

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Infecciones de baculovirus en poblaciones del gusano cogollero del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick): Mecanismos de transmisión y efecto sobre poblaciones hospederas**

**Jorge Eliécer Mariño García**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Biociencias, Área Curricular de Ciencias Naturales  
Medellín, Colombia  
2020



# **Infecciones de baculovirus en poblaciones del gusano cogollero del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick): Mecanismos de transmisión y efecto sobre poblaciones hospederas**

**Jorge Eliécer Mariño García**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magíster en Ciencias-Entomología**

Director (a):

Ph. D. Diego Fernando Rincón Rueda

Codirector (a):

Ph. D. Adelaida Maria Gaviria Rivera

Línea de Investigación:

Control biológico de plagas agrícolas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Ciencias Naturales

Medellín, Colombia

2020



*A mi madre y mi hermana.*

*CICADA*

*Cansado de su rostro,  
cansado de su propia piel, de la oscuridad.  
Se arrastra fuera de sí mismo  
para cantar -*

*Un mejor poeta que la mayoría*

*Hosho McCreesh*



## **Agradecimientos**

Me gustaría expresar mi agradecimiento a las organizaciones y personas que aportaron al desarrollo del proyecto. A la Universidad Nacional de Colombia por brindarme la formación académica, al Dr. Diego Rincón por sus aportes en la formulación y ejecución del proyecto, por estimular mi pensamiento crítico y con quien disfruté expresar mis puntos de vista. Aprecio una gran cantidad de cosas que aprendí, pero, en especial la guía paciente que tuvo conmigo en este proceso a pesar de mis dificultades. A la profesora Adelaida Gaviria por ser una gran instructora en la enseñanza de la ciencia y una excelente persona conmigo.

Agradezco a todos los integrantes del Grupo de Investigación de Control biológico de plagas agrícolas de Agrosavia. En especial a la Dra. Gloria Barrera por aceptarme en el grupo, compartir su fascinación por la genética molecular y enseñarme muchísimo acerca de temas a los que les encontré el gusto. Disfruté mucho la compañía de excelentes compañeros de laboratorio. Especialmente, me gustaría agradecerle a Gustavo Araque quien hizo más fácil mi aprendizaje sobre temas de biología molecular.

Agradezco a la Corporación colombiana de investigación agropecuaria AGROSAVIA por financiar mi proyecto de investigación y brindarme todos los espacios necesarios para su realización. También porque allí conocí a muchas personas valiosas.



## Resumen

Con el fin de contribuir con estudio de las interacciones insecto-patógeno como un factor crucial para la optimización del uso de patógenos para el control de plagas, se estudiaron los mecanismos que favorecen la persistencia del baculovirus en las poblaciones naturales del gusano cogollero del tomate, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). Se propusieron los siguientes objetivos: 1. Determinar los efectos de las infecciones no letales del aislamiento nativo del granulovirus de *Photorimaea operculella* (PhopGV) sobre los parámetros poblacionales de *T. absoluta*, 2. Identificar los mecanismos de transmisión de PhopGV en poblaciones de *T. absoluta* y 3. Determinar el efecto de la densidad poblacional de *T. absoluta* por unidad de área sobre la letalidad de PhopGV. Larvas recién eclosionadas fueron sometidas a diferentes concentraciones del virus para determinar la persistencia de éste entre estados, mecanismos de dispersión y el efecto a través de una generación. Se evaluó la mortalidad, longevidad, tasa de desarrollo, fecundidad y fertilidad. Todas las muestras fueron analizadas por qPCR para determinar prevalencia de la infección. La administración de dosis del virus por debajo de la concentración letal media tuvo un efecto prometedor debido a que pueden reducir de manera significativa el potencial de crecimiento de las poblaciones plaga a mediano y largo plazo. Se detectaron infecciones encubiertas en adultos que sobrevivieron la infección durante el estado de larva, pero su fecundidad y fertilidad se vieron reducidas en comparación con adultos sanos. En este trabajo se reporta por primera vez la transmisión de infecciones encubiertas de baculovirus en adultos de *T. absoluta* a su progenie y su potencial letalidad dependiendo de la densidad poblacional. Las infecciones no letales y encubiertas de baculovirus proveen una amplia gama de oportunidades para examinar la complejidad de los patosistemas insecto-virus y para explorar las relaciones ecológicas y evolutivas de estos patógenos con plagas agrícolas.

**Palabras clave:** Bioplaguicidas, Granulovirus, Mecanismos de transmisión, Infecciones encubiertas.

## Abstract

In order to contribute to the study of insect-pathogen interactions as a critical factor for optimizing the use of pathogens as pest control agents, the mechanisms that favor the persistence of baculovirus in natural populations of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), were studied. The following objectives were proposed: 1. To determine the effects of non-lethal infections of the native *Photorimaea operculella* granulovirus (PhopGV) isolate on the population parameters of *T. absoluta*. 2. To identify the transmission mechanisms of PhopGV in *T. absoluta* populations, and 3. To determine the effect of *T. absoluta* population density per unit area on the lethality of PhopGV. Neonate larvae were subjected to different concentrations of the virus to determine the persistence of the virus between stages, dispersal mechanisms and the effect through a generation. Mortality, longevity, development rate, fecundity and fertility were evaluated. All samples were analyzed by qPCR to determine prevalence of the infection. Doses below the mean lethal concentration had a promising effect because they can significantly reduce the growth potential of pest populations for the medium and long-term. Covert infections were detected in adults that survived larval infection, but their fecundity and fertility were reduced in comparison with healthy adults. In this work, the persistence of covert baculovirus infections in adults of *T. absoluta*, the potential transmission to their progeny and the density-dependent lethality is reported for the first time. Nonlethal and covert baculovirus infections provide a wide range of opportunities to examine the complexity of insect-virus pathosystems and to explore the ecological and evolutionary relationships of these pathogens with agricultural pests.

**Keywords:** Biopesticides, Granuloviruses, transmission mechanisms, Covert infections.

**Baculovirus infections in tomato leaf  
miner, *Tuta absoluta*, populations:  
Transmission mechanisms and effect on  
host populations**



# Contenido

<b>1. Capítulo 1.....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Resumen.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2 Introducción.....</b>	<b>24</b>
<b>1.3 Materiales y métodos.....</b>	<b>27</b>
1.3.1 Cría de insectos .....	27
1.3.2 Detección del virus.....	27
1.3.3 Ensayos biológicos.....	30
1.3.4 Análisis de datos.....	32
<b>1.4 Resultados .....</b>	<b>34</b>
1.4.1 Detección de virus.....	34
1.4.2 Persistencia del granulovirus entre estados .....	37
1.4.3 Efecto de concentraciones virales sobre poblaciones de <i>Tuta absoluta</i> .....	38
<b>1.5 Discusión .....</b>	<b>47</b>
<b>1.6 Literatura citada.....</b>	<b>50</b>
<b>2. Capítulo 2.....</b>	<b>58</b>
<b>2.1 Resumen.....</b>	<b>59</b>
<b>2.2 Introducción.....</b>	<b>59</b>
<b>2.3 Materiales y métodos.....</b>	<b>61</b>
2.3.1 Transmisión horizontal del virus por heces de larvas infectadas .....	61
2.3.2 Transmisión vertical del virus.....	62
<b>2.4 Resultados .....</b>	<b>62</b>
2.4.1 Transmisión horizontal del virus por heces de larvas infectadas .....	62
2.4.2 Transmisión vertical .....	63
<b>2.5 Discusión .....</b>	<b>63</b>
<b>2.6 Literatura citada.....</b>	<b>65</b>
<b>3. Capítulo 3.....</b>	<b>69</b>
<b>3.1 Resumen.....</b>	<b>70</b>

<b>3.2</b>	<b>Introducción.....</b>	<b>70</b>
<b>3.3</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>71</b>
3.3.1	Efecto de la densidad de larvas por unidad de área sobre la letalidad del virus .....	71
3.3.2	Análisis estadístico .....	73
<b>3.4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>73</b>
<b>3.5</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>76</b>
<b>3.6</b>	<b>Literatura citada.....</b>	<b>78</b>
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>81</b>
<b>4.2</b>	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>82</b>

## Lista de figuras

<i>Figura 1.1 Montaje experimento para determinar los parámetros biológicos del gusano cogollero del tomate, Tuta absoluta.</i>	31
<i>Figura 1.2 (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con producto de amplificación del gen gran. (B): Purificación de producto de amplificación gen gran</i>	34
<i>Figura 1.3 Digestión de los plásmidos con enzima de restricción EcoRI la cual posee dos sitios de corte.</i>	35
<i>Figura 1.4 Curva de amplificación qPCR de diluciones seriadas de ADN plasmídico con un inserto del gen de granulina</i>	36
<i>Figura 1.5 Curva patrón de qPCR basada en 6 estándares del gen de granulina</i>	37
<i>Figura 1.6 Larvas de Tuta absoluta sana (izq) e infectada (der) con VG013</i>	39
<i>Figura 1.7 Efecto de la concentración de VG013 sobre la mortalidad de individuos de Tuta absoluta. La línea continua representa el modelo log-logístico de dosis-respuesta, y la intercepción de las dos líneas punteadas denota la CL50 estimada por el modelo.</i>	40
<i>Figura 1.8 Relación entre la concentración viral (CI/ml) y la fecundidad de las hembras de Tuta absoluta que sobrevivieron a la infección de VG013.</i>	42
<i>Figura 1.9 Relación entre concentración (CI/ml) y fertilidad de las hembras de Tuta absoluta que sobrevivieron a la infección de VG013</i>	43
<i>Figura 1.10 Tasa de desarrollo promedio de individuos de Tuta absoluta sometidos a diferentes concentraciones de VG013.</i>	44
<i>Figura 1.11 Modelo Michaelis-Menten ajustado a la tasa de desarrollo de individuos de Tuta absoluta en función de las concentraciones del aislamiento VG013. Los puntos representan los promedios por tratamiento.</i>	44
<i>Figura 1.12 Modelo Michaelis-Menten ajustado a los datos de tasa intrínseca de crecimiento de poblaciones de Tuta absoluta en función de la concentración de VG013 en escala logarítmica.</i>	46
<i>Figura 3.1 Montaje larvas GCT en folíolos de tomate</i>	72
<i>Figura 3.2 Relación entre larvas con infecciones encubiertas de VG013 y la densidad poblacional.</i>	75

## Lista de tablas

<i>Tabla 1.1 Condiciones de amplificación gen de granulina.</i>	28
<i>Tabla 1.2 Desviación estándar de Ct de las corridas para los estándares de granulina en tres repeticiones en el tiempo</i>	39
<i>Tabla 1.3 Estimaciones de parámetros del modelo log-logístico de dosis-respuesta.</i>	40
<i>Tabla 1.4 Tablas de vida de poblaciones de Tuta absoluta expuestas a diferentes concentraciones de cuerpos de inclusión (CI) del granulovirus VG013 a <math>25 \pm 2</math> °C y humedad relativa <math>60 \pm 5</math> %. Nx: Número de individuos en el estado x, lx: proporción de sobrevivientes</i>	41
<i>Tabla 1.5 Estimación de parámetros modelo Michaelis-Menten ajustado a la tasa de desarrollo de poblaciones del GCT a diferentes concentraciones de VG013</i>	45
<i>Tabla 1.6 Estimación de parámetros modelo Michaelis-Menten ajustado a la tasa de desarrollo, fecundidad y mortalidad de poblaciones de Tuta absoluta sometidas a diferentes concentraciones de VG013</i>	46
<i>Tabla 3.1 Supervivencia de individuos de T. absoluta infectados subletalmente con VG013. R: réplica, L/P: larvas por planta, Adultos: individuos que alcanzaron el estado adulto por planta</i>	74
<i>Tabla 3.2 Estimación parámetros modelo logístico y distribución binomial que describe la supervivencia de larvas infectadas en función de la densidad de larvas por foliolo</i>	75





# Introducción

Los Baculovirus (Baculoviridae) son una familia de virus que poseen ADN de doble cadena y son patógenos de los estados larvales de algunos lepidópteros, mosquitos y avispas sierra (Miller 1997; Caballero et al., 2001). Algunos baculovirus tienen un papel protagónico en la dinámica poblacional de su hospedero (Myers 1988) y su potencial como agentes para el control de plagas ha sido ampliamente explorado (Moscardi 1999). El efecto de los baculovirus en los insectos hospederos va desde modificación del comportamiento de los individuos infectados (Steinhaus 1967; Vasconcelos et al., 1996; Goulson 1997; Cory y Myers 2003), hasta alteraciones en tiempos de desarrollo, tamaño (Myers et al 2000; Rothman y Myers 1996), fecundidad, viabilidad de los huevos y vigor (Duan y Otvos 2001). Las relaciones teóricas entre la dinámica de los virus y poblaciones de insectos han sido estudiadas principalmente con modelos matemáticos (Anderson y May 1980, 1981). Con frecuencia, tales modelos tienen en cuenta la variación en las tasas de transmisión (Getz y Pickering 1983), métodos de transmisión y densidad del hospedero (Vezina y Peterman 1985; Bonsall et al., 1999), heterogeneidad en la susceptibilidad (Dwyer et al., 1997) e infecciones subletales (Boots y Norman 2000). Sin embargo, el sustento empírico de la mayoría de los modelos que exploran las dinámicas entre poblaciones de insectos y baculovirus es pobre.

Los virus de la familia Baculoviridae se caracterizan por la formación de cuerpos de inclusión (CI), que son matrices proteicas en cuyo interior se encuentran los viriones y que confieren protección contra las condiciones ambientales cuando estos se encuentran por fuera del insecto hospedero (Gómez Valderrama et al., 2018). La forma de los CI y los taxa de los insectos que sirven de hospederos sirven para clasificar a los Baculovirus. Se distinguen cuatro géneros: *Alphabaculovirus* (nucleopoliedrovirus de lepidópteros); *Betabaculovirus* (granulovirus de lepidópteros); *Gammabaculovirus* (nucleopoliedrovirus de himenópteros) y *Deltabaculovirus* (nucleopoliedrovirus de dípteros) (Jehle et al., 2006; Thiem y Cheng 2009; Gómez-Valderrama et al., 2018).

El ciclo de infección inicia cuando las larvas del insecto consumen los CIs que se encuentran en el ambiente. El pH alcalino del intestino medio del insecto hospedero (que oscila entre 9 y 11) disuelve la matriz proteica de los CI, liberando los viriones derivados de cuerpos de inclusión (VDO) (Caballero et al., 2001; Gómez-Valderrama y Villamizar 2013). Una vez liberados los VDO, éstos atraviesan la membrana peritrófica del intestino (Wang y Granados 2000; Williams et al., 2017) e ingresan a las células del intestino medio (Gómez-Valderrama y Villamizar 2013). Luego, las nucleocápsides entran en el citoplasma y se dirigen al núcleo para comenzar con la liberación y transcripción del genoma viral que dará lugar a alteraciones fisiológicas del insecto (Caballero et al., 2001). A este proceso se le denomina infección primaria. Las nucleocápsides que se forman, son transportadas hasta la membrana celular donde brotan y adquieren la envoltura de la misma membrana para formar los viriones brotados (VB). Posteriormente, los VB circulan en la hemolinfa o a través del sistema traqueal dispersando la infección a las demás células y tejidos del insecto, proceso denominado infección secundaria (Caballero et al., 2001; Rohrmann 2011). Los VB entran a las células por endocitosis. Una vez que la vesícula endosomal se libera en el citosol, se produce una acidificación del endosoma y su membrana con la del VB se fusionan liberando la nucleocápside en el citoplasma.

Los viriones que permanecen en el núcleo obtienen una membrana de microvesículas provenientes de la membrana nuclear interna (Braunagel y Summers, 2007). Las nucleocápsides recién ensambladas pueden brotar fuera de la célula o envolverse para formar VDO que se ocluyen en la matriz proteica de poliedrina o granulina para formar nuevamente CI. Al final del ciclo infectivo, los CI se acumulan en el núcleo de las células y cuando la mayor parte de los tejidos susceptibles están afectados, el insecto muere (Williams et al., 2017). El tegumento de la larva se rompe por la acción de una quitinasa codificada por el propio virus (Hawtin et al., 1995; Wang et al., 2005) para liberar los CI en el ambiente.

Los baculovirus, junto con la bacteria *Bacillus thuringiensis* y algunas especies de hongos, constituyen los entomopatógenos que más se han estudiado con el fin de desarrollar bioinsecticidas (Del Rincón-Castro et al., 1997). En Estados Unidos y Canadá, el uso de virus entomopatógenos se ha enfocado en el control de plagas forestales y frutales (Caballero et al., 2001). En Brasil, se ha llevado a cabo de manera exitosa el control de

*Anticarsia gemmatalis* por más de veinte años usando baculovirus (Moscardi y Sosa Gomez, 2007).

A nivel mundial, el *Betabaculovirus, Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV) (King et al., 2012) ha demostrado tener una gran capacidad para controlar lepidópteros de la familia Gelechiidae como *Phthorimaea operculella* (Zeller), *Tecia solanivora* (Povolny) y el gusano cogollero del tomate (GCT), *Tuta absoluta* (Meyrick) (Mascarin et al., 2010; Gómez Valderrama et al., 2016), debido a su alta actividad patogénica, compatibilidad con organismos benéficos y su alta especificidad. Varios aislados del PhopGV se han colectado y evaluado, encontrando varias diferencias en su origen geográfico y hospederos (Carpio et al., 2012; Chaparro et al., 2010; Espinel-Correal et al., 2010). Gómez-Valderrama et al. (2018) reportaron la clasificación y caracterización morfológica de un granulovirus colombiano aislado del GCT denominado VG013. Algunos biopesticidas basados en esas variantes se han desarrollado para controlar poblaciones plaga de *T. solanivora* y *P. operculella* (Espinel-Correal et al., 2010), mientras que actualmente se encuentra en desarrollo un bioplaguicida a base de VG013 para controlar poblaciones de GCT.

Por otro lado, el aislamiento mexicano genéticamente homogéneo del *granulovirus de Cydia pomonella* (CpGV) fue usado en los huertos de Europa para controlar la polilla. Sin embargo, se reportaron varios casos de resistencia (Asser-Kaiser et al., 2007; Espinel-Correal et al., 2010). La actividad patogénica y la variabilidad genética, el rango de hospederos, la tolerancia a rayos UV parecen ser factores claves para seleccionar un aislamiento como ingrediente activo. Sin embargo, otra característica como el método de aplicación, debe ser estudiada para tener un control seguro, sostenible y eficaz.

En la gran mayoría de casos, los aislamientos de baculovirus usados como ingrediente activo de un biopesticida son seleccionados por su alta patogenicidad cuyo propósito es causar la más alta mortalidad posible en un momento puntual como cualquier insecticida. Sin embargo, una alta patogenicidad implica la reducción de otros parámetros que deben ser tenidos en cuenta (Espinel-Correal et al., 2010). Los baculovirus presentan una estrategia de transmisión mixta que puede ser horizontal o vertical tal y como es el caso de parásitos, simbioses y microbiota (Ebert, 2013 en Williams et al., 2017). En lepidópteros, la transmisión horizontal de Baculovirus generalmente ocurre cuando los estados susceptibles del insecto se alimentan de material contaminado y luego del proceso

de replicación dentro del hospedero, la larva eventualmente muere liberando CI al exterior para que sean consumidos por otras larvas susceptibles (Williams et al., 2017; Cory y Myers, 2003; Cory et al., 2015). La transmisión vertical ocurre cuando hay una infección encubierta del virus que pasa de una generación a la siguiente sin expresar síntomas aparentes (Olofsson, 1989; Sood et al., 2010; Cory et al., 2015; Williams et al., 2017).

Cada tipo de transmisión (vertical u horizontal) se vuelve ventajosa según la situación. La transmisión horizontal es en general riesgosa si los hospederos son escasos y las tasas de contacto son bajas, mientras que la transmisión vertical depende de la supervivencia y el éxito reproductivo del hospedero (Cory et al., 2015). Por lo tanto, la transmisión horizontal es óptima cuando hay una alta densidad de hospederos, mientras que la vertical se ve favorecida cuando la densidad del hospedero es baja (Steineke y Jhale, 2004; Cory y Myers, 2003; Cory et al., 2015).

En este sentido, el tipo de transmisión modula la diversidad genética y puede ser fundamental para la persistencia de los baculovirus en el ambiente. Por un lado, las estrategias que tienen los virus para mantener una infección encubierta (ligada a la transmisión vertical) son la selección de células especiales para mantener el genoma viral, moderar la expresión de genes virales y evadir el sistema inmune del hospedero (Kane y Golovikina, 2010). Por ejemplo, el nucleopoliedrovirus SeMNPV aislado de adultos de *Spodoptera exigua* colectados en campo y adaptado para la transmisión vertical es menos patogénico y tomó más tiempo en matar al hospedero que la variante adaptada para la transmisión horizontal (Cabodevilla et al., 2011). Por otro lado, la tasa de transmisión horizontal de baculovirus puede disminuir en ciertos ambientes, debido a que éstos son susceptibles a la radiación UV. De hecho, Rothman y Roland (1998) encontraron que las larvas de *Malacosoma disstria* que se alimentan en los bordes del bosque presentan una menor infección viral que las que lo hacen al interior. Pese a que el suelo parece proteger al baculovirus de la radiación UV y funcionar como reservorio en algunos sistemas, la transmisión vertical y las infecciones encubiertas deben jugar un papel clave en la persistencia del patógeno en el ambiente (Thompson et al., 1981; Fuxa y Ritcher, 2001; Cabodevilla et al., 2011). Aunque hasta el momento no hay evidencia de que insectos con infecciones encubiertas liberen CI que puedan ser transmitidos horizontalmente, los baculovirus son viables y competentes como para ser usados en el control de poblaciones plaga (Burden et al., 2006; Williams et al., 2013).

## **Enfoque de investigación**

Los agricultores realizan rutinariamente aplicaciones periódicas de insecticidas no específicos para controlar al GCT (Lietti et al., 2005; Oliveira et al., 2009; Guedes y Picanço, 2011), muchas veces sin tener en cuenta los periodos de carencia (Siqueira et al., 2000, 2001; De Vis et al., 2001). Esta estrategia facilita la implementación de medidas preventivas y simplifica los protocolos de uso de los insumos, pero favorece su aplicación cuando no son necesarios y el deterioro general de la sostenibilidad del sistema por cuenta del incremento en la dependencia en insecticidas químicos (Lewis et al., 1997).

Pese a que los patógenos tienen propiedades que favorecen su persistencia en el ambiente, tales como la transmisibilidad y la capacidad de evolucionar, la mayoría de los bio-plaguicidas son diseñados con el mismo enfoque de los insecticidas químicos. Esta investigación pretende explorar los mecanismos de transmisión de un Baculovirus entre individuos de una plaga de importancia económica en Colombia y el mundo. El propósito es comprender la complejidad de la coexistencia entre patógenos e insectos desde un enfoque evolutivo y poder replicar, con una perspectiva del control de plagas, las dinámicas patógeno-hospedero que se han mantenido naturalmente a través del tiempo. El presente trabajo busca generar información básica relacionada con los mecanismos asociados a la transmisión de virus entre insectos, que permita el desarrollo de estrategias de control sostenido de plagas, con una mínima necesidad de introducir insumos en el sistema.

## **Sistema de estudio**

La presente investigación usará como modelo de estudio el sistema conformado por la planta de tomate, el gusano cogollero del tomate y el Baculovirus PhopGV VG013. A continuación, se describe cada uno en detalle.

### *Planta de tomate*

La planta de tomate es herbácea con un sistema radicular amplio entre los 50-60 cm de profundidad. Se compone de una raíz principal desde la que parte una gran cantidad de ramificaciones (Almanza-Merchán et al., 2016). El tallo es anguloso y recubierto de una

vellosidad visible de origen glandular que dota a la planta de un olor característico. Las hojas son compuestas e imparipinnadas. Generalmente se constituyen por 7-9 folíolos que también están recubiertos de pequeñas vellosidades (Bertin, 2005).

El tomate, *Solanum lycopersicum* L. (Solanaceae), es el segundo cultivo de hortalizas más consumido después de la papa (Baracaldo et al., 2014). En el año 2018, la producción mundial de tomates fue de 182,256,458 toneladas (FAO, 2019). China, el principal productor, representó el 33,8% de la producción total con una producción de 61,631,581 ton y un rendimiento de 59,225 ton/ha. India, con una producción de 19,377,000 ton y un rendimiento de 24,65 ton/ha, y Estados Unidos con una producción de 12,612,139 ton y un rendimiento de 96,8 ton/ha, le siguen con la segunda y tercera posición (FAO, 2019). Colombia cuenta con más de 4.000 ha cultivadas en 18 departamentos y una producción cercana a las 377,000 ton y un rendimiento de 46,96 ton/ha (Agronet, 2019; FAO, 2019). El departamento de Antioquia se caracteriza por ser el mayor productor del país en los últimos 6 años con una producción promedio de 130,594 ton y un rendimiento de 112,41 ton/ha. Le siguen los departamentos de Boyacá con una producción de 36,433 ton y un rendimiento de 97,94 ton/ha; Cundinamarca con 45,419 ton y 67,40 ton/ha; Nariño 36,483 ton y 107,45 ton/ha; Quindío 24,179 ton y 88,63 ton/ha (Agronet, 2019).

Entre las principales plagas que atacan el cultivo de tomate bajo invernadero se encuentran los nemátodos (*Meloidogyne* spp.) que causan heridas y daños en las raíces, esta es la puerta de entrada a hongos y se forman nódulos o tumores que generan pudrición y reducción de raicillas (Mahgoob, AA. El-Tayeb, 2010). Los Áfidos (*Aphis* spp, *Mizus* spp, *Aulacorthum* spp, *Macrosiphum* spp) normalmente se ubican en los brotes, succionan la savia de las hojas ocasionando deformaciones y un leve enrollamiento que limita el crecimiento de la planta, además, son transmisores de virus. Diferentes especies de moscablanca, *Bemisia tabaci* (Gennadius) o *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, en su estado de ninfa, que normalmente no se monitorea, se alimentan del tejido de las hojas reduciendo el crecimiento de la planta y produciendo fumagina que puede cubrir la totalidad de la planta. Las moscas blancas son transmisoras de virus, especialmente Begomovirus y Crinivirus para los que se recomienda usar variedades resistentes (Barreto et al., 2002; Rodríguez et al., 1994; Vaca-Vaca et al., 2012). Entre los minadores de hojas se encuentran el GCT y la mosca minadora *Liriomyza trifolii* que, en sus estados larvales, se alimentan de los tejidos vegetales realizando túneles que reducen la tasa fotosintética de

la planta. El principal método de control de estas plagas es la aplicación de insecticidas químicos (Endersby N.M. y Morgan W.C., 1991; Endersby N.M. et al., 1992; Silva y Correa, 2009; Chen et al., 2010; Gilden et al., 2010; Mdellel et al., 2015; Martínez-Mera et al., 2019; Manoj et al., 2020). En Colombia, el uso intensivo de estos productos ha incrementado la degradación de los suelos (Silva y Correa, 2009; Martínez-Mera et al., 2009), principalmente porque se aumenta considerablemente su concentración de metales pesados (Kabata-Pendias, 2011; Wu et al., 2012).

#### *Gusano cogollero del tomate (GCT), Tuta absoluta*

El GCT es una plaga limitante del cultivo de tomate (Desneux et al., 2010) nativa de Suramérica, originalmente descrita como *Phthorimaea absoluta* por el entomólogo inglés E. Meyrick en 1917, de un ejemplar colectado en la localidad de Huancayo, Perú (López, 2003). Fue reportada como *Gnorimoschema absoluta* (Clarke), *Scobipalpula absoluta* (Povolny) y *Scrobipalpuloides absoluta* (Povolny) antes de ser ubicada finalmente en el género *Tuta* por Povolny en 1994 (Desneux et al., 2010). Posteriormente se reportó en Chile, Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Uruguay, Venezuela y Argentina (Gómez Valderrama, 2017). En 2006, la plaga fue reportada en España y se dispersó hacia el sur de Europa y norte de África donde es considerada la plaga más importante del tomate (Desneux et al., 2010).

*T. absoluta* es una especie multivoltina que presenta un alto potencial reproductivo lo que le permite incrementar el tamaño de la población rápidamente (Pereyra y Sánchez, 2006). Las hembras ovipositan preferencialmente sobre hojas (73%) y, en un grado menor, sobre tallos nuevos (21%), sépalos (5%) o frutos verdes (1%) (Estay, 2000; Desneux et al., 2010). Al someter a las hembras a condiciones forzadas, por ejemplo, plantas deshojadas, débiles y con alta infestación, las polillas pueden ovipositar sobre la superficie de los frutos verdes, pero no en los maduros (Estay, 2003; Monserrat, 2009). Las larvas se alimentan de hojas, frutos y tallos en los que cavan galerías o minas y causan daños severos (Pereyra, 2002). Cuando las larvas se alimentan del meristemo apical (cogollo), se detiene el desarrollo de la planta (Bajracharya et al., 2018). En las hojas, disminuye la capacidad fotosintética de la planta y, por ende, disminuye la producción (Urbaneja et al., 2012). En los tallos, las galerías causan necrosis (Desneux et al., 2010). En los frutos, las galerías hacen que estos no sean aptos para el mercado (Cely et al., 2006), además de la potencial invasión de

patógenos secundarios que causan la pérdida total del fruto (Pereyra y Sánchez, 2006; Morales *et al.*, 2013). La duración de la fase larval y la longevidad y fecundidad de los adultos varía con la temperatura (Duarte *et al.*, 2015). En condiciones de laboratorio a 20-25°C, la fase larval (desde huevo a pupa) es de 15 a 17 días, lo cual representa aproximadamente el 50% del ciclo entero del GCT (Duarte *et al.*, 2015). La mayoría de los entomopatógenos usados en el control biológico del GCT atacan larvas debido a que es la fase en la que hay más actividad alimenticia (Urbaneja *et al.*, 2012). Su principal hospedero son las plantas de tomate; sin embargo, se ha reportado en hojas y tallos de papa (CIP, 1996; Notz, 1992), y especies de solanáceas silvestres como *Solanum nigrum*, *Solanum puberulum*, *Datura ferox*, *Solanum elaeagnifolium*, y *Nicotiana glauca* (CIP, 1996). En Argentina, también se ha reportado en tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Mallea *et al.*, 1972) y en berenjena (*Solanum melongena*), pero únicamente en ensayos de laboratorio (Galarza, 1984). Desde su llegada a Europa, *T. absoluta* se ha reportado en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana*) (Tropea Garzia, 2009), en *Lycium* sp. y *Malva* sp. (Caponero, 2009).

En Suramérica, el principal método de control es el uso de insecticidas químicos (Lietti *et al.*, 2005; Desneux *et al.*, 2010). En un principio se utilizaron organofosforados, los cuales se reemplazaron por piretroides y otros como el Thycyclam, un organosulfurado heterocíclico (Desneux *et al.*, 2010). Luego se introdujeron insecticidas nuevos como abamectinas, acylurea, spinosad y tebufonozide, los cuales pueden causar un 100% de mortalidad de larvas (Silvérico *et al.*, 2009). Sin embargo, desde la década de los 80, se han reportado casos de resistencia a insecticidas como abamectina, cartap y permethrin en Bolivia, Brasil y Chile, lo cual ha generado disminución en su eficacia (Salazar y Araya, 1997; Siqueira *et al.*, 2000). El esquema de uso de insecticidas se basa en feromonas sintéticas para monitorear niveles poblacionales de la plaga y efectuar las aplicaciones (Salas, 2004; Desneux *et al.*, 2010). Otros métodos de control incluyen prácticas culturales como la rotación de plantaciones con cultivos diferentes a solanáceas, arado periódico, fertilización adecuada, irrigación, eliminar las plantas infestadas, etc. (Torres *et al.*, 2002). Además, el CGT en tomate tiene umbrales económicos relativamente altos. Por ejemplo, en Chile (Estay y Bruna, 2002) se han establecido umbrales en campo que dependen del número de machos capturados en trampas con feromonas y muestreos de nivel de ataque en planta (porcentaje de plantas con huevos o larvas). Se aplica el control químico cuando se superen los 70 machos/trampa/día y 0% de plantas atacadas, 50 machos/ trampa y día y 6% de plantas atacadas o 25 machos/trampa y día y 10% de plantas atacadas. En

cultivos bajo cubiertas se recomienda realizar tratamientos con capturas superiores a 40 machos/trampa/día (Estay, 2000). En Argentina se ha establecido como umbral: dos foliolos de daño fresco por planta (Polak, 1996; Polack y Brambilla, 2000; Vercher, 2010). Estos umbrales son lo suficientemente altos como para poder diseñar estrategias novedosas que impliquen la tolerancia de ciertos niveles de población en los cultivos.

Un gran número de parasitoides se han reportado atacando huevos, larvas y pupas de *T. absoluta*, algunos de ellos presentan distribución amplia en Suramérica y otros, están restringidos a ciertas localidades (Desneux et al., 2010). Los parasitoides de huevos se registran en las familias Encyrtidae (*Arrhenophagus* sp, *Copidosoma desantisi*, *Copidosoma koehleri*) (Ripa et al., 1995), Eupelmidae (*Anastatus* sp) (Oatman y Planer, 1989), Trichogrammatidae (*Trichogramma bactrae*, *T. exiguum*, *T. narudai*, *T. pretiosum*) (Botto et al., 2000; Riquelme y Botto, 2003). En parasitoides de larvas, se han reportado especies de las familias Bethyidae, Braconidae, Eulophidae, Ichneumonidae y Tachinidae. En Argentina *Pseudapanteles dignus* (Braconidae) y *Dineulophus phthorimaeae* (Eulophidae) se han usado como controladores en cultivos comerciales de tomate con niveles de parasitismo del 70% (Sánchez et al., 2009). En Colombia, la atención se ha centrado el braconido *Apanteles gelechiidivoris* con un porcentaje de control de hasta 70% en laboratorio (Morales et al., 2013).

### *Baculovirus*

A nivel mundial, el Betabaculovirus *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV) (King et al., 2012) ha demostrado tener una gran capacidad para controlar lepidópteros de la familia Gelechiidae como *Phthorimaea operculella* (Zeller), *Tecia solanivora* (Povolny) y el GCT (Mascarín et al., 2010; Gómez Valderrama et al., 2018). Con el fin de encontrar aislamientos específicos y efectivos para el GCT, Gómez-Valderrama et al. (2014) hicieron varios muestreos de larvas del GCT en los departamentos de Boyacá, Caldas, Cundinamarca y Santander. Se reportaron por primera vez dos aislamientos geográficos del GCT (nombrados VG012 y VG013) aislados de poblaciones infectadas naturalmente. Posteriormente, Gómez-Valderrama et al. (2018) hicieron la caracterización y un análisis de restricción de endonucleasas del aislamiento VG013. Como resultado, se encontró que el aislamiento es una variante del PhopGV.

El aislamiento VG013 ha demostrado causar una mortalidad del 90% de larvas del GCT con una concentración de  $7.0 \times 10^6$  CI/ml bajo condiciones de laboratorio (Gómez Valderrama et al., 2018). Como consecuencia, este aislamiento se seleccionó para análisis como potencial agente de control biológico del GCT y actualmente se está trabajando en la formulación como plaguicida.

## Objetivos

Con el fin de diseñar una estrategia sostenible que mantenga las poblaciones del GCT por debajo de los niveles económicos con mínima intervención, es necesario comprender los mecanismos que favorecen la permanencia del baculovirus en las poblaciones naturales del GCT.

### Objetivo general

Determinar los mecanismos que favorecen la persistencia de VG013 en poblaciones del GCT.

### Objetivos específicos

- Determinar los efectos de las infecciones no-letales de VG013 sobre los parámetros poblacionales del GCT.
- Identificar la potencial transmisión vertical y los mecanismos de transmisión horizontal de infecciones del aislamiento VG013 en poblaciones del GCT.
- Determinar el efecto de la densidad poblacional del GCT por unidad de área sobre la letalidad de la infección del aislamiento VG013.

## Hipótesis de investigación

Williams et al. (2007) plantearon un modelo teórico de las rutas de transmisión, modo de infección y dispersión de baculovirus en el ambiente. Luego de que las larvas ingieren los CI mientras se alimentan de follaje contaminado, una porción de los individuos infectados desarrolla una enfermedad letal y liberan CI en la planta donde pueden ser transmitidos a un hospedero susceptible. Los CI en las plantas son transportados al suelo por acción de las lluvias o viento, desde donde pueden ser trasladados de vuelta a la planta por factores bióticos o abióticos. Alternativamente, los insectos que consumen los CI pero sobreviven, siguen con su desarrollo, pupan y emergen como adultos con infecciones encubiertas. Estos adultos migran y dispersan el baculovirus antes de ovipositar y transmitir la infección a su descendencia. Esta transmisión vertical se puede sostener durante varias generaciones hasta que algún elicitor o factor de estrés convierta a la infección encubierta en enfermedades letales que generen un nuevo ciclo de transmisión horizontal.

Mi tesis es que el sistema tomate-GCT-VG013 sigue el modelo planteado por Williams et al. (2017). En este sistema, las infecciones encubiertas requieren de una respuesta inmune por parte del GCT que reduce los recursos disponibles para la reproducción y la supervivencia (efectos subletales). El estrés asociado al incremento en la densidad del GCT reduce su respuesta inmune y su capacidad para combatir la infección. Además, una baja densidad reducirá la probabilidad de transmisión horizontal, por lo que se favorecen las infecciones encubiertas y la transmisión vertical. En este sentido, las hipótesis son:

Hipótesis 1: Las infecciones encubiertas del aislamiento VG013 se transmiten verticalmente y reducen la tasa de crecimiento de las poblaciones del GCT.

Hipótesis 2: El virus VG013 se transmite a individuos sanos del GCT a través de la ingesta de excreciones de individuos con infecciones encubiertas que comparten el mismo sustrato de alimentación.

Hipótesis 3: La letalidad del aislamiento VG013 se incrementa con la cantidad de individuos del GCT por unidad de área.

## Literatura citada

- Agronet - Ministerio Colombiano de Agricultura y Desarrollo Rural (2019). Estadísticas para el Sector Agrícola. Disponible en: <http://www.agronet.gov.co> (consultado 04.04.19).
- Almanza-Merchán, Pedro José, Arévalo, Yuly Alexandra, Cely R., Germán Eduardo, Pinzón, Elberth Hernando, & Serrano C., Pablo Antonio. (2016). Fruit growth characterization of the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) hybrid Ichiban' grown under cover. *Agronomía Colombiana*, 34(2), 155-162.  
<https://dx.doi.org/10.15446/agron.colomb.v34n2.57193>
- Anderson R. M, May R. M. (1980). Infectious diseases and population cycles of forest insects. *Science* 210:658–61
- Anderson R. M, May R. M. (1981). The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 291:451–524
- Asser-Kaiser, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Eberle, K. E., Gund, N. A., ... Jehle, J. A. (2007). Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science*, 317(5846), 1916–1918.  
<https://doi.org/10.1126/science.1146542>
- Bajracharya, A. S. R., Bhat, B., & Sharma, P. N. (2018). Geographical distribution of South American tomato leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) in Nepal. *Journal of the Plant Protection Society of Nepal*, 5(December), 203–216. Retrieved from [www.entomoljournal.com](http://www.entomoljournal.com)
- Baracaldo, A., R. Carvajal, A.P. Romero, A.M. Prieto, F.J. García, G. Fischer, and D. Miranda. (2014). El anegamiento afecta el crecimiento y producción de biomasa en tomate chonto (*Solanum lycopersicum* L.), cultivado bajo sombrero. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 8, 92-102. Doi: 10.17584/rcch.2014v8i1.2803
- Barreto, J.D. et al. (2002). Manual del cultivo de tomate tipo milano, pimentón, maíz dulce y frijol en el sistema de siembra en camas plastificadas, bajo las condiciones agroecológicas de la meseta de Ibagué. Colciencias, Cooperativa Serviarroz, Corpoica, Sena. Ibagué. p 3-42.
- Bertin, N. (2005). Analysis of the tomato fruit growth response to temperature and plant fruit load in relation to cell division, cell expansion and DNA end reduplication. *Annals of Botany*. 95,439-447. Doi: 10.1093/aob/mci042

- Bonsall M, Godfray H. C. J., Briggs C, Hassell M.P. (1999). Does host self-regulation increase the likelihood of insect-pathogen population cycles? *The American Naturalist*. 153:228–35
- Boots M, Norman R. (2000). Sublethal infection and the population dynamics of host-microparasite interactions. *Journal of Animal Ecology*. 69:517–24
- Botto E. N, Ceriani S. A, Lopez S. N, Saini E. D, Cedola C. V, Segade G, Vizcarret M, (2000). Control biológico de plagas hortícolas en ambientes protegidos. La experiencia argentina hasta el presente. *RIA INTA* 29:83–98
- Braunagel, S. C., Russell, W. K., Rosas-Acosta, G., Russell, D. H., & Summers, M. D. (2003). Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), 9797–9802.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1733972100>
- Braunagel, S. C. & Summers, M. D. (2007). Molecular biology of the baculovirus occlusion- derived virus envelope. *Curr Drug Targets* 8, 1084-1095.
- Burden, J. P., Possee, R. D., Sait, S. M., King, L. A., and Hails, R. S. (2006). Phenotypic and genotypic characterisation of persistent baculovirus infections in populations of the cabbage moth (*Mamestra brassicae*) within the British Isles.
- Caballero, P., T. Williams y M. López-Ferber. (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. 1ª edición. Editorial *Phytoma*. España. 518 p.
- Cabodevilla, O., Ibañez, I., Simón, O., Murillo, R., Caballero, P., and Williams, T. (2011). Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 56, 184–192. doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.10.007
- Caponero A. (2009) Solanaceae, rischio in serre. Resta alta l'attenzione alla tignola del pomodoro nelle colture protette. *Colture Protette* 10:96–97
- Carpio, C., Dangles, O., Dupas, S., Léry, X., López-Ferber, M., Orbe, K., Zeddám, J.-L. (2012). Development of a viral biopesticide for the control of the Guatemala potato tuber moth *Tecia solanivora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, 184–191.
- Carrera, M., Zeddám, J., Pollet, A., Lery, X., & López-Ferber, M. (2008). Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. *IOBC/wprsBulletin*, 31, 40–43

- Chaparro, M., Espinel-Correal, C., Cotes, A. M., & Villamizar, L. (2010). Fotoestabilidad y actividad insecticida de dos formulaciones de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Revista Colombiana de Entomología*.
- Chen, X., Xia, X., Zhao, Y., Zhang, P., (2010). Heavy metal concentrations in roadside soils and correlation with urban traffic in Beijing, China. *J. Hazard Mater. Journal of Hazardous Materials*, 181(1-3), 640–646. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.05.060 181 (1-3), 640-646.
- CIP (1996) Major Potato Diseases, Insects, and Nematodes, 3rd edn. *Centro Internacional de la Papa*, Lima (PE).
- Cory, J. S. (2015, April 1). Insect virus transmission: Different routes to persistence. *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.007>
- Cory, J. S., Green, B. M., Paul, R. K., & Hunter-Fujita, F. (2005). Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 101–111.
- Cory, J. S., & Myers, J. H. (2003). The Ecology and Evolution of Insect Baculoviruses. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 239–272.
- Del Rincón-Castro, Ma Cristina, & Ibarra, Jorge. (1997). Baculovirus entomopatógenos: una alternativa para el control de plagas. *Folia Entomológica Mexicana*. 100. 45-.
- Duan L, Otvos I. S. (2001). Influence of larval age and virus concentration on mortality and sub-lethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the Western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*. 30:136–46
- Duarte, Leticia & Martínez, María & Bueno, Vanda. (2015). Biología y parámetros poblacionales de *Tuta absoluta* (Meyrick) bajo condiciones de laboratorio. 30.19-29.
- Dwyer G, Elkinton J. S, Buonaccorsi J. P. (1997). Host heterogeneity in susceptibility and disease dynamics: tests of a mathematical model. *American Naturalist*. 150:685–707
- Endersby, N.M. Morgan, W.C., Brenden C. Stevenson, Colin T. Waters. (1992). Alternatives to Regular Insecticide Applications for Control of Lepidopterous Pests of *Brassica oleracea* var. capitata. *Biological Agriculture & Horticulture* 8:3, pages 189-203.
- Endersby, N.M & Morgan, W.C (1991). Alternatives to Synthetic Chemical Insecticides for Use in Crucifer Crops, *Biological Agriculture & Horticulture*, 8:1, 33-52, DOI: 10.1080/01448765.1991.9754574

- Espinel-Correal, C., Léry, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddám, J. L., Cotes, A. M., & López-Ferber, M. (2010). Genetic and biological analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Applied and Environment Microbiology*, 76, 7617–7625.
- Espinel-Correal, C., López-Ferber, M., Zeddám, J.-L., Villamizar, L., Gómez, J., Cotes, A. M., & Léry, X. (2012). Experimental mixtures of *Phthorimaea operculella* granulovirus isolates provide high biological efficacy on both *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 110, 375-381.
- Estay, P., Bruna, A. (2002). Insectos, Ácaros y Enfermedades asociadas al Tomate en Chile. *Colección libros INIA N° 7*. Santiago-Chile.
- Estay, P. (2000). Polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick). Informativo La Platina 9 FAOSTAT – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2019). Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Fuxa J. R., Richter A. R. (2001). Quantification of soil-to-plant transport of recombinant nucleopolyhedrovirus: effects of soil type and moisture, air currents, and precipitation. *Applied Environmental Microbiology*. 67:5166–70
- Galarza J (1984). Laboratory assessment of some solanaceous plants as possible food plants of the tomato moth *Scrobipalpa absoluta*. IDIA Nos 421/424, 30–32.
- Getz W, Pickering J. (1983). Epidemic models: thresholds and population regulation. *American Naturalist*. 121:893–98
- Gilden, R.C., Huffling, K., Sattle, B., (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetric Gynecological and Neonatal Nursing*. 39 (1), 103–110
- Gómez-Valderrama, J. A., Barrera, G., López-Ferber, M., Belaich, M., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. (2018). Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick). *Journal of Applied Entomology*, 142, 67–77. <https://doi.org/10.1111/jen.12406>
- Gómez-Valderrama, J., Herrera, L., Uribe-vélez, 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, 136–143.
- Gómez-Valderrama, J.A., y Villamizar, L. (2013). Baculovirus: Hospederos y especificidad. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 143. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41273>

- Goulson D. (1997). Wipfelkrankheit: modification of host behavior during baculoviral infection. *Oecologia* 109:219–28
- Guedes, R. N. C. & Picancço M. C (2012). The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *OEPP/EPPO Bulletin* 2012; 42:1-6.
- Hawtin, R. E., Zarkowska, T., Arnold, K., Thomas, C. J., Gooday, G. W., King, L. A., Kuzio, J. A. & Possee, R.D. (1997). Liquefaction of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus-infected insects is dependent on the integrity of virus-encoded chitinase and cathepsin genes. *Virology* 238, 243-253.
- Jehle, J., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, 151, 1257–1266.
- Kabata-Pendias, A., (2011). Trace Elements in Soils and Plants, fourth ed. CRC, Press, Boca Raton, FL, USA, p. 505p.
- Kane, M., & Golovkina, T. (2010). Common Threads in Persistent Viral Infections. *Journal of Virology*, 84(9), 4116–4123. <https://doi.org/10.1128/jvi.01905-09>
- King, A., Lefkowitz, E., Adams, M., & Carstens, E. (2012). Virus Taxonomy: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. *Virus Taxonomy: Elsevier*.
- Lewis W.J, van Lenteren J. C, Phatak S. C, Tumlinson J. H (1997). A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (23):12243-12248).
- Mdellel Lassaad, Monia Ben Halima Kamel, Bisma Assadi. (2015). Impact of winter pruning of pomegranate trees on *Aphis punicae* (Hemiptera, Aphididae) and its natural enemies in Tunisia. *Annales de la Société entomologique de France (N.S.)* 51:3, pages 266-271.
- Lietti M. M., Botto E, Alzogaray R. A. (2005). Insecticide Resistance in Argentine Populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 34:113–119.
- Mahgoob, A.A. El-Tayeb, T.S. (2010). Biological Control of the Root-Knot Nematode, *Meloidogyne incognita* on tomato using plant growth promoting bacteria. *Egyptian Journal Of Biological Pest Control*: 20(2), p. 95-103. 31.
- Mallea A. R., Macola G. S., Garcia S.J.G., Bahamondes L. A. & Suarez JH (1972) *Nicotiana tabacum* var. virginica, a new host of *Scrobipalpa absoluta*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo* 18, 13–15.

- Manoj, Srinivas & Karthik, Chinnannan & Kadirvelu, K. & Arulselvi, Padikasan & Shanmugasundaram, Thangavel & Bruno, Benedict & Rajkumar, Mani. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*. 254. 109779. 10.1016/j.jenvman.2019.109779.
- Martínez-Mera A., Torregroza-Espinosa C., Crissien-Borrero T., Marrugo-Negrete L., González-Márquez L., (2019). Evaluation of contaminants in agricultural soils in an Irrigation District in Colombia. *Heliyon* 5, e02217.
- Mascarin, G., Alves, S. B., Rampelotti-Ferreira, F. T., Urbano, M. R., Demétrio, C. G. B., & Delalibera, I. (2010). Potential of a granulovirus isolate to control *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl*, 55, 657–671.
- Miller L. K., ed. 1997. The Baculoviridae. New York: Plenum
- Monserrat A (2009) La polilla del tomate *Tuta absoluta* en la Región de Murcia: bases para su control. Serie Técnica y de Estudios No. 34. *Conserjería de Agricultura y Agua*.
- Monserrat A (2010) Estrategias globales en el manejo de *Tuta absoluta* en Murcia. *Phytoma España* 217:81–86.
- Morales, J., Muñoz, L. Rodríguez, D, & Cantor, F. (2014). Acción combinada de feromona sexual y de avispa *Apanteles gelechiidivoris* para el control de *Tuta absoluta* en cultivos de tomate bajo invernadero. *Acta Biológica Colombiana*, 19(2), 175-184.
- Moscardi, F. (1999). Assessment of the application of baculoviruses for control of lepidoptera. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 44).
- Moscardi, F. and S. Gomez. D. (2007). Microbial control of insect pest of soybean. Chapter VII-5, pp 411-426.
- Myers, J. (1988). Can a general hypothesis explain population cycles of forest Lepidoptera? *Advances in Ecological Research*. 18, 179–242.
- Myers, J. (2000). Population fluctuations of western tent caterpillars in southwestern British Columbia. *Population Ecology*. 42. 231-241. 10.1007/PL00012002.
- Notz A.P. (1992) Distribution of eggs and larvae of *Scrobipalpula absoluta* in potato plants. *Revista de la Facultad de Agronomía* (Maracay) 18, 425–432.
- Oatman E. R. Platner G.R. (1989) Parasites of the potato tuberworm, tomato pinworm and other closely related Gelechiids. *Proceedings of the Hawaiian Entomological Society* 29:23–30.

- Oliveira F. A. da Silva DJH, Leite GLD, Jham GN, Picanco M (2009). Resistance of 57 greenhouse-grown accessions of *Lycopersicon esculentum* and three cultivars to *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Scientia Horticulturae* 119:182–187.
- Olofsson, E. (1989). Transmission of the nuclear polyhedrosis virus of the European pine sawfly from adult to offspring. *J. Invertebrate Pathology*. 54, 322–330. doi: 10.1016/0022-2011(89)90116-X.
- Pereyra P.C., Sánchez N.E (2006), Effect of two solanaceous plants on developmental and population parameters of the tomato leaf miner, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Neotropical Entomology* 35:671–676.
- Polack, L. A. (1996). Control químico de la polilla del tomate (*Scrobipalpus absoluta*, Meyrick). Determinación del momento oportuno y frecuencia para realizar los tratamientos de control. En: Curso de capacitación. Producción de hortalizas en invernáculo. Modulo 3. *Manejo de enfermedades y plagas*. EEA INTA San Pedro.
- Polack, L. A; Brambilla, R.J. (2000). Evaluación de un Sistema de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate en un Cultivo de Tomate Cherry bajo Invernáculo. En XXIII *Congreso Argentino de Horticultura*. ASAHo. Mendoza, septiembre de 2000.
- Ripa S.R, Rojas P.S, Velasco G (1995). Releases of biological control agents of insect pests on Easter Island (Pacific Ocean). *Entomophaga* 40:427–440.
- Riquelme M. B, Botto E. N. (2003). Dispersión y persistencia de *Trichogrammatoidea bactrae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) en cultivo de tomate bajo cubierta. Resúmenes XXV *Congreso Chileno de Entomología*., Talca, Chile, 23 pp.
- Rodriguez-Burgos P., Chaves G., Franco-Lara L., Guzman-Barney M. (2010). Low molecular variability of Potato yellow vein virus (PYVV) isolates of *Solanum phureja* and *Solanum tuberosum* from Colombia. *Phytopathology* 100 S176.
- Rodriguez-Lopez M. J., Garzo E., Bonani J. P., Fereres A., Fernandez-Muñoz R., Moriones E. (2011). Whitefly resistance traits derived from the wild tomato *Solanum pimpinellifolium* affect the preference and feeding behavior of *Bemisia tabaci* and reduce the spread of Tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology* 101 1191–1201.
- Rohrmann, G. (2011). Baculovirus molecular biology Second edition. Ed. Bethesda (MD): *National Library of Medicine* (US), NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49500/>.
- Rothman, L. D., y J. H. Myers. (1996). Debilitating effects of viral diseases on host Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67: 1-10.

- Salas J. (2004). Capture of *Tuta absoluta* in traps baited with its sex pheromone. *Revista Colombiana de Entomología* 20, 75–78.
- Salazar E.R., Araya J.E (1997). Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate. *Simiente* 67:8–22.
- Salvador, R., Ferrelli, M. L., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2014). Analysis of a chitinase from EpapGV, a fast killing betabaculovirus. *Virus Genes*, 48(2), 406–409. <https://doi.org/10.1007/s11262-013-1019-7>
- Sánchez N. E. (2010). Ecological studies of two parasitoids of the tomato moth *Tuta absoluta*: challenges and perspectives for their application in biological control in Argentina. *Congress proceedings, IOBC Biological control in the Americas: past, present and future*.
- Silva Arroyave, S. M.; Correa Restrepo, F. J. (2009) Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de la regulación económica. *Semestre Económico*, v. 12, n. 23, p. 13-34, 2009.
- Silvérico F.O., de Alvarenga E. S., Moreno S. C., Picanço M. C. (2009) Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. *Pest Management Sci* 65:900–905.
- Siqueira H. A., Guedes R. N. C y Picanço M. C (2000) Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta*. *Agricultural and Forest Entomology* 2, 147–153.
- Siqueira H. A, Guedes R. N. C, Fragoso D. B, Magalhaes L. C (2001). Abamectin resistance and synergism in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *International Journal of Pest Manage* 47:247–251.
- Sood, P., Mehta, P. K., Bhandari, K., and Prabhakar, C. S. (2010). Transmission and effect of sublethal infection of granulosis virus (PbGV) on *Pieris brassicae* Linn. (Pieridae: Lepidoptera). *Journal of Applied Entomology*. 134, 774–780. doi: 10.1111/j. 1439- 0418.2010.01514.x.
- Steineke, Susanne y Jehle, Johannes. (2004). Investigating the horizontal transmission of the *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) in a model system. *Biological Control*. 30. 538–545. 10.1016/j.biocontrol.2004.02.010.
- Steinhaus E. A. (1967). Principles of Insect Pathology. New York: McGraw-Hill.
- Thiem, S., Cheng, X. (2009). Baculovirus Host Range. *Virologica Sinica*. 24 (5): 436-457.
- Thompson C. G, Scott D. W, Wickman B. E. (1981). Long-term persistence of the nuclear poly- hedrosis virus of the Douglas-fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae), in forest soil. *Environmental Entomology*. 10:254–55.

- Torres, J. B., C. A. Faria, W. S. Evangelista, and D. Pratisoli. (2001). Within-plant distribution of the leaf miner *Tuta absoluta* (Meyrick) immatures in processing tomatoes, with notes on plant phenology. *International Journal of Pest Management* 47: 173-178.
- Tropea Garzia G (2009) *Physalis peruviana* L. (Solanaceae), a host plant of *Tuta absoluta* in Italy. *IOBC/WPRS Bulletin* 49:231–232.
- Urbaneja, A., González-Cabrera, J., Arnó, J., & Gabarra, R. (2012). *Prospects for the biological control of Tuta absoluta in tomatoes of the Mediterranean basin. Pest Management Science*, 68(9), 1215–1222. doi:10.1002/ps.3344
- Vaca-Vaca, Juan Carlos, Betancur-Pérez, Jhon Fredy, y López-López, Karina. (2012). Distribución y diversidad genética de Begomovirus que infectan tomate (*Solanum lycopersicum* L) en Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 60-76.
- Vasconcelos, S. D., Cory, J. S., Speight, M. R., & Williams, T. (1996). Host Stage Structure and Baculovirus Transmission in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae: A Laboratory Examination of Small-Scale Epizootics.
- Vercher, R., A. Calabuig, and C. Felipe. (2010). Ecología, muestreos y umbrales de *Tuta absoluta* (Meyrick). *Phytoma España* 217:23–26.
- Vezina A, Peterman R. (1985). Tests of the role of nuclear polyhedrosis virus in the population dynamics of its host, Douglas-fir tussock moth, *Orgyia pseudotsugata* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Oecologia* 67:260–66.
- Wang, P., Granados, R. (2000). Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 135-143.
- Williams, T., Virto, C., Murillo, R., y Caballero, P. (2017, July 17). Covert infection of insects by baculoviruses. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01337>.
- Wang, H., Wu, D., Deng, F., Peng, H., Chen, X., Lauzon, H., Arif, B. M., Jehle, J. A. & Hu, Z. (2004). Characterization and phylogenetic analysis of the chitinase gene from the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *Virus Research* 100, 179 - 189.
- Wu, G., Wu, J.Y., Shao, H.B., (2012). Hazardous heavy metal distribution in dahuofang catchment, fushun, liaoning, an important industry city in China: a case study. *Clean. - Soil, Air, Water* 40 (12), 1372–1375.





## **1.Capítulo 1**

**Parámetros biológicos de poblaciones de *Tuta absoluta* afectadas por infecciones de Baculovirus**

## 1.1 Resumen

El granulovirus de *Phthorimaea operculella* (*PhopGV*) representa un agente de control muy prometedor para el gusano cogollero del tomate (GCT), *Tuta absoluta*. Basado en un aislamiento nativo de Baculovirus dominado VG013, se desarrolló un prototipo del biopesticida que produjo una mortalidad de más del 90% en laboratorio. Teniendo en cuenta la importancia de estudiar las interacciones insecto-patógeno como un factor crucial para la optimización de bioplaguicidas, el objetivo de este estudio fue evaluar los efectos subletales de *PhopGV* VG013 sobre los parámetros biológicos de estados inmaduros y adultos del GCT. Larvas recién eclosionadas fueron sometidas a diferentes concentraciones del aislamiento VG013 para determinar la persistencia del virus entre estados del insecto y efecto a través de una generación. Se evaluó la mortalidad, longevidad y tasa de desarrollo. Los adultos sobrevivientes fueron apareados y se determinó la fecundidad y fertilidad. Las dosis por debajo de la concentración letal media ( $1,08 \times 10^4$  CI/ml) tuvieron un efecto muy prometedor ya que pueden reducir de manera significativa el potencial de crecimiento de las poblaciones plaga a mediano y largo plazo. Los efectos subletales en adultos sobrevivientes a la infección, fueron evidentes. Mediante qPCR se detectaron infecciones encubiertas en el 75% de adultos sobrevivientes a un inóculo ( $1 \times 10^4$  CI/ml) que mató el 46,6% de individuos en su estado larval.

**Palabras clave:** Efectos subletales, Persistencia, Infecciones encubiertas.

## 1.2 Introducción

La gran mayoría de estudios de patógenos en poblaciones de Lepidoptera se concentran en las tasas de mortalidad y sus causas directas. En este sentido, pocas veces se abordan aspectos relacionados con reproducción o la supervivencia de los individuos infectados (Fuxa y Tanada 1987) y se asume que el patógeno se comporta de la misma manera que un depredador (Boots y Norman 2000; Anderson y May 1981). Sin embargo, hay evidencia que sustenta que los individuos sobrevivientes a un patógeno rara vez eliminan el patógeno por completo y que las infecciones, con frecuencia causan efectos sub-letales considerables (Lipsitch et al., 1995; Simón et al., 2008; Vilaplana et al., 2008; Vilaplana et al., 2010). Estos efectos subletales pueden ser fecundidad reducida, tiempo de desarrollo

---

mayor, menor habilidad competitiva y alteración en la proporción de sexos (Vail and Hall 1969; Santiago- Alvarez y Vargas-Osuna 1986; Bell y Romine 1986; Sait et al., 1994; Patil et al. 1989; Myers J. 2001; Duan y Otvos 2001; Sorrel et al., 2009).

Los efectos subletales de las infecciones por patógenos, pueden ser cruciales en la dinámica poblacional de los lepidópteros (Anderson y May 1981; Myers 1993) y la gran mayoría de veces se pasan por alto a la hora de probar el potencial de la enfermedad como control de plagas agrícolas. Por ejemplo, el virus de la polilla gitana, *Lymantria dispar*, se considera el principal regulador natural de las densas poblaciones de esta polilla (Podgwaite 1981). Asimismo, los Baculovirus (BV) de la polilla del abeto Douglas, *Orgyia pseudotsugata*, constituyen un factor importante en el control de este insecto (Thompson 1978). Una vez que se entendió el papel que desempeñaban estos virus en el control de las poblaciones de insectos naturales, fueron tenidos en cuenta para una variedad de programas de control de insectos, particularmente de plagas forestales (Huber 1986) ya que inducen infecciones letales con una alta patogenicidad (Caballero et al., 2001; Cory y Myers 2003; Carpio et al., 2012; Cory 2015). Por esto, han recibido una atención considerable como candidatos de control biológico y bio-insecticidas (Rothman y Myers 1996).

El granulovirus PhopGV, aislado de individuos de *Phthorimaea operculella* es uno de los BV que se ha examinado para controlar esa plaga en varios países del mundo (Reed y Springett 1971; Lacey et al., 2010). En Perú, un aislado de PhopGV se desarrolló como insecticida para controlar poblaciones de *P. operculella* en papa almacenada (Raman et al., 1987, 1992). En Bolivia, se desarrolló el bioinsecticida Matapol® en una planta piloto, cuyo ingrediente activo es PhopGV. El producto fue efectivo para control de *P. operculella* y posteriormente se desarrolló una nueva formulación con PhopGV y *Bacillus thuringiensis* (Matapol Plus®) (Barea et al., 2002). En Brasil, un PhopGV nativo se evaluó para *P. operculella* y el gusano cogollero del tomate (GCT) *Tuta absoluta*. Este aislamiento se formuló como una suspensión líquida que, combinado con los productos NeemAzal™ y DalNeem™, produjeron una alta mortalidad de larvas y se usa para control en papa almacenada (Mascarin et al., 2010). En Colombia, al estar bien documentada la acción infectiva del PhopGV en el GCT y *Tecia solanivora* (Ángeles y Alcázar 1995; Cuartas et al., 2009), se desarrolló una formulación de PhopGV denominada “Baculovirus

CORPOICA”, a partir de la identificación de cinco aislamientos nativos de *T. solanivora* (Espinel-Correal et al., 2010), recomendada para el control de *T. solanivora* en papa almacenada. La formulación de PhopGV para control del GCT en Colombia continúa en desarrollo.

La implementación de técnicas sensibles como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR) y PCR en tiempo real y (qPCR), ha permitido evidenciar que los BV a menudo adquieren una estrategia de “baja virulencia” para transmitirse verticalmente cuando las condiciones para una transmisión horizontal son limitadas (Longworth & Cunningham 1968; Jurkovicova 1979; Hughes et al., 1993, 1997; Kukan y Myers 1999; Lin et al., 1999; Burden et al., 2002, 2003, 2006; Sorrel et al., 2009; Barrera et al., 2016). Esto les permite persistir dentro del hospedero sin mostrar síntomas evidentes (Williams et al., 2017). Por esto, se considera que las infecciones sub-letales tienen un papel importante en la persistencia de los virus entre poblaciones de Lepidoptera.

No obstante, la atención que recibieron los BV como agentes de control de plagas ha sido bajo la misma lógica de los insecticidas químicos. Las aplicaciones de los productos se diseñan con el fin de causar una mortalidad alta en un momento puntual, esto es, solo cuando la densidad poblacional de la plaga alcanza un punto crítico (Altieri y Nicholls, 2003). Lo que se pretende con esta investigación es determinar los efectos subletales de infecciones del aislamiento nativo del PhopGV (VG013) en poblaciones del GCT, con miras a generar epidemias persistentes que mantengan en equilibrio, a mediano y largo plazo, las poblaciones de la plaga. En este contexto, el objetivo de este capítulo es determinar el efecto de las diferentes infecciones sub-letales sobre los parámetros biológicos de poblaciones del GCT. Para esto se hicieron varios bioensayos con los que se construyeron tablas de vida, tablas de fecundidad y fertilidad de poblaciones del GCT sometidas a varias concentraciones del virus.

## 1.3 Materiales y métodos

### 1.3.1 Cría de insectos

Se obtuvo una colonia sana (sin virus) del GCT de la cría masiva del laboratorio de entomología localizada en el Centro de investigación Tibaitatá de Agrosavia, Mosquera, (Colombia, 4°41'31.3"N 74°12'08.3"W). Los insectos se criaron a  $25 \pm 3\text{C}^\circ$  y un fotoperiodo de 12:12 h (luz: oscuridad) con dieta natural (plantas de tomate).

### 1.3.2 Detección del virus

#### Amplificación aislamiento de granulovirus

El granulovirus del GCT, codificado como VG013, fue aislado previamente de larvas infectadas naturalmente y colectadas de cultivos de tomate (Espinel-Correal et al., 2010; Gómez-Valderrama et al., 2014). El aislamiento fue amplificado por la Planta de bioproductos del Centro de investigación Tibaitatá de Agrosavia en larvas de *Tecia solanivora*. Los CI del granulovirus a una concentración de  $1 \times 10^8$  CI/ml fueron asperjados sobre papel absorbente con huevos de *T. solanivora* (Gómez-Valderrama et al., 2018). Posteriormente, los huevos se incubaron y ubicaron en tubérculos de papa. Pasados 25 días, las larvas que presentaran síntomas (apariencia lechosa) fueron seleccionadas para la extracción viral. Los cadáveres de las larvas seleccionadas se homogeneizaron en una solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.1%. Las larvas se mezclaron y licuaron para liberar la mayor cantidad de partículas virales posibles. Se purificó la mezcla por filtración y centrifugación en solución salina (15000 rpm – 20 min). La suspensión viral se cuantificó por medidas de absorbancia a 280nm (NanoDrop 2000, ThermoFisher) usando una curva estándar previamente calibrada con stocks del granulovirus contados en un microscopio óptico y cámara de Neubauer (Gómez-Valderrama et al., 2018). La suspensión viral se almacenó a  $4\text{C}^\circ$  y se usó como stock para los experimentos subsiguientes.

#### Clonación de ADN

Para la extracción de ADN de virus puro se utilizó el protocolo descrito por Barrera et al. (2016), con algunas modificaciones. Para esto, se mezcló 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión viral ajustada a  $10^8$  CI/ml con 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,5 M), 50  $\mu\text{l}$  de SDS al 10% y 250  $\mu\text{l}$  de agua

ultra pura, luego se incubó durante 10 min a 60°C. El sobrenadante que contenía los viriones fue tratado con 25 µl de proteinasa K (20 mg/ml) durante 1 hora a 56°C. La extracción de ADN viral se realizó mediante dos pases con 500 µl de fenol saturado (pH 7.6-7.9) y uno con 500 µl de cloroformo, utilizando centrifugaciones intermedias a 3000 rpm durante 5 min. La precipitación del ADN se realizó con etanol y acetato de sodio 3 M.

Al extraer el ADN se obtienen todos los genes de virus. Sin embargo, el gen que es de interés es aquel que codifica la proteína *granulina*. Para amplificar únicamente el gen completo de *granulina* se utilizaron los cebadores diseñados por Barrera et al. (2009):

Gran-F: 5'-TCCTCGGTTACCATGTACTG-3'

Gran-R: 5'- CACTTGCGTCATCGACAA- 3'

Para esto, se mezclaron 3 µl de ADN con 12,5 µl de GoTaq® qPCR Master mix, 1 µl de Gran-F, 1 µl de Gran-R y 7,5 µl de agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las del programa Amplitaq 360 (Tabla 1.1)

Tabla 1.1 Condiciones de amplificación gen de granulina.

Temperatura	Tiempo	Paso
94°C	3 minutos	<i>Desnaturalización</i>
95°C	30 segundos	
55°C	30 segundos x 35	<i>Anillaje</i>
72°C	1 minutos	<i>Extensión</i>
72°C	7 min	
4°C	∞	

Se hizo una purificación del producto de PCR con el kit de Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, ya que presentaba restos de primers, dNTPs, enzimas y demás compuestos usados en la PCR. Se hizo la ligación del “clean up” (producto de PCR purificado) directamente a un plásmido vector pCR 4.0-TOPO utilizando el Kit TOPO TA

(Invitrogen K4500-01). El plásmido con el producto de PCR se insertó en células de *Escherichia coli* quimiocompetentes Top10 (Invitrogen K4500-40) para que las propias bacterias hicieran la replicación masiva del plásmido y por ende del gen que codifica *granulina*.

Se sembraron varias colonias en medio sólido Luria Bertani-LB con agar y ampicilina. Los clones que sobrevivieron al antibiótico se seleccionaron y se crecieron en medio líquido Luria Bertani-LB con ampicilina (10 µg/ml) a 37°C por 14 horas. El ADN de los plásmidos se extrajo con el PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit de Invitrogen. La cuantificación de los ácidos nucleicos (ng/µl) se realizó por medidas de absorbancia a 280nm. Se verificó la presencia del inserto del gen completo de *granulina* mediante una digestión que consistió en incubar a 37°C durante 2 horas y 65°C durante 5 minutos de inactivación, una mix de: 2 µL de Buffer H, 0.5 µL de BSA 10x, 0.5 µL de la Enzima de restricción EcoRI, 5 µL de ADN y 12 µL de agua.

### Curva de referencia qPCR

El ADN se utilizó para los controles positivos de la técnica q-PCR y el número de copias del gen por µl para las diluciones de ADN plasmídico se estimó mediante la fórmula aportada por el Centro de secuenciación y genómica de la universidad de Rhode Island.

$$\text{Copias del gen} = \frac{\text{Concentración ADN} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) * \text{No de Avogadro}}{\text{Longitud del ADN (pb)} * 1 \times 10^9 * 650} \quad (1.1)$$

Las curvas estándar se construyeron a partir de un ciclo umbral (threshold cycle ct) calculado para  $\log^{10}$  copias del gen. La PCR en tiempo real es capaz de amplificar y a la vez cuantificar de forma absoluta el producto de ADN debido a la fluorescencia (directamente proporcional a la cantidad). A mayor número de copias iniciales de la muestra de ADN, más rápido se detecta el incremento exponencial de la fluorescencia (Cerón, J., 2012). Sin embargo, factores como el tipo de polimerasa y la concentración de

la sonda son críticos a la hora de evitar errores en el desarrollo de la prueba, por lo que se utilizó la metodología ya estandarizada de Barrera *et al.*, (2016).

### **Protocolo de detección viral en las muestras**

Usando pistilos plásticos y tubos eppendorf de 1.5 ml, cada muestra fue macerada en 100  $\mu$ L de agua ultrapura. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 3.500 rpm por 5 min para separar el tejido grueso del insecto. Se recuperó el sobrenadante y se sometió a un proceso de desnaturalización a 95°C por 5 min en baño serológico para romper los enlaces de hidrógeno de los nucleótidos. La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 25  $\mu$ l utilizando: 1) 12.5  $\mu$ l de GoTaq qPCR Master Mix (Promega ®), 2) 6.5  $\mu$ l de una sonda específica para el gen que codifica para granulina, 3) 1  $\mu$ l de agua ultrapura, y 4) 5  $\mu$ l de la suspensión diluida en 1: 10 del sobrenadante obtenido de los individuos macerados. Cada reacción se montó tres veces y se utilizó la curva patrón desarrollada previamente, la cual se diseñó con 6 concentraciones de ADN plasmídico con un inserto del gen que codifica para granulina.

## **1.3.3 Ensayos biológicos**

### **Persistencia del granulovirus entre estados**

El experimento se realizó en un cuarto de laboratorio con temperatura  $25 \pm 2$  °C y humedad relativa  $60 \pm 5\%$ . Se aplicó una concentración de  $1 \times 10^4$  CI/ml en foliolos de plantas de tomate con un nebulizador (Gómez Valderrama *et al.*, 2018; Carrera *et al.*, 2008). Se ubicaron 3 foliolos inoculados en cajas Petri donde 3 larvas neonatas del GCT se ubicaron usando un pincel fino. Se hizo un grupo de 10 cajas Petri para el tratamiento y otro para el control con hojas limpias. Se registró diariamente la mortalidad y desarrollo. Los individuos se criaron hasta estado adulto. Inmediatamente emergieron los adultos, se les hizo qPCR para verificar la persistencia del granulovirus entre estados.

### Tabla de vida

El experimento fue establecido en un cuarto de laboratorio con temperatura y humedad relativa controlada, las cuales fueron fijadas en  $25 \pm 2$  °C y  $60 \pm 5\%$ , respectivamente. Se definieron 7 tratamientos que incluyeron 6 diferentes concentraciones del aislamiento GV013, más un control que consistió en una población del GCT libre de virus. Las concentraciones del virus usadas para este experimento fueron establecidas de acuerdo con experimentos previos llevados a cabo por Gómez-Valderrama et al. (2018) y fueron las siguientes:  $3.2 \times 10^3$  CI/ml (tratamiento 1),  $1.6 \times 10^4$  CI/ml (tratamiento 2),  $8 \times 10^4$  CI/ml (tratamiento 3),  $4 \times 10^5$  CI/ml (tratamiento 4),  $2 \times 10^6$  CI/ml (tratamiento 5), y  $1 \times 10^7$  CI/ml (tratamiento 6). Para cada tratamiento, se individualizaron 100 larvas recién eclosionadas en copas de 3 x 3 cm en las que se introdujeron foliolos de plantas de tomate (Figura 1.1). Los tratamientos se aplicaron directamente sobre los foliolos en dosis de 4 ml por foliolo, 2 ml en el haz y 2 ml en el envés con un nebulizador. Se registró diariamente la mortalidad y el desarrollo entre estados de cada larva.



Figura 1.1 Montaje experimento para determinar los parámetros biológicos del gusano cogollero del tomate, *Tuta absoluta*.

## Fecundidad y fertilidad

Los individuos que llegaron a estado adulto fueron sexados siguiendo los caracteres propuestos por Genç (2016). Los adultos de cada tratamiento se llevaron a cámaras de cópula y oviposición. Se registró diariamente la mortalidad de adultos, el número de huevos (fecundidad) y la cantidad de larvas que nacieron en la segunda generación (fertilidad). Las cámaras de cópula consistían en un frasco de vidrio cubierto en su abertura con malla fina invertido sobre papel absorbente para que las hembras ovipositaran. Los huevos se contaron en el papel absorbente con un microscopio óptico. Los adultos y las larvas de la segunda generación se mantuvieron en refrigeración. Se les hizo la qPCR a 53 de los adultos obtenidos de este experimento (10 de cada tratamiento, excepto para los tratamientos 5 y 6 en los que sólo se obtuvieron dos y un adulto, respectivamente) una vez murieron.

### 1.3.4 Análisis de datos

Se seleccionó un modelo dosis-respuesta en los que la variable independiente es la dosis o concentración mientras que la variable dependiente es la respuesta o efecto. Para determinar la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) del aislado VG013 en individuos del GCT, se ajustó el modelo Log-logístico (Ecuación 1.2) con 4 parámetros donde el coeficiente  $b$  denota la pendiente de la curva,  $c$ ,  $d$  son límites de respuesta inferior y superior, 0 y 1 respectivamente, y  $\hat{e}$  es el logaritmo de la  $CL_{50}$  (Ritz et al. 2016). Incluir la  $CL_{50}$  como un parámetro explícito del modelo evita incurrir en procedimientos mucho más elaborados, como la regresión inversa, para estimarlo. El intervalo de confianza al 95% de la  $CL_{50}$  se estimó re-escalando el valor de la ecuación usando una transformación de vuelta de los valores estimados en escala logarítmica (Ritz et al., 2016).

$$f(x, (b, c, d, \hat{e})) = c + \frac{d-c}{(1+\exp(b(\log(x)-\hat{e})))} \quad (1.2)$$

Para cada tratamiento, se construyó una tabla de vida que incluyó la supervivencia hasta cada estado (larva, pupa y adulto),  $lx$ , y dentro de cada estado,  $Sx$ . Para los tratamientos

en los que se obtuvo un número suficiente de adultos, se calculó la fecundidad por hembra ( $F_x$ ). Se obtuvo, además, estimados del tiempo promedio, en días, que tarda un individuo en alcanzar su edad reproductiva (tiempo desde larva hasta adulto),  $T$ , para cada tratamiento. Con las tablas de vida, se calculó la tasa intrínseca de crecimiento,  $r_m$ , de las poblaciones del GCT expuestas a los diferentes tratamientos, utilizando métodos numéricos para resolver la siguiente igualdad (Begon et al., 2006):

$$l_x F_x \exp(-r_m (T + 1)) = 1 \quad (1.3).$$

Los valores de  $r_m$  y  $T$  hallados se usaron para comparar la viabilidad de las poblaciones del GCT, bajo diferentes niveles de estrés biótico, y el potencial del uso de VG013 para un control sostenible de la plaga. La estimación de parámetros se llevó a cabo usando el software R (versión 3.5.1) y se utilizó la función “optim” para hallar el valor de  $r_m$ .

Para la tasa de desarrollo,  $TD$  [definida como el inverso del tiempo de desarrollo y que, por tanto, mide la porción de desarrollo avanzada por unidad de tiempo (Pedigo, 1996)], se ajustó un modelo Michaelis-Menten en escala logarítmica (Ecuación 1.4) con 3 parámetros, donde  $x$  es la concentración viral.

$$TD = c + \frac{d-c}{1+\frac{e}{x}} \quad (1.4),$$

donde  $c$ ,  $d$  y  $e$  son parámetros que se estiman de los datos. Se utilizaron los datos de fecundidad y fertilidad para construir un modelo Michaelis-Menten que explicara la tasa intrínseca de crecimiento ( $r_m$ ) de la población en función de la concentración viral. La tasa intrínseca de crecimiento en función de la concentración viral se modeló usando la Ecuación 1.4. El siguiente (ver Ecuación (1.5)) es un método alternativo al método numérico de la Ecuación (1.2) para calcular  $r_m$

$$r_m = \log (\sum l_x F_x) / T \quad (1.5)$$

Donde  $l_x$  es la supervivencia,  $F_x$  corresponde a la fecundidad y  $T$  es el tiempo promedio que tardan los individuos en alcanzar la edad reproductiva (en días). Para construir el modelo, la variabilidad de los valores de  $r_m$  en cada concentración se estimó con la técnica Jackknife usando los valores de  $T$  de cada individuo.

## 1.4 Resultados

### 1.4.1 Detección de virus

Los cebadores diseñados para amplificar el gen de *granulina* de 750 pb, permitieron tener una amplicón utilizando ADN genómico de granulovirus proveniente de *T. absoluta*. En la Figura 1.2 A se observa la electroforesis en gel de agarosa al 1% con un producto de amplificación del gen *gran*. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular Thermo Scientific™ de ADN GeneRuler™ de 1 kb, en el segundo carril está el control negativo compuesto de agua libre de nucleasas y el tercer carril muestra el producto de amplificación del gen *gran* del ADN extraído. En ambos carriles se observan impurezas de la PCR en la parte inferior. Se hizo una purificación del producto de PCR y se verificó con por medio de una electroforesis (Figura 1.2 B).

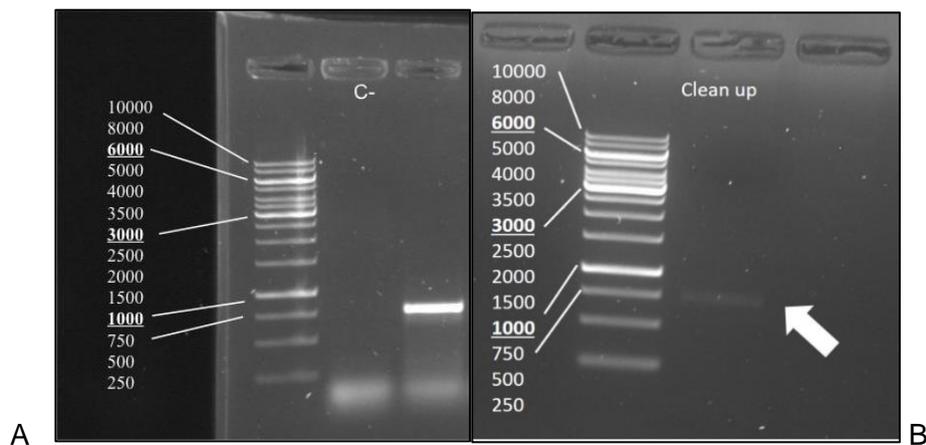


Figura 1.2 (A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con producto de amplificación del gen *gran*. (B): Purificación de producto de amplificación gen *gran*

Se hizo 15 clones a los que se les extrajo el ADN plasmídico. Luego de la digestión se observa el plásmido de 3956 pb y el inserto de *granulina* de 750 pb dividido en dos fragmentos indicando que hay un sitio de reconocimiento de la enzima en el gen de *granulina* (Figura 1.3).

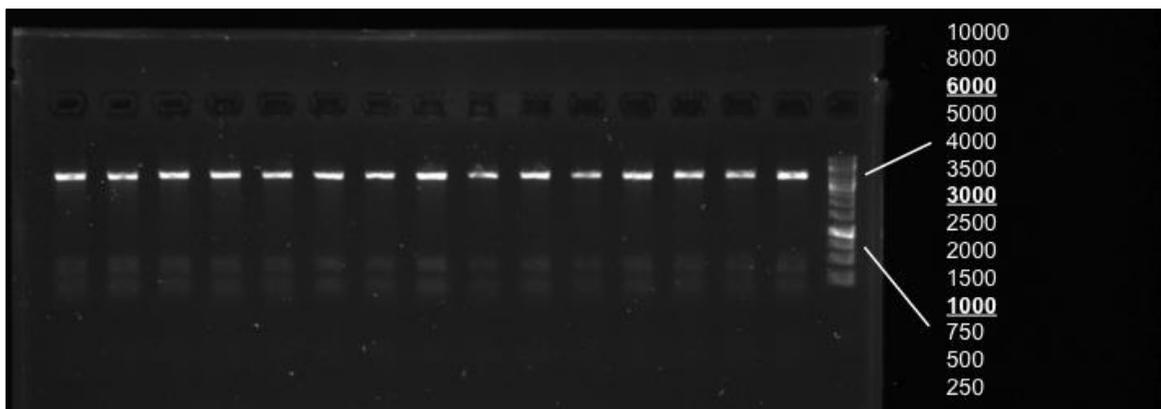


Figura 1.3 Digestión de los plásmidos con enzima de restricción EcoRI la cual posee dos sitios de corte.

Luego de confirmar que la clonación se realizó correctamente, se mezclaron todos los clones y se midió la concentración de ADN plasmídico por espectrofotometría que fue de 40.4 nanogramos por microlitro (ng/μl), como la longitud del vector PCR 4.0-TOPO es de 3956 pb, el número total de copias del gen es de  $4.73 \times 10^{10}$

### Curva de referencia qPCR

En los resultados de la PCR en tiempo real se observan las curvas de amplificación dadas por el crecimiento exponencial de las copias del gen ubicadas en el eje de las ordenadas vs el número de los ciclos de la reacción en el eje de las abscisas (Figura 1.4). La curva de amplificación cuenta con una línea paralela al eje de las abscisas conocida como línea base, esta línea corta la curva de amplificación en el punto en el que la fluorescencia provocada por la reacción alcanza el nivel exponencial.

Para cuantificar el gen *gran* se utilizaron diluciones seriadas del ADN plasmídico con el inserto del gen completo, con las que se estandarizó una recta estándar o patrón (Figura 1.5). Con esta recta se determinó la mínima dilución en la cual se observó amplificación, la cual es  $4,73 \times 10^2$  copias del gen que corresponden a 0.000004 ng de ADN. Este valor fue usado para establecer el límite de 32 ciclos; todas las muestras con un valor de Cq mayor se consideró negativo, mientras que todas las muestras con un número menor de

ciclos y que mostraran un solo pico a la temperatura de fusión (72°C) se consideraron positivas

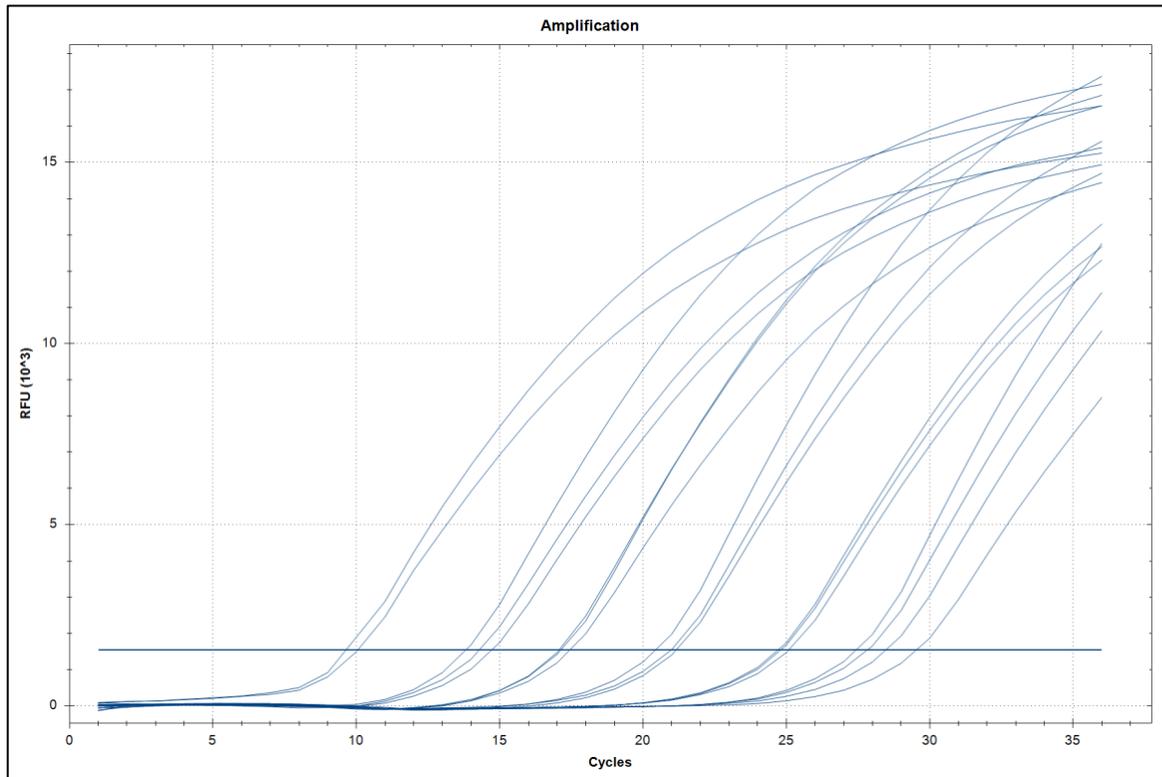


Figura 1.4 Curva de amplificación qPCR de diluciones seriadas de ADN plasmídico con un inserto del gen de granulina

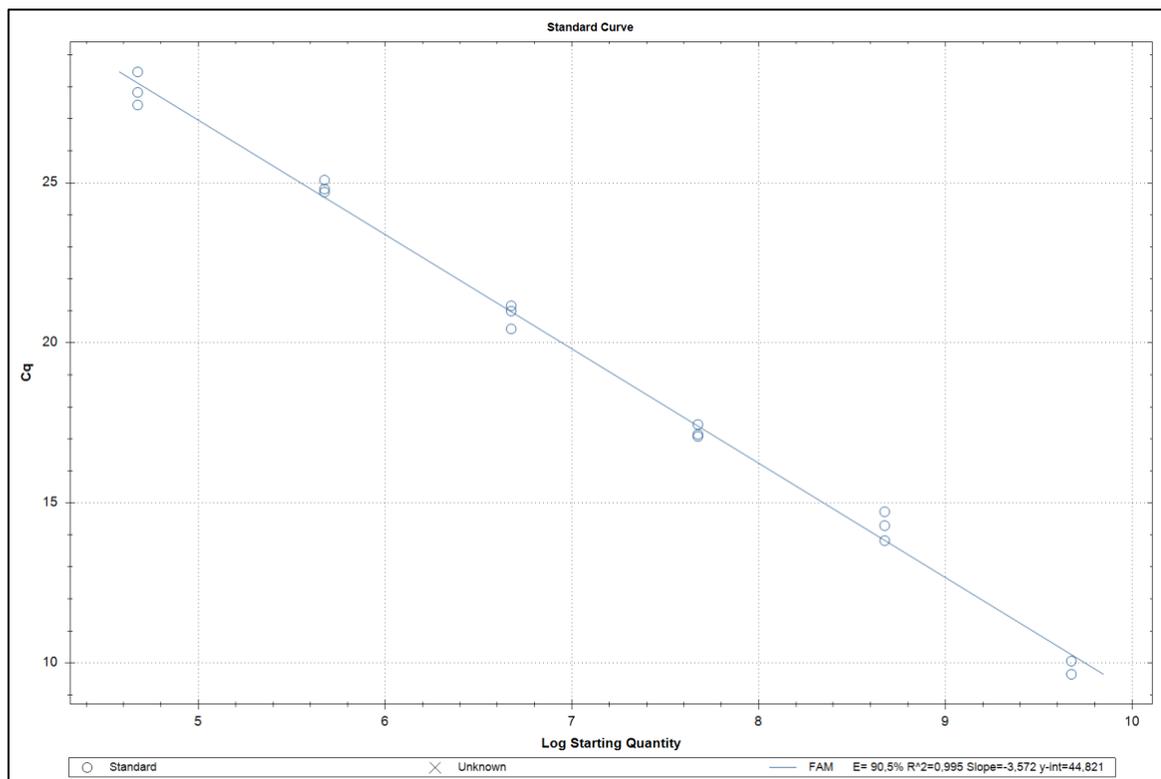


Figura 1.5 Curva patrón de qPCR basada en 6 estándares del gen de granulina

La curva de calibración fue verificada mediante el valor de coeficiente de correlación ( $R^2 = 0,99$ , eficiencia mayor a 90% y el valor de la pendiente (-3,572) según lo recomendado por Bustin (2002) y Whelan et al., (2003). La reproducibilidad de la curva se evaluó haciendo 4 ensayos de amplificación, además de 3 réplicas de cada ADN en cada prueba. La desviación estándar fue baja y no mayor a 1 (Tabla 1.2), lo cual evidenció que la técnica fue reproducible.

#### 1.4.2 Persistencia del granulovirus entre estados

De los 30 individuos sometidos al virus en el primer ensayo, 14 murieron a causa de la infección evidente del virus y los 16 restantes alcanzaron el estado adulto sin presentar ningún tipo de síntoma asociado a la infección viral. En el control, la mortalidad fue mucho menor, únicamente 6 de los 30 individuos no alcanzaron el estado adulto.

La qPCR se les aplicó a todos los individuos que lograron llegar a estado adulto. A ninguno de los adultos del control se le detectó presencia viral mientras que a 12 de los 16 adultos obtenidos del tratamiento, se les detectó persistencia del virus.

Con el fin de determinar si la infección persiste en los adultos durante todo su periodo de vida, se seleccionaron al azar 10 adultos de cada tratamiento del experimento de tabla de vida una vez estos murieron por causas naturales relacionadas con la senescencia (9 a 11 días). De los 53 individuos a los que se les hizo la qPCR, solo a 1 del tratamiento 1 ( $3.2 \times 10^3$  CI/ml) se le detectó persistencia del virus.

Estos resultados sustentan la predicción de que las infecciones encubiertas de PhopGV en larvas de *T. absoluta* se conservan hasta el estado adulto. Sin embargo, el virus no fue detectado en individuos que murieron 10 días en promedio después de la emergencia. Esto se puede deber a que el virus no puede replicarse en los adultos de *T. absoluta*, por lo que la concentración se va perdiendo con el tiempo de vida del insecto infectado. Esta, sin embargo, es una hipótesis que requiere ser probada.

### **1.4.3 Efecto de concentraciones virales sobre poblaciones de *Tuta absoluta***

El aislamiento de PhopGV produjo los síntomas típicos de infección como pérdida de capacidad de movimiento, una tasa de alimentación reducida, cambio de color verde a un blanco lechoso y cuerpo flácido (Lacey et al., 2011; Gómez-Valderrama et al., 2018) (Figura 1.6). La concentración letal media del virus fue de  $1,08 \times 10^4$  CI/ml (intervalo de confianza [ $9,6 \times 10^3$ ,  $1,2 \times 10^6$ ]) (Figura 1.7). El efecto de la dosis sobre la mortalidad es estadísticamente significativo ( $P = 0,00012$ ) (Tabla 1.3). Es importante mencionar que la mortalidad natural del control fue del 25%, valores muy similares a los reportados por Mascarín et al. (2010) ( $27,8 \pm 10,1\%$ ) indicando la confianza del método de nuestros bioensayos.

Tabla 1.2 Desviación estándar de Ct de las corridas para los estándares de granulina en tres repeticiones en el tiempo

Estándar Copias del gen/ul	$\sigma$ Ct Repetición 1	$\sigma$ Ct Repetición 2	$\sigma$ Ct Repetición 3	$\sigma$ Ct Repetición 4
$4,73 \times 10^9$	0,401	0,542	0,140	0,052
$4,73 \times 10^8$	0,294	0,624	0,119	0,119
$4,73 \times 10^7$	0,473	0,401	0,223	0,108
$4,73 \times 10^6$	0,244	0,406	0,040	0,123
$4,73 \times 10^5$	0,336	0,560	0,225	0,140
$4,73 \times 10^4$	0,176	0,271	0,072	0,113
$4,73 \times 10^3$	0,537	0,218	0,113	0,117



Figura 1.6 Larvas de *Tuta absoluta* sana (izq) e infectada (der) con VG013

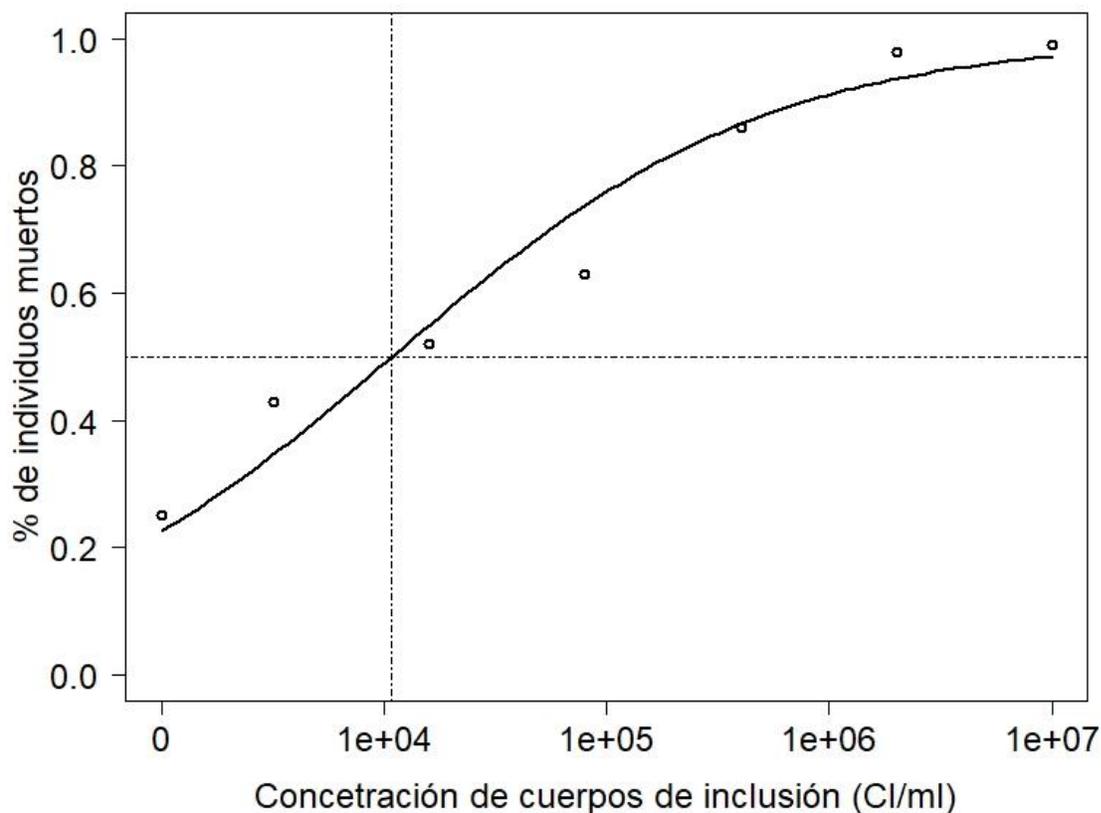


Figura 1.7 Efecto de la concentración de VG013 sobre la mortalidad de individuos de *Tuta absoluta*. La línea continua representa el modelo log-logístico de dosis-respuesta, y la intersección de las dos líneas punteadas denota la CL50 estimada por el modelo.

Tabla 1.3 Estimaciones de parámetros del modelo log-logístico de dosis-respuesta.

Parámetro	Estimado	Std. Error	Valor - t	Valor - p		
b: intercepto	-0.517	0.493	-1.05	2.9e-01		
e: intercepto	9.290	2.410	3.86	1.2e-04 ***		
Signif. Codes	0 '***'	1e-03 '**'	1e-02 '*'	5e-02 '.'	0.1 ''	1

Además de la supervivencia, se encontró que la fecundidad de los individuos del GCT sobrevivientes a la infección de PhopGV se ve afectada significativamente por la concentración de virus al que son expuestos (Tabla 1.4). En general, se observa que el estado más susceptible a la infección es el de larva, en el cual se observa una mayor mortalidad a través de todas las concentraciones. Sin embargo, la reducción abrupta en la supervivencia entre el tratamiento 2 y 3, se debe esencialmente a una alta mortalidad durante el estado de pupa (Tabla 1.4).

No se logró obtener información relacionada a la fecundidad en los tratamientos 5 y 6 debido a la baja cantidad de adultos que sobrevivieron (Tabla 1.4). No obstante, se observó que la tendencia es a una reducción apreciable de la cantidad de huevos por hembra (Figura 1.8) y las larvas de la segunda generación, a concentraciones por encima de  $8 \times 10^4$  CI/ml (Figura 1.9).

Tabla 1.4 Tablas de vida de poblaciones de *Tuta absoluta* expuestas a diferentes concentraciones de cuerpos de inclusión (CI) del granulovirus VG013 a  $25 \pm 2$  °C y humedad relativa  $60 \pm 5$  %. Nx: Número de individuos en el estado x, lx: proporción de sobrevivientes

Estado	Control				T1 ( $3.2 \times 10^3$ CI/ml)				T2 ( $1.6 \times 10^4$ CI/ml)				T3 ( $8 \times 10^4$ CI/ml)			
	Nx	lx	Sx	Fx	Nx	lx	Sx	Fx	Nx	lx	Sx	Fx	Nx	lx	Sx	Fx
Larva	100	1.00	0.80	-	100	1.00	0.71	-	100	1.00	0.71	-	100	1.00	0.40	-
Pupa	80	0.80	0.94	-	71	0.71	0.80	-	71	0.71	0.68	-	40	0.40	0.93	-
Adulto	75	0.75	0.00	57.8757	0.57	0.00	59.4248	0.48	0.00	31.3937	0.37	0.00	40.04			

Estado	T4 ( $4 \times 10^5$ CI/ml)				T5 ( $2 \times 10^6$ CI/ml)				T6 ( $1 \times 10^7$ CI/ml)			
	Nx	lx	Sx	Fx	Nx	lx	Sx	Fx	Nx	lx	Sx	Fx
Larva	100	1.00	0.23	-	100	1.00	0.06	-	100	1.00	0.04	-
Pupa	23	0.23	0.61	-	6	0.06	0.33	-	4	0.04	0.25	-
Adulto	14	0.14	0.00	33.632	0.02	0.00	-		1	0.01	0.00	-

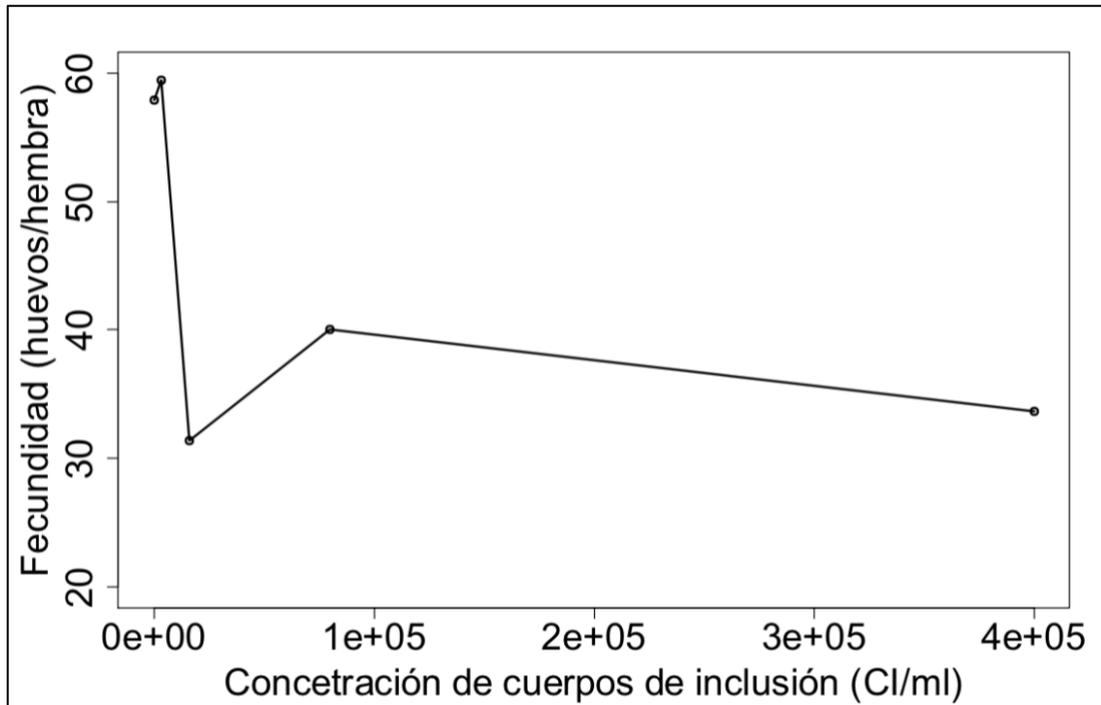


Figura 1.8 Relación entre la concentración viral (CI/ml) y la fecundidad de las hembras de *Tuta absoluta* que sobrevivieron a la infección de VG013.

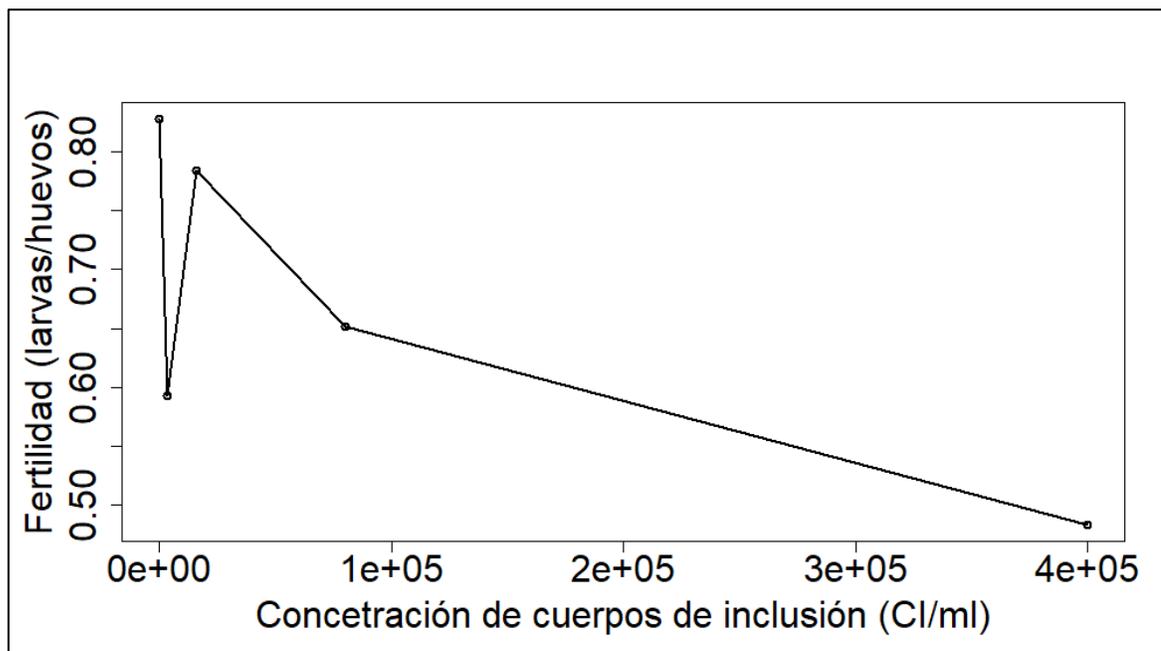


Figura 1.9 Relación entre concentración (CI/ml) y fertilidad de las hembras de *Tuta absoluta* que sobrevivieron a la infección de VG013

Se encontró que el tiempo de desarrollo desde larva hasta adulto se ve afectado por la concentración viral a la que fueron expuestas las larvas del CGT. Pese a que se encontró que el patrón general es una relación directa entre la concentración y el tiempo de desarrollo, se observó que concentraciones bajas (tratamientos 1 y 2) pueden causar una reducción en el tiempo de desarrollo del insecto. Este fenómeno de respuesta sigue un patrón de hormesis (Luckey 1991; Calabrese E. J. y Baldwin L. A., 1999; Calabrese E. J. y Baldwin L. A. 2002), el cual se caracteriza por una estimulación a dosis bajas.

Para ajustar el modelo Michaelis-Menten se usó el tiempo de desarrollo de cada individuo ya que existe variabilidad en cada punto, esto es, entre individuos. La Figura 1.10 muestra los promedios y los errores estándar de las tasas de desarrollo por tratamiento. En la Figura 1.11 se muestra el modelo Michaelis-Menten ajustado a los datos en escala logarítmica debido a que hace más fácil visualizar la tendencia. Este modelo se escogió debido a que modela respuestas a estímulos con hormesis.

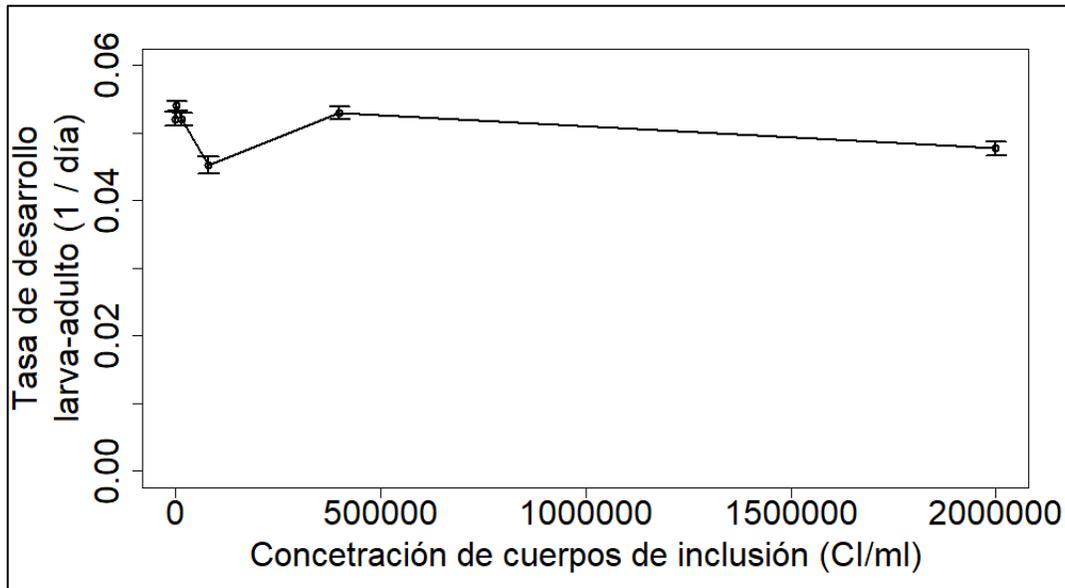


Figura 1.10 Tasa de desarrollo promedio de individuos de *Tuta absoluta* sometidos a diferentes concentraciones de VG013.

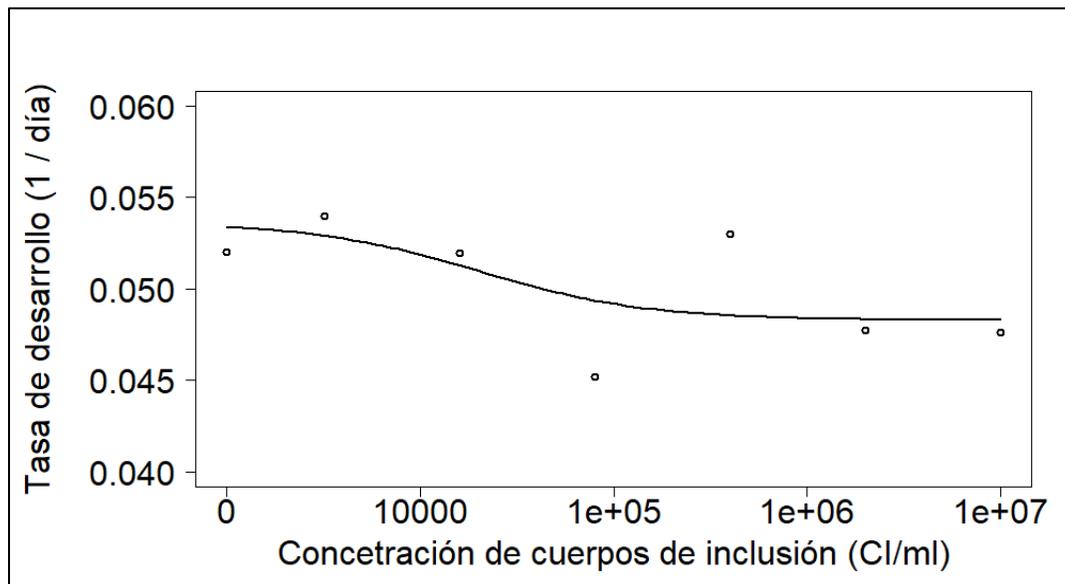


Figura 1.11 Modelo Michaelis-Menten ajustado a la tasa de desarrollo de individuos de *Tuta absoluta* en función de las concentraciones del aislamiento VG013. Los puntos representan los promedios por tratamiento.

Tabla 1.5 Estimación de parámetros modelo Michaelis-Menten ajustado a la tasa de desarrollo de poblaciones del GCT a diferentes concentraciones de VG013

Parámetro	Estimado	Error stnd	Valor- t	Valor- p
c:	5.3638e-02	6.7094e-04	79.9450	<2e-16 ***
d:	4.8292e-02	1.2298e-03	39.2679	<2e-16 ***
e:	2.0355e+04	1.1364e+04	1.7912	0.0741

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Error estándar residual:: 0.008619711 (363 grados de libertad)

### Tasa intrínseca de crecimiento

A pesar de no poder construir un modelo para explicar la fecundidad y fertilidad, estos datos se pudieron utilizar para construir uno que describiera el ritmo de crecimiento de la población en función de la concentración del virus en escala logarítmica. La  $r_m$  no tiene desviación debido a que posee sólo un punto por concentración y tiene un comportamiento, al igual que la tasa de desarrollo, de hormesis. Por lo tanto, se ajustó el mismo modelo de Michaelis-Menten usando la variabilidad de los datos de tiempo de desarrollo de los individuos (Figura 1.12). Se encontró que la  $r_m$  disminuye con el incremento en la concentración viral a la que fueron expuestas las larvas ( $P < 0.001$ ) (Tabla 1.6; Figura 1.12).

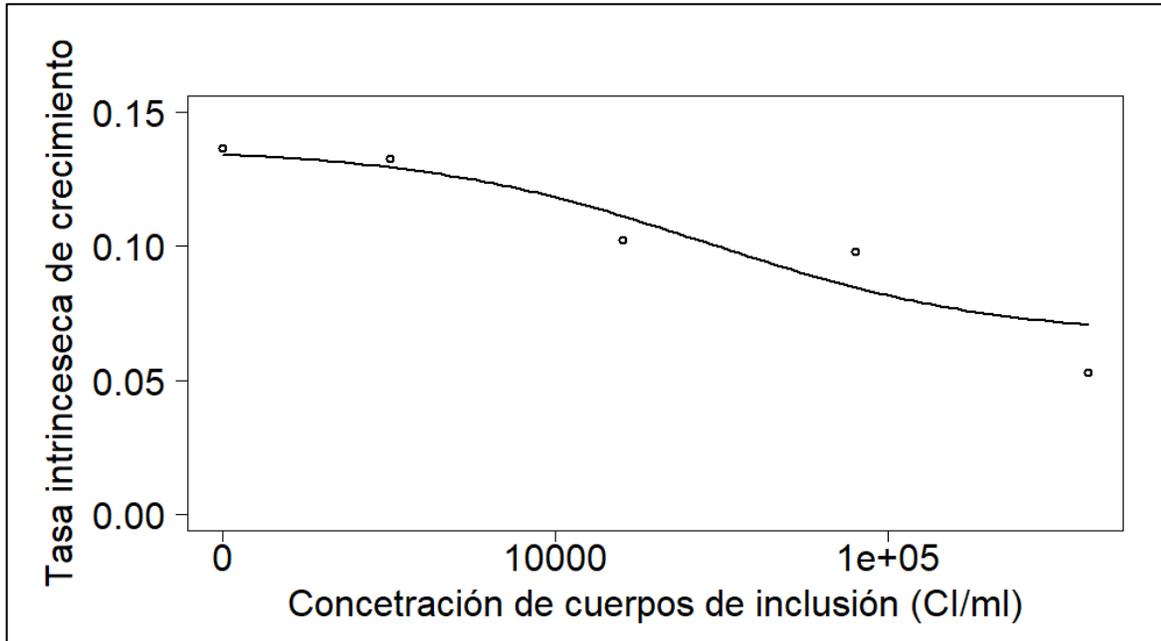


Figura 1.12 Modelo Michaelis-Menten ajustado a los datos de tasa intrínseca de crecimiento de poblaciones de *Tuta absoluta* en función de la concentración de VG013 en escala logarítmica.

Tabla 1.6 Estimación de parámetros modelo Michaelis-Menten ajustado a la tasa de desarrollo, fecundidad y mortalidad de poblaciones de *Tuta absoluta* sometidas a diferentes concentraciones de VG013

Parámetro	Estimado	Error Std.	valor-t	valor-p
c:	1.3657e-01	9.4944e-04	143.8419	< 2.2e-16 ***
d:	6.5939e-02	2.9779e-03	22.1430	< 2.2e-16 ***
e:	2.8538e+04	4.5009e+03	6.3406	1.214e-09 ***

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Error estándar residual: 0.008187398 (228 grados de libertad)

## 1.5 Discusión

La implementación y desarrollo de herramientas moleculares altamente sensibles ha permitido detectar infecciones encubiertas de baculovirus en insectos tanto en laboratorio como en poblaciones naturales (Vilaplana et al., 2010). Se ha evidenciado que los nucleopoliedrovirus y granulovirus pueden desarrollar infecciones subletales y que el hecho de que se mantengan hasta el estado adulto es dependiente de la dosis (Burden et al., 2002; Cabodevilla et al., 2001). En el presente estudio se reporta la persistencia entre estados y los efectos de infecciones subletales del aislamiento VG013 de PhopGV en poblaciones del GCT. Se detectaron infecciones persistentes en el 75% de adultos sobrevivientes a un inóculo ( $1 \times 10^4$  CI/ml) que mató el 46,6% de individuos en su estado larval. A ningún adulto del tratamiento control se le detectó (mediante qPCR) la presencia del virus, lo que sugiere que la colonia con la que se llevó a cabo este estudio estaba sana.

La  $CL_{50}$  ( $1,08 \times 10^4$  CI/ml) obtenida en este estudio mostró valores similares a los reportados por Gómez-Valderrama et al. (2018) de  $1,6 \times 10^4$  CI/ml y Mascarín et al. (2010) de  $1,05 \times 10^4$  CI/ml. Estos valores evidencian que VG013 es altamente patógeno al GCT. La tendencia general es que la tasa de desarrollo disminuyó a medida que las larvas eran sometidas a concentraciones cada vez más altas. Se ha demostrado que los Baculovirus pueden disminuir los niveles de ecdisteroides en la hemolinfa de la larva a través del gen ecdisteroide UDP-glucosiltransferasa (EGT) causando retraso en la pupación (O'Reilly, 1995). Sin embargo, se observó que concentraciones muy bajas, tratamientos 1 y 2, pueden causar un aumento en la tasa de desarrollo del insecto (Figura 1.12). Este fue un resultado interesante ya que los recursos que las larvas deben invertir en fortalecer su sistema inmune y defenderse del patógeno deberían reducir los recursos y la energía necesaria para el desarrollo (Klowden, 2013). Los Baculovirus, como el PhopGV, son virus que atacan primordialmente células del sistema digestivo (Williams et al., 2017), el cual se disuelve una vez las larvas entran en estado de pupa (Williams y Adkinsson, 1964; Klowden, 2013). Es posible que acelerar la entrada en estado de pupa sea un mecanismo de defensa del insecto para eliminar la infección cuando la concentración de ésta es muy baja y controlable. Al evitar una mayor duración del estado de larva, estado con una mayor exposición a patógenos, depredadores y parasitoides (Lewis et al., 1997); se asegura la

supervivencia y el traspaso de material genético a la siguiente generación. No obstante, esta hipótesis aún requiere ser probada de forma experimental.

El efecto que tienen las concentraciones más altas (tratamientos 5 y 6) sobre la duración del estado inmaduro y tasa de desarrollo del GCT (Figura 1.12) tiene implicaciones muy importantes para el manejo de la plaga. En primer lugar, un incremento en la duración del estado de larva incrementaría de manera significativa la probabilidad de que los individuos entren en contacto con más virus, ya sea porque se alimentan de más hojas contaminadas o porque el virus se replica en mayor cantidad dentro del individuo. Una mayor duración en este estado también hace que tengan mayor exposición a controles intrínsecos del agroecosistema aumentando la mortalidad de la población, debido a que es menos móvil y más susceptible del insecto (Lewis et al., 1997). En segundo lugar, un incremento en la duración del estado de larva retrasaría la emergencia de adultos en el cultivo, reduciendo o suprimiendo la cantidad de individuos que se generen por la reproducción de adultos dentro del cultivo. Además, en varias especies de lepidópteros, se sabe que individuos más pequeños se ven altamente afectados por competencia intraespecífica, lo que a mediano y largo plazo es una desventaja. Las larvas afectadas subletalmente, que toman más tiempo para desarrollarse, son aún más propensas a ser excluidas por este tipo de competencia. La reducción en la adquisición de nutrientes ha mostrado un incremento en la incidencia de enfermedades entre individuos tratados con granulovirus (David y Gardner 1965; David y Taylor 1977; Sait et al., 1994).

El único tratamiento que no siguió la tendencia entre tasa de desarrollo y concentración viral, fue el tratamiento 4 ( $4 \times 10^5$  CI/ml). Esto se puede deber a la aleatorización y heterogeneidad del hecho que los individuos están consumiendo diferentes concentraciones de virus. Probablemente una cohorte de larvas al alimentarse, adquirió una concentración un poco más alta de virus. Además, este punto está basado en una considerable menor cantidad de individuos con respecto a otros tratamientos. El tratamiento 4 causa más de un 85% de mortalidad mientras que, los tratamientos 2 y 3 solo causan entre un 50-60% de mortalidad ([ver *lx*], Tabla 1.4)

El parámetro  $r_m$  es usado convencionalmente para comparar la viabilidad y la adaptación de poblaciones en determinados ambientes, debido a que su cálculo incluye el tiempo de desarrollo, la fecundidad y la supervivencia (ver Ecuación (1.5)) (Begon et al., 2006). Las dosis altas del virus mostraron una  $r_m$  del orden de 0.05 (Figura 1.14), lo que representa una reducción del 50% respecto a la  $r_m$  cuando no hubo presencia del virus. Desde la perspectiva poblacional, el uso de estas concentraciones podría solucionar un problema de plagas sin tener como fin la erradicación momentánea o permanente de la plaga. Sin embargo, concentraciones bajas de VG013 pueden tener un efecto más grande sobre la viabilidad del GCT en cultivos de tomate que concentraciones altas, a pesar de que las altas causen una mortalidad significativamente más alta. Si un insumo tiene la capacidad de causar una mortalidad cercana al 100% de la población blanco, el impacto a corto plazo será significativo. Sin embargo, a mediano y largo plazo, la inmigración y los sobrevivientes con frecuencia conservan la capacidad de repoblar los cultivos, haciendo necesarias nuevas y más frecuentes aplicaciones de insumos. Los resultados de este estudio presentan la posibilidad de que la aplicación de entomopatógenos en cultivos sirva para reducir las poblaciones a mediano y largo plazo, ya que tales aplicaciones pueden reducir de manera significativa el potencial de crecimiento de las poblaciones plaga. La gran ventaja de los entomopatógenos sobre los insumos químicos como método de control es que los primeros cuentan con la adaptación innata de transmitirse a nuevos individuos de la plaga. Por ejemplo, si la aplicación de dosis bajas de VG013 tiene la capacidad de causar una epidemia entre los individuos de una población del GCT, se podría reducir su capacidad de crecimiento a niveles similares a los logrados por dosis altas, y promover la transmisión del entomopatógenos entre individuos sobrevivientes y entre aquellos que provienen de otros cultivos. Las infecciones subletales (encubiertas) de baculovirus han sido descritas previamente para otros sistemas, en los que se ha evidenciado que pueden transmitirse de madres a hijos y que pueden volverse letales bajo determinadas condiciones (Williams et al., 2017). Para el caso del PhopGV aislamiento VG013 en poblaciones del GCT, los resultados que se presentan en este capítulo representan el primer acercamiento al uso de infecciones no letales para el manejo del CGT.

A pesar de los efectos de las infecciones subletales de VG013 sobre la fecundidad y la capacidad de crecimiento de las poblaciones del GCT, de los 53 individuos que murieron por senescencia y que fueron examinados con qPCR para la presencia de virus, solo a 1

del tratamiento 1 ( $3.2 \times 10^3$  CI/ml) se le detectó persistencia del virus. Probablemente la muestra de adultos no haya sido suficiente para detectar el porcentaje de individuos que conserva la infección una vez alcanzan el estado de pupa. También puede que todos los efectos reportados en este estudio se deban al gasto de energía y recursos en el que los individuos sobrevivientes tuvieron que incurrir para eliminar al patógeno. Sin embargo, en el experimento de persistencia, en el que se examinaron adultos provenientes de larvas infectadas recién emergidos, se confirmó la presencia del virus en un porcentaje considerable de individuos.

Esta aparente contradicción puede deberse a las defensas que presenta el insecto a la infección. Los insectos no poseen una respuesta inmune adquirida, tal como sucede en los vertebrados (Strand y Pech, 1995; Kane y Golovikina, 2010). Sin embargo, otros autores afirman que en la parte no celular de la hemolinfa (plasma) se pueden desarrollar factores de inmunidad natural. Esos factores pueden ser comparables con los anticuerpos, inmunoglobulinas y antígenos, de los vertebrados (Tanada y Kaya 1993). Las hemaglutininas conocidas como lectinas se presentan en lepidópteros, y su función es facilitar los procesos de fagocitosis. Sin embargo, en su función inmunológica pueden actuar por tres caminos: (1) como una membrana receptora, (2) como factores opsonicos humorales, (3) actuando independientemente de los hemócitos y aglutinando las bacterias invasoras (Renwranz, 1983, 1986; Lacke, 1981 en Tanada y Kaya 1993). Si la infección supera los mecanismos de resistencia innata, se ponen en marcha otros sistemas específicos de resistencia inmunitarias adquiridas en el adulto, que posee un componente celular y otro humoral. Esto generaría que la concentración de partículas virales en el interior de los adultos disminuya con el tiempo, al punto que, al alcanzar su muerte natural, la concentración viral ya no es detectable. Esto, sumado a que el virus no se puede replicar en tejido de individuos adultos (Haase et al., 2015).

## 1.6 Literatura citada

Altieri, M.A.; Nicholls, C.I. (2003). Ecologically based pest management: a key pathway to achieving agroecosystem health. En: Rappoport, D. J.; Lasley, W.L.; Rolston,

- D.E.; Nielsen, N. O.; Qualset, C.O.; Damania, A.B. (eds.), Managing for healthy ecosystems. *Lewis Publishers, Boca Raton*, p. 999-1010.
- Anderson, R.M. y May, R.M. (1981) The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences*, 291, 451-524.
- Ángeles, I.; Alcázar, J. (1995) Susceptibilidad de la polilla *Scrobipalpus absoluta* al virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* (PoVG). *Revista Peruana de Entomología*. 35, 65–70.
- Barea, O.; Bejarano, C.; Calderón, R.; Crespo, L.; Franco, J.; Herbas, J.; Lino, V; Martínez, E.; Ramos J. (2002). Desarrollo de componentes del manejo integrado de las polillas de la papa (*Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*) en Bolivia y el Bioinsecticida Baculovirus (MATAPOL). PROINPA: Cochabamba, Bolivia.  
online:<http://www.asocam.org/biblioteca/files/original/35b23c7f7ae28eae20b35f797ad89b5b.pdf>.
- Barrera, G.P., Cuartas, P., & Villamizar, L. (2009). Comparative analysis of a granulin fragment of Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *IOBC/wprs Bulletin*, 45, 129–132.
- Barrera, G.P., Murcia, J., Cerón, J., Cuartas, P. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. XVIII No. 2, 24-31.
- Begon, M., Townsend, C.R., and Harper, J.L. (2006). Ecology: from individuals to ecosystems. Malden, MA: *Blackwell Publisher*.
- Bell, M.R. & Romine, C.L. (1986) *Heliothis virescens* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae): dosage and effects of feeding mixtures of *Bacillus thuringiensis* and a nuclear polyhedrosis virus on mortality and growth. *Environmental Entomology*, 15, 1161-1165.
- Ben Tiba S, Larem A, Laarif A, et al. (2019) The potential of novel African isolates of *Phthorimaea operculella* granulovirus for the control of *Tuta absoluta*. *Journal of Applied Entomology*. 143:11–20.
- Boots M, Norman R. (2000). Sublethal infection and the population dynamics of host-microparasite interactions. *Journal of Animal Ecology*. 69:517–24.

- Bustin, S. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, 29, 23–39.
- Burden J. P., Griffiths C. M., Cory J. S., Smith P, Sait S. M. (2002) Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Molecular Ecology* 11: 547–555.
- Caballero, P., T. Williams y M. López-Ferber. (2001). Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. 1ª edición. Editorial *Phytoma*. España. 518 p.
- Cabodevilla O, Villar E, Virto C, Murillo R, Williams T, et al. (2011) Intra- and intergenerational persistence of an insect nucleopolyhedrovirus: Adverse effects of sublethal disease on host development, reproduction, and susceptibility to superinfection. *Applied Environmental Microbiology* 77: 2954–2960.
- Calabrese E. J, Baldwin L. A. Chemical hormesis: its historical foundations as a biological hypothesis. *Toxicologic Pathology* (1999); 27: 195 ± 216. (Reprinted in *Human and Experimental Toxicology* 2000; 19: 31 ± 40).
- Calabrese, E. J., & Baldwin, L. A. (2002). *Defining hormesis*. *Human & Experimental Toxicology*, 21(2), 91–97. doi:10.1191/0960327102ht217oa.
- Carrera, M., Zeddani, J., Pollet, A., Lery, X., & López-Ferber, M. (2008). Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. *IOBC/wprsBulletin*, 31, 40–43
- Carpio, C., Dangles, O., Dupas, S., Léry, X., López-Ferber, M., Orbe, K., Zeddani, J.-L. (2012). Development of a viral biopesticide for the control of the Guatemala potato tuber moth *Tecia solanivora*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 112, 184–191.
- Cerón, J. L. (2012). Identificación y cuantificación de baculovirus (Nucleopoliedrovirus y Granuklovris) de *Spodoptera frugiperda* mediante PCR en tiempo real. (Trabajo de grado, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia).
- Cory, J. S. (2015, April 1). Insect virus transmission: Different routes to persistence. *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.007>

- Cory, J. S., Green, B. M., Paul, R. K., & Hunter-Fujita, F. (2005). Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89, 101–111.
- Cory, J. S., & Myers, J. H. (2003). The Ecology and Evolution of Insect Baculoviruses. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 239–272.
- Cuartas, P.O.; Villamizar, L.; Espinel, C.C.; Cotes, A.M. (2009). Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 35, 122–129.
- David, W.A.L. & Gardner, B.O.C. (1965) The incidence of granulosis deaths susceptible and resistant *Pieris brassicae* (Linnaeus) larvae following changes of population density, food and temperature. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7, 347-355.
- David, W.A.L. & Taylor, C.E. (1977) The effect of sucrose content of diets on susceptibility to granulosis virus in *Pieris brassicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30, 117-118.
- Duan L, Otvos I. S. (2001). Influence of larval age and virus concentration on mortality and sub-lethal effects of a nucleopolyhedrovirus on the Western spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Environmental Entomology*. 30:136–46.
- Espinel-Correal, C., Léry, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddani, J. L., Cotes, A. M., & López-Ferber, M. (2010). Genetic and biological analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Applied and Environment Microbiology*, 76, 7617–7625.
- Genç, Hanife. (2016). The tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae): Pupal key characters for sexing individuals. *Turkish Journal of Zoology*. 40. 801-805. 10.3906/zoo-1510-59.
- Gómez-Valderrama, J. A., Barrera, G., López-Ferber, M., Belaich, M., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. (2018). Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick). *Journal of Applied Entomology*, 142(1–2), 67–77. <https://doi.org/10.1111/jen.12406>.
- Gómez-Valderrama, J., Herrera, L., Uribe-vélez, 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, 136–143.

- Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: Historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/v7052230>
- Huber J. (1986). Use of baculoviruses in pest management programs, p 181-202. In Granados RR, Federici BA (ed), *The biology of baculoviruses*, vol II. CRC, Boca Raton.
- Kane, M., & Golovkina, T. (2010). Common Threads in Persistent Viral Infections. *Journal of Virology*, 84(9), 4116–4123. <https://doi.org/10.1128/jvi.01905-09>
- Klowden, M. J. (2013). Integumentary Systems. *Physiological Systems in Insects*, 1–90. Amsterdam; Boston: *Elsevier/Academic Press*.
- Lacey, L., Hoffmann, D. F., & Federici, B. (2011). Histopathology and effect on development of the PhopGV on larvae of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 108, 52–55.
- Lacey, L.A.; Kroschel, J.; Arthurs, S.P.; de la Rosa, F. (2010) Control microbiano de la palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 2010, 36, 181–189.
- Lewis, W.J., Van Lenteren, J.C., Phatak, S.C., and Tumlinson, J.H. (1997). A total system approach to sustainable pest management. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 12243-12248
- Lipsitch M, Nowak MA, Ebert D et al (1995) The population dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, Biological Sciences* 260:321–327. doi:10.1098/rspb.1995.0099.
- Luckey TD. Radiation hormesis. Boca Raton, FL: CRC Press, 1991.
- Mascarin, G., Alves, S. B., Rampelotti-Ferreira, F. T., Urbano, M. R., Demétrio, C. G. B., & Delalibera, I. (2010). Potential of a granulovirus isolate to control *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *BioControl*, 55, 657–671.
- Myers, J. H. (1993). Population outbreaks in forest Lepidoptera. *American Scientist*. **81**, 240–251.
- Myers, J. (2000). Population fluctuations of western tent caterpillars in southwestern British Columbia. *Population Ecology*. 42. 231-241. 10.1007/PL00012002.

- O'Reilly, D.R. (1995) Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyltransferases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.*, 25, 541–550.
- Patil, U. R., C. J. Savanurmath, S. B. Mathad, P. I. Aralaguppi, and S. S. Ingahalli. 1989. Effects of nuclear polyhedrosis virus on the growth, development and reproduction in surviving generations of the armyworm *Mythimna (Pseudaletia) seperata* (Walker). *Journal of Applied Entomology.* 108: 527- 532.
- Podgwaite J. D. (1981). Natural disease within dense gypsy moth populations. *In* Doane CC, McManus ML (ed), *The Gypsy Moth: Research Towards Integrated Pest Management.* U.S. Dept. of Agriculture, Washington, D.C.
- Pedigo, L. (1996). *Entomology and pest management.* 2<sup>nd</sup> Edition. Ed. Prentice-Hall Inc. New Jersey. 679 pp.
- Raman, K.V.; Booth, R.H.; Palacios, M. (1987). Control of potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) in rustic potato stores. *Tropical Science.*, 27, 175–194.84.
- Raman, K.V.; Alcazar, J.; Valdez, A. (1992) Biological Control of the Potato Tuber Moth Using *Phthorimaea* Baculovirus; *International Potato Center:* Lima, Peru.
- Reed, E.M.; Springett, B.P. Large-scale field testing of a granulosis virus for the control of the potato moth (*Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lep., Gelechiidae)). *Buletin of Entomological Research.* 1971, 61, 207–222.
- Renwranz, L. (1983). Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defensereactions: the inmuno-biological importance of cabohydrate-specific binding molecules. *Developmental and Comparative Inmunology*, Vol. 7: pp. 603-608
- Renwranz, L. (1986). Lectins in mollusks and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symposium of the Zoological Society of London*, Vol. 56: 81-93.
- Ritz C, Baty F, Streibig J. C, Gerhard D (2015) Dose-Response Analysis Using R. PLoS ONE 10(12): e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021
- Rothman, L. D., y J. H. Myers. (1996). Debilitating effects of viral diseases on host Lepidoptera. *Journal of Invertebrate Pathology.* 67: 1-10.
- RStudio Team (2019). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Sait, S.M., Begon, M. & Thompson, D.J. (1994). The effects of a sublethal baculovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Journal of Animal Ecology*, 63, 541-550.

- Santiago-Alvarez, C., and E. Vargas-Osuna. (1986). Differential mortality between male and female *Spodoptera litto-ralis* larvae infected with a baculovirus. *Journal of Invertebrate Pathology*. 47: 374-376.
- Simón O, Williams T, Lopez-Ferber M, Caballero P (2004) Virus entry or the primary infection cycles are not the principal determinants of host specificity of *Spodoptera spp.* nucleopolyhedroviruses. *Journal of General Virology* 85:2845–2855. doi:10.1099/vir.0.80179-0.
- Sorrell, I., White, A., Pedersen, A. B., Hails, R. S., & Boots, M. (2009). The evolution of covert, silent infection as a parasite strategy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1665), 2217–2226. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1915>
- Strand, M. R.; Pech, L. L. (1995). Immunological basios for compatibility in parasitoid host relationships. *Annual Review of Entomology*. 40, 31-56.
- Tanada, Y.; Kaya, H. K. (1993). Insect Pathology. Academic press, inc. USA. 665p.
- Thompson C. G. 1978. Nuclear polyhedrosis epizootiology. In Brookes MH, Stark RW, Campbell RW (ed), The Douglas-fir tussock moth: a synthesis. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Vail, P. V., and I. M. Hall. (1969). The influence of infections of nuclear-polyhedrosis virus on adult cabbage looper and their progeny. *Journal of Invertebrate Pathology*. 13: 358D370
- Vilaplana L., Wilson K., Redman E., Cory J. (2010). Pathogen persistence in migratory insects: High levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm. *Evolutionary Ecology*. 24.147-160. 10.1007/s10682-009-9296-2.
- Vilaplana L, Redman EM, Wilson K et al (2008) Density-related variation in vertical transmission of a virus in the African armyworm. *Oecologia* 155:237–246. doi:10.1007/s00442-007-0914-9.
- Whelan, J., Rusell, N., & Whelan, M. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278, 261-269.
- Williams, C. M. y Adkisson, P. L. (1964). physiology of insect diapause. xiv. an endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm, *antheraea pernyi*. *the biological bulletin*, 127(3), 511–525. doi:10.2307/1539252

Williams, T., Virto, C., Murillo, R., y Caballero, P. (2017, July 17). Covert infection of insects by baculoviruses. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01337>.

## **2. Capítulo 2**

### **Mecanismos de transmisión de Baculovirus en individuos de *Tuta absoluta*.**

## 2.1 Resumen

Los patógenos enfrentan numerosos retos para persistir en hospederos con una densidad poblacional baja o impredecible. Estas estrategias incluyen a la transmisión horizontal, a través de estructuras que les permiten persistir en el ambiente, y a la transmisión vertical mediante infecciones encubiertas de adultos a su descendencia. En este capítulo, se examinaron los mecanismos de transmisión tanto horizontal como vertical de granulovirus en poblaciones del gusano cogollero del tomate (GCT) *Tuta absoluta*. El GCT es una de las plagas más importantes del cultivo de tomate en todo el continente. A pesar de los estudios enfocados en producir bioinsecticidas a base de granulovirus, poco se ha hecho en entender y demostrar la manera en que estos se transmiten en poblaciones naturales. Se evidenció la transmisión vertical del granulovirus PhopGV en individuos del GCT sometidos en su estado larval y que las heces no son un mecanismo de transmisión de cuerpos de inclusión virales. Este estudio provee el primer reporte de transmisión vertical de granulovirus en individuos del GCT, además de un primer acercamiento a los mecanismos de transmisión horizontal que pueden tener implicaciones muy importantes para el diseño de programas de manejo.

**Palabras clave:** Persistencia, GV, transmisión vertical, transmisión horizontal.

## 2.2 Introducción

Un factor importante que contribuye en el éxito de los baculovirus como agentes de control de plagas, es su habilidad para persistir en el ambiente. Gran parte de esa persistencia se logra por la protección de los viriones mediante la formación de cuerpos de inclusión (CI), que son matrices proteicas que confieren protección contra las condiciones ambientales cuando estos se encuentran por fuera del insecto hospedero (Gómez Valderrama et al.,

2018). Sin embargo, hay evidencia de que los baculovirus pueden persistir dentro de la población de insectos hospederos de forma oculta o latente (Hughes et al., 1997; Longworth y Cunningham 1968; Burand et al., 2002; Williams et al., 2017).

Las poblaciones de baculovirus pueden adoptar dos caminos de transmisión para infectar insectos susceptibles. La transmisión horizontal ocurre cuando una larva sana consume una cantidad suficiente de CI provenientes de un cadáver infectado. Muchos baculovirus codifican proteínas que degradan el integumento de las larvas permitiendo la liberación de los CI del cadáver (Blissard y Rohrmann 1990). Este mecanismo de transmisión es el más estudiado y mejor entendido (Virto et al., 2013). Además, se ha documentado en un considerable número de especies de lepidópteros (Del Rincón-Castro et al., 1997; Cory y Myers, 2003; Asser-Kaiser et al., 2007; Moscardi y Sosa Gomez, 2007; Cabodevilla et al., 2011; Cory et al., 2015). Por otro lado, poco se conoce sobre la transmisión vertical de baculovirus de padres infectados a su progenie, sin embargo, este tipo de transmisión se ha propuesto como una estrategia de supervivencia cuando la densidad de hospederos es baja y las oportunidades de transmitirse horizontalmente son escasas (Cory et al., 2003). Solo las infecciones persistentes sub-letales son capaces de transmitirse verticalmente mientras que las letales lo hacen de manera horizontal (Williams et al., 2017; Burden et al., 2002). Las infecciones persistentes y su transmisión vertical se han reportado en varias especies de lepidópteros colectados en campo y en laboratorio (Kukan B 1999; Fuxa et al., 2002; Murillo et al., 2011; Vilaplana et al., 2010).

El granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) es un prometedor agente de control para el GCT, *Tuta absoluta*. Se ha identificado y caracterizado la actividad insecticida del aislamiento VG013, dando excelentes resultados en laboratorio (Gómez Valderrama et al., 2018). Sin embargo, poco se sabe acerca de sus mecanismos de transmisión entre individuos. A diferencia de muchos otros baculovirus, PhopGV no posee los genes auxiliares *v-chiA* y *v-cath* que codifican proteínas encargadas de romper el integumento de la larva y facilitar la dispersión de CI (Mahy y Van 2010; D'Amico et al., 2013). Esto indica que PhopGV puede tener otro tipo de mecanismos de transmisión y persistencia en poblaciones hospederas. El presente capítulo tiene por objeto evaluar diferentes

estrategias de transmisión del aislamiento VG013 entre individuos de una población del GCT. Mediante qPCR se determinó si adultos con infecciones persistentes, le pueden transmitir el granulovirus a su progenie (transmisión vertical) y si excreciones como heces de larvas infectadas con el granulovirus, dispersan y transmiten horizontalmente de aislamiento viral.

## **2.3 Materiales y métodos**

### **2.3.1 Transmisión horizontal del virus por heces de larvas infectadas**

Se determinó si las heces de las larvas infectadas con el granulovirus VG013 son un mecanismo de transmisión horizontal del granulovirus. El experimento se realizó en un cuarto de laboratorio con temperatura  $25 \pm 2$  °C y humedad relativa  $60 \pm 5\%$ . Se aplicó una concentración de  $1,6 \times 10^4$  CI/ml del aislamiento VG013 en folíolos de plantas de tomate con un nebulizador (Gómez Valderrama et al., 2018; Carrera et al., 2008). Se definieron 2 tratamientos, el primero con los folíolos inoculados con el virus y el otro de hojas libres de virus. Cada tratamiento tuvo 4 réplicas y cada réplica consistió en 30 larvas individualizadas en copas de 3 x 3 cm en las que se introdujo un folíolo de tomate. Luego de 5 días, tiempo necesario para que las larvas adquirieran el granulovirus, todas las larvas fueron trasladadas a nuevas copas con folíolos libres de virus y se registró diariamente la mortalidad y desarrollo. Cada 2 días se colectaron las heces de cada una de las larvas y se conservaron a -20°C. Cada larva que presentara síntomas de infección y muriera, inmediatamente era conservada a -20°C. Los individuos que sobrevivieron la infección del virus, fueron colectados y conservados a -20°C, en prepupa.

#### **Detección de virus**

Se seleccionaron al azar 42 muestras de cada tratamiento, las cuales estaban divididas así: 1) 11 larvas que murieron antes de pupar, 2) 11 individuos que superaron el estado larval y lograron llegar a prepupa, 3) 10 muestras de heces de larvas que murieron en este estado y 4) 10 muestras de individuos que superaron el estado larval. Se llevaron a cabo pruebas de qPCR para determinar la presencia de baculovirus. Usando pistilos plásticos y

tubos eppendorf de 1.5 ml, cada muestra fue macerada en 100 µl de agua ultrapura. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 3.500 rpm por 5 min para separar el tejido grueso del insecto. Se recuperó el sobrenadante y se sometió a un proceso de denaturalización a 95°C por 5 min en baño serológico para romper los enlaces de hidrógeno de los nucleótidos. La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 25 µl utilizando: 1) 12.5 µl de GoTaq qPCR Master Mix (Promega®), 2) 6.5 µl de una sonda específica para el gen que codifica para granulina, 3) 1 µl de agua ultrapura, y 4) 5 µl de la suspensión diluida en 1: 10 del sobrenadante obtenido de los individuos macerados. Cada reacción se montó tres veces y se utilizó la curva patrón desarrollada previamente, la cual se diseñó con 6 concentraciones de ADN plasmídico con un inserto del gen que codifica para granulina.

### **2.3.2 Transmisión vertical del virus**

Para determinar si hay transmisión vertical del aislamiento VG013 en el GCT, se tomaron al azar 10 larvas de cada tratamiento (tratamientos 1, 2, 3 y 4) de la segunda generación del ensayo de tabla de vida del Capítulo 1. Posteriormente se llevó a cabo una prueba de qPCR para detectar el aislamiento VG013 en las larvas recolectadas. El procedimiento de detección fue similar al que se describe para las muestra de transmisión horizontal con heces, pero en este caso se analizaron las muestras individuales de larvas.

## **2.4 Resultados**

### **2.4.1 Transmisión horizontal del virus por heces de larvas infectadas**

Los análisis por qPCR del tratamiento con el inóculo de  $1,6 \times 10^4$  CI/ml de VG013 evidenciaron que al 100% de las muestras de larvas que murieron antes de superar este estado, se les detectó el virus. Por otra parte, a la mitad de los individuos seleccionados que superaron la infección viral y pasaron el estado larval, se les detectó presencia viral. A ninguna muestra del tratamiento con inóculo viral se le detecto presencia viral.

Ninguna de las qPCR mostró presencia viral para las muestras de heces de ningún individuo independiente de si había sido expuesto a foliolos con virus o no. Con el fin de determinar si las heces, al contener gran cantidad de material vegetal o por algún otro motivo desconocido, podían inhibir la detección viral por qPCR, se tomó una parte de las heces ya seleccionadas, se maceraron en 50  $\mu$ l del stock de virus y se les hizo la qPCR normalmente. Al 100% de estas muestras de heces se les detectó el virus, lo que confirma que las heces no inhiben la detección viral por qPCR y que las heces no son un mecanismo de transmisión horizontal o dispersión del aislamiento VG013 en larvas del GCT.

## 2.4.2 Transmisión vertical

Se evidenció transmisión vertical del aislamiento VG013 en el GCT. De los 40 individuos de la segunda generación seleccionados del bioensayo del Capítulo 1, únicamente a 5 muestras se les detectó el virus. De estas 5 muestras 2 pertenecían al tratamiento 1 ( $3.2 \times 10^3$  CI/ml), 2 más al tratamiento 2 ( $1.6 \times 10^4$  CI/ml) y 1 del tratamiento 3 ( $4 \times 10^5$  CI/ml).

## 2.5 Discusión

El desarrollo de herramientas moleculares altamente sensibles ha permitido entender mejor el papel que tienen las estrategias de transmisión de virus en las dinámicas insecto-patógeno (Vilaplana et al., 2010; Virto et al., 2013). En este estudio, gracias a esas herramientas, se evidenció que las heces no son un mecanismo de dispersión del aislamiento VG013 de PhopGV en larvas del GCT. Lo cual fue un resultado inesperado ya que es en las células del intestino medio por donde ingresan los CI y ocurre la infección primaria (Williams et al., 2017). Adicionalmente, PhopGV no posee los genes auxiliares *v-chiA* y *v-cath* que codifican proteínas encargadas de romper y licuar el integumento de la larva muerta (Valicente et al., 2008; Mahy y Van 2010; D`Amico et al., 2013), lo que sugiere que el virus debe poseer otros métodos de transmisión horizontal. La razón por la que PhopGV no posee el gen *v-chiA* puede deberse a su origen filogenético. Hawtin et al (1995) investigaron el origen de este gen en el nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* y reportaron que pertenece a un linaje bacteriano. Los baculovirus que no presentan *v-chiA*,

tampoco tienen *v-cath* (Slack J., 2013). Sin embargo, este tipo de granulovirus han adoptado otras estrategias para poder transmitirse. El oscurecimiento o melanización de los tejidos después de la muerte del insecto ha demostrado ser una protección contra los rayos UV (Shapiro 1984), que depende de factores abióticos como las lluvias, el viento y la radiación para salir del cadáver (Dougherty 1995; Shapiro y Robertson 1990; D'Amico y Elkinton 1995). Otros mecanismos como los constantes vómitos inducidos como mecanismo de defensa por la infección de virus (Haas-Stapleton et al., 2005), el exoesqueleto desechado por las larvas al cambiar de instar y demás secreciones, pueden ser potenciales mecanismos de dispersión que deberán ser estudiados.

Desde una perspectiva del control de plagas agrícolas, que no se rompa el integumento del individuo puede ser una ventaja. Esta condición es muy eficiente a la hora de establecer un sistema de producción a gran escala de baculovirus ya que las larvas deben ser congeladas antes de coleccionar el virus (Valicente et al., 2008). Baculovirus que rompan el integumento implican mayor trabajo en laboratorio, incrementando el precio del biopesticida (Valicente et al., 2008).

Recientemente, Larem et al., (2019) demostraron la infección persistente del PhopGV en larvas de *P. operculella* naturales y su impacto en la dinámica poblacional ya que pueden suprimir o permitir la co-infección con otros aislamientos virales de la misma especie. En este estudio al 13% de los individuos de segunda generación seleccionados, se les detectaron infecciones encubiertas. Pese a que es solo una pequeña parte de la población sometida a la infección del baculovirus, es el primer reporte de transmisión vertical de PhopGV en el GCT. Los individuos a los que se les detectó el virus son descendencia de adultos provenientes de los tratamientos con menor concentración viral. Esto cobra sentido ya que la transmisión vertical es una estrategia de largo plazo para la persistencia en las poblaciones hospederas (Burden et al., 2003) y está relacionada con una baja virulencia (Williams et al., 2017). La persistencia de virus entre generaciones del hospedero son una parte crucial y poco explorada de las dinámicas de la infección viral (Beukema 1992; Kukan 1999). Por esto, incrementar el conocimiento en los factores que afectan los mecanismos de transmisión horizontal y vertical del sistema VG013-GCT, contribuirá al desarrollo de

estrategias óptimas y sostenibles de insecticidas basados en virus. Estudios adicionales sobre la relación del de los adultos con la transmisión vertical, la edad de infección de las larvas y los mecanismos que regulan la letalidad de las infecciones proveerán información útil para reducir la frecuencia en la que se aplican los biopesticidas en los cultivos.

## 2.6 Literatura citada

- Asser-Kaiser, S., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Kienzle, J., Eberle, K. E., Gund, N. A., Jehle, J. A. (2007). Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science*, 317(5846), 1916–1918.  
<https://doi.org/10.1126/science.1146542>
- Beukema, S. J. (1992). “Towards More Realistic Models of Disease and Insect Population Dynamics: Virus–Tent Caterpillar Interactions.” M.Sc. thesis. Univ. of British Columbia.
- Blissard G. W., Rohrmann G. F. (1990). Baculovirus diversity and molecular biology. *Annual Review of Entomology*. 35:127–155.
- Burand, J. P., Horton, H. M., Retnasami, S. & Elkington, J. S. (1992). The use of polymerase chain reaction and shortwave UV irradiation to detect baculovirus DNA on the surface of gypsy moth eggs. *Journal of Virological Methods* 36, 141–150.
- Burden J. P., Griffiths C. M., Cory J. S., Smith P, Sait S. M. (2002) Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Molecular Ecology* 11: 547–555.
- Burden, J. P. Nixon, C. P. Hodgkinson, A. E. Possee, R. D. Sait, S. M. King, L. A. Hails, R. S. (2003) Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses. *Ecoogy Letters*. 524–531.
- Cabodevilla, O., Ibañez, I., Simón, O., Murillo, R., Caballero, P., and Williams, T. (2011). Occlusion body pathogenicity, virulence and productivity traits vary with transmission strategy in a nucleopolyhedrovirus. *Biological Control*. 56, 184–192.  
 doi: 10.1016/j.biocontrol.2010.10.007
- Cory, J. S., & Myers, J. H. (2003). The Ecology and Evolution of Insect Baculoviruses. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 239–272.

- Cory, J. S. (2015, April 1). Insect virus transmission: Different routes to persistence. *Current Opinion in Insect Science*. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.007>
- D'Amico, V., Slavicek, J., Podgwaite, J. D., Webb, R., Fuester, R., & Peiffer, R. A. (2013). Deletion of v-chiA from a baculovirus reduces horizontal transmission in the field. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(13), 4056–4064.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.00152-13>
- D'Amico, V., Elkinton J. S., (1995). Rainfall Effects on Transmission of Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nuclear Polyhedrosis Virus, *Environmental Entomology*, Volume 24, Issue 5, 1 October, Pages 1144–1149, <https://doi.org/10.1093/ee/24.5.1144>
- Del Rincón-Castro, Ma Cristina, & Ibarra, Jorge. (1997). Baculovirus entomopatógenos: una alternativa para el control de plagas. *Folia Entomológica Mexicana*. 100. 45-.
- Dougherty E. 1995. In vitro effects of fluorescent brightener on the efficacy of occlusion body dissolution and polyhedral-derived virions. *Biological Control* 5:383–388.
- Fuxa J. R., Richter A. R., Ameen A. O., Hammock B. D. (2002) Vertical transmission of TnSNPV, TnCPV, AcMNPV, and possibly recombinant NPV in *Trichoplusia ni*. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 44–50.
- Gómez-Valderrama, J. A., Barrera, G., López-Ferber, M., Belaich, M., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. (2018). Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick). *Journal of Applied Entomology*, 142(1–2), 67–77.  
<https://doi.org/10.1111/jen.12406>.
- Haas-Stapleton, E. J., Washburn, J. O., & Volkman, L. E. (2005). *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *Journal of General Virology*, 86(5), 1349–1355. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80845-0>
- Hawtin, R. E., Arnold, K., Ayres, M. D., de A. Zanotto, P. M., Howard, S. C., Gooday, G. W., ... Possee, R. D. (1995). Identification and Preliminary Characterization of a Chitinase Gene in the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Genome. *Virology*, 212(2), 673–685. doi:10.1006/viro.1995.1525

- Hughes D. S, Possee R. D, King L. A (1997) Evidence for the presence of a low-level, persistent baculovirus infection of *Mamestra brassicae* insects. *Journal of General Virology* 78:1801–1805.
- Kukan, B. (1999). Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *Journal of Invertebrate Pathology.*, 74, 103–111.
- Larem, A., Tiba, S. B., Fritsch, E., Undorf-Spahn, K., Wennmann, J. T., & Jehle, J. A. (2019). Effects of a covert infection with phthorimaea operculella granulovirus in insect populations of phthorimaea operculella. *Viruses*, 11(4).  
<https://doi.org/10.3390/v11040337>
- Longworth J. F., Cunningham J.C. (1968) The activation of occult nuclear-polyhedrosis viruses by foreign nuclear polyhedra. *Journal of Invertebrate Pathology*.10:361–367. doi:10.1016/0022-2011(68)90094-3.
- Mahy, B. W. J., & Van, R. M. H. V. (2010). Desk encyclopedia of general virology. Oxford, UK: Academic Press.
- Moscardi, F. and S. Gomez. D. (2007). Microbial control of insect pest of soybean. Chapter VII-5, pp 411-426.
- Murillo R, Hussey M. S., Possee R. D. (2011) Evidence for covert baculovirus infections in a *Spodoptera exigua* laboratory culture. *Journal of General Virology* 92: 1061–1070.
- Shapiro M, Robertson J. L., (1990). Laboratory evaluation of dyes as ultra- violet screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economical Entomology*. 83:168 –172.
- Shapiro, M. (1984). Host tissues and metabolic products as ultraviolet screens for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhdrosis virus. *Environmental Entomology*. 13, 11311134.
- Slack, J. (2013). Viral Cathepsin. Handbook of Proteolytic Enzymes. 1902 1906. doi:10.1016/b978-0-12-382219-2.00435-x
- Valicente, F. H., Tuelher, E. S., Paiva, C. E. C., Guimarães, M. R. F., Macedo, C. V., & Wolff, J. L. C. (2008). A New Baculovirus Isolate that does Not Cause the Liquefaction of the Integument in *Spodoptera frugiperda* Dead Larvae. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 7(1), 77–82. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v7n1p77-82>
- Vilaplana L., Wilson K., Redman E., Cory J. (2010). Pathogen persistence in migratory insects: High levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the

African armyworm. *Evolutionary Ecology*. 24. 147-160. 10.1007/s10682-009-9296-2.

Virto, C., Zárate, C. A., López-Ferber, M., Murillo, R., Caballero, P., & Williams, T. (2013). Gender-Mediated Differences in Vertical Transmission of a Nucleopolyhedrovirus. *PLoS ONE*, 8(8).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070932>

Williams, T., Virto, C., Murillo, R., y Caballero, P. (2017, July 17). Covert infection of insects by baculoviruses. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01337>.

### **3. Capítulo 3**

**Efecto de la densidad poblacional de *Tuta absoluta* en la activación de Baculovirus encubiertos.**

### 3.1 Resumen

Las infecciones persistentes de baculovirus en lepidópteros son algo común en poblaciones naturales. Generalmente después del aumento en la población de insectos, se presenta un dramático descenso debido a varios factores limitantes que influyen en las dinámicas poblacionales. Varios estudios han demostrado el aumento de mortalidad de insectos con infecciones encubiertas dependiendo de su densidad, sin embargo, la forma exacta de esta relación es demasiado variable entre especies. Se ha postulado la hipótesis de que los insectos que normalmente experimentan densidades poblacionales altas, utilizan mayor energía en superar la infección que a bajas densidades debido a que es más probable para ellos enfrentarse a patógenos denso-dependientes. Por otro lado, el estrés de las condiciones de alta densidad poblacional, debería dejar a los insectos más vulnerables a la infección. Ambos caminos han sido reportados en varias especies de Lepidoptera. En este estudio se evaluó la relación entre la densidad larval y la activación de infecciones encubiertas del granulovirus PhopGV en *Tuta absoluta*. Las larvas fueron alimentadas con el virus, se seleccionaron aquellas que presentaban infecciones encubiertas y se criaron a diferentes densidades. En este sistema, se presentó una mortalidad adicional a medida que la densidad larval aumentaba.

**Palabras clave:** Infecciones encubiertas, Patógenos denso-dependientes, Activación.

### 3.2 Introducción

En los insectos es común que haya poblaciones que fluctúen de manera drástica por diversas razones (Schowalter 2006; Burden 2002). Factores como la depredación o el parasitismo, tienen un papel protagónico en la dinámica poblacional de los insectos y varían a diferentes densidades poblacionales (Myers 1998). Las epizootias naturales de baculovirus en insectos han sido documentadas cuando la densidad población es lo suficientemente alta para que la transmisión horizontal se dé con mayor frecuencia (Myers 1998; McCallum et al., 2001). Por ejemplo, en los años 1964 y 1995 se reportaron

epizootias de granulovirus que redujeron drásticamente la población de la polilla del Lárice *Zeiraphera diniana* (Baltensweiler y Fischlin 1988). En los años 2003-2004 y 2012 se reportaron varios brotes de infecciones de nucleopoliedrovirus en larvas de la polilla otoñal *Epirritia autumnata* (Myers y Cory 2013). Otros estudios han demostrado que larvas criadas en grupos presentan una mayor susceptibilidad a la infección de baculovirus. La eficiencia de transmisión de nucleopoliedrovirus aumentó con el incremento de la densidad de larvas de *M. brassicae* (Vasconcelos 1996), *Lymantria dispar* (Reilly y Hajek 2008) y de granulovirus en *P. interpunctella* (Knell et al., 1998). No obstante, la mayoría de estudios se han centrado en la relación que tienen la resistencia y susceptibilidad con la densidad poblacional. Dejando de lado las infecciones encubiertas asintomáticas las cuales han sido pobremente estudiadas (Williams et al., 2017; Cory 2015). A pesar de que no está del todo claro que las infecciones encubiertas tengan un efecto a nivel poblacional, muchos estudios recientes indican que el papel de las infecciones encubiertas de baculovirus y su activación en los hospederos, es clave en la regulación de las poblaciones de insectos (Burden et al., 2003; Vilaplana et al., 2010; Myers y Cory 2015; Williams et al 2017). Las infecciones encubiertas de baculovirus son capaces de mantener una virulencia con bajos niveles de replicación, pueden ser activadas por factores de estrés como temperatura, humedad, nutrición, infección secundaria por otro virus o sobrepoblación (Burden et al., 2003; Fuxa et al., 1999; Hughes et al., 1993). El objetivo de este trabajo es determinar el papel que tiene la densidad poblacional del hospedero en la transición de una infección asintomática en una infección letal.

### **3.3 Materiales y métodos**

#### **3.3.1 Efecto de la densidad de larvas por unidad de área sobre la letalidad del virus**

Aproximadamente 2000 larvas recién eclosionadas del GCT fueron alimentadas con foliolos de tomate inoculados con VG013 ( $1,6 \times 10^4$  CI/ml) (Gómez Valderrama et al., 2017; Carrera et al., 2008) mediante un nebulizador. Luego de 8 días (tiempo medio de muerte del virus) (Gómez Valderrama et al., 2017) se colectaron los individuos que sobrevivieron a la infección y que no presentaban síntomas virales. Para determinar si la densidad de

larvas por unidad de área influye en la letalidad del VG013, se estableció un experimento en invernadero a  $27 \pm 2$  °C. Se definieron 4 tratamientos con 6 réplicas que incluyeron un número diferente de larvas por foliolo de tomate, más un control que consistió en 1 larva por foliolo. El número de larvas para este experimento fueron: 2 larvas por foliolo (tratamiento 1), 4 larvas por foliolo (tratamiento 2) y 8 larvas por foliolo (tratamiento 3). Para cada tratamiento se seleccionaron plantas de la misma edad, altura y tamaño de hojas. Las plantas se podaron para que todas tuvieran exactamente 10 foliolos en los cuales se ubicaron las larvas (Figura 3.1). Cada planta se ubicó en una jaula de malla diferente, se registró la mortalidad, longevidad y se colectaron tanto larvas muertas como adultos.

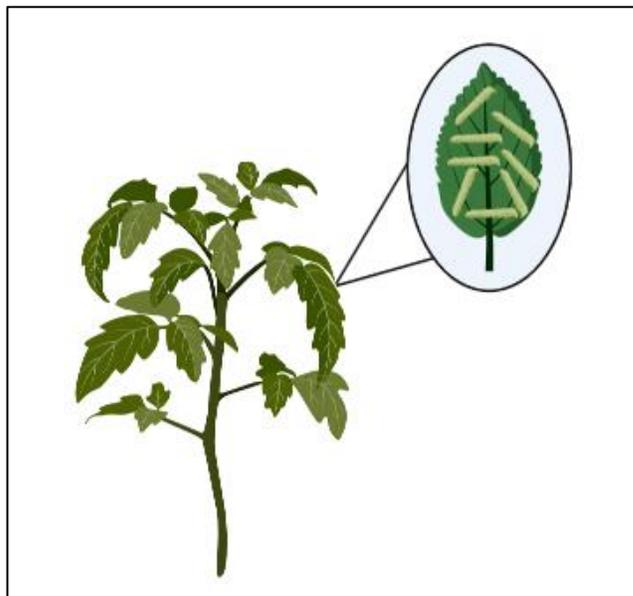


Figura 3.1 Montaje larvas GCT en foliolos de tomate

### Detección de virus

A medida que iban emergiendo los adultos, se tomaron 10 individuos de cada tratamiento y se llevaron a cabo qPCR para determinar si tenían el baculovirus. Usando pistilos plásticos y tubos eppendorf de 1.5 ml, cada adulto fue macerado en 100  $\mu$ l de agua ultrapura. Posteriormente, cada muestra se centrifugó a 3.500 rpm por 5 min para separar el tejido grueso del insecto. Se recuperó el sobrenadante y se sometió a un proceso de

desnaturalización a 95°C por 5 min en baño serológico para romper los enlaces de hidrógeno de los nucleótidos. La reacción de PCR se realizó a un volumen final de 25 µl utilizando: 1) 12.5 µl de GoTaq qPCR Master Mix (Promega ®), 2) 6.5 µl de una sonda específica para el gen que codifica para granulina, 3) 1 µl de agua ultrapura, y 4) 5 µl de la suspensión diluida en 1: 10 del sobrenadante obtenido de los individuos macerados. Cada reacción se montó tres veces y se utilizó la curva patrón desarrollada previamente, la cual se diseñó con 6 concentraciones de ADN plasmídico con un inserto del gen que codifica para granulina.

### 3.3.2 Análisis estadístico

Se usó un modelo logístico y una distribución binomial para describir la supervivencia de larvas infectadas en función de la densidad de larvas por foliolo. La estimación de los parámetros se hizo por estimación por máxima verosimilitud (ver ecuación 3.1). Donde  $a$  y  $b$  son parámetros y  $x$  es la densidad de larvas por foliolo.

$$S = \frac{1}{1 + \exp(-bx - a)} \quad (3.1)$$

## 3.4 Resultados

La mortalidad de individuos del GCT infectados con VG013 se ve afectada por la cantidad de individuos por unidad de área (tabla 3.1). En general se observa una disminución de la supervivencia a medida que la densidad poblacional es mayor (Figura 3.2). La tendencia es menos evidente a densidades muy bajas, pero más acentuada a medida que la densidad aumenta. Las qPCR evidenciaron que más del 50% de los adultos que sobrevivieron a los factores de estrés, mantuvieron la infección de manera encubierta.

Tabla 3.1 Supervivencia de individuos de *T. absoluta* infectados subletalmente con VG013. R: réplica, L/P: larvas por planta, Adultos: individuos que alcanzaron el estado adulto por planta

C (1 larva/foliolo)		T1 (2 larvas/foliolo)		
	L/P	Adultos	L/P	Adultos
R1	10	8	20	15
R2	10	10	20	18
R3	10	8	20	17
R4	10	6	20	11
R5	10	7	20	16
R6	10	6	20	15
T2 (4 larvas/foliolo)		T3 (8 larvas/foliolo)		
	L/P	Adultos	L/P	Adultos
R1	40	23	80	31
R2	40	23	80	35
R3	40	24	80	29
R4	40	17	80	37
R5	40	19	80	34
R6	40	21	80	34

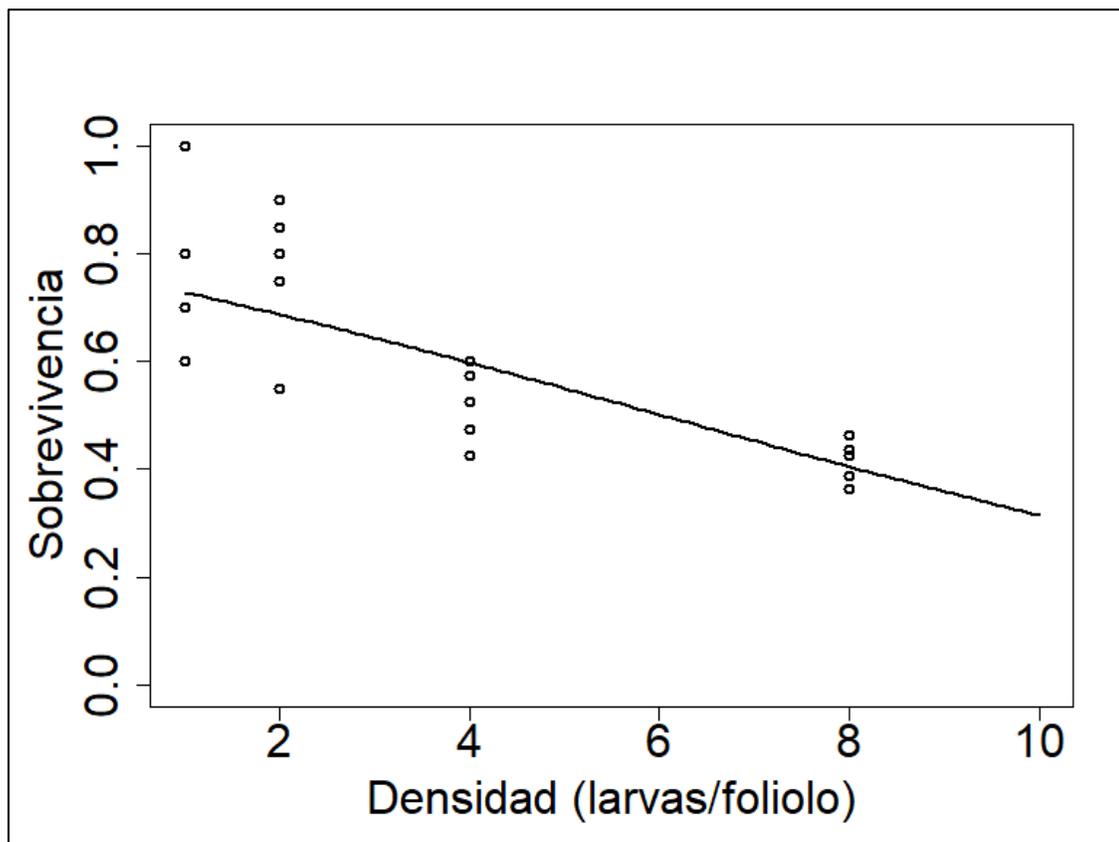


Figura 3.2 Relación entre larvas con infecciones encubiertas de VG013 y la densidad poblacional.

Tabla 3.2 Estimación parámetros modelo logístico y distribución binomial que describe la supervivencia de larvas infectadas en función de la densidad de larvas por foliolo

	Estimado	Error stnd	Valor z	Pr(z)
a	1.180580	0.169484	6.9657	3.267e-12 ***
b	-0.195798	0.026798	-7.3063	2.745e-13 ***

Signif. cod: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

### 3.5 Discusión

Los procesos de infección de baculovirus pueden influenciar las dinámicas poblacionales de reducción de las poblaciones de insectos (Reilly y Hajek 2008). Existen una gran cantidad de estudios que demuestran que la resistencia y susceptibilidad a baculovirus es denso-dependiente, sin embargo, esta dependencia varía de especie a especie. Los resultados de este estudio mostraron una relación entre la mortalidad y la densidad de larvas del GCT infectadas con el aislamiento VG013 de PhopGV. Sin embargo, no se puede concluir que esta relación es por causa de la infección viral ya que no se hicieron los ensayos sin la presencia del virus. La supervivencia estimada cuando hay 1 larva por foliolo (0.7280559) es un poco más alta de lo que se esperaría. Cuando la densidad es de 8 larvas por foliolo, la supervivencia es de solo 40%, lo que quiere decir que la mortalidad promedio es de 60%. No obstante, los individuos utilizados en este bioensayo fueron los sobrevivientes a una infección viral previa, esto es, los individuos con síntomas de infección y que murieron fueron descartados. Por este motivo, es probable que la densidad del GCT genere una mortalidad adicional más que una activación de la letalidad efecto de la infección de VG013.

La relación entre la densidad de larvas y el tiempo de muerte fue negativa; las larvas que murieron por la infección, lo hicieron más rápido a densidades altas. Estos resultados coinciden con los encontrados en el Capítulo 1. En términos numéricos, las larvas de altas densidades fueron sometidas a más concentración de virus que las larvas solitarias (Vilaplana et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, los resultados de este tipo de estudios varían mucho entre especies de insectos. Por ejemplo, Kunimi y Yamada (1990) demostraron que cuando se crían en grupos, *Mythimma separata* es mucho más resistente a la infección de baculovirus que insectos criados de manera solitaria (profilaxis denso-dependiente). Reilly y Hajek (2008) demostraron que la susceptibilidad de *L. dispar* a los baculovirus aumenta cuando hay densidades altas del lepidóptero. Goulson y Cory (1995) muestran que los individuos de *Mamestra brassicae* que han crecido en condiciones solitarias son poco resistentes a las infecciones de baculovirus. La gran mayoría de estudios de este tipo,

incluyendo este, han considerado solo la infección viral administrada vía oral. Son necesarios estudios que evalúen la densidad de la plaga y su interacción con infecciones encubiertas provenientes de transmisiones verticales de padres a descendencia (Pavlushin et al., 2019).

Los resultados de este estudio indican que el incremento en la densidad poblacional del GCT, no puede ser considerado un factor, por sí mismo, detonante de epizootias del aislamiento VG013. Al parecer, la activación de infecciones encubiertas no se relaciona solo con la densidad de la plaga sino con factores adicionales que son denso-dependientes (inanición, profilaxis) (Wilson y Cotter 2008; Pavlushin et al., 2019). El rol de este tipo de factores debe ser evaluado en estudios posteriores.

Las qPCR mostraron que las larvas que murieron luego de someterlas a diferentes densidades murieron a causa de la infección viral. En todos los tratamientos, el 90% de las larvas que murieron, presentaron los síntomas visibles de infección y se les detectó el virus. En cuanto a los individuos que llegaron a estado adulto, se confirmó que presentaron el virus, pero evidentemente no fue letal. En todos los tratamientos más del 50% de adultos se les detectó el virus. Los adultos seleccionados para qPCR fueron recolectados apenas emergieron, lo que confirma una de las conclusiones del Capítulo 1: Probablemente las partículas virales de los adultos disminuyen con el tiempo al punto que, después de su muerte natural, la concentración viral no es detectable. El hecho de que una porción de individuos que sobrevive al desafío que presenta la infección y se le adicione un factor de estrés como lo es el aumento de población, abre el espectro para futuras investigaciones de este tipo. Por ejemplo, 1. Evaluar si estos adultos tienen mayor o menor capacidad de transmitir el virus verticalmente que adultos que no sufrieron factores de estrés como la alta densidad poblacional y 2. Evaluar la activación de infecciones no letales de infecciones transmitidas verticalmente.

### 3.6 Literatura citada

- Baltensweiler W, Fischlin A. (1988). The larch budmoth in the Alps. In Dynamics of Forest Insect Populations: Patterns, Causes, Implications, ed. A Berryman, pp. 332–53. New York: Plenum
- Burden J. P., Griffiths C. M., Cory J. S., Smith P, Sait S. M. (2002) Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Molecular Ecology* 11: 547–555.
- Burden, J. P. Nixon, C. P. Hodgkinson, A. E. Possee, R. D. Sait, S. M. King, L. A. Hails, R. S. (2003) Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses. *Ecology Letters*. 524–531.
- Carrera, M., Zeddani, J., Pollet, A., Lery, X., & López-Ferber, M. (2008). Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. *IOBC/wprsBulletin*, 31, 40–43
- Cory, J. S. (2015, April 1). Insect virus transmission: Different routes to persistence. Current Opinion in Insect Science. Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.01.007>
- Fuxa, J.R.; Sun, J.Z.; Weidner, E.H.; LaMotte, L.R. (1999) Stressors and rearing diseases of *Trichoplusia ni*: Evidence of vertical transmission of NPV and CPV. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74, 149–155.
- Gómez-Valderrama, J. A., Barrera, G., López-Ferber, M., Belaich, M., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. (2018). Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick). *Journal of Applied Entomology*, 142(1–2), 67–77.  
<https://doi.org/10.1111/jen.12406>.
- Hughes, D.S.; Possee, R.D.; King, L.A. (1993) Activation and detection of a latent baculovirus resembling *Mamestra brassica* nuclear polyhedrosis virus in *M. brassica* insects. *Virology*, 194, 604–615.
- Knell R. J., Begon M, Thompson D. J. (1998). Transmission of *Plodia interpunctella* granulosis virus does not conform to the mass action model. *Journal of Animal Ecology*. 67:592– 599
- McCallum H., Barlow N. & Hone J. (2001): How should pathogen transmission be modelled? *Trends in Ecology and Evolution*. 16: 295–300.

- Myers, J. (1988). Can a general hypothesis explain population cycles of forest Lepidoptera? *Advances in Ecological Research*. 18, 179–242.
- Myers, J. H., & Cory, J. S. (2013). Population Cycles in Forest Lepidoptera Revisited. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 44(1), 565–592. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110512-135858
- Myers J. H. & Cory J. S. (2015) Ecology and evolution of pathogens in natural populations of Lepidoptera. *Evolutionary Applications*. 9: 231–247.
- Pavlushin, S. V., Belousova, I. A., Chertkova, E. A., Kryukova, N. A., Glupov, V. V., & Martemyanov, V. V. (2019). The effect of population density of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae) on its fitness, physiology and activation of the covert nucleopolyhedrovirus. *European Journal of Entomology*, 85–91. <https://doi.org/10.14411/EJE.2019.009>.
- Reilly J. R. & Hajek A. E. (2008): Density-dependent resistance of the gypsy moth *Lymantria dispar* to its nucleopolyhedrovirus, and the consequences for population dynamics. *Oecologia* 154:
- Schowalter T. D. (2006): Insect Ecology: An Ecosystem Approach. 2nd ed. Academic Press, Burlington, MA, pp. 157–159.
- Vasconcelos, Simão D., Cory, Jennifer S., Speight, Martin R., & Williams, Trevor. (2002). Host Stage Structure and Baculovirus Transmission in *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae: a Laboratory Examination of Small Scale Epizootics. *Neotropical Entomology*, 31(3), 391-396. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2002000300007>
- Vilaplana L., Wilson K., Redman E., Cory J. (2010). Pathogen persistence in migratory insects: High levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm. *Evolutionary Ecology*. 24. 147-160. 10.1007/s10682-009-9296-2.
- Williams, T., Virto, C., Murillo, R., y Caballero, P. (2017, July 17). Covert infection of insects by baculoviruses. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01337>.
- Wilson K. y Cotter S.C. (2009): Density-dependent prophylaxis in insects. In Ananthakrishnan T.N. & Whitman T.W (eds): Phenotypic Plasticity of Insects: Mechanisms and Consequences.

## **4. Conclusiones y recomendaciones**

## 4.1 Conclusiones

El aislamiento VG013 demostró un gran potencial para ser usado como ingrediente activo en un biopesticida novedoso para el control del GCT. Este aislamiento presenta una gran ventaja sobre los insumos químicos ya que estos últimos no cuentan con la adaptación innata de transmitirse a nuevos individuos de la plaga.

La aplicación de dosis bajas del aislamiento VG013 causan un aumento en la tasa de desarrollo de los insectos; sin embargo, pueden reducir a mediano y largo plazo las poblaciones del GCT en cultivos agrícolas. Dicha aplicación disminuye de manera significativa el potencial de crecimiento de las poblaciones plaga. Este trabajo constituye el primer acercamiento al uso de infecciones no letales para el manejo del CGT.

El estudio de los mecanismos de transmisión y los efectos subletales del granulovirus VG013, son una parte fundamental en la obtención de una estrategia sostenible para mantener las poblaciones del GCT por debajo de los niveles económicos. El granulovirus VG013 sigue un modelo mixto de transmisión en poblaciones del GCT. Este trabajo presenta la primera evidencia de transmisión vertical de baculovirus en *T. absoluta*. Respecto a los mecanismos de transmisión horizontal, se determinó que las heces de larvas no son un medio de dispersión del granulovirus.

Los resultados de este estudio indican que el incremento en la densidad poblacional del GCT, no puede ser considerado un factor, por sí mismo, detonante de infecciones letales del aislamiento VG013. Al parecer, la activación de infecciones encubiertas no se relaciona solo con la densidad de la plaga sino con factores adicionales que son denso-dependientes (inanición, profilaxis).

Las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real lograron detectar las concentraciones de virus encubiertas en los individuos.

## 4.2 Recomendaciones

Es importante continuar con estudios que involucren las infecciones encubiertas ya que brindan información valiosa para entender la complejidad de los sistemas insecto-virus, aspectos sobre su evolución, biología y determinan la importancia ecológica de estos patógenos en los cultivos más importantes.

Se sugiere complementar los estudios de efectos sub-letales de patógenos con muestreos continuos en los cultivos, con secuenciación genética de baculovirus. Esto puede brindar información valiosa sobre la historia de vida de estos patógenos a la que no se puede llegar con ensayos convencionales.

Se recomienda llevar a cabo estudios que evalúen el efecto que tienen factores abióticos (lluvias, viento radiación) en la transmisión de granulovirus en sistemas donde el patógeno no puede romper el integumento del insecto por sí mismo.

La transmisión vertical de granulovirus en el GCT abre la puerta para más investigación. Se recomienda llevar a cabo estudios que evalúen si la transmisión vertical está mediada por el sexo de los adultos, hasta cuantas generaciones es posible transmitir el virus. También se sugieren estudios que evalúen las partes del cuerpo del adulto donde se presenta mayor cantidad de virus y si estos pueden adquirir de algún modo la infección en su etapa reproductiva.

Estudios sobre la dinámica de dispersión viral por parte de los adultos se hacen necesarios para comprender la estrecha relación de esta granulovirus con el GCT.

Se sugiere continuar con la metodología de detección de infecciones encubiertas con qPCR debido a que es una técnica muy sensible, genera resultados rápidamente y es reproducible.

