departamento de Norte de Santander en Colombia y en 1994 se encontraron porcentajes de daño entre 10% y 40% en el departamento de Cundinamarca. En 1996 se localizó en Ecuador y en 1999 se detectó en la zona noroeste de Tenerife, Islas Canarias en España (Niño, 2004).

En nuestro país, *T. solanivora* se ha adaptado a las diferentes condiciones agroecológicas que presentan las regiones productoras de papa, las cuales se encuentran entre los 1.800 a 3.200 msnm, temperaturas entre 6°C y 24°C, precipitaciones entre 500 a 2.500 mm y humedad relativa entre 60% y 100% (Araque y García, 1999).

Los huevos de *T. solanivora* son de forma ovalada casi redondeada, miden en promedio 0.53 mm de largo y 0.41 mm de ancho. Recién puestos son de color blanco aperlado y a medida que avanza la incubación se tornan de color amarillo y luego marrón oscuro al acercarse la eclosión que ocurre de 9 a 15 días después de la postura (Figura 1) (Sotelo, 1997).



Figura 1. Huevos de *Tecia solanivora*

Los huevos son colocados en masa o en grupos cuando hay presencia de tubérculos. En campo se encuentran en grupos pequeños sobre las hojas bajas de la planta, en el cuello de la raíz, base del tallo y sobre el área de tuberización; en almacenamiento los huevos son colocados sobre los tubérculos cerca de los ojos o en cualquier cavidad o lugar protegido (Araque y García, 1999).

Del huevo emerge una larva de 1 mm de largo. Las larvas son de tipo erusciforme o forma de gusano con cabeza esclerotizada con tres pares de patas torácicas, cuatro pares de pseudopatas y un par anal (Figura 2). En el interior del tubérculo pasan por cuatro instares larvales (Sotelo, 1997).

Las larvas de primer instar penetran en el tubérculo a través de un diminuto orificio que abren con sus mandíbulas y comienzan a alimen-



Figura 2. Larva de *T. solanivora*

tarse de la pulpa del tubérculo. Miden de 1.2 a 1.4 mm de largo, son de color blanco transparente y con cabeza de color marrón oscuro. Este estado es muy susceptible a la luz solar, al agua y a los polvos finos que se le pueden pegar y envolver su cuerpo ocasionando deshidratación. Las larvas de segundo instar son de color blanco crema y hacen minas superficiales en el tubérculo. Las de tercer instar son de color amarillo verdoso, con puntos más visibles y se caracterizan por hacer galerías profundas y por ser el estado más voraz. En el cuarto estadio alcanzan en promedio 14 mm de largo y 2.5 mm de ancho, adquieren una coloración violácea en la parte dorsal y crema con visos verdes en el aspecto ventral (Sotelo, 1997; Araque y García, 1999).

Después que la larva ha completado su desarrollo deja de alimentarse, sale del tubérculo y se ubica en un sitio aledaño al suelo, en empaques, en paredes de almacén o eventualmente en la superficie del tubérculo; allí construye un capullo con seda al cual se adhieren partículas del substrato presente (Sotelo, 1997).

El estado larval de *T. solanivora* se caracteriza por presentar puntos o manchas de color negro en cada segmento torácico y abdominal, lo que la diferencia de las larvas de *P. operculella*, principalmente en los tres primeros instares (Araque y García, 1999).

La pupa se forma dentro del capullo elaborado por la larva. Es de tipo obtecta y exhibe una coloración café rojiza que se va oscureciendo conforme madura (Sotelo, 1997).

Miden en promedio, en el caso de la hembra, 8.52 mm de largo por 2.95 mm de ancho. La pupa macho mide 7.83 mm de largo por 2.42 mm de ancho (Figura 3). Empupa en el suelo, en las paredes del sitio de almacenamiento, en empaques o dentro del mismo tubérculo (Sotelo, 1997).



Figura 3. Pupa de *Tecia solanivora*

El adulto es una polilla de color marrón oscuro en los machos y marrón claro en las hembras. La hembra mide 12 mm de largo por 3.4 mm de ancho mientras el macho mide 9.7 por 2.9 mm. Poseen una cabeza poblada de escamas, palpos labiales largos y recurvados hacia arriba y antenas filiformes. Tienen las alas dispuestas en forma de techo en la posición de reposo, en la cual se observan unas líneas oscuras longitudinales de la base al ápice del ala (Figura 4). El abdomen de la hembra es abultado y en el macho es delgado (Araque y García, 1999).



Figura 4. Adulto de *Tecia solanivora*

Los adultos son difíciles de visualizar por el mimetismo con el suelo, son muy sensibles a la luz y por eso durante el día permanecen ocultos debajo de los terrones en el suelo, en los arrumes de papa en los almacenes o debajo de objetos. Durante la noche son muy activos, copulan y ovipositan sobre o muy cerca de los tubérculos. La hembra pone entre 180 y 235 huevos durante su vida dependiendo de su alimentación en

su estado larval; cerca del 80% de posturas las hace durante sus diez primeros días de vida (Sotelo, 1997; Araque y García, 1999).

Generalmente, el manejo de este insecto plaga se ha basado en el uso indiscriminado de productos químicos, los cuales han resultado insuficientes para controlarlo, además de generar alta contaminación ambiental. Aunque no existen insecticidas químicos específicos para la polilla guatemalteca de la papa, hasta el año 2002 en Colombia se tenían 10 insecticidas con licencia de uso provisional expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para el control de esta plaga. Sin embargo, pruebas de campo en Boyacá y Cundinamarca para evaluar la eficacia agronómica de estos productos mostraron bajos niveles de control de la plaga, por lo que el ICA se pronunció oficialmente dejando vigentes solamente los insecticidas Pirestar 38 EC, Orthene 75% SP, Lorsban 4 EC, Trapper EC y Curacron 500 EC (Correo de la papa, 2002), cuyos ingredientes activos, clorpirifos, permetrina y profenofos son altamente tóxicos para peces y organismos acuáticos, al igual que para insectos benéficos y para el hombre, para quien son altamente tóxicos por exposición aguda y presentan problemas crónicos de neurotoxicidad retardada (Liñán, 1997). Por esta razón, surge la necesidad de desarrollar alternativas de bajo costo y de bajo impacto ambiental tales como los virus de insectos, que aseguren

el control de la polilla y puedan ser incluidas dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

En la naturaleza existe una gran diversidad de virus patógenos de insectos, pertenecientes a las familias Baculoviridae, Poxviridae, Ascoviridae, Reoviridae e Iridoviridae. La infección viral en los insectos ocurre por vía oral, a través de la ingestión del alimento contaminado con las partículas virales. La replicación del virus en los tejidos susceptibles del insecto causa desintegración de éstos y las larvas se tornan blandas y muy frágiles (Burges, 1981). Según Alves (1986) los insectos afectados por virus presentan falta de apetito, cambios en la coloración y alargamiento del estado larval; hay una disminución de la actividad de las larvas y en los estados más avanzados de la infección se produce la muerte de las mismas.

Una de las familias de entomovirus más estudiada es la familia Baculoviridae a la cual pertenecen los virus de la granulosis (PhoGv) y de la polihedrosis nuclear (NPV). Éstos se caracterizan por presentar cuerpos de inclusión que los protegen contra los factores ambientales. Afectan sólo a invertebrados, especialmente insectos, siendo adecuados para ser utilizados como agentes de control microbioal (Burges, 1981), sin embargo, no han sido reportados aislamientos de estos virus específicos para *Tecia solanivora*. Esto puede tener relación con la evolución recíproca o coevolución entre especies

mediada por la selección natural, la cual es uno de los factores más importantes en la asociación entre patógenos e insectos, como es el caso de los baculovirus. Se han reportado estos virus en 600 especies hospederas, siendo la mayoría del orden Lepidóptera y las restantes comprendidas en los órdenes Díptera e Hymenóptera (Herniou *et al.*, 2004).

Existe un número considerable de experiencias exitosas en el manejo de insectos plaga mediante el uso de virus entomopatógenos, particularmente de baculovirus, pero también con otro tipo de virus. Por ejemplo, Alcázar y colaboradores en 1993, reportaron reducciones de la población de *Phthorimaea operculella* entre el 70% y 100%, después de aplicaciones de un virus de la granulosis en ensayos de laboratorio. Posteriormente Alcázar y Ramón (1993b) validaron el uso de dicho virus en almacenes rústicos donde alcanzaron una reducción del 68.4% del daño en tubérculos. Aplicaciones inundativas en campo del granulovirus de *Cydia pomonella* (CPGV) en Norte América produjo el 94% de mortalidad de las larvas de este insecto (Arthurs y Lacey, 2004).

El virus de granulosis de *Phthorimaea operculella* (Zeller) fue introducido en Colombia mediante un aislamiento proveniente del Perú, el cual fue producido masivamente para responder a la emergencia sanitaria causada por *T. solanivora*. En el año 2000, el laboratorio de control biológico de CORPOICA se enfrentó

al reto de fabricar el producto a base de baculovirus a escala semicomercial adoptando inicialmente la tecnología de formulación desarrollada por el Centro Internacional de la Papa. Sin embargo, dicho proceso artesanal no permitía asegurar la calidad de los diferentes lotes de producción, presentándose inconsistencias en los resultados de eficacia del producto. Por tales razones y con miras a producir cantidades comerciales del bioinsecticida que permitieran suplir las necesidades del sector, se planteó como meta la tecnificación del proceso productivo, dentro de una filosofía de “calidad total”, para lo cual fue necesario construir una planta de producción que cumpliera con las especificaciones técnicas para este tipo de industrias, se adquirieron los equipos para realizar cada parte del proceso como una operación unitaria independiente y estandarizable, se estandarizaron todas las operaciones unitarias y se determinaron los puntos críticos de cada una de ellas. Así mismo, con el ánimo de disponer de cepas nativas del virus, mediante un proyecto de investigación financiado por Colciencias se realizó una colección de aislamientos nativos de granulovirus, se ajustó su concentración efectiva en el producto y se validaron y documentaron las técnicas de control de calidad en Procedimientos Operacionales Estándar (POES) (Villamizar *et al.*, 2004).

Desde 1964, en varios países del mundo como Australia, Perú y Bolivia entre otros, se ha reportado la pre-

sencia de un virus de la granulosis infectando larvas de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller), especie estrechamente relacionada con *T. solanivora* (Povolny). Estos virus han sido aislados y ampliamente investigados con el fin de ser utilizados para el control de estas plagas, mediante el desarrollo de tecnologías de producción de bioplaguicidas. El Centro Internacional de la Papa (CIP) en el Perú desarrolló un bioplaguicida a base de un aislamiento del granulovirus de *P. operculella* que se aplica en condiciones de almacenamiento de semilla de papa para el control de *P. operculella*. En Colombia, en el año 2000, CORPOICA produjo un bioplaguicida a base de baculovirus con el fin de responder a la emergencia sanitaria causada por la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora*. Inicialmente se obtuvo la cepa del granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú y se adaptó la tecnología de formulación desarrollada por el CIP; este producto se encuentra en proceso de registro.

Aunque el virus de la granulosis aislado inicialmente de *P. operculella* 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* permitiría contar con un virus más adaptado a este hospedero y posiblemente más eficiente para su control. Además, el trabajar con aislamientos nativos permite utilizar organismos adaptados a las condiciones ambientales de nuestro país y aprovechar la biodiversidad que en éste se encuentra. Por lo tanto, se planteó como objetivo de la investigación, crear una colección de aislamientos nativos del virus de la granulosis aislado de *T. solanivora*.

RECOLECCIÓN DE LARVAS EN LAS DIFERENTES ZONAS PAPERAS DEL PAÍS

Gómez, J.; Grijalba, E.; Villamizar, L.; Torres, L.; Espinel, C.

El muestreo de larvas de *T. solanivora* se realizó en los principales municipios productores de papa de los departamentos de Cundinamarca (Chocontá, Villapinzón, Mosquera, Sibaté y Carmen de Carupa), Boyacá (Siachoque, Ventaquemada, Motavita, Oicatá, Cóbbita y Tunja), Nariño (Contadero, Pupiales, Túquerres e Ipiales), Norte de Santander (Chitagá y Pamplona) y Antioquia (Santa Rosa de Osos y San Pedro). En cada municipio se seleccionaron fincas con cultivos de papa y/o con papa almacenada en bodegas o silos rústicos para realizar el muestreo. La búsqueda de larvas se realizó mediante una revisión de la superficie de los costales, el suelo y las paredes del sitio donde se en-

contraban los tubérculos almacenados. Así mismo, se hizo un muestreo destructivo al azar de los tubérculos que presentaban los signos típicos del daño causado por *Tecia solanivora* con el fin de coleccionar las larvas que se encontraban en el interior del tubérculo.

Se coleccionaron 377 muestras en total (Tabla 1) en los 19 municipios muestreados en los cinco departamentos productores de papa del país.

Tabla 1. Resultados de la recolección de larvas de *T. solanivora* en los departamentos muestreados y principales condiciones ambientales de los municipios

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	ALTITUD (msnm)	TEMPERATURA PROMEDIO	MUESTRAS COLECTADAS
CUNDINAMARCA	Chocontá	2.655	13°C	62
	Villapinzón	2.715	13°C	24
	Mosquera	2.548	14°C	5
	Sibaté	2.574	14°C	5
	Carmen de Carupa	2.574	19°C	22
BOYACÁ	Siachoque	2.700	13°C	13
	Ventaquemada	2.630	15°C	18
	Motavita	2.700	12°C	26
	Oicatá	2.600	14°C	21
	Cómbita	2.825	12°C	22
	Tunja	2.783	13°C	20
NARIÑO	Contadero	2.600	14°C	11
	Pupiales	3.100	12°C	25
	Túquerres	310	12°C	15
	Ipiales	2.850	14°C	4
ANTIOQUIA	Santa Rosa de Osos	2.587	14°C	43
	San Pedro	2.450	13°C	21
NORTE DE SANTANDER	Chitagá	2.300	12°C	10
	Pamplona	2.287	15°C	10

La cantidad de individuos de *T. solanivora* varió drásticamente entre los municipios muestreados lo que podría atribuirse a las diferentes condiciones climáticas de cada sitio geográfico (Tabla 1), a factores ambientales propios de la época de muestreo y a las prácticas culturales y de control implementadas en cada finca visitada.

En el único municipio en el que se encontraron larvas con sintomatología típica de infección por granulovirus fue Mosquera, en el cual además la cantidad de individuos de *T. solanivora* fue muy baja a pesar de que las condiciones ambientales presentadas en la época de muestreo favorecían la reproducción de la polilla y su prevalencia tanto en los cultivos como en las bodegas con papa almacenada. Sin embargo, una posible epizootia causada por un virus de la granulosis afectando las larvas de la polilla, pudo haber disminuido significativamente la población de la plaga. Las epizootias pueden ocurrir cuando hay brotes de población de larvas y juegan un rol importante en el descenso de las poblaciones de las plagas (Magnarelli y Andreadis, 2004).

En cuanto a la búsqueda de individuos con sintomatología típica de infección por granulovirus en las larvas recolectadas en campo, en el presente trabajo se constató que no es frecuente hallar insectos con estas características bajo condiciones naturales.

DETERMINACIÓN DE LA POSIBLE PRESENCIA DE GRANULOVIRUS EN MUESTRAS DE LARVAS COLECTADAS EN CAMPO

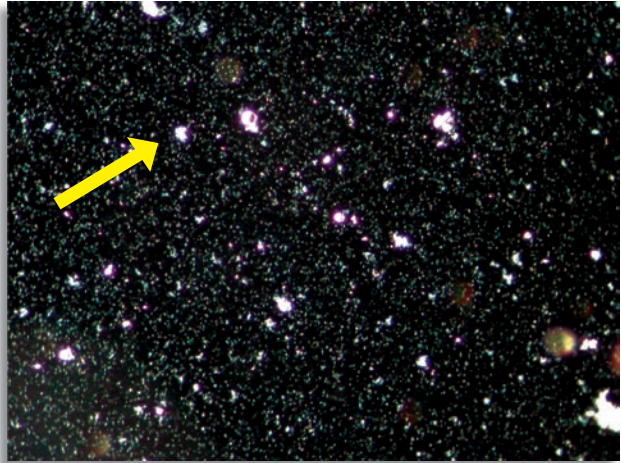
Gómez, J.; Grijalba, E.; Villamizar, L.; Torres, L.; Espinel, C.; Cotes, A.

Se determinó la presencia de partículas virales realizando una preparación en fresco y observándola en un microscopio óptico equipado con campo oscuro en el objetivo de 40X. Las muestras en las que se observaron pequeños cuerpos blancos brillantes con ligero movimiento browniano sobre un fondo negro se reportaron como positivas para posible infección por granulovirus. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los aislamientos que por la técnica de observación directa en microscopio de campo oscuro dieron positivo para posible infección por granulovirus.

Para esta observación se tomó como referencia (testigo positivo) la cepa de granulovirus proveniente del Perú, con la cual se realizó un montaje en fresco de una larva infectada y se observó al microscopio (Figura 5).

De las 377 muestras recolectadas en la totalidad de municipios muestreados se determinaron como positivas para posible infección por granulovirus mediante microscopía óptica de campo oscuro, nueve muestras de Cundinamarca, 20 de Norte de Santander, 15 de Boyacá, 26 de Nariño y 34 de Antioquia (Tabla 2).

Figura 5. Hemolinfa de un insecto infectado con la cepa de granulovirus del Perú observado al microscopio de campo oscuro. Los cuerpos de inclusión corresponden a los puntos blancos, brillantes, pequeños y uniformes (40X).



Estas muestras presentaron puntos blancos, brillantes y titilantes, similares a los observados con la cepa de referencia del Perú (Figura 5).

La presencia del virus de la granulosis en *T. solanivora* en los diferentes municipios evaluados y la incidencia relativamente baja de este patógeno comparado con la incidencia de este tipo de virus reportada a nivel mundial en larvas de *P. operculella* (Vickers *et al.*, 1991; Ben Salah y Aalbu, 1992; Zeddami *et al.*, 1999; Laarif *et al.*, 2003) sugie-

re que las condiciones locales posiblemente no son favorables para el desarrollo de este tipo de patógeno o que el hospedero *T. solanivora* es más resistente que *P. operculella* a la infección por granulovirus.

Las 105 muestras que fueron positivas en la evaluación al microscopio fueron utilizadas para un ensayo de reproducción de signos y síntomas de la enfermedad que además de confirmar la presencia de un agente infeccioso permitió contar con material suficiente para otros ensayos.

Tabla 2. Presencia de granulovirus mediante microscopía de campo oscuro

DEPARTAMENTO	MUESTRAS TOTALES	MUESTRAS POSITIVAS
ANTIOQUIA	64	34
BOYACÁ	120	15
NORTE DE SANTANDER	20	20
NARIÑO	55	26
CUNDINAMARCA	118	9

PROPAGACIÓN DE LOS VIRUS PROVENIENTES DE LAS LARVAS COLECTADAS EN CAMPO

Gómez, J.; Grijalba, E.; Torres, L.; Espinel, C.; Villamizar, L.; López-Ávila, A.

Para confirmar la posible presencia del virus se realizó una prueba de reproducción de síntomas virales con las muestras seleccionadas por microscopía, infectando larvas de primer ínstar de *T. solanivora*. Se reportaron como positivos aquellos aislamientos en los que se observaron los síntomas de infección viral en algunas o en todas las larvas encontradas y estos aislamientos fueron seleccionados para continuar con el trabajo.

De las 105 muestras propagadas, solamente cinco presentaron una reproducción contundente de síntomas y signos de la enfermedad (Tabla 3), aislamientos que fueron seleccionados para continuar con la identificación del agente infeccioso. Las larvas infectadas obtenidas en dicha propagación presentaron una coloración blanca lechosa característica de infección por granulovirus, se observó desintegración de tejidos y en los aislamientos C0404 y N0108 además se observó un notorio retraso en el crecimiento del insecto. Estas variaciones en el desarrollo de la infección podrían estar relacionadas con diferentes niveles de virulencia de los aislamientos nativos, lo cual puede ser consecuencia de diferencias genotípicas entre ellos.

Tabla 3. Reproducción de signos y síntomas de la enfermedad en las muestras

DEPARTAMENTO	NÚMERO DE MUESTRAS PROPAGADAS	NÚMERO DE MUESTRAS POSITIVAS
ANTIOQUIA	34	0
BOYACÁ	15	0
NORTE DE SANTANDER	20	1
NARIÑO	26	1
CUNDINAMARCA	9	3

CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS NATIVOS

Villamizar, L.; Zeddám, J.; Barrera, G.; Herrera, L.

Con el fin de determinar la presencia de la proteína granulina en los aislamientos purificados se realizó una electroforesis SDS PAGE.

Para los cinco aislamientos nativos se obtuvo en el gel de poliacrilamida una sola banda ubicada en el mismo lugar (Figura 6), la cual corresponde a un peso molecular aproximado de 35 kDa y es coherente con el peso molecular reportado para la proteína granulina (25 a 38 kDa). No se observaron otras bandas de proteína, lo que era de esperarse considerando que el 96% de la

proteína en estos virus es granulina y el 4% restante de proteínas serían imperceptibles en el gel debido a su baja concentración. Este resultado confirmó la identidad de los cinco aislamientos nativos como virus del grupo de los granulovirus, siendo éste el primer reporte de aislamientos nativos de granulovirus aislados de *T. solanivora* en nuestro país.

Al analizar estos aislamientos mediante microscopía electrónica se observaron estructuras ovoides que coincidieron con la descripción típica de los cuerpos de inclusión del granulovirus, presentándose como corpúsculos de forma de bastón, en algunos de los cuales se observa la nucleocápside viral de forma helicoidal (Figura 7).

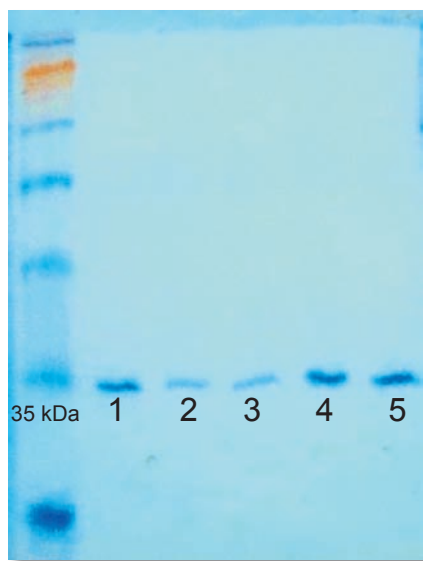


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE de los cinco aislamientos nativos de granulovirus: 1. C0404, 2. C0126, 3. C0611, 4. N0108 y 5. Nr004

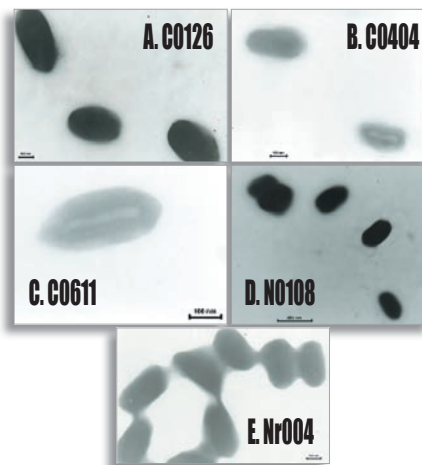


Figura 7. Fotografías de los aislamientos nativos de granulovirus en microscopio electrónico

El aislamiento C0126 presentó un tamaño promedio de 424 nm de largo x 216 nm de ancho, el aislamiento C0611 con 380 nm de largo x 162.4 nm de ancho, el aislamiento C0404 con 360 nm de largo x 176 nm de ancho, el aislamiento Nr004 con 400 nm de largo x 200 nm de ancho y el aislamiento N0108, fue el que presentó el mayor tamaño de los cuerpos de inclusión con 450 nm de largo x 210 nm de ancho. Los tamaños obtenidos son coherentes con el tamaño promedio reportado en la literatura para este virus, el cual oscila entre 160 y 300 nm de ancho y entre 300 y 500 nm de largo (Caballero *et al.*, 2001).

Para la identificación de los aislamientos nativos se realizó una prueba de ELISA indirecta en sandwich. Para tal fin se trabajó con anticuerpos policlonales producidos con el granulovirus del Perú tanto en conejo como en huevos de gallina.

Se observó coloración amarilla intensa para todos los pozos de los cinco aislamientos nativos (Figura 8) y el control positivo con el aislamiento del Perú. Esta coloración indicó un resultado positivo que confirmó la identidad de los cinco aislamientos nativos como virus de la granulosis.

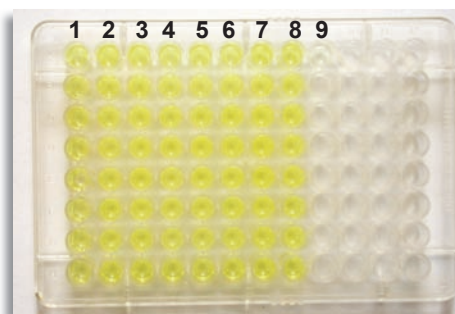


Figura 8. Prueba de Elisa para los aislamientos nativos de virus aislados de *Tecia solanivora*. 1 y 2. C0404, 3. C0126, 4. C0611, 5. N0108, 6. Nr004, 7 y 8. Perú y 9. Buffer PBS

ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS AISLAMIENTOS NATIVOS SELECCIONADOS

Espinel, C.; Villamizar, L.; Cotes, A.

Se comparó la actividad biocontroladora de los aislamientos de baculovirus seleccionados evaluándolos tanto formulados como sin formular.

La prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) detectó diferencias significativas entre los tratamientos formulados y sin formular para los aislamientos virales N0108, C0126, C0404 y Perú ($p < 0.0001$), siendo significativamente mayor el porcentaje de eficacia obtenido cuando los aislamien-

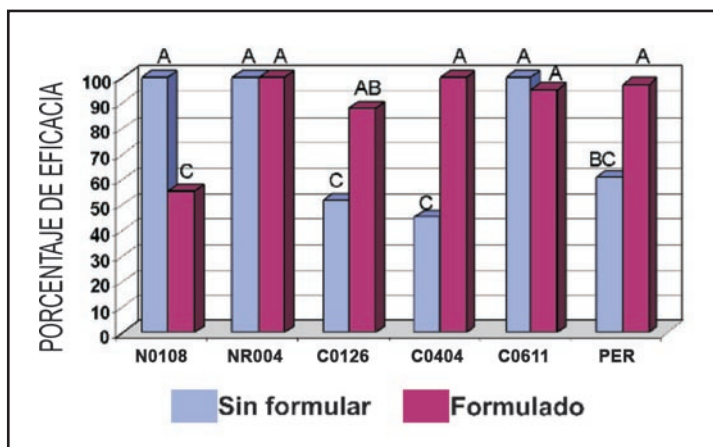
tos C0126, C0404 y Perú fueron sometidos al proceso de formulación (Figura 6). Este resultado sugiere que posiblemente la formulación potencializó la actividad de estos aislamientos virales, lo cual podría atribuirse a que los auxiliares de formulación empleados para elaborar el producto pudieron tener un efecto sobre las larvas de *T. solanivora*, ya sea causando su muerte o aumentando su susceptibilidad al virus.

El análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre los porcentajes de eficacia de los aislamientos sin formular N0108, Nr004, y C0611, ni entre los aislamientos C0126, C0404 y Perú, presentando estos últimos porcentajes de eficacia significativamente menores con respecto a los anteriores (Figura 9). Estos resultados indican que posiblemente dichos aislamientos se

pueden clasificar en dos grupos, uno de mayor virulencia que ocasionó porcentaje de eficacia del 100% y otro cuyos porcentajes de eficacia oscilaron entre el 45% y el 60%. Dentro de cada grupo de aislamientos que no presentaron diferencias estadísticas en su actividad biocontroladora se podría sugerir un mismo origen genético de los virus, lo que en consecuencia podría evidenciarse en una similitud en la virulencia de los mismos. Por el contrario las diferencias en la eficacia de los dos grupos de aislamientos podrían indicar orígenes genéticos diferentes en estos aislamientos virales.

Cuando los aislamientos fueron formulados, se detectaron diferencias significativas entre estos ($p > 0.0001$), siendo los aislamientos Nr004 y C0404 los que presentaron los mayores porcentajes de eficacia

Figura 9. Porcentajes de eficacia de los aislamientos nativos de granulovirus formulados y sin formular, sobre larvas de *T. solanivora*



* Valores con letras distintas difieren significativamente entre sí conforme a Tukey ($\alpha = 0.05$)

con un 100%, tratamientos que no fueron significativamente diferentes entre sí ni con los aislamientos C0611, C0126 y Perú, a pesar que entre algunos de estos aislamientos se encontraron diferencias al ser evaluados sin formular, posiblemente el efecto potencializador de la formulación igualó los resultados de eficacia. Este resultado sugiere

que los aislamientos Nr004 y C0611 se comportaron más eficientemente que los demás al ser utilizados como principio activo del bioplaguicida, lo que podría deberse a una mayor compatibilidad entre estos agentes infecciosos y los auxiliares de formulación empleados, así como en los procesos tecnológicos utilizados para la elaboración del producto.

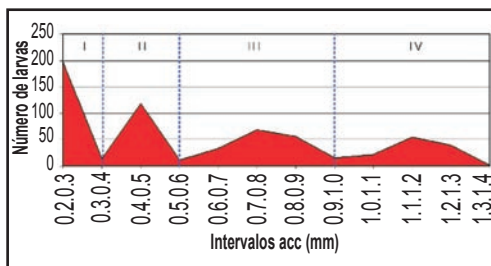
DESARROLLO DE LA INFECCIÓN VIRAL EN LARVAS DE *T. solanivora* TRATADO CON LOS DIFERENTES AISLAMIENTOS DE BACULOVIRUS NATIVOS

Espinel, C.; Villamizar, L.

Inicialmente y con miras a realizar este estudio, fue necesario determinar los estados de desarrollo larval de la polilla bajo las condiciones del laboratorio (23°C; HR 65%). Como primera medida, el crecimiento de las larvas cumplió con la ley de Dyar, la cual postula que el crecimiento de las partes esclerotizadas (cápsula cefálica) de ínstares sucesivos sigue una progresión geométrica regular.

El análisis de la distribución de frecuencias del ancho de la cápsula cefálica permitió establecer cuatro ínstares larvales debido a que se formaron igual número de picos, como se observa en la Figura 10. Los cuatro ínstares larvales también han sido reportados por autores como Niño y Notz (2000), quienes realizaron el seguimiento del desarrollo y síntomas de larvas de la polilla de la papa *Te-cia solanivora* infectadas por un virus de la granulosis. Para realizar dicho estudio fue necesario establecer los ínstares larvales de la polilla sana, experimento en el cual se observó que las larvas sanas presentaron cuatro grupos claramente definidos y sin solapamiento entre ellos, que

Figura 10. Distribución de frecuencias del ancho de la cápsula cefálica de *T. solanivora* bajo condiciones de laboratorio



indicaron los cuatro ínstares presentes en el desarrollo normal de *T. solanivora*.

Estos resultados permitieron establecer la escala del ACC para cada uno de los ínstares (Tabla 4). En la Figura 11 se observa el comportamiento en el tiempo de los cuatro ínstares determinados mediante la medición del ACC.

Tabla 4. Escala de ancho de cápsula cefálica (ACC) para cada ínstar de *T. solanivora*

ÍNSTAR	ACC (mm)
1	0.2-0.4
2	0.4-0.6
3	0.6-1.0
4	1.0-1.4

Quando las larvas fueron infectadas con granulovirus se observó un traslape de ínstares, llegándose a encontrar en los días 10 y 14 los ínstares 1, 2 y 3, en el día 16 los ínstares 2, 3 y 4; en el día 6 y 8 se traslapan los ínstares 1 y 2, en el día 12, el segundo y tercer ínstar, y en los días 18 y 20, se traslapan los ínstares 3 y 4.

Al realizarse la infección con los aislamientos C0404, C0611, C0126, N0108, se observó un desorden en los ínstares larvales evidenciado por una mayor duración en el primer ínstar, ya que en el desarrollo normal de una larva

sana se observó que entre los días 6 y 8 la frecuencia de individuos en dicho estado estuvo entre el 3% y el 14%, en contraste con la frecuencia obtenida para las larvas infectadas en el día 7 en que se alcanzó un valor de 66.6%, 69.2%, 50%, 60%, respectivamente (Figuras 12, 13, 14 y 15). Dicho retraso en el primer ínstar no fue observado para los aislamientos Nr004 y Perú (Figuras 16 y 17), lo que sugeriría que el proceso de la infección primaria desarrollada por estos aislamientos ocurre de una manera más lenta. Se observó un comportamiento similar para el tercer ínstar, ya que en las larvas sanas dicho estado presentó

Figura 11. Comportamiento de los ínstares larvales de *T. solanivora* bajo condiciones de laboratorio

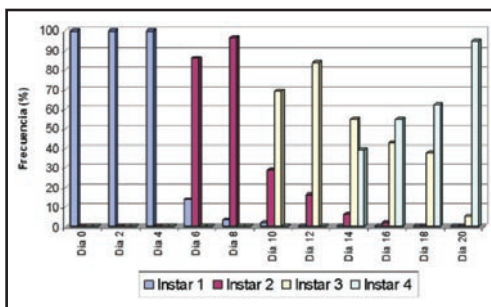


Figura 12. Desarrollo larval de *Tecia solanivora* ante la infección de un aislamiento nativo del virus de la granulosis (C0404)

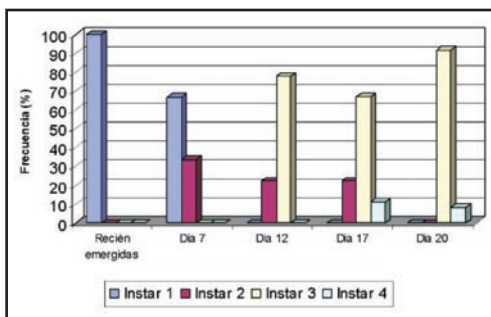


Figura 13. Desarrollo larval de *Tecia solanivora* ante la infección de un aislamiento nativo del virus de la granulosis (C0611)

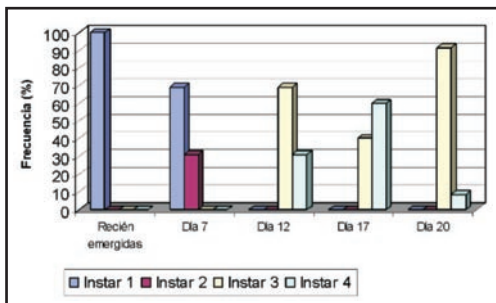


Figura 14. Desarrollo larval de *Tecia solanivora* ante la infección de un aislamiento nativo del virus de la granulosis (C0126)

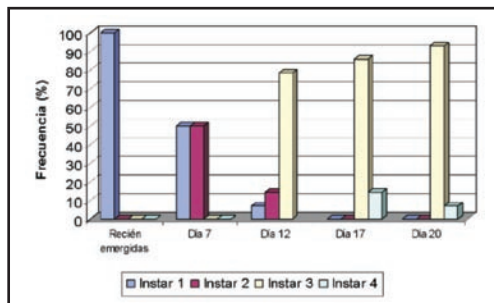


Figura 15. Desarrollo larval de *Tecia solanivora* ante la infección de un aislamiento nativo del virus de la granulosis (N0108)

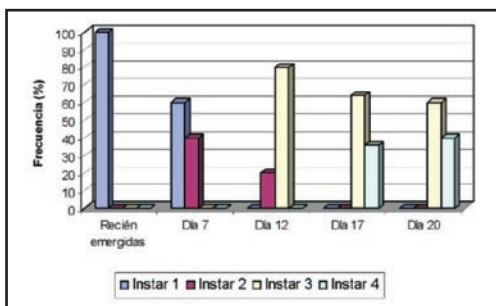


Figura 16. Desarrollo larval de *Tecia solanivora* ante la infección de un aislamiento nativo del virus de la granulosis (Nr004)

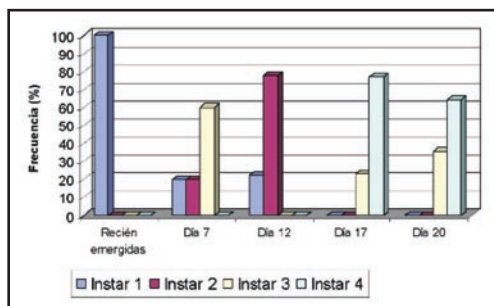
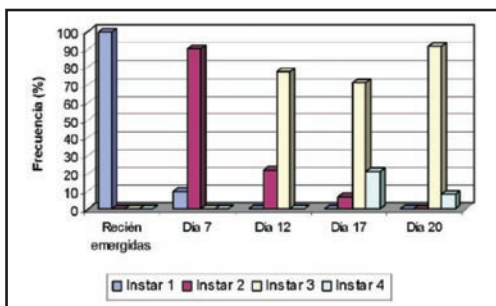


Figura 17. Desarrollo larval de *Tecia solanivora* ante la infección de un aislamiento nativo del virus de la granulosis (Perú)



el día 20, siendo ésta de 5.6%. Un comportamiento diferente se registró en las larvas infectadas con los aislamientos virales, las cuales en el día 20 tuvieron una frecuencia entre el 35% y 92%.

En el cuarto ínstar larval también se observaron diferencias entre las larvas sanas e infectadas, ya que en las primeras, este ínstar comenzó hacia el día 14 con una frecuencia de 39%, mientras que en todos los tratamientos con granulovirus, excepto con el C0611, el cuarto ínstar comenzó al día 17 con

una frecuencia del 69% en el día 10, aumentando a un 84% al día 12 y posteriormente la frecuencia disminuyó hasta

porcentajes de frecuencia entre el 11% y el 77%. Además, para el día 20 de evaluación la frecuencia fue del 94.3% en las larvas sanas, mientras que en las larvas infectadas con los diferentes aislamientos, el cuarto ínstar estuvo presente entre el 7% y el 64%. Cabe resaltar, que en el día 20 se presentaron pupas provenientes del tratamiento de larvas sanas, lo que indicaría que la duración del estado inmaduro sería de este período de tiempo; mientras que en los tratamientos con infección viral aún la mayor frecuencia estaba en tercer ínstar. Esto indicaría que el virus tiene un efecto sobre el desarrollo larval evidenciado por un desorden en la presencia de los ínstares, afectando la duración de los mismos y prolongándose los últimos ínstares sin llegar a formar el estado de pupa.

En el día 7 post infección se observaron larvas sin signos evidentes de la infección por granulovirus; la epidermis tenía aspecto translúcido dejando ver los órganos internos de la larva. En el día 12 comenzaron a presentarse los signos de infección evidenciados por la presencia de “parches” o agregaciones de gránulos blancos en los últimos segmentos abdominales, cuya coloración se fue generalizando en todo el cuerpo a medida que transcurrieron los días. También fue muy evidente la diferencia de tamaños larvales, en longitud, ancho de cápsula cefálica y peso. En el día 20 se observaron algunas larvas con pigmentación rosada en la región dorsal, la cual

denotaría el cambio en el estado de pupa, pero con la mayor parte del cuerpo completamente blanco o lechoso, contrastando claramente con las larvas sanas, las cuales tuvieron una coloración roja intensa en el dorso y sin signos de infección blanca en la región ventral (Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25).

Estos resultados fueron similares a los encontrados por Niño y Notz (2000), cuando evaluaron un granulovirus sobre *T. solanivora*. Estas larvas presentaron variaciones en el desarrollo y manifestaron síntomas de infección viral antes de morir. Se observó un retraso en el proceso de muda a partir del segundo ínstar y un alargamiento de su duración en comparación con las larvas sanas. Las larvas presentaron los síntomas externos típicos de la infección viral a partir del ínstar II. Éstos se caracterizaron por manchas de color blanco lechoso que se observaron a tra-

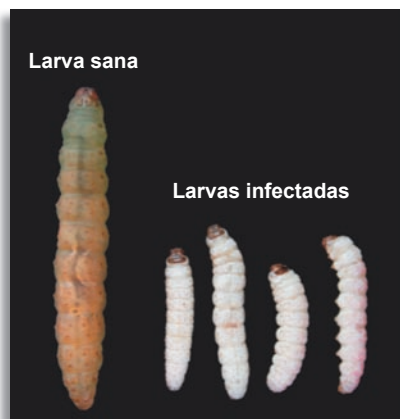


Figura 18. Comparación de larva sana con infectadas

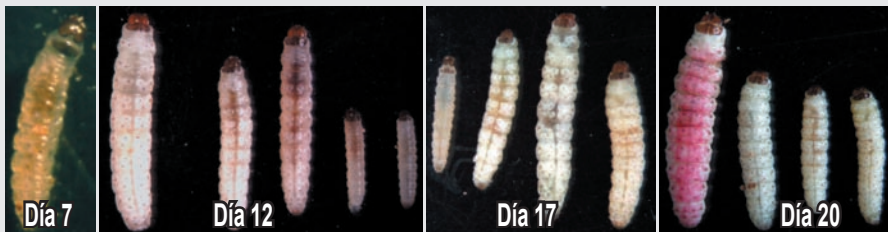


Figura 19. Desarrollo de la infección del aislamiento C0404



Figura 20. Desarrollo de la infección del aislamiento C0611

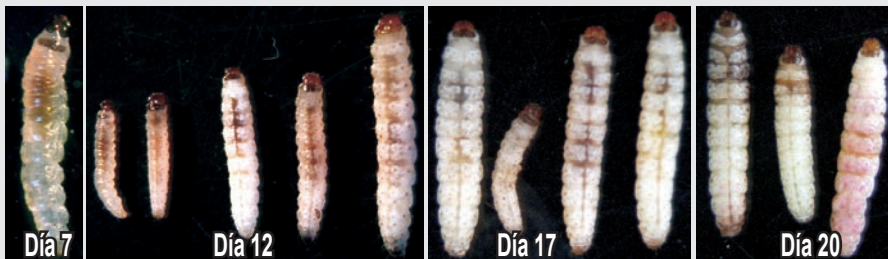


Figura 21. Desarrollo de la infección del aislamiento C0126

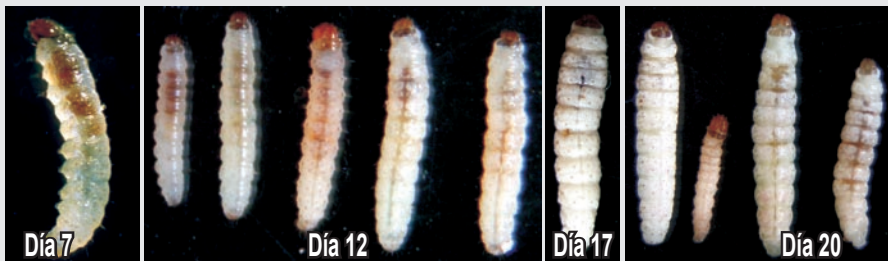


Figura 22. Desarrollo de la infección del aislamiento N0108

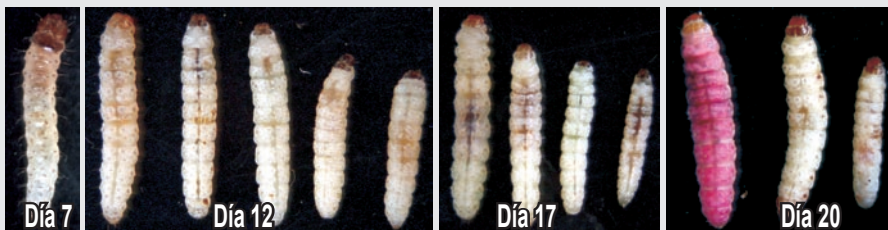


Figura 23. Desarrollo de la infección del aislamiento Nr004

vés del integumento que cubrieron todo el cuerpo. De la población infectada que sobrevivió los primeros cinco días después de la infección, el porcentaje de larvas que alcanzó los estadios larvales II, III y IV fue de 86.5%; 54.5% y 19% respectivamente. El período entre la ingestión del virus y la muerte de las larvas varió entre 5 y 45 días.



Figura 24. Desarrollo de la infección del aislamiento Perú



Figura 25. Larvas de *T. solanivora* sin infección viral

BIBLIOGRAFÍA

- Alves, S.** 1986. Controle microbiano de insetos. Editorial Manole, Brasil. 406 p.
- Briese, D.** 1980. Characterization of a laboratory strain of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bulletin of Entomological Research. 70: 203-212.
- Harvey, J.; Volkman, L.** 1983. Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus. Virology 124: 21-34.
- Liñan, C.** 1997. Farmacología vegetal. Ediciones Aerotécnicas S.L. Madrid, 1187 p.
- Magnarelli, L.; Andreadis, T.** 2004. An epizootic of nuclear polyhedrosis virus in armyworms (*Pseudaletia unipuncta*) in Connecticut. Northeastern Naturalist 11(1): 75-80.
- 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.
- 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.** 2005. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhoGV. Revista Colombiana de Entomología. 31 (2): 127-132.