

# Caracterización morfológica, biológica y genética de un aislamiento Colombiano de granulovirus de *Erinnyis ello* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae)

## Characterization of a Colombian isolate of *Erinnyis ello* granulovirus (L.) (Lepidoptera: Sphingidae)

Gloria Barrera\*, Juliana Gómez\*\*, Paola Cuartas\*\*, Guillermo León\*\*\*, Laura Villamizar\*\*\*\*

### Resumen

El gusano cachón *Erinnyis ello* (L.) es una plaga polífaga que puede causar graves pérdidas en cultivos de caucho. El uso de granulovirus representa una alternativa interesante para el control biológico de este insecto. Tres aislamientos colombianos del granulovirus de *E. ello* (EeGV) recuperados en larvas de campo, fueron caracterizados morfológica y molecularmente. Los cuerpos de inclusión de los tres aislamientos presentaron forma ovoide con una única nucleocápside, con tamaño promedio de  $302,9 \pm 22 \times 181,5 \pm 16$  nm. El análisis de los perfiles de restricción con diferentes endonucleasas no mostró diferencias entre los tres aislamientos, lo cual sugiere que son muestras de la misma cepa viral, denominada VG010, cuyo tamaño del genoma se estimó en 88,7 Kb. El análisis de las relaciones filogenéticas basado en las secuencias de *lef-8*, *lef-9* y *gran* mostró con alta consistencia la estrecha relación entre VG010 y un aislamiento de EeGV (M34-4) previamente descrito, lo cual sugiere que son variantes genotípicas de la misma especie viral. La eficacia del aislamiento VG010 en condiciones de laboratorio sobre larvas de segundo y cuarto estadio fue de 100 % y 64 % respectivamente, mientras que la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) fue  $4,3 \times 10^3$  CI/mL. La productividad viral, osciló entre  $2,1 \times 10^9$  y  $3,8 \times 10^9$  CI/gramo de larva. Estos resultados representan la base para el desarrollo de un nuevo bioinsecticida para el control de la plaga en campo.

**Palabras clave:** gusano cachón, baculovirus, control biológico, filogenia.

### Abstract

*Erinnyis ello* (L.) is a polyphagous lepidopteran pest that may cause serious annual losses in the rubber industry. The use of granulovirus represents an interesting alternative as a biological control agent for this insect. Three Colombian isolates of granulovirus for *E. ello* (EeGV) were obtained from field larvae and characterized at morphological, biological and molecular level. Occlusion bodies (OB) of the three isolates showed an oval morphology with a unique nucleocapsid, with a size of  $302.9 \pm 22 \times 181.5 \pm 16$  nm. Analysis of DNA endonuclease restriction profiles did not showed differences among the three viral isolates, which means that they correspond to samples of the same viral strain, denominated VG010. The VG010 viral genome size was estimated to be approximately 88.7 kb. The analysis of the phylogenetic relationships based on selected gene sequences *lef-8*, *lef-9* and *gran* showed a close relationship between VG010 and the previously described isolate EeGV (M34-4). These sequence similarities suggest that the three isolates are genotypic variants of the same viral species. The *in vitro* efficacy of the VG010 isolate against second and fourth instar larvae was 100 and 64%, respectively, while the mean lethal concentration (LC<sub>50</sub>) was  $4,3 \times 10^3$  OB/mL. The viral productivity ranged between  $2.1 \times 10^9$  and  $3.8 \times 10^9$  OB/g of larvae. These results represent the basis to develop a new biopesticide control agent for the pest in the field.

**Key words:** hornworm, baculovirus, biological control, biopesticide.

**Recibido:** enero 24 de 2014

**Aprobado:** octubre 26 de 2014

\* Ph.D. Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. gbarrera@corpoica.org.co. (Autor para correspondencia).

\*\* Microbiólogo. Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. jagomez@corpoica.org.co. pcuartas@corpoica.org.co.

\*\*\* Ph.D. (c). Corpoica. Km 17 Vía Puerto López, Meta. Colombia. gleon@corpoica.org.co

\*\*\*\* Ph.D. Corpoica. Km 14 vía Mosquera, Colombia. lvillamizar@corpoica.org.co.

## Introducción

*Erinnys ello* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Sphingidae) es una plaga polífaga con amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales de América desde el sureste de Brasil, Argentina y Paraguay hasta el sureste de Estados Unidos (Bellotti *et al.*, 1999). Esta especie posee un amplio rango de hospederos con descripciones en más de 35 plantas diferentes, los cuales incluyen cultivos con importancia económica como tomate, tabaco y algodón, siendo muy frecuentes los ataques a plantaciones de yuca y caucho (Winder, 1976).

En caucho, las larvas de *E. ello* también conocido como gusano cachón, se alimentan inicialmente de las hojas más jóvenes de las plantas y en casos severos de infestación pasan a hojas de mayor edad, causando defoliaciones totales con reducción en la producción de látex. El impacto económico negativo que puede causar la plaga en el cultivo de caucho en Colombia es de gran relevancia, teniendo en cuenta que se encuentra dentro de la apuesta exportadora del país y que sus áreas cultivadas se han incrementado vertiginosamente durante los últimos 10 años. Aproximadamente 40 enemigos naturales de *E. ello* han sido identificados incluyendo parasitoides de huevos y larvas, depredadores en huevos, larvas y pupas, además de hongos, bacterias y virus. Sin embargo, debido al comportamiento migratorio de los adultos, la abundancia de enemigos naturales no previene las explosiones periódicas de la plaga (Bellotti *et al.*, 1992).

Entre los organismos entomopatógenos que afectan este insecto, se encuentra el Granulovirus de *E. ello* (EeGV), el cual presenta alta especificidad y virulencia. El virus EeGV pertenece a la familia Baculoviridae, que incluye el género *Betabaculovirus*, (ICTV, 2012) correspondientes a granulovirus que infectan insectos del orden Lepidoptera. Su ADN es circular de doble cadena, cuyo tamaño se encuentra entre 99 y 178 Kb. Los granulovirus se caracterizan por formar cuerpos de inclusión (CI) proteicos con forma de gránulo y generalmente, un único virión ocluido, lo cual lo protege de las condiciones medioambientales, favoreciendo la transmisión horizontal del virus (Rohrmann, 2010).

La diversidad de los granulovirus ha sido ampliamente estudiada, principalmente en virus que infectan insectos plaga de cultivos agrícolas de importancia económica. Existen varios reportes acerca del análisis con endonucleasas de restricción (REN) de diversos granulovirus y en la actualidad 15 especies tienen secuenciado su genoma completo. El perfil REN es una metodología sencilla, ampliamente utilizada para diferenciar cepas o aislamientos geográficos de Baculovirus (Barrera *et al.*, 2011; Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999), los cuales a pesar de ser de la misma especie pueden variar su perfil REN por mutaciones puntuales o pequeñas inserciones o deleciones (Erlandson, 2009). Estas diferencias a nivel genómico

frecuentemente influyen en la patogenicidad y la virulencia de los diferentes aislamientos (Cory and Myers, 2003; Erlandson *et al.*, 2007).

Varios aislamientos de EeGV provenientes de cultivos de yuca se han utilizado para el control de *E. ello* en Brasil, Colombia y Venezuela, con eficacias superiores al 90% (Schmitt, 1988). El análisis molecular de un aislamiento colombiano de EeGV demostró diferencias con respecto a otros granulovirus aislados de diferentes especies de insectos (Finnerty *et al.*, 2000) y el análisis REN de diferentes aislamientos de EeGV en una región geográfica de Brasil demostró la presencia de genotipos distintos en diferentes períodos de tiempo (Costa *et al.*, 2005). El objetivo del presente estudio fue caracterizar tres aislamientos colombianos de EeGV, como base para el posible desarrollo de un bioinsecticida para el control del gusano cachón en Colombia.

## Materiales y métodos

### Cría de insectos de *E. ello*

La cría de larvas de *E. ello* se estableció en condiciones controladas en el Centro de Investigación La Libertad, de Corpoica (Villavicencio, Colombia), utilizando follaje de yuca como fuente de alimentación. En el interior de una casa de malla, se establecieron tres módulos de anejo de 2m x 3m x 2m, dentro de los cuales se sembraron plantas de yuca en diferentes épocas del año. Se colectaron huevos de *E. ello* en campo y se mantuvieron en cajas plásticas hasta su eclosión. Las larvas neonatas se ubicaron en recipientes plásticos dotados de la fuente alimenticia y se mantuvieron hasta que alcanzaron el segundo estadio bajo condiciones de laboratorio (28 °C y Humedad relativa 75 %). Para completar las fases siguientes de desarrollo del insecto, las larvas se ubicaron sobre las plantas de yuca mantenidas en casa de malla. Las pupas formadas se colectaron en cajas plásticas con aserrín, hasta la emergencia de los adultos, los cuales se confinaron en los módulos de anejo con plantas de yuca para cumplir en ellas sus etapas de cópula y oviposición.

### Propagación y purificación viral

Tres aislamientos virales se multiplicaron en larvas de tercer estadio (L3) de *E. ello*. Para tal fin, se inocularon 10 hojas de yuca mediante la aspersión de 10 mL de una suspensión viral ajustada a  $1 \times 10^7$  CI/mL. Cada hoja se introdujo en un frasco de vidrio y se infestó con 10 larvas sanas de *E. ello* provenientes de la colonia en laboratorio, los cuales se incubaron a 28 °C y Humedad relativa 75 %. Diariamente se recolectaron las larvas muertas en cada tratamiento, se codificaron y se procedió a la extracción de los CIs. Para la purificación de los CIs, las larvas muertas por granulovirus se homogenizaron con agua destilada en proporción

1:1 (1 mL de agua por cada gramo de larva) y la mezcla obtenida se filtró a través de una muselina para retirar restos de tejido del insecto. Los CIs se purificaron siguiendo la metodología descrita por Caballero et al. (1992) y se resuspendieron en agua ultrapura, para su posterior cuantificación por espectrofotometría con extrapolación del resultado en una curva de calibración previamente estandarizada.

### **Caracterización morfológica**

Para la caracterización morfológica, los tres aislamientos de EeGV fueron procesados para su observación bajo el microscopio electrónico de transmisión. Se fijaron 100 µL de suspensión viral con igual volumen de fijador (formaldehído 4 %, glutaraldehído 1 % en tampón fosfato pH 7,4). Las muestras se colocaron en rejillas de cobre recubiertas con resina Fomvar y se realizó una tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 2 % para su observación en un microscopio electrónico Philips CM10. El tamaño de los cuerpos de inclusión se determinó mediante el programa NIS-elements (Nikon).

### **Caracterización molecular**

Para la extracción de ADN viral se tomó una suspensión purificada de CIs ( $1 \times 10^8$  CIs/mL) a la cual se añadió 2,5 vol. de agua, 1 vol. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,5 M, pH 7,2) y 0,5 vol. de SDS (10 %) y se incubó durante 10 min. a 60°C. La muestra se centrifugó a 2500 g durante 5 min. y se recogió el sobrenadante que contenía los viriones. Se añadieron 50 µL de proteinasa K (10 mg/mL) y se incubó durante 30 min. a 50°C. La extracción del ADN se realizó mediante dos pases con fenol-cloroformo y la posterior precipitación con etanol. El ADN precipitado se resuspendió en 200 µL de tampón TE 0,1x (Tris-EDTA) y el ADN se cuantificó mediante espectrofotometría.

Para realizar los perfiles de restricción, se utilizaron 2 µg de ADN viral para la digestión con las enzimas *Pst*I, *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Bgl*II y *Kpn*I (Takara, Shiga, Japan) durante 4–12 horas a 37 °C. Las reacciones se mezclaron con tampón de carga (azul de bromofenol 0,25% p/v, sacarosa 40% p/v) y se cargaron en un gel de agarosa al 1% en tampón TAE (Tris-acetato 0,04 M y EDTA 0,001 M). La electroforesis se realizó a 20 Voltios durante 12 horas. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en luz UV (Chemidoc, BioRad, California, USA). Para el análisis de los tamaños de los fragmentos generados se utilizó el programa QuantityOne versión 4.2.1 de Biorad.

### **Amplificación y secuenciación genes *gran*, *lef-8* y *lef-9***

Se amplificaron fragmentos parciales de los genes *gran*, *lef-8* y *lef-9* utilizando parejas de cebadores degenerados. Para el gen *gran* se utilizaron los cebadores directo

Gran-F (5´-ATGGGATAYAAAYAAAWCDYT-3´) y reverso Gran-R (5´-TYARTANGCBGGDCCVGTAA-3´) (Barreira et al., 2009). Para *lef-8* se utilizaron los cebadores prL8-1 (5´- CAGGAAACAGCTATGACCCAYGGHGARTGAC -3´) y prL8-2 (5´-CAGGAAACAGCTATGACCAYRTASGGRTCYTCSGC-3´), para *lef-9* se utilizaron los cebadores prL9-1 (5´- CAGGAAACAGCTATGACCAARAAYGGITAYGCBG-3´) y prL9-2 (5´-TGTAACGACGCGCCAGTTTGTCDCCRTCRCARTC-3) (Jehle et al., 2006). El programa de amplificación por PCR consistió de un ciclo inicial de denaturación a 95°C por 4 min y 35 ciclos así: 95 °C por 30 seg, anillamiento a 52 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 90 seg. Se realizó un paso final de extensión a 72 °C por 10 min. Cada 25 µl de reacción de PCR contenían 50-100 ng de ADN genómico, dNTPs 200 µM, 0,5 µM de cada cebador,  $\text{MgCl}_2$  2,0 mM y tampón 10X (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl, pH 9,0, 0.1% Nonidet). La reacción se llevó a cabo con 2U de Taq polimerasa (Promega M1665). Se verificó cada producto de amplificación mediante gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-safe (Invitrogen). Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados directamente para las dos hebras.

### **Análisis filogenético**

Las secuencias parciales de nucleótidos de los tres genes secuenciados (*gran*, *lef-8* y *lef-9*) se alinearon independientemente con secuencias homólogas de 26 granulovirus depositadas en el Genbank, mediante el programa CLUSTAL W (Larkin et al., 2007). Los alineamientos de las secuencias se concatenaron y analizaron mediante el programa MEGA versión 4 (Tamura et al., 2011). Para el cálculo de la distancia genética se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica Kimura-2 parámetros (Tamura et al., 2011). Se construyó un fenograma de relaciones filogenéticas basado en las secuencias peptídicas concatenadas de los tres genes secuenciados.

### **Perfil de proteínas SDS-PAGE**

Se tomaron 7 µL de viriones de una suspensión de  $10^9$  CIs/mL y se mezclaron con 5 µL de tampón de carga (Tris-HCl 125 mM; SDS 2 %; pH 6,2; glicerol 10 %; azul de bromofenol 0,004 % y 2-mercaptoetanol 5 %). La mezcla se calentó hasta ebullición durante tres minutos. Posteriormente, las muestras se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (gradiente 10-12 %), corrido a 80 v durante 4 h. La tinción de las bandas de proteínas se realizó con azul brillante de Comassie 0,1 % (Laemmli, 1970).

### **Caracterización biológica**

Se determinó la patogenicidad en términos de concentración letal media del aislamiento VG010 mediante un bioensayo en laboratorio. A partir de virus purifi-

cado se prepararon suspensiones ajustadas a cinco concentraciones desde  $2 \times 10^4$  hasta  $2 \times 10^8$  CI/mL, empleando una curva de calibración estandarizada previamente (Datos no mostrados). Se tomaron 200  $\mu$ L de cada suspensión y se mezclaron con 200  $\mu$ L de una solución de sacarosa al 4% con un colorante azul de alimentos Tuska® (Azul No. 1 y Azul No. 2) al 1%. Con cada concentración se inocularon 24 larvas neonatas de *E. ello* colocadas previamente en una copa plástica de 2 onzas siguiendo el método de la gota descrito previamente por Hughes y Wood (1981). Para la inoculación de los insectos, se dispensaron gotas de 2  $\mu$ L dentro de cada copa y se esperó hasta que la larva bebió la suspensión de virus, lo que se evidenció por la coloración azul en el cuerpo de la larva como consecuencia de la ingestión del tratamiento (virus + solución colorante). Una vez se observó la coloración azul en el cuerpo de las larvas, se alimentaron con un fragmento de hoja de yuca previamente desinfectada (NaClO al 0,5%). Se contó con un testigo absoluto correspondiente a larvas neonatas alimentadas con dieta natural sin aplicar ningún tratamiento. Las larvas se mantuvieron bajo condiciones controladas de laboratorio (28 °C y 75 % HR). La mortalidad de las larvas se registró a los siete días después del montaje del bioensayo. Las larvas muertas se recolectaron y almacenaron a -20 °C. El diseño experimental fue completamente al azar y con cuatro repeticiones por tratamiento, cada una compuesta por 6 larvas. Los resultados de mortalidad fueron sometidos a un análisis Probit (Finney, 1952) mediante el programa BioStat (2007) para la determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y noventa (CL<sub>90</sub>).

Se determinó la productividad del aislamiento VG010, como el promedio de CIs producidos por gramo de peso larval. Para tal fin, se tomaron hojas de yuca y se asperjaron con una suspensión viral ajustada a  $7,2 \times 10^7$  CIs/mL, utilizando un volumen de 1 mL por hoja. Las hojas inoculadas fueron dispuestas en recipientes plásticos de 4 L y se infestaron con 30 larvas de *E. ello* de tercer estadio provenientes de la cría. Los recipientes se incubaron bajo condiciones controladas de humedad (75 %) y temperatura (28 °C). Cada larva muerta por infección viral fue pesada individualmente, macerada y diluida en un volumen de agua estéril conocido. Las suspensiones virales se pasaron por una capa de muselina para retirar los restos de tejido larval. A partir del filtrado obtenido se realizaron diluciones para su cuantificación a 280 nm, con un espectrofotómetro Nanodrop®. La concentración viral se estimó por extrapolación de las mediciones en una curva de calibración previamente estandarizada.

Se determinó la eficacia de VG010 bajo condiciones de laboratorio, en larvas de segundo (L2) y cuarto estadio (L4). Cinco hojas de yuca, previamente asperjadas con una suspensión de VG010 ( $7,2 \times 10^7$  CIs/mL) se colocaron en un recipiente de vidrio y se infestaron con 10 larvas, lo cual se tomó como unidad experi-

mental. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Se contó con un tratamiento control consistente en larvas alimentadas con hojas sin inocular. La evaluación de mortalidad se realizó 3 y 5 días después de la inoculación. La mortalidad en los tratamientos fue corregida con respecto al testigo mediante el cálculo del porcentaje de eficacia utilizando la fórmula de Schneider-Orelli (Schneider-Orelli, 1947).

$$\text{Eficacia} = ((A-B)/(100-B)) \times 100$$

donde, A es la mortalidad larval obtenida en el tratamiento y B es la mortalidad obtenida en el control negativo.

La eficacia en campo se determinó en una plantación comercial de caucho (MAVALLE S.A), en un área de 16,4 ha y con presencia de larvas de *E. ello* entre primer y tercer estadio. Se asperjaron  $2,9 \times 10^7$  CIs/ha del aislamiento viral VG010, suspendidos en 250 L de agua, mediante una pulverizadora Jacto AJ-401LH. El diseño fue completamente al azar y cada unidad experimental consistió en 4 surcos, cada uno con 50 árboles, de los cuales se escogieron 20 árboles al azar con presencia de larvas para hacer los muestreos. De los 20 árboles por repetición, 18 se evaluaron en el tercio medio del árbol y 2 en el tercio superior, contabilizando la población natural de larvas vivas antes de la aplicación. Posteriormente se contabilizó el número de larvas vivas y el número de larvas muertas con sintomatología viral, 1, 3 y 5 días después de la aplicación. El tratamiento control se realizó sobre un área de 2 ha, en la cual no se aplicó virus. Los resultados fueron transformados mediante la fórmula Henderson y Tilton (1955) para el cálculo de la eficacia.

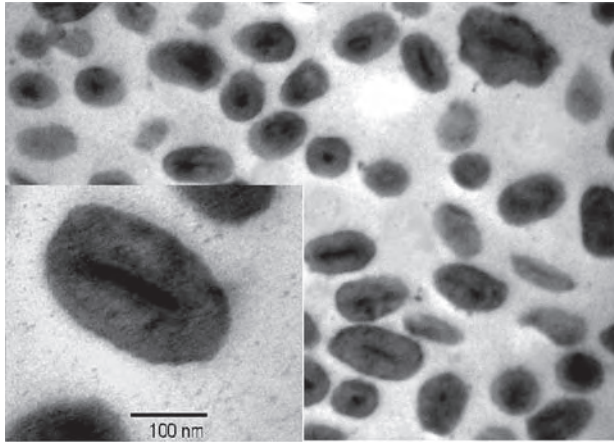
## Resultados y discusión

### Caracterización morfológica

Los cuerpos de inclusión presentaron forma típica de gránulo con un único virión interno. El tamaño de los gránulos fue de  $302,9 \pm 22 \times 181,5 \pm 16$  nm sin presentarse diferencias significativas entre los tres aislamientos de EeGV analizados ( $P > 0,05$ ). La morfología y el tamaño coincide con lo observado por Finnerty y colaboradores (2000) en un aislamiento colombiano recuperado en plantas de yuca (figura 1)

### Caracterización molecular

Los perfiles de restricción de los tres aislamientos de granulovirus de *E. ello* fueron similares, sin diferencias evidentes en el tamaño y número de bandas generados, por lo cual se consideraron pertenecientes a la misma cepa viral, la cual se denominó VG010. Los perfiles de restricción con diferentes enzimas mostraron entre 6 y 16 fragmentos de diferente tamaño, los cuales se designaron alfabéticamente asignando la letra A a los de mayor tamaño para cada endonucleasa (figura

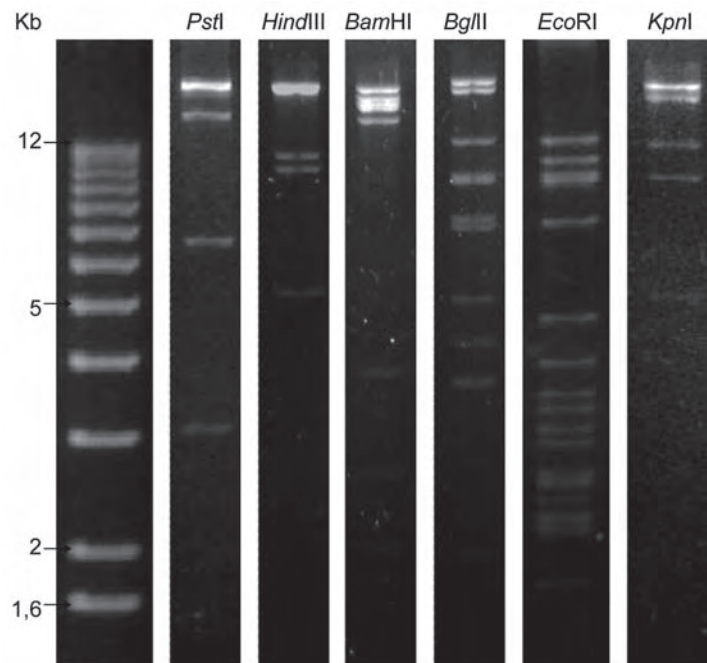


**Figura 1.** Micrografía electrónica de gránulos de un aislamiento colombiano de EeGV. La micrografía interna muestra en mayor aumento un gránulo con único virión interno y barra de 100 nm de longitud.

2; tabla 1). Los fragmentos con migración similar se detectaron por la intensidad de la banda generada y se encontraron en los perfiles generados con *Pst*I (A-B y C-D), *Hind*III (A-B), *Bgl*II (A-B y E-F) y *Eco*RI (C-D). De acuerdo con lo anterior se calculó el tamaño del genoma total de aproximadamente 88,7 Kb, el cual es pequeño, comparado con los tamaños de los betabaculovirus secuenciados a la fecha y similar al estimado por perfiles REN para otro aislamiento de granulovirus de *E. ello* proveniente de Colombia (Finnerty *et al.*,

2000). Las diferencias entre el aislamiento VG010 y el aislamiento previamente publicado se presentaron en el número y tamaño de bandas generadas con las enzimas *Kpn*I, *Eco*RI y *Hind*III, lo que sugiere que se trata de variantes genotípicas de la misma especie viral. Trabajos previos con perfiles de restricción en baculovirus han servido para determinar la diversidad genética entre aislamientos de la misma especie que provienen de diferentes regiones geográficas e inclusive para determinar la variedad genotípica en aislamientos de un solo individuo hospedero (Barrera *et al.*, 2011; Rowley *et al.*, 2010). La diversidad genética observada entre los aislamientos de EeGV puede ser resultado de procesos de recombinación en eventos de infección múltiple o podría ser resultado de la deriva genética por mutaciones durante el ciclo infeccioso y puede ser la fuente para la selección natural, debido a que los cambios en el genoma producen cambios en patogenicidad y virulencia (Erlandson, 2009).

Para analizar las relaciones filogenéticas del aislamiento VG010 se secuenciaron regiones de tres genes altamente conservados en baculovirus, *gran*, *lef-8* y *lef-9* (Jehle *et al.*, 2006). El tamaño de la secuencia obtenida para el gen *gran* fue de 735pb, representando el 100% del gen, mientras que los fragmentos secuenciados de *lef-8* y *lef-9* fueron de 785 y 311 pb respectivamente, similares al tamaño de los fragmentos obtenidos con los mismos cebadores en otros granulovirus (Jehle *et al.*, 2006).



**Figura 2.** Perfiles de restricción de un aislamiento Colombiano de EeGV (VG010) con las endonucleasas *Pst*I, *Hind*III, *Bam*HI, *Bgl*II, *Eco*RI y *Kpn*I como se indica en la parte superior de cada carril. En el primer carril se indica el marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen).

**Tabla 1.** Tamaños estimados de los fragmentos de restricción generados por la digestión del ADN genómico de un aislamiento Colombiano de EeGV (VG010) con las endonucleasas *Pst*I, *Hind*III, *Bgl*II, *Eco*RI.

Fragmento	Fragmentos de restricción			
	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Bgl</i> II	<i>Eco</i> RI
A	17.900	22.064	15.921	14.750
B	17.369	22.000	14.280	11.740
C	17.200	20.226	8.814	10.070
D	17.000	9.345	7.081	10.000
E	11.120	9.514	7.000	7.548
F	5.490	4.614	7.000	4.781
G	2.594		5.768	4.000
H			5.700	3.583
I			5.572	3.363
J			4.126	3.129
K			3.553	2.974
L			3.077	2.650
M				2.529
N				2.423
O				2.244
P				2.200
Total	88.673	87.763	87.892	87.984

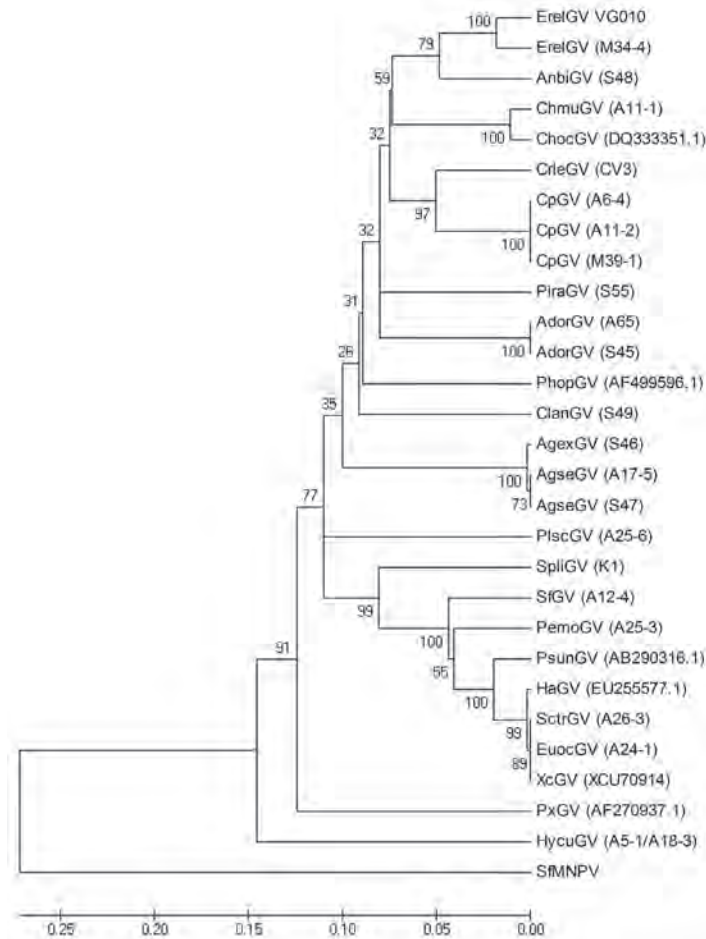
Las principales diferencias entre los aislamientos de granulovirus de *E. ello* M34-4 (Jehle *et al.*, 2006) y VG010 se encontraron en la secuencia del gen *lef-8*, donde se observaron 11 sustituciones no sinónimas. El gen *gran* presentó un alto grado de conservación

entre los dos aislamientos, con sólo tres sustituciones sinónimas presentes. Debido a su alto grado de conservación y por ser la proteína mayoritaria dentro del género betabaculovirus, la granulina ha sido de gran utilidad para el desarrollo de sistemas de detección por técnicas moleculares (Barrera *et al.*, 2011) e inmunoenzimáticas (Parola *et al.*, 2003). Adicionalmente, los genes *lef-8*, *lef-9* y *gran* son de gran utilidad para la inferencia filogenética basada en las distancias genéticas (Jehle *et al.*, 2006). Existe un límite establecido de 0,015 como la mayor distancia existente entre dos aislamientos para ser considerados de la misma especie. En contraste, distancias superiores a 0,050 se consideran de diferente especie (Jehle *et al.*, 2006). En el presente trabajo, las distancias genéticas entre los aislamientos VG010 y M34-4 fueron bajas (0,014), por lo cual se puede sugerir que son variantes genotípicas de la misma especie. De forma similar, se observó que aislamientos pertenecientes a la misma especie de hospedero como los granulovirus de *Agrotis segetum*, *Adoxophyes orana* y *Cydia pomonella* presentaron distancias bajas (<0,01) (tabla 2).

Las diferencias genéticas entre aislamientos de baculovirus se relaciona con el tipo de planta de la cual se alimenta el insecto hospedero (Hodgson *et al.*, 2002). La distancia genética entre VG010 y M34-4 indica que existen diferencias genéticas para ser considerados cepas diferentes, lo cual podría relacionarse con el tipo de cultivo de sus hospederos originarios. El aislamiento VG010 fue obtenido de larvas colectadas en un cultivo de caucho, mientras que el aislamiento M34-4 proviene de larvas colectadas en un cultivo de yuca. El cladograma de relaciones filogenéticas basado en las secuencias concatenadas de las proteínas granulina, *lef-8* y *lef-9* mostró una topología compatible con la descrita para baculovirus por otros autores con estos tres genes (Jehle *et al.*, 2006) y con 31 genes núcleo (Miele *et al.*, 2011) (figura 3). El granulovirus de *E. ello* VG010 se agrupó en un clado junto con el aislamiento

**Tabla 2.** Matriz de distancia de las secuencias de nucleótidos de los genes concatenados *gran*, *lef-8* y *lef-9* calculados en MEGA (Modelo Kimura-2 parámetros). Valores en gris son considerados aislamientos de la misma especie.

Aislamientos	1	2	3	4	5	6	7	8
1 ErelGV_VG010	0	0,014	0,355	0,355	0,355	0,311	0,311	0,311
2 ErelGV_(M34-4)	0,014	0	0,344	0,344	0,344	0,294	0,294	0,294
3 AgexGV_(S46)	0,355	0,344	0	<0,01	<0,01	0,359	0,359	0,359
4 AgseGV_(A17-5)	0,355	0,344	<0,01	0	<0,01	0,359	0,359	0,359
5 AgseGV_(S47)	0,355	0,344	<0,01	<0,01	0	0,359	0,359	0,359
6 CpGV_(A11-2)	0,311	0,294	0,359	0,359	0,359	0	0,001	0,001
7 CpGV_(M39-1)	0,311	0,294	0,359	0,359	0,359	0,001	0	<0,01
8 CpGV_(A6-4)	0,311	0,294	0,359	0,359	0,359	0,001	<0,01	0

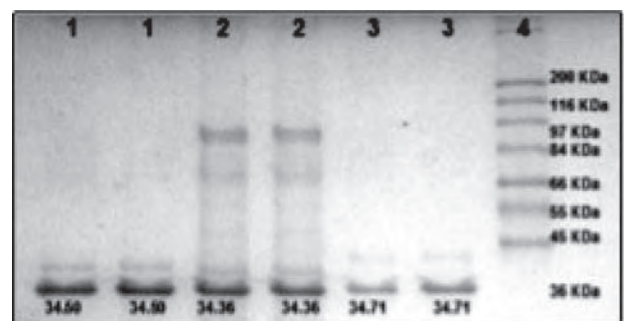


**Figura 3.** Cladograma de relaciones filogenéticas (UPGMA) basado en secuencias proteicas concatenadas de granulina, lef-8 y lef-9. El número encima de cada nodo indica el valor de bootstrap (1000 réplicas).

M34-4 con un alto valor de soporte (100%). A su vez, los granulovirus de *E. ello* (Sphingidae) se agruparon con granulovirus de *Andraca bipunctata* (Bombycidae) con alto valor de soporte (79%).

El perfil de proteínas del granulovirus de *E. ello* VG010 evidenció una banda intensa con peso molecular de 34,50 kDa similar a la observada en el perfil proteico de un aislamiento del granulovirus de *P. operculella* (figura 4). El tamaño y la intensidad de la banda generada coincide con la proteína granulina, mayoritaria en el género betabaculovirus, la cual oscila entre 29 a 38 kDa (Caballero *et al.*, 2001). El perfil proteico de un aislamiento colombiano del granulovirus *E. ello* previamente descrito, presentó 10 bandas de diferente tamaño, una de ellas en mayor cantidad correspondió a la granulina, con un tamaño similar al encontrado en VG010 (Finnerty *et al.*, 2000). Esta proteína altamente conservada ha sido descrita en perfiles proteicos de diferentes granulovirus (Sciocco-Cap *et al.*, 2001). Adicionalmente, en VG010 se observaron proteínas de mayor tamaño y menor concentración, similares a las

descritas por Finnerty *et al.*, (2000) para un aislamiento de EeGV, una de ellas con tamaño (37 kDa) compatible con una proteína de cápside viral.



**Figura 4.** Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida. Carriles 1 corresponden al granulovirus de *Erinnys ello* VG010, carriles 2 corresponden al granulovirus de *Erinnys ello* VG011, carriles 3 corresponden al granulovirus de *Phthorimaea operculella* VG003 y carril 4 presenta el marcador de peso molecular.

## Caracterización biológica

### Patogenicidad

Los valores de *P* obtenidos del análisis Probit fueron superiores a 0,05 (tabla 3), lo cual sugiere que existe una correlación lineal entre la dosis viral y la mortalidad de las larvas. Adicionalmente, los bajos valores de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) indican homogeneidad entre los datos, es decir que la distribución experimental se ajustó a la teórica (Zar, 1999) (tabla 3).

Bajo las condiciones experimentales evaluadas en este estudio, la mortalidad de las larvas se afectó por la concentración viral utilizada, siendo la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de  $4,3 \times 10^3$  CI/mL y la concentración letal noventa (CL<sub>90</sub>) de  $5,5 \times 10^4$  CI/mL (tabla 3). En todos los tratamientos inoculados con el virus se observaron larvas con síntomas típicos de infección por granulovirus como cambio en la coloración, pérdida de movimiento y de alimentación, pérdida de turgencia en el cuerpo de la larva y ruptura de la epidermis, al igual que lo reportado por otros autores para este virus (León *et al.*, 2010).

Aunque en la literatura no se han reportado valores de concentraciones letales de aislamientos de granulovirus de *E. ello*, si se encuentran datos de otros aislamientos de granulovirus sobre larvas de otros lepidópteros. Sciocco-Cap *et al.*, (2001) utilizando una técnica de bioensayo similar a la de este trabajo, encontraron valores de CL<sub>50</sub> entre  $4$  y  $5,6 \times 10^3$  CI/mL empleando un aislamiento de granulovirus de *Epinothia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) sobre larvas de este insecto; estos valores de CL<sub>50</sub> fueron similares a lo encontrado en este trabajo. Por el contrario, para la mayoría de aislamientos de granulovirus como los de *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) y *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae) se han encontrado rangos más altos con valores de CL<sub>50</sub> de  $6,9 \times 10^5$  CI/mL,  $3,6 \times 10^6$  CI/mL y  $3,4 \times 10^6$  CI/mL, respectivamente (Espinel-Correal *et al.*, 2009; Hatem *et al.*, 2011).

Las variaciones de CL<sub>50</sub> entre aislamientos de granulovirus de diferentes especies de insectos plaga se puede deber principalmente al hospedero y por ende a la adaptación del virus al mismo; adicionalmente dentro del género betabaculoviridae donde se encuentran los granulovirus de lepidópteros (Jehle *et al.*, 2006), se

agrupan tres tipos de virus diferentes según el tipo de infección que ocasionen y los tejidos susceptibles del insecto a la infección; estas variaciones en el proceso de infección repercuten directamente en la patogenicidad y en la virulencia del aislamiento viral (Caballero *et al.*, 2001; Rohrmann, 2010; Wang *et al.*, 2008).

Las cepas de alta patogenicidad como VG010 poseen ventajas como agentes de control y serían muy adecuadas para el control de plagas en cultivos de ciclo anual. Sin embargo, la patogenicidad no puede ser considerada de forma aislada, pero sí relacionada con otros aspectos del ciclo de vida del patógeno, como su tasa de transmisión y su capacidad de persistir en el ambiente (Caballero *et al.*, 2001).

### Productividad

Se determinó la cantidad promedio de cuerpos de inclusión producidos por gramo de tejido larval con el aislamiento de granulovirus VG010, la cual osciló entre  $2,1 \times 10^9$  y  $3,8 \times 10^9$  CIs/g. El resultado obtenido en el presente trabajo coincide con lo descrito por Hodgson y colaboradores (2001), quienes concluyeron que para la mayoría de larvas de lepidópteros infectadas por un virus de la familia Baculoviridae, el rendimiento promedio es de  $10^9$  CIs/g de larvas, presentándose la invasión de una gran variedad de tejidos del hospedero durante el ciclo de infección. Teniendo en cuenta que una larva de último estadio de *E. ello* puede pesar aproximadamente 7 g, una sola larva podría producir más de  $10^{10}$  CIs, valor significativamente alto si se compara con los valores descritos para los granulovirus de otras especies de polillas como *P. operculella* para la cual la producción fue de  $2,35 \times 10^9$  CIs/larva (Zeddarn *et al.*, 2003) y *Tecia solanivora* para la cual la productividad se ha estimado en  $1 \times 10^9$  CIs/larva (Gómez *et al.*, 2009). Esta alta productividad representa una ventaja desde el punto de vista tecnológico para el desarrollo de un bioplaguicida (Vásquez *et al.*, 2002), ya que una de las principales limitantes de estos bioplaguicidas es la producción del virus a gran escala y a un costo aceptable, teniendo en cuenta que la producción se hace *in vivo* sobre el hospedero susceptible (Caballero *et al.*, 2009), actividad altamente demandante de mano de obra que incrementa los costos del ingrediente activo. Por otra parte, la alta productividad viral mejora el potencial económico de un bioplaguicida, ya que reduce el número de insectos necesarios para producir una dosis de aplicación

**Tabla 3.** Concentración letal media CL<sub>50</sub> CI/mL y noventa CL<sub>90</sub> CI/mL del aislamiento de granulovirus de *E. ello* VG010.

Aislamiento	CL50 (CI/mL)	Límites de confianza de la CL50 95% (CI/mL)		CL90 (CI/mL)	P	Heterogeneidad	
		Inferior	Superior			$\chi^2$	gl
VG010	$4,3 \times 10^3$	$7,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4$	0,99	0,0485	3



en campo (Grzywacz *et al.*, 2001) y esto disminuye también el precio del producto por unidad comercial.

El rendimiento de un virus se ve afectado por muchos factores involucrados en el ciclo de infección sobre el insecto hospedero como el tiempo letal y la virulencia (Kamiya *et al.*, 2004). Por ejemplo, Cherry y colaboradores (2002) evaluaron entre otros factores, el rendimiento de un granulovirus en larvas de la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), encontrando que a pesar de la alta patogenicidad del aislamiento de granulovirus empleado, la cual fue reflejada en la dosis letal media, los rendimientos fueron bajos posiblemente debido a la reducción de los tiempos de mortalidad. Al igual que el tiempo letal, la dosis proporcionada a las larvas y el aumento del peso y el tamaño inicial, son factores que pueden afectar el rendimiento del virus, obteniéndose menores rendimientos cuando el insecto se infecta consumiendo altas concentraciones virales debido a que su muerte ocurre más rápidamente (Boucias *et al.*, 1980; Hodgson *et al.*, 2001).

Otros factores importantes en la productividad viral están relacionados con el sistema de propagación, en el cual se debe tener en cuenta la dosis de inoculación, la edad de las larvas, el tiempo de recolección y la temperatura de incubación de las larvas, entre otros (Caballero *et al.*, 2001; 2008). En un estudio realizado por Grzywacz y colaboradores (1998), en el cual se optimizó el sistema de producción del nucleopoliedrovirus de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), determinaron que uno de los factores más importantes para la productividad viral es el momento de la recolección de las larvas, el cual se encuentra relacionado con la cantidad máxima de producción de partículas virales y con la presencia de altos niveles de contaminación bacteriana cuando esta actividad se realiza después de la muerte del insecto.

Con respecto a la temperatura, éste es un factor que influencia tanto el crecimiento de las larvas como la replicación del virus y su capacidad infectiva (Sajap *et al.*, 2007), por tal razón este factor se debe controlar para aumentar la productividad, siendo recomendada una temperatura de incubación entre 25 °C y 28 °C después de la inoculación con el virus (Subramanian *et al.*, 2006).

En el caso del granulovirus de *E. ello*, a pesar del gran tamaño de las larvas que permiten obtener grandes cantidades de virus, es necesario estandarizar las condiciones tanto de cría masiva del insecto como de producción viral con el fin de aumentar la productividad y disminuir los costos, factores claves en la viabilidad económica de un producto comercial.

### **Evaluación de eficacia en laboratorio**

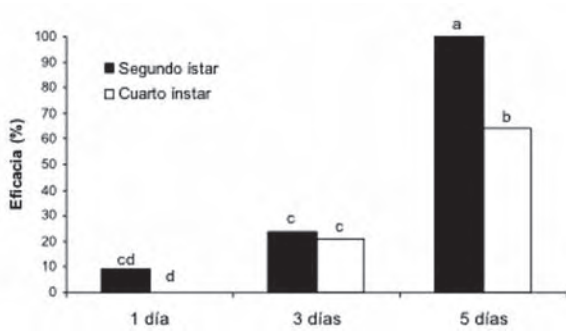
Los resultados de eficacia (mortalidad corregida) en condiciones de laboratorio se muestran en la figura 5,

donde se puede observar que se presentó una mayor mortalidad de larvas cuando éstas fueron inoculadas en segundo estadio (L2) en comparación con la mortalidad obtenida con larvas de mayor edad (L4) (figura 5). La mortalidad de individuos a los tres días después de la infección fue del 23% para larvas L2 y del 20 % para larvas L4. Cinco días después de la inoculación estos valores aumentaron alcanzando el 100 % para larvas L2 y el 64 % para larvas L4.

La mayor susceptibilidad de larvas más jóvenes a la infección viral ha sido descrita por otros autores como Schmitt (1988), quien recomendó la infección de larvas en segundo y tercer estadio para asegurar la infección eficiente de las mismas. Las diferencias en susceptibilidad a los baculovirus dependiendo de la edad de las larvas también han sido evidenciadas en varios trabajos (Hochberg, 1991; Sporleder *et al.*, 2007; Teakle *et al.*, 1986) y para otros patógenos de este insecto como la bacteria *Bacillus thuringiensis* (CIAT, 1989).

En trabajos realizados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en los años 80s se obtuvieron resultados similares a los del presente estudio en laboratorio, alcanzándose un 100% de mortalidad de larvas de los primeros estadios, tres días después de la inoculación del sustrato de alimentación consistente en hojas de yuca (CIAT, 1989). La mortalidad de las larvas aumentó progresivamente a medida que pasó el tiempo después de la inoculación. Se obtuvo una eficacia significativamente superior a los cinco días después de la inoculación con respecto a las mediciones anteriores, tanto para larvas en segundo como en cuarto estadio ( $F=94,2$ ;  $P=0,0001$ ;  $gl=17$ ). La rápida mortalidad de las larvas infectadas con este virus, que alcanza el 100% a los cinco días de la inoculación de larvas L2, demuestra una alta virulencia, en comparación con granulovirus de otras especies que requieren un mayor tiempo para evidenciar su letalidad. Por ejemplo, un aislamiento del granulovirus de *Adoxophyes orana* (Lepidoptera: Tortricidae) mostró un tiempo letal medio de 37 días en larvas de primer estadio según lo determinaron Hilton y Winstanley (2008). Para el granulovirus de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) también se han establecido tiempos letales medios prolongados que oscilan entre 15 y 27 días dependiendo de la edad de larvas al ser inoculadas (Hatem *et al.*, 2011). En el caso del granulovirus de *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidea) se estimaron tiempos letales medios entre 15 y 21 días dependiendo de la calidad de la dieta de alimentación (McVean *et al.*, 2002).

Las cepas muy virulentas naturalmente poseen ventajas como agentes de control y serían muy adecuadas para el control de plagas en cultivos de ciclo anual. Sin embargo, la virulencia no puede ser considerada de forma aislada, pero sí relacionada con otros aspectos del ciclo de vida del patógeno, como su tasa de



**Figura 5.** Eficacia en laboratorio del aislamiento VG010 de EeGV sobre larvas del gusano cachón, diferentes días después de la inoculación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según DMS (95%).



**Figura 6.** Larva de *Erinnyis ello* (L.) mostrando los síntomas típicos de muerte por causa del EeGV

transmisión y su capacidad de persistir en el ambiente (Caballero *et al.*, 2002).

### Evaluación de eficacia en campo

En las evaluaciones realizadas en cultivos de caucho después de aplicar el aislamiento de granulovirus VG010 se encontraron larvas con sintomatología típica de la infección (Figura 6), la cual se caracteriza por la presencia de larvas muertas colgando de las ramas por sus pseudopatas anales y evidenciando un tegumento frágil con licuefacción de los tejidos internos (Mukhopadhyay and Dev, 2009).

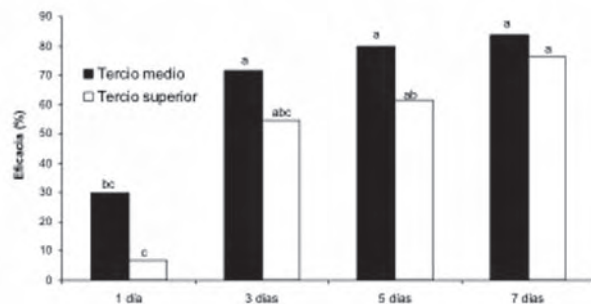
Cuando el aislamiento viral fue aplicado en un cultivo de caucho se observó mortalidad de las larvas a partir de las 24 horas post inoculación con valores de eficacia entre el 7 % y el 30 % para el tercio superior y medio respectivamente (figura 7). Pasados tres días se detectó un incremento significativo de la eficacia ( $F=8,23$ ;  $P=0,0001$ ;  $gl=31$ ), con valores del 54 % y 71 % para los tercios superior y medio respectivamente. La población de larvas en el tercio medio de los árboles fue mayor (18 a 66 larvas/árbol) a la encontrada en el tercio superior de estos (entre 6 y 17 larvas/árbol), lo cual sugiere que las larvas prefieren alimentarse de hojas del tercio medio de los árboles. A medida que transcurrió el tiempo, la mortalidad de los individuos aumentó progresivamente sin presentar diferencias estadísticas entre los valores de eficacia obtenidos en las dos alturas de los árboles a los tres, cinco y siete días después de la aspersión del virus.

Después de siete días de haber realizado la aspersión del tratamiento, la eficacia osciló entre el 76 % y el 83 % para los tercios medio y superior respectivamente, sin detectarse diferencias significativas entre las dos alturas, lo que podría sugerir que la aspersión del virus fue homogénea a lo largo de los árboles. La homogeneidad en la aplicación en campo es de gran importancia para estos organismos debido a su actividad

mediante infección oral, que requiere una alta cobertura para aumentar la posibilidad de infección de los individuos susceptibles (Caballero *et al.*, 2002).

La alta eficacia de este virus sobre larvas del gusano cachón también ha sido demostrada en campo en cultivos de yuca, en los cuales se han alcanzado mortalidades del 100 %, cinco días después de la aplicación con bomba de espalda (CIAT, 1989).

El uso de este baculovirus se generalizó en países como Brasil, donde tuvo un gran auge en la década de los 80s y luego decayó, aunque aún se pueden conseguir algunos productos a nivel semicomercial para el control del gusano cachón en cultivos de yuca principalmente (Souza, 2001).



**Figura 7.** Eficacia en campo del baculovirus de *E. ello* aislamiento VG010 sobre larvas del gusano cachón, a diferentes días después de la inoculación. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según Tukey (95 %).

## Conclusiones

El análisis de la morfología de los cuerpos de inclusión de los aislamientos analizados demostró que pertenecen al género betabaculovirus por sus características típicas de gránulo y virión único. Los perfiles de restricción de los tres aislamientos colombianos de *E. ello* analizados en el presente trabajo, no presentaron diferencias entre ellos, por lo cual se consideraron como una misma especie viral. Los perfiles de restricción y el análisis de la secuencia de genes altamente conservados de VG010 demostró diferencias genéticas comparadas con aislamientos de Granulovirus de *E. ello* previamente reportados, lo cual sugiere que se trata de un aislamiento nuevo. La caracterización biológica del aislamiento VG010 demostró su efectividad para el control de la plaga en condiciones de laboratorio y campo, especialmente en los primeros estadios larvales. Estos resultados representan la base para el desarrollo de un bioinsecticida para el control de *E. ello* en caucho.

## Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo financiero del presente trabajo.

## Referencias bibliográficas

- Barrera, G.; Cuartas, P.; Villamizar, L. 2009. Comparative analysis of a granulin fragment of Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. Proceedings of the IOBC/WPRS Working Group "Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes", Pamplona, Spain, 22-25 June 2009. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants (OIBN/OILB). pp. 129-132.
- Barrera, G.; Simón, O.; Villamizar, L.; Williams, T.; Caballero, P. 2011. *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: Genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. *Biol Control*. 58: 113-120.
- Bellotti, A.; Arias, B.; Guzmán, O. 1992. Biological control of the cassava hornworm *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae). *Flo Entomol*. 506-515.
- Bellotti, A.C.; Smith, L.; Lapointe, S.L. 1999. Recent advances in cassava pest management. *Ann Rev Entomol*. 44: 343-370.
- Berretta, M.F.; Rios, M.L.; Sciocco de Cap, A. 1998. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. *J Invert Pathol*. 71: 280-282.
- Boucias, D.; Johnson, D.; Allen, G. 1980. Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* larvae. *Environ Entomol*. 9: 59-61.
- Caballero, P.; Zuidema, D.; Santiago-Alvarez, C.; Vlak, J.M. 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. *Biocontrol Sci Tech*. 2: 145-157.
- Caballero, P.; Williams, T.I.; López-Ferber, M. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma-España.
- Caballero, P.; Williams, T. 2008. Virus entomopatógenos, 121-135. En: Jacas, J. y Urbaneja, A., (eds.). Control biológico de plagas agrícolas Unidad Asociada de Entomología UJI-HVIA-CIB. Editorial M.V. Phytoma, España.
- Caballero, P.; Murillo, R.; Muñoz, D.; Williams, T. 2009. El nucleopolyhedrovirus de *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) como bioplaguicida: análisis de avances recientes en España. *Rev Col Entomol*. 35: 105-115.
- Cherry, A.; Osae, M.; Djegui, D. 2002. Relative potency, yield and transmission of a Kenyan isolate of *Plutella xylostella* granulovirus in a population of diamondback moth from Benin, West Africa. Memorias del primer simposio internacional de mejoramiento del control biológico de *Plutella xylostella*. Cirad (Centre de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) Montpellier, Francia. En: <http://dbm2002.cirad.fr/papers/cherry.doc> (Consulta: marzo de 2009).
- CIAT. 1989. Manejo integrado de *Erinnyis ello* (L.) (gusano cachon de la yuca): guía de estudio. Serie: 04SC-04.01. 04.
- Cory, J.S.; Myers, J.H. 2003. The ecology and evolution of insect baculoviruses. *Ann Rev Ecol Syst*. 34: 239-272.
- Costa, N.; Castro, M.; Sihler, W.; Pegoraro, R.; Souza, M. 2005. Análise da estabilidade genética do *Erinnyis ello* granulovirus aplicado em Santa Catarina como bioinseticida no período de 1986 a 2000. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. p. 110.
- Erlandson, M.; Newhouse, S.; Moore, K.; Janmaat, A.; Myers, J.; Theilmann, D. 2007. Characterization of baculovirus isolates from *Trichoplusia* in populations from vegetable greenhouses. *Biol Control*. 41: 256-263.
- Erlandson, M.A. 2009. Genetic variation in field populations of baculoviruses: Mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. *Virol Sinica*. 24: 458-469.
- Escribano, A.; Williams, T.; Goulson, D.; Cave, R.D.; Chapman, J.W.; Caballero, P. 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. *J Econ Entomol*. 92: 1079-1085.
- Espinell-Correal, C.; Gómez, J.; Villamizar, L.; Cotes, A.; Léry, X.; López-Ferber, M. 2009. Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *IOBC/wprs Bulletin*. 45: 145-48.
- Finnerty, C.M.; Li, G.; Granados, R.R. 2000. Characterization of a Granulovirus from the Cassava Hornworm (*Erinnyis ello*: Sphingidae). *J Invertebr Pathol*. 75: 273-278.
- Finney, D. 1952. Probit analysis. London: Cambridge University Press.
- Gómez, J.; Villamizar, L.; Espinell, C.; Cotes, A.M. 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: 152-158.
- Grzywacz, D.; Jones, K.; Moawad, G.; Cherry, A.; 1998. The *in vivo* production of *Spodoptera littoralis* nuclear polyhedrosis virus. *J Virol Methods*. 71: 115-122.
- Grzywacz, D.; Parnell, M.; Kibata, G.; Oduor, G.; Ogutu, W.; Miano, D.; Winstanley, D. 2001. The development of endemic baculoviruses of *Plutella xylostella* (diamondback moth, DBM) for control of DBM in East Africa. The Management of Diamondback Moth and other Cruciferous Pests (Proceedings of the Fourth International Workshop on Diamondback Moth, Melbourne University), pp. 179-183.
- Hatem, A.E.-S.; Aldebis, H.K.; Vargas Osuna, E. 2011. Effects of the *Spodoptera littoralis* granulovirus on the development and reproduction of cotton leafworm *S. littoralis*. *Biol Control*. 59: 192-199.
- Henderson, C.; Tilton, E. 1955. Tests with acaricides against the white flour mite. *J Econ Entomol*. 48: 157-161.
- Hilton, S.; Winstanley, D. 2008. Biological characterization of an English granulovirus from the summer fruit tortrix moth, *Adoxophyes orana*. *J Invertebr Pathol*. 97: 298-305.
- Hochberg, M.E.; 1991. Intra-host interactions between a braconid endoparasitoid, *Apanteles glomeratus*, and a baculovirus for larvae of *Pieris brassicae*. *J An Ecol*. 51-63.
- Hodgson, D.J.; Vanbergen, A.J.; Watt, A.D.; Hails, R.S.; Cory, J.S. 2001. Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a Lepidopteran baculovirus. *Evol Ecol Res*. 3: 687-701.

- Hodgson, D.J.; Vanbergen, A.J.; Watt, A.D.; Hartley, S.E.; Hails, R.S.; Cory, J.S. 2002. Differential selection of baculoviruses genotypes mediated by different species of host food plant. *Ecol Letters*. 5: 512-518.
- Hughes, P.; Wood, H. 1981. A synchronous per oral technique for the bioassay of insect virus. *J Invertebr Pathol*. 37: 154-159.
- ICTV, 2012. International Committee on Taxonomy of viruses.
- Jehle, J.A.; Lange, M.; Wang, H.L.; Hu, Z.H.; Wang, Y.J.; Hauschild, W., 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. *Virology*. 346: 180-193.
- Kamiya, K.; Zhu, J.; Murata, M.; Laviña-Caoili, B.A.; Ikeda, M.; Kobayashi, M.; Kawamura, S. 2004. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biol Control*. 31: 38-48.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Larkin, M.; Blackshields, G.; Brown, N.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23: 2947-2948.
- León, G.; Beltrán, J.; Campos, J. 2010. Enemigos naturales y manejo integrado del gusano cachón (*Erinnyis ello*) en el cultivo del caucho (*Hevea brasiliensis*), Primera ed. Produmedios.
- McVean, R.; Sait, S.; Thompson, D.; Begon, M. 2002. Dietary stress reduces the susceptibility of *Plodia interpunctella* to infection by a granulovirus. *Biol Control*. 25: 81-84.
- Miele, S.A.B.; Garavaglia, M.J.; Belaich, M.N.; Ghiringhelli, P.D. 2011. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. *Int J Evol Biol*. 211, 37.
- Mukhopadhyay, A.; Dev, D. 2009. Pathogenicity of a baculovirus isolated from *Arctornis submarginata* (Walker) (Lepidoptera: Lymantriidae), a potential pest of tea growing in the Darjeeling foothills of India. *J Invertebr Pathol*. 100: 57-60.
- Parola, A.D.; Sciocco-Cap, A.; Glikmann, G.; Romanowski, V. 2003. An immunochemical method for quantitation of *Epinotia aporema* granulovirus (EpaGV). *J Virol Meth*. 112: 13-21.
- Rohmann, G.F. 2010. Baculovirus molecular biology. National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD.
- Rowley, D.L.; Farrar, R.R., Jr; Blackburn, M.B.; Harrison, R.L. 2010. Genetic and biological variation among nucleopolyhedrovirus isolates from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Virus Genes*. 40: 458-468.
- Sajap, A.S.; Bakir, M.; Kadir, H.; Samad, N. 2007. Effect of pH, rearing temperature and sunlight on infectivity of Malaysian isolate of nucleopolyhedrovirus to larvae of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Int J Trop Ins Science*. 27: 108.
- Schmitt, A. 1988. Uso de Baculovirus *erinnyis* para el control biológico del gusano cachón de la yuca. *Yuca Boletín Informativo*. 12: 1-4.
- Schneider-Orelli, O. 1947. Entomologisches Praktikum – Einführung in die land- und forstwirtschaftliche Insektenkunde. Sauerländer & Co, Aarau, Germany.
- Sciocco-Cap, A.; Parola, A.D.; Goldberg, A.V.; Ghiringhelli, P.D.; Romanowski, V.A. 2001. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. *Appl Environ Microbiol*. 67: 3702-3706.
- Souza, M. 2001. Utilização de microrganismos na agricultura. *Biotec Ciência e Desenvol*. 21: 28-31.
- Sporleder, M.; Rodriguez Cauti, E.M.; Huber, J.; Kroschel, J. 2007. Susceptibility of *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera; Gelechiidae) to its granulovirus PoGV with larval age. *Agricul Forest Entomol*. 9: 271-278.
- Subramanian, S.; Santharam, G.; Sathiah, N.; Kennedy, J.; Rabindra, R. 2006. Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biol Control*. 37: 367-374.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 28: 2731-2739.
- Teakle, R.; Jensen, J.; Giles, J. 1986. Age-related susceptibility of *Heliothis punctiger* to a commercial formulation of nuclear polyhedrosis virus. *J Invertebr Pathol*. 47: 82-92.
- Vásquez, J.; Zeddám, J.; Tresierra, A. 2002. Control biológico del "cogollero del maíz" *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus. *Folia Amazónica*. 13: 25-39.
- Wang, Y.; Choi, J. Y.; Roh, J. Y.; Woo, S. D.; Jin, B. R.; Je, Y. H., 2008. Molecular and phylogenetic characterization of *Spodoptera litura* granulovirus. *J Microbiol*. 46: 704-8.
- Winder, J.A. 1976. Ecology and control of *Erinnyis ello* and *E. alope*, important insect pests in the New World. *Int J Pest Manag*. 22: 449-466.
- Zar, J., 1999. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice Hall.
- Zeddám, J.-L.; Vasquez Soberon, R.; Vargas Ramos, Z.; Lagnaoui, A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*. 29: 659-667.