

BACULOVIRUS PARA CONTROL DEL PERFORADOR DEL FRUTO (*Tuta absoluta* Meyrick) ASOCIADO AL CULTIVO DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)¹

Katherine Bonilla², Yannery Gómez-Bonilla³

RESUMEN

Baculovirus para control del perforador del fruto (*Tuta absoluta* Meyrick) asociado al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). En la presente investigación, se estudió el potencial de control a nivel de bioensayo, de cepas de betabaculovirus aisladas de larvas de *Phthorimaea operculella* Zeller, *Tecia solanivora* Povolny y suelo, sobre larvas de la polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick). Las cepas de betabaculovirus: PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4 y PhopGV-CR5 purificadas se revigorizaron en larvas de *P. operculella* Z y *Tecia solanivora* P. En los ensayos de patogenicidad se impregnaron hojas de tomate desprendidas (*Solanum lycopersicum*) con tres concentraciones teóricas: 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 cuerpos de inclusión/ml (CI/ml) de cada cepa de baculovirus y se transfirieron larvas L1 de *T. absoluta* M. La cepa PhopGV-CR2 no presentó mortalidades superiores al tratamiento control. Las cepas PhopGV-CR1, PhopGV-CR3, y PhopGV-CR5 mostraron un aumento en la mortalidad de las larvas conforme aumento la concentración del virus. PhopGV-CR4 presentó una mortalidad mayor al testigo, sin embargo, no se mostró un aumento con el incremento de la concentración. Los síntomas observados en las larvas infectadas por baculovirus fueron coloración blanquecina, flacidez, poco movimiento y muerte. Se seleccionaron las cepas PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5 para determinar la concentración letal media. La CL50 de PhopGV-CR3 corresponde a 1×10^4 CI/ml y para la cepa PhopGV-CR5 es 1×10^2 CI/ml. Por último, fotografías tomadas por microscopio electrónico de transmisión mostraron la distribución de los CI de PhopGV-CR3 en distintas secciones a lo largo del cuerpo de las larvas. La información generada en esta investigación permitió identificar las cepas PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5 como cepas promisorias para el control de la especie de *T. absoluta* M.

Palabras clave: Control biológico, baculovirus, polilla del tomate.

ABSTRACT

Baculovirus to control the tomato (*Solanum lycopersicum*) pinworm (*Tuta absoluta* Meyrick). In this study different strains of betabaculovirus, PhopGV-CR, isolated from potato tuber moths (*Phthorimaea operculella* Zeller, *Tecia solanivora* Povolny and soils were investigated regarding its potential for biological control of tomato pinworm (*Tuta absoluta* M.). The betabaculovirus strains: PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4, PhopGV-CR5 were amplified on *P. operculella* Z. and *T. solanivora* P. larvae. Neonate larvae of *T. absoluta* were placed on inoculated tomato leaves with three theoretical concentrations: 1×10^3 , 1×10^5 , 1×10^7 occlusion bodies/ml (OBs/ml) of each baculovirus strain. The mortality response of

1 Actividad que formo parte del proyecto financiado por FITTACORI y EL INTA.

2 Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, INTA – Costa Rica. kbonilla@inta.go.cr. Sede del Laboratorio de Servicios de Fitoprotección del INTA. Sabana Sur San José. ORCID: 0000-0003-0899-4751.

3 Yannery Gómez-Bonilla, INTA. yangomez27@yahoo.com. ORCID: 0000-0002-4229-7434

PhopGV-CR1, PhopGV-CR3, and PhopGV-CR5 were proportional to pathogen concentration. PhopGV-CR4 presented a higher mortality than the control, however, it showed no increase when augmenting concentration. PhopGV-CR2 did not showed significant virulence against larvae of *T. absoluta* M. The symptoms showed by virus infection in *T. absoluta* M. were milky appearance, flaccid body, loss of movement and dead. CL50 of PhopGV-CR3 was 1×10^4 CI/ml and 1×10^2 CI/ml for PhopGV-CR5. At last, micrographs captured by a transmission electronic microscope the distribution of the OBs through the body of a larvae infected by PhopGV-CR3. These results showed PhopGV-CR3 and PhopGV-CR5 as promissory strains to control *T. absoluta* populations.

Keywords: Biological control, baculoviruses, tomato pinworm.

INTRODUCCIÓN

La producción del cultivo del tomate es una actividad económica importante a nivel nacional. En Costa Rica se producen aproximadamente 69.040,45 toneladas métricas sembradas en 1.171,9 hectáreas y emplea 1.012 personas divididas entre pequeños y medianos productores (López 2017; FAOSTAT 2017).

El cultivo de tomate puede ser afectado en gran medida por las larvas de lepidópteros de la familia Gelechiidae, específicamente *Tuta absoluta* Meyrick. Esta plaga fue reportada en el país en el año 2014 por el Servicio Fitosanitario del Estado (IPPC 2015). El daño que ocasiona a la planta y al fruto disminuye el rendimiento y calidad potencial, lo que genera pérdidas económicas (Roditakis *et al.* 2012). Las prácticas realizadas para el control de esta plaga se reducen a la aplicación constante de insecticidas y manejo etológico (Cocco *et al.* 2013). Estas aplicaciones además de constituir un aumento en los costos de producción afectan negativamente las poblaciones de los enemigos naturales, la generación de resistencia por parte de la plaga, daños ambientales y el deterioro de la salud humana bajo manejo inadecuado (Picanço *et al.* 1995).

El estudio de controladores biológicos ha adquirido importancia durante los últimos años con el fin de detener y disminuir la creciente demanda de uso de insecticidas en estos sistemas de producción. Por lo que la utilización de virus entomopatógenos (baculovirus) se muestra como un biopesticida potencial para el manejo integrado de la plaga (Lobo *et al.* 2007).

Los baculovirus (Familia: Baculoviridae) infectan artrópodos (insectos y crustáceos), principalmente de las familias del orden Lepidoptera, Hymenoptera, y Diptera (Van Beek y Davis 2007; Theilmann *et al.* 2005; Fuxa 2004; Inceoglu *et al.* 2001; Evans 1986). Dentro de esta familia se reconocen cuatro géneros: *Alphabaculovirus*, *Betabaculovirus*, *Gammabaculovirus* y *Deltabaculovirus*. Los primeros dos géneros infectan insectos de la familia Lepidoptera, el tercer género Hymenoptera y el último Diptera, respectivamente (Carstens y Ball 2009; Jehle *et al.* 2006).

Estos virus son altamente seguros y potencialmente efectivos, ya que presentan un rango limitado de huéspedes, su replicación es limitada a invertebrados y no hay evidencia de que se presente resistencia por parte de la plaga. Además, no presentan patogenicidad cruzada sobre plantas, mamíferos, aves, peces, o insectos no blanco (Ojeda *et al.* 2002).

Adicionalmente, los baculovirus tienen características únicas que pueden ser aprovechadas, incluyendo la capacidad de replicarse en sus huéspedes, dispersarse en el cultivo y potencial de ser producidos a escala local o regional. (Williams 2002).

La adaptación de cepas de baculovirus a nuevos hospederos ha sido informada por varios autores. Estudios han demostrado que esta adaptación se da tanto en cepas *Alphabaculovirus* como en *Betabaculovirus*. Ignoffo (1968) menciona que las cepas de baculovirus no solo pueden

causar mortalidad a su especie de insecto sino también a especies de insectos pertenecientes a la misma familia.

A nivel nacional y centroamericano no existe investigación sobre los virus entomopatógenos

de plagas en el cultivo de tomate. Por lo que la presente investigación pretende estudiar la eficacia biológica a nivel de bioensayo de cepas de baculovirus, aisladas de larvas de *Phthorimaea operculella* Zeller. o *Tecia solanivora*, Povolny, sobre larvas de *Tuta absoluta* M.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las cepas

Las cepas de baculovirus provenían del banco de microorganismos del Laboratorio de Fitoprotección del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicado en Mata Redonda, San José. En este lugar se desarrollaron los ensayos *in vitro*. Las cepas fueron aisladas, caracterizadas y codificadas anteriormente por Gómez- Bonilla *et al.* (2011a y b).

Las cepas utilizadas fueron las siguientes: PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4, PhopGV-CR5. La revigorización de las cepas para potenciar su virulencia se desarrolló en larvas de *Tecia solanivora* P. y en *Phthorimaea operculella* Z.

El procedimiento para la cría de las polillas y revigorización se basó en la metodología descrita por Gómez-Bonilla *et al.* (2011a), con algunas modificaciones.

Cría de *T. solanivora* y *P. operculella*

Los estadios larvales de *T. solanivora* P. y *P. operculella* Z. se recolectaron de un campo de papa ubicado en la Estación Experimental Carlos Durán (N 09°55'08", O 83°52'43") en Oreamuno de Cartago. Las colonias se mantuvieron en un cuarto de cría en condiciones ambientales naturales (60% H.R, 26 °C, L16:08 h de fotoperíodo) en el Laboratorio de Fitoprotección del INTA.

Los tubérculos de papa infestados de larvas de las polillas fueron colocados en tres cajas de madera con dimensiones de 40x40x40 cm. Cuando los especímenes llegaron al estado adulto se introdujeron nuevas papas previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio (5%). Los tubérculos nuevos sirvieron como sitios de oviposición de los huevos de las polillas y como medio de alimentación para las larvas, para continuar con el mantenimiento de las crías. Dentro de las cajas se colocaron motas de algodón impregnadas de una solución azucarada al 30% (vol/vol) preparada con miel para la alimentación de adultos.

Recolección de larvas neonatas de *P. operculella* o *T. solanivora* para la revigorización de las cepas

Para la colecta de huevos se tomaron aproximadamente 30 adultos (15♂:15♀) de una de las cajas de crías y se transfirieron a recipientes plásticos de un volumen de cuatro litros, previamente forrados con papel craft internamente a fin de que las hembras colocaran en este las posturas. Dentro del recipiente se colocó una mota de algodón impregnado de solución azucarada con miel al 30% (vol/vol) para su alimentación y se tapó el recipiente con una tela de malla por un período de 48 horas. Luego se extrajo el papel craft con las posturas y se cortaron las áreas del papel donde se encontraron huevos. Posteriormente estos papeles con huevos se colocaron en platos Petri de vidrio sellados con parafilm y se pusieron a incubar a 27°C, en oscuridad total. En estas condiciones los huevos tardaban aproximadamente 96-120 h en eclosionar.

Revigorización de las cepas

Por cada una de las cepas se utilizaron seis tubérculos sanos (peso aproximado de 50 gramos). Cada tubérculo se desinfectó por un 1 min con hipoclorito de sodio (0,5%) y posteriormente se lavó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. Cada tubérculo de papa se asperjó con 2 ml de cepa pura previamente preparada (1×10^7 CI/ml) con un aerógrafo con una descarga de 3 ml/min. Luego de este proceso, con ayuda de un pincel, se colocaron 15 larvas en estado L1 por tubérculo. Los tubérculos se ubicaron en cajas plásticas de 412 ml con tapa y se incubaron por 25 días en la cámara ambiental (27°C, 60% H.R y 16L:8O h de fotoperiodo).

A partir de los 15 días se procedió a recolectar las larvas parasitadas por baculovirus que se encontraban fuera de los tubérculos. A los 24 días se peló y cortó cada una de las papas cuidadosamente para extraer las larvas enfermas que se encontraban muertas dentro de las galerías. Todas las larvas fueron colocadas en microtubos de 2 ml a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas en los bioensayos con *Tuta absoluta* M.

Cría de *Tuta absoluta* M.

Las larvas y pupas de *T. absoluta* M se colectaron de una plantación de tomate (N 9°53'18", O 84°10'44") ubicada en Santa Ana, San José y se colocaron en cajas de madera y vidrio con dimensiones de 40x40x40 cm. Las larvas se alimentaron de plantas de tomate de la variedad JR de una edad de 40 días sembradas en potes. Una vez emergidos los adultos se colocaron motas de algodón impregnadas de una solución azucarada al 10 % (vol/vol) preparada con miel y agua destilada para su alimentación.

Recolección de larvas neonatas de *T. absoluta* M.

Para dicho proceso se sustituían las plantas de tomate de las cajas de cría y se colocaban cuatro folíolos de tomate sanos y previamente desinfectados en erlenmeyers con el peciolo

sumergido en agua estéril; para que no perdieran la turgencia; las cuales servían de sustrato para que los adultos hembras colocaran las posturas. Transcurridas 48 horas, se extraían los folíolos con las posturas. Con un pincel fino y suave se transferían los huevos a discos de algodón donde se colocaban 100 huevos por disco. Una vez colectadas estas posturas se colocaron los discos de algodón en cajas plásticas transparentes de 412 mL y se introducían en la cámara ambiental (25°C, 70% H.R y 12L:12O h de fotoperiodo).

Evaluación de las cepas de baculovirus sobre larvas de *T. absoluta* M.

La evaluación de la eficacia de cada cepa se llevó a cabo de forma individual, en períodos diferentes. La evaluación de las cepas de baculovirus en *T. absoluta* M. se realizó basado en la metodología utilizada por Moura *et al.* 2010 con modificaciones.

Preparación de las cepas

La preparación previa de las cepas de baculovirus se realizó colocando una larva parasitada (1 Eq larval= 10^9 cuerpo oclusivos/ml (Zeddam *et al.* 2003)) en un microtubo de centrifuga y se añadió 500 µl de Tris 0,01 M y SDS 0,1% (pH 7.5), luego se maceró con un pistilo, una vez triturada la larva se añadió 500 µl de H₂O bides-tilada. Posteriormente se colocó la muestra en un agitador, para garantizar la homogeneidad de la mezcla. Las concentraciones utilizadas en los tratamientos se prepararon mediante la técnica de diluciones seriadas.

Bioensayos de patogenicidad

En cada bioensayo se utilizaron hojas de tomate desprendidas, compuestas de tres a cinco folíolos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (0,05%) por 1 min y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron al ambiente.

Las plantas control se impregnaron con agua destilada estéril constituido por 20% de Tris 0,01 M y SDS 0,1% (pH 7.5). Cada concentración constituyó un tratamiento y cada tratamiento consistió en 6 repeticiones. Cada repetición estaba conformada por grupos de 10 larvas L1. Se utilizaron tres concentraciones teóricas (1×10^3 CI/ml, 1×10^5 CI/ml y 1×10^7 CI/ml) por cada cepa de baculovirus. La cantidad de aplicación consistió en 1 mL por el haz y 1 mL por el envés de la hoja y fue realizada con un aerógrafo. Después de secadas las hojas al aire, se colocaron en platos petri con algodón húmedo adherido al peciolo de la hoja para evitar la desecación. Al algodón se le añadió agua cada vez que fue necesario. Seguido se transfirieron grupos de 10 larvas (L1) a cada una de las hojas de tomate. Todo el procedimiento se realizó en una cámara de transferencia.

Después de 12 días de incubación en ambiente controlado (Temperatura $25 \pm 3^\circ\text{C}$, humedad relativa 50%, 12L:12O h de fotoperiodo) se contabilizó la cantidad de pupas y larvas sanas (sobrevivientes) y el total de larvas infectadas. Las larvas o pupas muertas y enfermas se clasificaron como “larvas muertas por virus”, las larvas y pupas vivas sanas se clasificaron “sobrevivientes”.

Determinación de la concentración letal media (CL50) de dos cepas patógenas a *T. absoluta* M.

Con los resultados obtenidos en los bioensayos anteriores, se seleccionaron las cepas PhopGV-CR5 y PhopGV-CR3 para la determinación de la CL50. La metodología utilizada fue la misma que los ensayos de patogenicidad. Las concentraciones utilizadas fueron: 1×10^3 CI/ml, 1×10^4 CI/ml, 1×10^5 CI/ml, 1×10^6 CI/ml y 1×10^8 CI/ml.

Fotografías al microscopio electrónico

Por último, se envió una larva infectada con la cepa de baculovirus PhopGV-CR3 al Centro de Investigación de Estructura Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica para obtener fotografías de los tejidos infectados por la cepa por medio del microscopio de barrido.

Análisis de los datos

Los datos obtenidos en la evaluación de cada una de las cepas se sometieron a un modelo generalizado lineal mixto con distribución binomial. La concentración letal media (CL50) se determinó con la prueba Probit con el software JMP.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La interacción de cada especie de baculovirus – hospedero es única, ya que esta define su susceptibilidad y como se pueden ver influenciadas por agentes externos como son las condiciones ambientales (Gómez-Valderrama y Villamizar 2013). Los resultados de las pruebas de patogenicidad para determinar si las cepas de baculovirus provenientes de *P. operculella* Z., *T. solanivora* P. y suelo se adaptaban a un nuevo hospedero, como es el caso de *T. absoluta* M., se muestran a continuación:

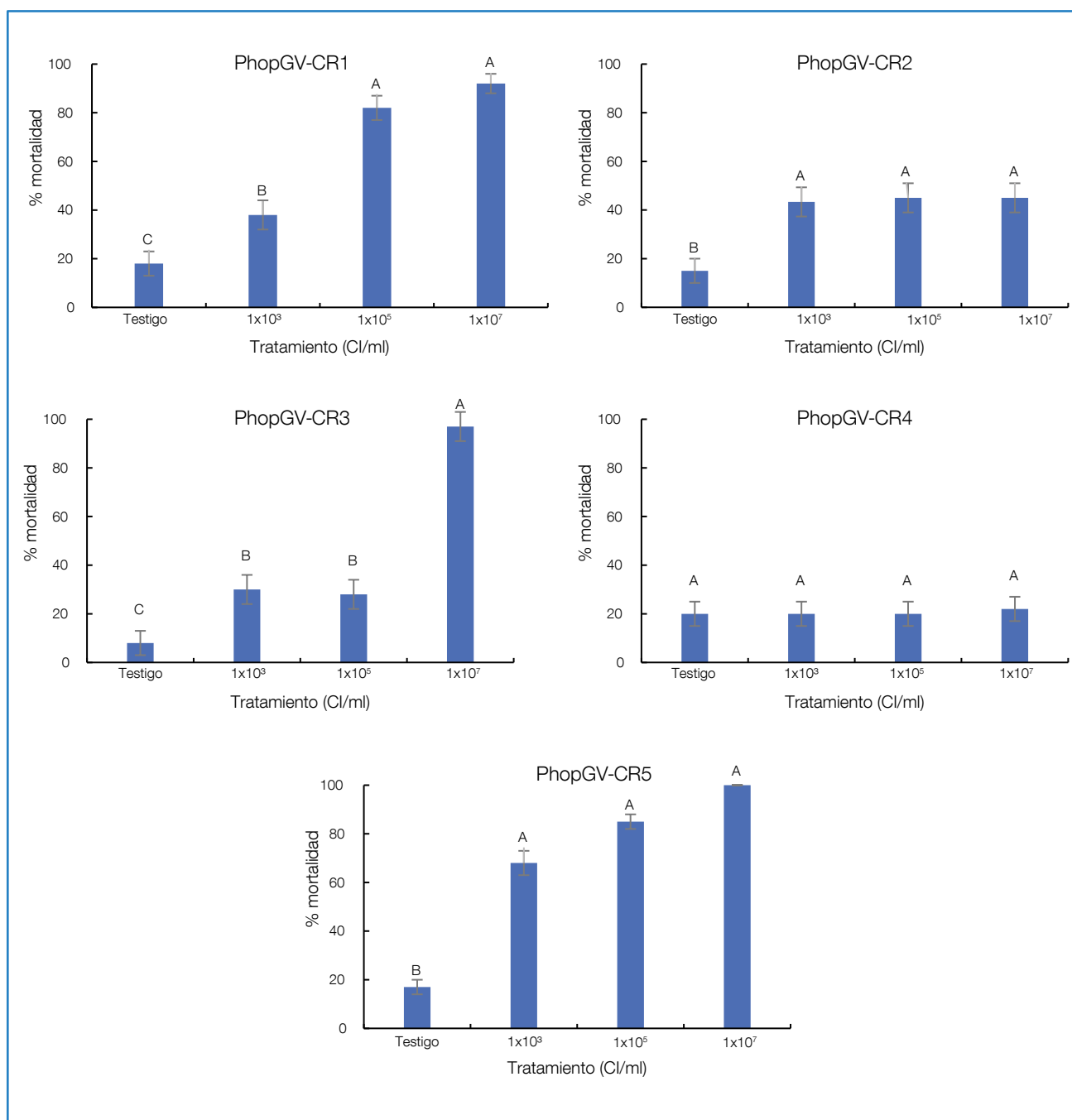


Figura 1. Porcentaje de la mortalidad promedio (\pm error estándar) de larvas de *T. absoluta* M. infectadas con cepas de betabaculovirus trece días después de la inoculación. San José, Costa Rica. 2016.

Medias con misma letra en la columna no son estadísticamente diferentes (LSD Fisher 0,05)

*CI/ml: cuerpos inclusión por mililitro.

La cepa PhopGV-CR1 presentó la mayor mortalidad de las larvas de *T. absoluta* M. en las concentraciones 1×10^5 y 1×10^7 . Las medias de ambas concentraciones no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero sí con el tratamiento de la menor concentración. La concentración 1×10^3 controló una menor proporción de larvas en comparación a las otras dos concentraciones.

Las distintas concentraciones de la cepa PhopGV-CR2 mostraron una mortalidad estadísticamente significativa mayor que el testigo, lo cual indica patogenicidad de la cepa sobre las larvas de *T. absoluta* M., sin embargo, entre las tres concentraciones evaluadas no se observó diferencias estadísticamente significativas.

La cepa PhopGV-CR3 causó mayor mortalidad de las larvas en la concentración de 1×10^7 . Las concentraciones 1×10^3 y 1×10^5 no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero sí mayor que el tratamiento control. La cepa PhopGV-CR4 no presenta alta virulencia en ninguna de las concentraciones, ni un mejor control que el testigo.

La cepa PhopGV-CR5 presentó una alta patogenicidad en larvas de *T. absoluta* M. en bajas concentraciones.

En los bioensayos en general se presentaron porcentajes de mortalidad en los grupos testigo, esto puede ser debido a causas naturales o manipulación de las larvas (Rosenheim y Hoy 1989). El menor porcentaje de mortalidad en grupo control se presenta en el bioensayo de la cepa PhopGV-CR3 con un $8,00 \pm 4,00$ % de mortalidad y el mayor en el bioensayo de la cepa PhopGV-CR4 con $20 \pm 5,00$ % de mortalidad. Moura et ál. (2010) documenta una mortalidad natural de *T. absoluta* M. de $27,8 \pm 10,1$ % a nivel de bioensayo.

En general las cepas presentaron un grado de patogenicidad sobre las larvas de *T. absoluta* M., a excepción de la cepa PhopGV-CR4. Esta adaptación de las cepas de baculovirus a un nuevo hospedero, como el caso de las larvas de *T. absoluta* M., es posible que se presente por

la heterogeneidad genética que permite que las poblaciones virales sean más adaptables a condiciones ambientales variables, los cuales incluyen diferentes hospederos y distintos haplotipos del mismo hospedero (Hodgson et al. 2004).

Esta variabilidad genotípica se presenta en aislamientos colectados en un mismo sitio, aislamientos colectados de la misma especie en diferentes lugares geográficos o incluso colectados en un único individuo (Hitchman et al. 2007; Murillo et al. 2006; Cory y Myers 2003; Lery et al. 1998). Para el caso de las cepas experimentales, Gómez-Bonilla et al. (2011b) menciona que las cepas experimentales (PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4, y PhopGV-CR5) presentan una mezcla de distintos genotipos, lo cual les permite maximizar la probabilidad de infección sobre un nuevo hospedero (Espinel-Correal et al. 2010; Hodgson et al. 2004).

La heterogeneidad genotípica se puede presentar por diversos factores como la recombinación entre diferentes genotipos, mutaciones puntuales, duplicación de secuencias. Sin embargo, es importante recalcar que las variaciones no se dan en todo el genoma sino en regiones hipervariables y que estos cambios pueden generar cambios significativos en la actividad biológica del baculovirus (Cory et al. 2005).

Los cambios significativos en la actividad biológica pueden darse en el grado de patogenicidad, la virulencia y la productividad, que favorecen la adaptación al hospedero o a las condiciones ambientales (Harrison 2009; Hitchman et al. 2007; Cory y Myers 2003), tal y como se observa en los resultados obtenidos en los bioensayos donde se registraron mortalidades por infección de baculovirus en un nuevo hospedero, como lo es *T. absoluta* M.

Gómez et al. (2011b) mencionan en su investigación que la cepa PhopGV-CR3 resultó altamente virulenta a *T. solanivora* P. y *P. operculella* Z. Lo cual es un indicador de que puede adaptarse a los distintos hospederos que coexisten en un mismo sitio; tomando en consideración que *T. absoluta* M. también es responsable de la formación de galerías en el follaje del cultivo de papa al igual que *P. operculella* Z.

La cepa PhopGV-CR5, mostró una alta patogenicidad en la menor concentración (1×10^3 CI/ml). Un comportamiento similar fue observado por Gómez-Bonilla *et al.* (2011b) en las cepas PhopGV-CR3 y PhopGV-CR2 con las concentraciones a 0,5 CI/mm² y 5 CI/mm², respectivamente, en la cuales se registró una mortalidad de más de un 50% cuando fueron inoculadas sobre especímenes de *T. solanivora* P. Aunque la metodología no es similar a la realizada en esta investigación, se puede observar que existe una tendencia en la que las concentraciones menores utilizadas muestran una alta patogenicidad sobre este hospedero.

Moura *et al.* (2010) realizaron pruebas de susceptibilidad de una cepa brasileña de granulovirus aislada de la especie *P. operculella* Z. sobre larvas de *T. absoluta* M. Las concentraciones utilizadas fueron $1,1 \times 10^3$ CI/ml, $1,1 \times 10^4$ CI/ml, $1,1 \times 10^5$ CI/ml, $1,1 \times 10^6$ CI/ml, $1,1 \times 10^7$ CI/ml y $5,5 \times 10^7$ CI/ml. Las concentraciones entre $1,1 \times 10^4$ CI/ml y $1,1 \times 10^6$ CI/ml presentaron mortalidades entre 41 y 60% y no presentaron diferencias estadísticas entre sí.

Alcazar y Angéles (1996) documentan en su investigación en la que evaluaron la patogenicidad de una cepa peruana de granulovirus aislada de *P. operculella* Z. sobre larvas de *T. absoluta* M. que esta cepa también se adaptó a este nuevo hospedero.

Estas dos últimas investigaciones evidencian la adaptación de cepas de granulovirus aisladas de *P. operculella* Z. a un nuevo hospedero (*T. absoluta* M.), similar a los resultados obtenidos en esta investigación para las cepas PhopGV-CR3, PhopGV-CR5 y PhopGV-CR1.

También Espinel-Correal *et al.* (2010) determinaron que aislamientos nativos de granulovirus de *T. solanivora* P. se adaptan a una nueva especie: *P. operculella* Z. lo que corrobora que las cepas se pueden adaptar a nuevos hospederos.

Un aspecto importante a considerar es que las cepas PhopGV-CR3, PhopGV-CR5 fueron aisladas de suelo y se adaptaron *T. solanivora* P. y *P. operculella* Z. según lo obtenido por Gómez *et al.* (2011b) y a un nuevo hospedero obtenido en esta investigación como lo es *T. absoluta* M.

Richards y Christian (1999) y Murillo *et al.* (2006) mencionan el haber aislado cepas de SNPV y MNPV de suelo las cuales resultaron patogénicas para *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera exigua* incorporando muestras de suelo en las dietas artificiales utilizadas para criar insectos.

A pesar de la variabilidad genotípica de las cepas de baculovirus para la adaptación a nuevos huéspedes hay factores que afectan la adaptación de los baculovirus a un nuevo hospedero, entre estos se encuentran los mecanismos de inmunidad del hospedero, las interacciones entre diferentes genotipos presentes en el hospedero y las interacciones entre los aspectos ecológicos del patógeno y el ambiente (Gómez *et al.* 2009).

La cepa PhopGV-CR4 no presentó patogenicidad, esto puede ser debido a diversos factores: las barreras físicas, fisiológicas o la inmunidad del hospedero. La primera barrera que debe atravesar el baculovirus para poder infectar eficientemente el hospedero es el intestino medio. En este sitio hay varios sistemas de defensa para proteger las células de una posible infección como lo es la presencia de la membrana peritrófica, la muda de las células del intestino medio y la excreción de enzimas (proteasas y lipasas) con actividad viricida (Sparks *et al.* 2008; Cory y Myers 2003; Wang y Granados 2000).

Otro mecanismo que impide la infección por los baculovirus en el hospedero es el reconocimiento, donde los hemocitos identifican y encapsulan las células virales. La apoptosis también es una estrategia de defensa activada por las enzimas caspasas en el hospedero. Por último, la inmunidad causada por la enzima fenoxilasa que se encuentra en el plasma de los insectos, la cual presenta efectos viricidas (McNeil *et al.* 2010; Sparks *et al.* 2008; Trudeau *et al.* 2001).

Los síntomas que se observaron en las larvas de *T. absoluta* M. son los mismos documentados por Moura *et al.* (2010), Alcázar y Ángeles (1996) y Gómez-Valderrama *et al.* (2014). La sintomatología presentada fue un cambio de color de verde claro (larva sana) a una coloración lechosa del cuerpo fragilidad de los tejidos, flacidez y muerte o poco movimiento de las larvas (figura 2).

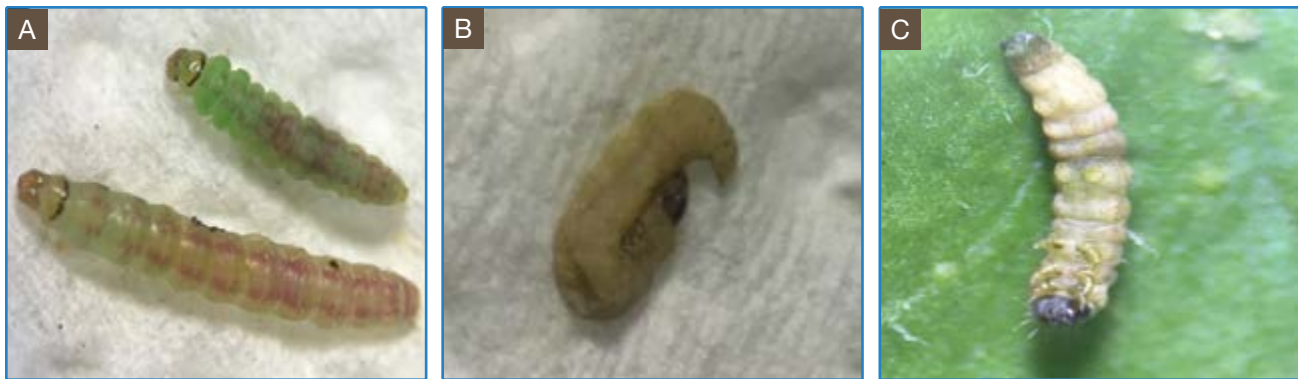


Figura 2. Larvas de *T. absoluta* M. sanas (A) y enfermas por baculovirus (B y C) de 12 días de edad colectadas en el bioensayo de la cepa PhopGV-CR3. San José, Costa Rica. 2016.

Determinación de la CL50

En la Figura 3 se indican los tratamientos evaluados, así como el porcentaje de mortalidad de larvas que se obtuvo con la aplicación de la cepa PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5. Se evidenció que hay una relación entre el aumento de la concentración y la mortalidad presentada por las larvas. La concentración letal media para la cepa PhopGV-CR3 es de $1 \times 10^{4.1}$ CI/ml y para PhopGV-CR5 de $1 \times 10^{2.5}$ CI/ml.

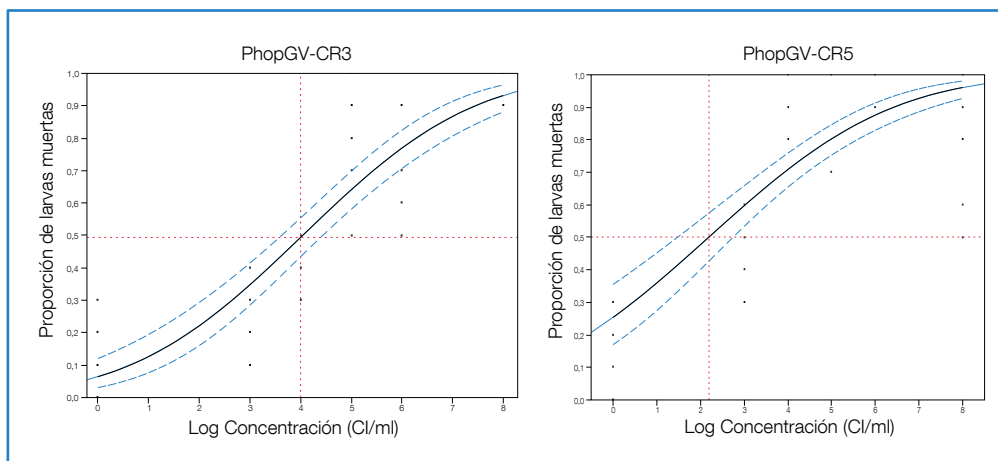


Figura 3. Relación de la concentración del virus contra la respuesta de mortalidad entre PhopGV-CR3 y PhopGV-CR5 y larvas de *T. absoluta* M. en hojas de tomate. Puntos: Datos observados, línea sólida: curva ajustada concentración-mortalidad por el modelo probit y línea punteada: límites de confianza al 95%. San José, Costa Rica. 2016.

Moura *et al.* (2010) documentan una tendencia similar a los datos obtenidos con la cepa PhopGV-CR3, donde la mortalidad de *T. absoluta* M. aumenta con la concentración de cepa de granulovirus (aislamiento nativo en larvas de *P. operculella* Z. en Brasil). Estos autores determinan que la concentración letal media es de $1,05 \times 10^4$ CI/ml. Por otro lado, Angéles y Alcázar

(1995) registraron que la concentración letal media para *Tuta absoluta* M. es $3,5 \times 10^6$ CL/ml de una cepa peruana de granulovirus aislada de *P. operculella* Z.

Gómez-Bonilla *et al.* (2011b) realizó el cálculo de la dosis letal media de las cepas PhopGV-CR1, PhopGV-CR2, PhopGV-CR3, PhopGV-CR4,

PhopGV-CR5 y PhopGV-1346 (cepa tunecina de granulovirus) en larvas de *P. operculella* Z. y *T. solanivora* P. Las concentraciones que utilizó fueron: 0.5, 5, 50, 500 y 5000 CI/mm². La CL50 en *T. solanivora* P. de PhopGV-CR3 fue de 0.5 y CI/mm² y para la cepa PhopGV-CR2 de 5 CI/mm². Aunque la metodología es distinta a la usada en esta investigación se puede observar que estas cepas tienen la capacidad de infectar dos especies de polilla pertenecientes a la misma familia.

En la Figura 4 se observan los cuerpos de inclusión de una larva de *T. absoluta* infectada con la cepa PhopGV-CR3 tomadas al microscopio electrónico. Los cuerpos inclusión presentan forma ovoide y con un virion por cuerpo de inclusión los cuales son las características típicas de los granulovirus, específicamente del género *Betabaculovirus* (Friesen 2007; Funk *et al.* 1997).

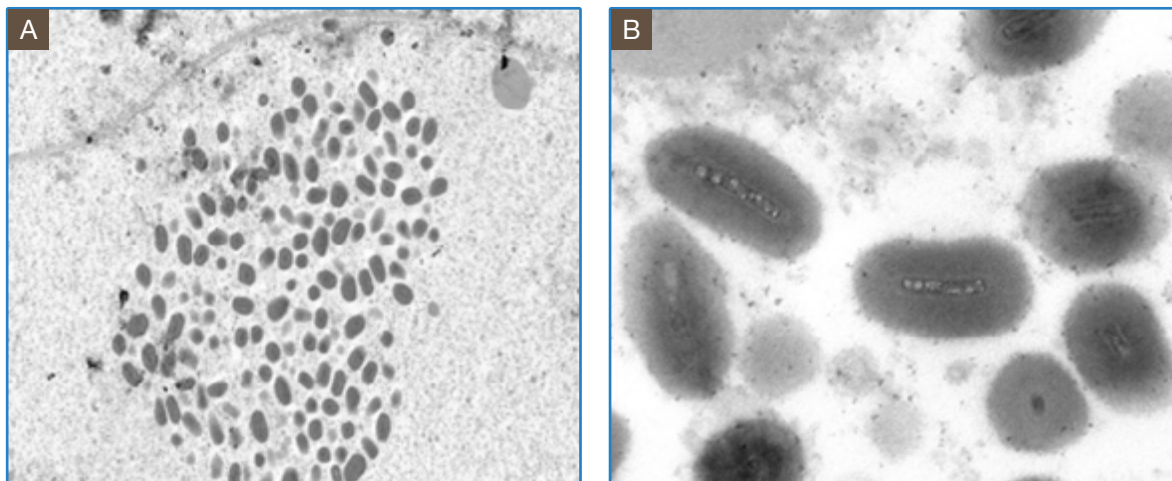


Figura 4. Fotografías al microscopio electrónico de cuerpos de inclusión de la cepa PhopGV-CR3 en corte transversal (barra: 1 µm) del cuerpo de una larva de *T. absoluta* (A). Cuerpos de inclusión con una nucleocapside embebida (barra: 200 nm) (B). CIBCM, San José, Costa Rica. 2016.

LITERATURA CITADA

Ángeles, I; Alcázar, J. 1996. Susceptibilidad de la polilla *Scrobipalpaloides absoluta* al virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* al virus PóVG. Rev. Per. Ent. 38:65-70.

Carstens, EB; Ball, LA. 2009. Ratification vote on taxonomic proposals to the international Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol 101:1181-1188.

Cocco, A; Deliperi, S; Delrio, G. 2013. Control of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) in greenhouse tomato crops using the mating disruption technique. Journal of Applied Entomology 137(1-2):16-28.

Cory, J; Myers, J. 2003. The ecology and evolution of insect viruses. Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics 34:239-272.

Cory, J; Green, B; Paul, R; Hunter-Fujita, F. 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. Journal of the invertebrate pathology 89(2):101-111.

Espinel-Correal, C; Lery, X; Villamizar, L; Gómez, J; Zeddarn, JL; Cotes, A; López-Ferber, M. 2010. Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Applied and Environmental Microbiology 76(22):7617-7625.

- Evans, HF. 1986. Ecology and epizootiology of baculoviruses. In: Granados, RR, Federeci, BA (eds). The Biology of Baculoviruses. Boca Raton, CRC Press. p.89-132.
- FAOSTAT. 2016. Food and Agriculture Organization. FAOSTAT Database. Consultado 6 de abr. 2016. Disponible en [www. http://www.fao.org/faostat/en/#data](http://www.fao.org/faostat/en/#data)
- Friesen, PD. 2007. Insect viruses. In Knipe, DM; Howley, PM; Griffin, DE; Lamb, RA; Martin, MA; Roizman, B; Straus, SE. (eds). Virology. 5 ed. Lippincott Williams and Wilkins. p.443-472.
- Funk, CJ; Braunagel, SC; Rohrmann GF. 1997. Baculovirus structure. In Miller, LK (ed). The Baculoviruses, Plenum Press. p. 7-32.
- Fuxa, JR. 2004. Ecology of insect nucleopolyhedroviruses. Agriculture, Ecosystems & Environment 103:425-442.
- Gómez J; Villamizar, L; Espinel, C; Cotes, A. 2009. Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. 10(2):152-158.
- Gómez-Bonilla, Y; Léry, X; López, M; Caballero, P; Muñoz, D. 2011a. Characterization of a Costa Rican granulovirus strain highly pathogenic against its indigenous hosts, *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora*. Entomol. Exp. Appl. 140: 230-246.
- Gómez-Bonilla, Y; López, M; Caballero, P; Lery, X; Muñoz, D. 2011b. Costa Rican soils contain highly insecticidal granulovirus strains against *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora*. Journal of Applied entomology. 136(7):530-538.
- Gomez-Valderrama J; Herrera, L; Uribe, D; López-Ferber, M; Villamizar, L. 2014. An immunological method for granulovirus detection in larvae of *Tuta absoluta*: searching for isolates with prospects for biological control of this pest in Colombia. International Journal of Pest Management 60(2):136-143.
- Gomez-Valderrama J; Villamizar L. 2013. Baculovirus: Hospederos y especificidad. Revista Colombiana de Biotecnología 15 (2): 143-155.
- Harrison, R. 2009. Structural divergence among genomes of closely related baculoviruses and its implications for baculovirus evolution. Journal of Invertebrate Pathology 101:113-118.
- Hitchman R; Hodgson, D; King, L; Hails; Cory; J. 2007. Phenotypic variation between naturally coexisting genotypes of Lepidoteran baculovirus. Evolutionary Ecological Research 3:687-701.
- Hogdson, D; Hitchman, R; Vanbergen, A; Hails, R; Possee, R; Cory, J. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. J. Evol. Biol. 17:1018-1025.
- Ignoffo, M. 1968. Specificity of insect viruses. Bull. Soc. Entom. 14(2):33-40.
- Inceoglu, AB; Kamita, SG; Hinton, AC; Huang, Q; Severson, TF; Kang, K; Hammock, BD. 2001. Recombinant baculoviruses for control. Pest Manag. Sci. 57:981-987.
- IPPC (Internartional Plant Protection Convention). 2015. Pest reports from Costa Rica (en línea). Consultado 26 abr. 2021. Disponible en <https://www.ippc.int/es/countries/costa-rica/pestreports/>
- Jehle, JA; Blissard, BC; Bonning, JS; Cory EA, Herniou, GF; Rohrmann, DA; Theilmann, SM; Thiem, SM; Vlask, JM. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. Arch. Virol. 151:1257-1266.
- Lery, X; Abol-ela, S; Giannotti, J. 1998. Genetic heterogeneity of *Phthorimaea operculella* granulovirus: restriction analysis of wild-type isolates and clones obtained in vitro. ActaVirologica 42:13-21.
- Lobo, M; Batista, M; Moscardi, F. 2007. Virus for the Biological Control of Insects. In Taylor y Francis (eds). Baculovirus Pesticides: Present state and future perspectives. p. 689-692.
- López, L. 2017. Generalidades de la agrocadena de tomate (*Solanum lycopersicum*) (en línea). Memoria del 4° Congreso Nacional del Cultivo de Tomate. Cartago, Costa Rica. 40 p. Consultado 26 abr. 2021. Disponible en <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/A50-10881.pdf>

- McNeil, J; Cox-Foster, D; Slavicek, J; Hoover, K. 2010. Contributions of immune responses to developmental resistance in *Lymantria dispar* challenge with baculovirus. *Journal of Insect Physiology* 56:1167-1177.
- Moura, G; Alves, S; Rampelotti-Ferreira, F; Ragassi, M; Borges, C; Delalibera, I. 2010. Potential of granulovirus isolate to control *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl* 55:657-671.
- Murillo, R; Elvira, S; Muñoz, D; Williams, T; Caballero, P. 2006. Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in the southern Spain. *Biol. Control* 38:157-165.
- Ojeda, Z; Rocha, P; Calvache, H. 2002. Baculovirus como insecticida biológico. *Palmas* 24(3):27-37.
- Picanco, M; Guedes, RN; Leite, G; Fontes, P; Silva, E. 1995. Incidencia de *Scrobipalpus absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em tomateiro sob diferentes sistemas de tutoramento e controle químico de pragas. *Hort. Bras.* 13:180-183.
- Richards, A; Christian, P. 1999. A rapid bioassays screen for quantifying nucleopolyhedrovirus (Baculoviridae) in the environment. *J. Virol. Methods* 82:63-75.
- Roditakis, E; Skarmoutso, U; Staurakaki, M. 2012. Toxicity of insecticides to populations of tomato borer *Tuta absoluta* (Meyrick) from Greece. *Pest Manag Sci.* 69:834-840.
- Rosenheim, JA; Hoy, MA. 1989. Confidence intervals for the Abbott's formula correction of bioassay data for control response. *Journal of Economic Entomology* 82:331-335.
- Sparks, W; Bartholomay, L; Bonning, B. 2008. Insect Immunity to viruses. *In: Beckage, NE. (ed). Insect Immunology.* Elsevier Academic Press. p. 209-242.
- Theilmann, DA; Blissard, GW; Bonning, B; Jehle, J; O'Reilly DR. 2005. Family: Baculoviridae. *In Fauquet C; Mayo MA; Maniloff, J; Desselberger, U; Ball, LA (eds). Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press. p 177-186.
- Trudeau D; Washburn, JO; Volkman, LE. 2001. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M. nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *J Virol* 75:996-1003.
- Wang, P; Granados R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30:135-143.
- Van Beek, N; Davis, DC. 2007. Baculovirus insecticide production in insect larvae. *Methods Mol. Biol.* 30:135-143.
- Williams, T. 2002. Diseño y aplicación de los bioinsecticidas basados en baculovirus. *Phytoma* 144:24-27.
- Zeddami, J; Vásquez, M; 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). *Plagas* 29:659-667.