

Fotoestabilidad y actividad insecticida de dos formulaciones de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*

Photostability and insecticidal activity of two formulations of granulovirus against *Tecia solanivora* larvae

MARTHA CHAPARRO¹, CARLOS ESPINEL C.², ALBA MARINA COTES P.³ y LAURA VILLAMIZAR R.⁴

Resumen: El Laboratorio de Control Biológico de Corpoica desarrolló dos formulaciones con base en un aislamiento nativo del granulovirus de *Phthorimaea operculella* extraído de larvas de *Tecia solanivora* para el control de estas polillas en campo. Estas formulaciones incluyen un protector UV del grupo de los abrillantadores ópticos. Para determinar el efecto del abrillantador, se prepararon suspensiones virales ajustadas a cinco concentraciones desde 10^2 hasta 10^6 CI/mL, en soluciones del abrillantador al 0,1% y al 0,5% y se realizó un bioensayo para determinar las CL_{50} del virus. Posteriormente las dos formulaciones, un concentrado emulsionable y granulado dispersable, fueron aplicadas sobre tubérculos de papa que se expusieron a la radiación ultravioleta durante dos, cuatro, seis, ocho y 10 horas y se realizó un bioensayo para determinar el nivel de inactivación del virus mediante la evaluación de la mortalidad de los insectos. Se observó mayor actividad del virus cuando se incrementó la concentración del abrillantador, obteniéndose una CL_{50} de $1,6 \times 10^6$ CI/mL para el virus puro, de $3,0 \times 10^5$ CI/mL para el virus con el fotoprotector al 0,1% y de $3,0 \times 10^4$ CI/mL para el virus con el fotoprotector al 0,5%, resultados que permiten sugerir que el abrillantador óptico presenta efecto sinérgico con el virus. Ambas formulaciones protegieron eficientemente al virus del efecto de la radiación UV, obteniéndose mortalidades corregidas del 60% después de 10 horas de exposición con el concentrado emulsionable, del 46,6% con el granulado dispersable y del 23,3% con el virus puro.

Palabras clave: Baculovirus. Bioplaguicida. Abrillantador óptico. Polilla guatemalteca de la papa.

Abstract: The Biological Control Laboratory of Corpoica developed two formulations based on a native isolate of the *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* larvae, for the control of these moths in the field. These formulations include a UV protector from the group of optical brighteners. To determine the effect of the brightener, viral suspensions adjusted to five concentrations from 10^2 up to 10^6 CI/mL were prepared in brightener solutions at 0.1% and 0.5% and a bioassay was performed to determine the viral LC_{50} . Afterwards the two formulations, an emulsifiable concentrate and a dispersible granule, were applied on potato tubers that were exposed to ultraviolet radiation during two, four, six, eight, and 10 hours and a bioassay was performed to determine viral inactivation level by evaluating insect mortality. Higher viral activity was observed when brightener concentration was increased, obtaining a LC_{50} of 1.6×10^6 CI/mL for pure virus, 3.0×10^5 CI/mL for the virus with the photoprotector at 0.1% and 3.0×10^4 CI/mL for the virus with the photoprotector at 0.5%, results that allow us to suggest the optical brightener presents a synergistic effect with the virus. Both formulations efficiently protected the virus from the effect of UV radiation, obtaining corrected mortalities of 60% after 10 hours of exposure with the emulsifiable concentrate, 46.6% with the dispersible granule and 23.3% with the pure virus.

Key words: Baculovirus. Biopesticide. Optical brightener. Guatemalan potato moth.

Introducción

Para el control de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae), una de las principales plagas de este cultivo, los agricultores acuden a una gran cantidad de plaguicidas químicos que con frecuencia son aplicados de forma exagerada e indiscriminada. Frente a este problema surge la necesidad de desarrollar estrategias de manejo integrado de plagas (MIP) que además del control cultural, etológico y químico, incluyen herramientas de control biológico (Herrera *et al.* 2000).

Dentro de las estrategias de control biológico implementadas para el manejo de *T. solanivora*, se encuentra el uso de virus entomopatógenos, como es el caso del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873), patógeno también de

T. solanivora (Espinell *et al.* 2009b). Sin embargo, la preservación de la actividad original de un virus o algún otro entomopatógeno usado como insecticida microbiano y aplicado en campo, se ve afectada por factores ambientales como la luz ultravioleta (Ignoffo *et al.* 1997).

Dentro de los factores ambientales, el que produce la mayor inactivación y afecta en mayor proporción la estabilidad de los virus entomopatógenos, es la radiación solar y se debe principalmente a la porción del espectro correspondiente a la luz ultravioleta (UV) (Shapiro *et al.* 1983), que causa la inactivación principalmente por la formación de dímeros de pirimidina, que impiden la replicación del ADN y la consecuente formación de nuevos viriones (Burgess 1998).

Por tales razones se han realizado trabajos en búsqueda de estrategias que le proporcionen protección a los virus, para lo

¹ Microbióloga Industrial, Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica. mchapparro@corpoica.org.co.

² Investigador, M. Sc. Entomología, Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, C.I. Tibaitatá. cespinel@corpoica.org.co.

³ Ph. D. Fitopatología. Directora del Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, C.I. Tibaitatá, acotes@corpoica.org.co.

⁴ Ph. D. Ciencias Farmacéuticas, Investigadora, Laboratorio de Control Biológico, Centro de Biotecnología y Bioindustria, Corpoica, C.I. Tibaitatá, lvillamizar@corpoica.org.co. Autora para correspondencia.

cual se han probado diferentes sustancias como los abrillantadores ópticos, los cuales no solamente permiten proteger los virus de la radiación UV, sino que simultáneamente tienen un efecto potenciador y permiten aumentar hasta más de dos mil veces la actividad de un virus (Caballero *et al.* 2001). Sin embargo, es importante considerar que su utilización puede tener algunos efectos en el medio, lo cual depende de las dosis utilizadas (Kramer 1992).

Es por esto que Corpoica desarrolló dos formulaciones a base del granulovirus nativo VG003 aislado de *Tecia solanivora*, el cual afecta también a *P. operculella* (Espinel *et al.* 2009b) y según el trabajo de Barrera *et al.* (2009), corresponde a un granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV). Una formulación corresponde a un concentrado emulsionable (CE) y otra a un granulado dispersable (GD). Éstas incluyen dentro de sus excipientes un protector UV que pertenece al grupo de los abrillantadores ópticos; este grupo de compuestos, además de brindar fotoprotección, ha mostrado tener un efecto potenciador de la actividad insecticida de varios baculovirus (Caballero *et al.* 2001).

El objetivo del presente trabajo fue el de evaluar el efecto de las dos formulaciones sobre la fotoestabilidad del virus expuesto a una fuente artificial de luz ultravioleta y determinar el posible efecto del abrillantador óptico incluido en las formulaciones, sobre la actividad insecticida del virus, con el fin de generar información que permita continuar con el desarrollo de los productos.

Materiales y Métodos

Propagación viral. Para obtener la cantidad requerida de inóculo viral, se tomaron huevos de *T. solanivora* provenientes de la cría del insecto ubicada en el Laboratorio de Entomología de Corpoica. Éstos se inocularon con el aislamiento PhopGV nativo (VG003) proveniente de Cundinamarca y previamente seleccionado por presentar alta actividad insecticida contra *T. solanivora* (Espinel *et al.* 2009a). Los huevos ubicados sobre un disco de papel toalla (aproximadamente 400-500 huevos/disco) fueron inoculados con un pincel aplicando la suspensión viral y dejándolos secar a temperatura ambiente.

En cubetas de plástico de 4 litros de capacidad se ubicaron seis tubérculos secos y previamente lavados con agua potable de papa pastusa. Sobre ellos se ubicaron trozos de papel, cada uno con aproximadamente 40 huevos inoculados. Los recipientes fueron cerrados e incubados en un cuarto de bioensayos a una temperatura de 25°C por 20 días. Pasado este tiempo, las larvas fueron extraídas y clasificadas. Aquellas larvas con síntoma típico de la enfermedad causada por granulovirus, se colocaron en cajas de Petri estériles, las cuales fueron selladas y almacenadas a 4°C.

Purificación y cuantificación viral. El virus utilizado para los ensayos y para la elaboración de los prototipos fue obtenido a partir de un proceso de purificación mediante centrifugaciones diferenciales. Para tal fin, las larvas infectadas se maceraron en SDS al 0,1% y la suspensión se filtró en tres capas de velo suizo estéril, para una posterior centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y centrifugó a 15000 rpm durante 1 hora y el sedimento obtenido se resuspendió en 2 mL de tampón Tris-HCl (pH 6.0) y se centrifugó nuevamente sobre un gradiente de glicerol de 30% - 80% (v/v) a 15000 rpm durante 10 minutos. Se recuperó la

banda blanca que contenía el virus y ésta se lavó dos veces en tampón Tris-HCl.

La concentración de todas las suspensiones de virus purificado utilizadas para todos los ensayos, se cuantificó mediante la lectura de la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro, usando una curva de calibración previamente estandarizada adaptando la metodología descrita por Matthiessen *et al.* (1978).

Evaluación del efecto potenciador del filtro UV. Se prepararon suspensiones virales ajustadas a concentraciones desde 2×10^2 hasta 2×10^6 CI/mL; éstas fueron mezcladas en relación 1:1 (V/V) con dos soluciones del filtro ultravioleta (CBUV05) ajustadas al 1% y al 0,2%.

Las suspensiones finalmente quedaron ajustadas a cinco concentraciones virales de 1×10^2 a 1×10^6 CI/mL y con el fotoprotector al 0,1% o al 0,5% respectivamente. El control positivo consistió en el virus puro mezclado con agua destilada y ajustado a las mismas concentraciones virales mencionadas anteriormente. De igual forma, se contó con un testigo absoluto en el cual los tubérculos no fueron tratados y un testigo relativo en el cual los tubérculos fueron tratados con las soluciones del filtro ultravioleta, pero sin estar éste mezclado con el virus. Tres tubérculos lavados de similar tamaño (180 ± 20 g por papa) fueron inoculados con cada tratamiento utilizando una brocha de 1 pulgada y aplicando 2 mL sobre cada cara del tubérculo.

Posteriormente se colocaron 10 larvas neonatas de *T. solanivora* sobre cada tubérculo (30 larvas por tratamiento) ubicado individualmente en un recipiente plástico de 16 onzas (unidad experimental). Los recipientes se taparon e incubaron a una temperatura de 25°C durante 30 días. Pasado este tiempo se realizó un muestreo destructivo de las papas en busca de todas las larvas. El número de larvas muertas se consideró como la suma de los individuos muertos, los desaparecidos y las larvas vivas con síntomas evidentes de infección viral y como individuos vivos, la suma de las larvas sanas y las pupas.

Este experimento contó con un diseño completamente al azar con tres repeticiones (10 larvas por repetición) por tratamiento. Los resultados se sometieron a un análisis Probit con el programa BioStat 2008, para determinar el efecto del filtro UV sobre la concentración letal media del virus.

Determinación del efecto fotoestabilizador de las formulaciones. Las formulaciones se elaboraron empleando virus purificado y diferentes tipos de componentes como aceites vegetales y surfactantes para el concentrado emulsionable (CE) y silicatos, almidón y azúcares para el granulado dispersable (GD). Además, los dos productos incluyeron un filtro ultravioleta del grupo de los abrillantadores ópticos, los cuales tienen la capacidad de absorber el espectro que comprende la luz UV y emitir luz en la región azul del espectro visible (Caballero *et al.* 2001).

Teniendo en cuenta que la concentración de los dos prototipos de bioplaguicidas es 1×10^9 CI por g o mL respectivamente, éstos se reconstituyeron en agua destilada utilizando 1 g o mL en 1000 mL para una concentración final de 1×10^6 CI/mL. También se preparó una suspensión de virus puro sin formular ajustada a la misma concentración de los prototipos de bioplaguicida reconstituidos. Estas suspensiones se utilizaron para inocular la superficie de tubérculos de papa de tamaño parejo (180 ± 20 g por papa), aplicando con una

brocha de 1 pulgada, un volumen de 2 mL por cada cara del tubérculo.

El experimento contó con 19 tratamientos, que consistieron en los tubérculos inoculados con los dos prototipos de bioplaguicidas y el virus puro sin formular, expuestos durante diferentes tiempos a la radiación UV y un testigo absoluto que consistió en tubérculos no tratados y no expuestos a la radiación UV.

Una vez inoculadas las papas, éstas fueron ubicadas en una cabina de flujo laminar a 60 cm de la fuente de luz UV, utilizando un diseño de bloques que contó con nueve columnas de seis tubérculos, tres columnas para cada tratamiento. Las filas comprendieron los diferentes tiempos de exposición y las columnas correspondieron a las formulaciones y el virus sin formular. Para la irradiación se utilizó una lámpara Repti Glo 20 que simula la radiación UV del sol y emite un 33% de UVA y un 8% de UVB; ubicada la lámpara a 10 cm de altura, las muestras se expusieron a una intensidad de radiación ultravioleta tipo B de 250 W/cm². Los tiempos de exposición fueron de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas y cada dos horas se cubrió con papel aluminio la fila de tubérculos correspondiente al respectivo tiempo de exposición.

Terminada la irradiación, se pusieron 10 larvas neonatas de *T. solanivora* sobre cada tubérculo ubicado individualmente en un recipiente plástico de 16 onzas (unidad experimental), para un total de 30 larvas por tratamiento. Los recipientes se taparon e incubaron a una temperatura de 25°C durante 30 días. Pasado este tiempo se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos en busca de las larvas. Se consideró como el número de larvas muertas la suma de los El número de individuos muertos es igual a la suma de larvas muertas, desaparecidas, larvas vivas con síntomas evidentes de infección viral; como individuos vivos se consideró la suma de las larvas sanas y las pupas. Los resultados de mortalidad se corrigieron con respecto al tratamiento testigo absoluto, determinando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider Orelli (Zar 1999):

$$\text{Eficacia (\%)} = (b - k) / (100 - k) \times 100$$

Donde *b* es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento y *k* es el porcentaje de mortalidad del testigo absoluto. Posteriormente se calculó el porcentaje de mortalidad original remanente (% MOR), mediante la fórmula (Martignoni e Iwai 1985):

$$\text{MOR (\%)} = (f / n) \times 100$$

Donde *f* es el porcentaje de mortalidad obtenido con el tratamiento expuesto a la radiación UV y *n* es el porcentaje de mortalidad obtenido con el tratamiento no expuesto.

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y contó con tres repeticiones por tratamiento. Los resultados se analizaron con el programa SAS 9.1. Éstos cumplieron los principios de normalidad y homogeneidad de varianzas, por lo que se sometieron a un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%).

Resultados y Discusión

Evaluación del efecto potenciador del filtro UV. En el tratamiento testigo no se presentó mortalidad, por lo que los resultados de los tratamientos restantes no fueron corregidos. Los resultados de mortalidad fueron entonces sometidos a un análisis Probit y para todos los tratamientos, el valor de *P* fue mayor a 0,05, lo que permitió aceptar la hipótesis propuesta, que sugiere que existe una correlación lineal entre la dosis y la mortalidad de las larvas.

Las concentraciones letales medias obtenidas para el virus puro, el virus con el fotoprotector al 0,1% y el virus con el fotoprotector al 0,5% fueron de $1,6 \times 10^6$, $3,0 \times 10^5$ y $3,0 \times 10^4$ CI/mL respectivamente, observándose que la CL₅₀ del virus con el fotoprotector al 0,1% fue un exponente menor que la del virus puro; cuando el virus se mezcló con el fotoprotector al 0,5%, ésta fue dos exponentes menor que la CL₅₀ del virus puro y un exponente menor que la del virus mezclado con el fotoprotector al 0,1% (Tabla 1).

Las potencias relativas de los tratamientos y sus respectivos límites de confianza (Tabla 1) evidenciaron diferencias significativas entre éstos, mostrando que el fotoprotector CBUV05 tuvo un efecto potenciador de la actividad insecticida del virus, el cual aumentó cuando se incrementó la concentración. El efecto de los abrillantadores ópticos fue comprobado por Shapiro (1992), cuando evaluaron 23 compuestos de este grupo mezclados con el nucleopoliedrovirus de *Lymantria dispar* (L., 1758) (Lepidoptera: Lymantriidae) en diferentes concentraciones como 0,1%, 0,25%, 0,5%, y 1%. Se evidenció que a una concentración del 1% se presentó el mejor porcentaje de mortalidad, hasta del 99,3%.

Este grupo de filtros UV ha demostrado tener la capacidad de aumentar la actividad insecticida de algunos virus como el nucleopoliedrovirus de *L. dispar*, para el cual aumentó dos mil veces su actividad con el uso de un abrillantador óptico (Caballero *et al.* 2001). En otro estudio realizado por Argauer y Shapiro (1997), se evaluó el efecto de varios abrillantadores ópticos sobre este mismo nucleopoliedrovirus y se confirmó esta actividad, ya que la CL₅₀ del virus puro fue de 26.500 CI/mL y con el uso de abrillantadores ópticos como el Blankophor BBH al 1%, ésta disminuyó a 76 CI/mL.

En otro estudio realizado por Martínez *et al.* (2003) se evidenció también el efecto potenciador de los abrillanta-

Tabla 1. Resultados del análisis Probit del ensayo concentración-mortalidad para el virus puro y mezclado con el fotoprotector al 0,1% y al 0,5%.

Tratamiento	CL ₅₀ (CI/ml)	Potencia relativa	Límite de confianza inferior	Límite de confianza superior	κ ²	Valor P
Virus Puro	$1,6 \times 10^6$	1.0	–	–	0.505	0.917
Virus con fotoprotector al 0.1%	$3,0 \times 10^5$	5.3	3.4	12.4	0.418	0.936
Virus con Fotoprotector al 0.5%	$3,0 \times 10^4$	53.3	40.9	131.6	0.173	0.981

dores ópticos sobre el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Las larvas de dicho insecto fueron tratadas con el virus solo, obteniéndose un porcentaje de mortalidad del 66,3% y cuando las partículas virales se mezclaron con dos de estos derivados del estilbano (Blankophor BBH y Calcofluor M2R), la mortalidad aumentó hasta el 100%. Sin embargo, en otro estudio realizado por Lasa *et al.* (2006), se aplicó el nucleopoliedrovirus de *Spodoptera exigua* (Hubner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) solo, sin formular y mezclado con el abrillantador óptico Leucophor AP a plantas ubicadas en un invernadero. Los valores de CL_{50} fueron reducidos de 57,3 CI/mm² cuando el virus se aplicó solo, a valores de CL_{50} de 2,29 CI/mm² cuando se incluyó el Leucophor AP.

Durante la última década han surgido diferentes hipótesis sobre el modo de acción de los abrillantadores ópticos, todas dirigidas hacia acciones en el intestino medio del insecto. En estudios con el NPV de *L. dispar*, se encontró que 48 h después del consumo del virus mezclado con Tinopal LPW, se produjeron perturbaciones fisiológicas que incluyeron la disminución del pH intestinal, la disminución en la alimentación y una disminución de peso (Caballero *et al.* 2001). En el trabajo de Okuno *et al.* (2002) además se observó que los abrillantadores ópticos incrementan la probabilidad de infección del virus, porque inhiben la síntesis de quitina, aumentando la permeabilidad de la membrana peritrófica, y en consecuencia reduciendo la cantidad necesaria de virus para causar infección y muerte en las larvas.

Dicho efecto sobre la quitina se considera el principal modo de acción de estas sustancias, debido a que la quitina en la membrana peritrófica actúa como un andamio para las proteínas. Sin embargo, también se ha observado un efecto debido a la degradación de la mucina del intestino, principalmente con el uso de Calcofluor M2R (Wang y Granados 2000).

Los resultados permiten concluir que el abrillantador óptico evaluado en este estudio tiene un efecto potenciador sobre el aislamiento VG003 de PhopGV, el cual es dependiente de la dosis. Dicho efecto podría mejorar la eficacia de un producto formulado a base de este virus, pero es necesario considerar el costo de esta tecnología en una línea de producción comercial.

Además de los costos, debe evaluarse el posible impacto ambiental que pueden generar los derivados del estilbano al ser aplicados masivamente en campo, ya que aunque su potencial de bioacumulación es muy bajo, dependiendo de la molécula, pueden encontrarse productos de mediana a alta toxicidad para peces y organismos acuáticos, con CL_{50} entre 7 y 100 mg/L. Un factor favorable, es que los abrillantadores ópticos son fotodegradados por efecto de reacciones de fotólisis causadas por la luz solar, con vidas medias estimadas en campo de aproximadamente 25 días. Adicionalmente, aunque estos compuestos no son realmente biodegradables, la biodegradación puede darse después de un proceso de aclimatación de los microorganismos (Kramer 1992).

Determinación del efecto fotoestabilizador de las formulaciones. La eficacia o mortalidad corregida con respecto al testigo (mortalidad del 6,6%), se redujo significativamente ($P < 0.05$) cuando el virus sin formular fue irradiado con luz UV a partir de 6 horas de exposición. La mortalidad causada por el virus puro sin irradiar fue del 90%, mientras que el virus irradiado por 6 horas fue del 26,6%, a las 8 horas del 23,3%, y a las 10 horas del 23,3% (Tabla 2).

El concentrado emulsionable presentó una reducción significativa de la eficacia a partir de 4 horas de exposición, pues pasó de una eficacia del 100% antes de ser expuesto a la luz UV al 66,6% después de 4 horas de irradiación. Sin embargo, esta formulación sigue brindando protección al virus, a pesar de haber presentado una reducción de su eficacia, pues después de 10 horas de exposición, su actividad insecticida fue significativamente mayor que la obtenida con el virus puro (Tabla 2). Por el contrario, con el granulado dispersable no se detectaron diferencias significativas entre la actividad insecticida del virus antes y después de 10 horas de irradiación, sugiriendo que la formulación granular fue más eficiente para la fotoestabilización del virus.

En términos generales, la mortalidad disminuyó en todos los tratamientos con el aumento del tiempo de exposición, resultado que indica que la radiación ultravioleta artificial utilizada (UVA y UVB), inactivó el virus formulado y sin formular, pero en los dos casos (GD y CE) el virus formulado se inactivó más lentamente que el no formulado, posiblemente por efecto de los auxiliares de formulación utilizados.

De los tres tratamientos, el granulado dispersable presentó una menor actividad insecticida antes de la irradiación, que podría estar relacionada con la composición particular de este producto, el cual incluye proteínas, carbohidratos y azúcares, que se solidifican o cristalizan sobre los cuerpos de inclusión (Támez *et al.* 2006), cuando el producto es sometido al proceso de secado, después de granularlo vía húmeda. Dichos compuestos poliméricos posiblemente formaron matrices de difícil disolución en el intestino del insecto, que afectaron la liberación del virus en el sitio de acción y por ende su actividad insecticida. Por esta misma razón, es posible que el granulado dispersable haya presentado una menor inactivación frente a la radiación, ya que las partículas virales podrían haberse encapsulado en las matrices poliméricas, adquiriendo una cubierta que las protegió del efecto de la luz UV.

Este efecto fotoprotector de las matrices poliméricas depositadas sobre la superficie de los cuerpos de inclusión virales fue descrito por Ignoffo y Batzer (1971), quienes microencapsularon el nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) con celulosa. El virus microencapsulado fue más fotoestable y produjo una mortalidad del 60%, en comparación con el 10% de mortalidad obtenido con el virus sin formular, lo que atribuyeron a la formación de las microcápsulas.

Otra posible explicación para la menor actividad inicial del granulado podría ser una heterogénea distribución de los cuerpos de inclusión virales en la superficie de los tubérculos, relacionada con una inadecuada desintegración de esta formulación en el momento de su reconstitución, debida posiblemente al uso de sustancias aglutinantes como el almidón y a un insuficiente contenido del agente desintegrante.

Con respecto a la mortalidad original remanente (MOR%), se observó que a medida que aumentó la exposición a la radiación UV, disminuyó significativamente el valor de esta variable para todos los tratamientos (Tabla 2), confirmando el efecto deletéreo de la radiación UV, el cual es directamente proporcional al tiempo de exposición. En un estudio similar, Batista *et al.* (2001) evaluaron la tolerancia a la radiación UV de dos formulaciones del nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). Los tratamientos fueron el virus sin formular y formulado como un concentrado emulsionable. El porcentaje de mortalidad de larvas obtenido con el virus formulado expuesto a luz UV por

Tabla 2. Efecto de la radiación UV sobre la eficacia, inactivación y mortalidad original remanente de las dos formulaciones a base del granulovirus VG003. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Tratamiento	Tiempo (h)	Eficacia (%)	Inactivación (%)	MOR (%)	Grupos homogéneos (95%)
Granulado dispersable	0	70,0	0,0	100,0	bcd
	2	56,6	19,0	80,9	cd
	4	56,6	19,0	80,9	cd
	6	53,3	23,8	76,1	d
	8	53,3	23,8	76,1	d
	10	46,6	33,3	66,6	d
Concentrado emulsionable	0	100,0	0,0	100,0	a
	2	80,0	20,0	80,0	abc
	4	70,0	30,0	70,0	bcd
	6	66,6	33,3	66,6	bcd
	8	60,0	40,0	60,0	cd
	10	60,0	40,0	60,0	cd
Virus puro	0	90,0	0,0	100,0	ab
	2	86,6	3,7	96,2	ab
	4	80,0	11,1	88,8	abc
	6	26,6	70,3	29,6	e
	8	23,3	70,0	25,9	e
	10	23,3	70,0	25,9	e

5 minutos fue mayor que el obtenido con el virus sin formular, con un 37% y un 19% respectivamente. En dicho trabajo el concentrado emulsionable protegió al virus de la radiación, lo que los autores relacionaron con la adición de aceites vegetales que actúan como fotoestabilizadores y mantienen la actividad de los agentes de biocontrol. Dicho efecto fotoestabilizador de los aceites podría también haberse producido con el concentrado emulsionable del granulovirus VG003 evaluado en el presente estudio, cuyo vehículo es una mezcla de ácidos grasos de origen vegetal.

La susceptibilidad a la radiación ultravioleta de otro aislamiento de PhopGV como el evaluado en el presente trabajo, fue estudiada por Sporleder *et al.* (2000). En dicho trabajo se determinó el tiempo de inactivación de este granulovirus sin formular, expuesto a la radiación solar natural en Perú. Después de la exposición a luz solar en diferentes meses del año, el virus se inactivó alrededor del 99% en un intervalo de 2,56 min a 4,53 min, dependiendo del mes de exposición y del incremento de la energía.

La inactivación causada por la luz solar sobre los virus entomopatógenos no se ha evidenciado solamente para PhopGV sino para una gran cantidad de especies y aislamientos virales. Tal es el caso del nucleopoliedrovirus de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1977) (Lepidoptera: Noctuidae), el cual después de una exposición de 16 horas a la luz solar simulada, presentó una actividad original remanente del 26% (Ignoffo *et al.* 1989).

Una de las alternativas más estudiadas para la fotoprotección de los virus ha sido la utilización de sustancias que absorben o reflejan la luz UV. Por ejemplo, en el trabajo realizado por Martignoni e Iwai (1985) se evaluaron siete absorbentes para la protección del nucleopoliedrovirus de *Lyman-*

tria dispar, obteniéndose una protección entre el 59,39% y el 100% cuando el virus fue mezclado con lignosulfonato a una concentración del 6,28%. En otro trabajo, Shapiro (1992) evaluó 23 abrillantadores pertenecientes a diferentes grupos químicos (estilbenos, oxazoles, pirazoles y ácido natálico), encontrando que la mejor protección se consiguió con los estilbenos: Leucophor BSB, Phorwithe AR, Intrawite CF, Leucophor BS, Phorwithe BRU, Phorwithe BKL, Phorwithe CL, y Tinopal LPW, los cuales a una concentración del 1% proporcionaron una protección total, con un porcentaje de actividad original remanente del 100%.

Las dos formulaciones evaluadas en el presente estudio incluían un protector ultravioleta del grupo de los derivados del estilbano, que podría haber jugado un papel fundamental en los resultados de fotoestabilidad obtenidos con los dos productos. Sin embargo, los demás componentes utilizados como carbohidratos, silicatos, aceites vegetales, proteínas y tensioactivos, posiblemente también contribuyeron en alguna proporción en la protección del virus frente a la radiación UV.

Los resultados del trabajo evidenciaron que el fotoprotector CBUV05 incluido en las dos formulaciones, tiene un efecto potenciador de la actividad insecticida del aislamiento de granulovirus VG003, el cual podría ser útil para reducir las dosis de aplicación en campo, haciendo más rentable el uso de este agente de control biológico. También se observó que las dos formulaciones elaboradas con dicho aislamiento viral, incluyendo el filtro CBUV05, fotoestabilizaron al virus, lo que se evidenció en una reducción de la velocidad de inactivación durante la irradiación luz UV artificial. Sin embargo, antes de la exposición a la luz UV, el granulado dispersable presentó una menor actividad insecticida, por lo que se selec-

cionó el concentrado emulsionable para continuar con la fase de optimización de la formulación y posteriormente iniciar los ensayos en campo.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por el apoyo financiero para el desarrollo del presente trabajo y a Bayer S.A. por la donación del abrillantador óptico.

Literatura citada

- ARGAUER, R.; SHAPIRO, M. 1997. Fluorescence and relative activities of stilbene optical brighteners as enhancers for the Gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus. *Journal of Economic Entomology* 90 (2): 416-420.
- BARRERA, G.; CUARTAS, P.; VILLAMIZAR, L. 2009. Comparative analysis of a granulin fragment of Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC wprs Bulletin Pamplona* 45: 129-132.
- BATISTA, A.; ALVES, S.; AUGUSTO, N.; PEREIRA, R.; ALVES, L. 2001. Stability and persistence of two formulations containing *Anticarsia gemmatilis* Nuclear Polyhedrovirus (AgMNPV). *Neotropical Entomology* 30 (3): 411-416.
- BURGES, H. D. 1998. Formulation of microbial biopesticides beneficial, microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 412 p.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial M.V. Phytoma. España, S.I. 518 p.
- ESPINEL, C.; GÓMEZ, J.; VILLAMIZAR, L.; COTES, A.; LERY, X.; LÓPEZ-FERBER, M. 2009a. Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC wprs Bulletin. Pamplona* 45: 145-148.
- ESPINEL, C.; LERY, X.; VILLAMIZAR, L.; ZEDDAM, J.; COTES, A.; LÓPEZ-FERBER, M. 2009b. A *Phthorimaea operculella* granulovirus (phopGV) containing several genotypes is highly efficient on *Tecia solanivora*. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC wprs Bulletin Pamplona* 45: 83-86.
- HERRERA, C.; FIERRO, L.; MORENO, J. 2000. Manejo integrado del cultivo de la papa. Manual técnico, pp. 112-116. Editorial Produmedios. Bogotá. Colombia.
- IGNOFFO, C.; BATZER, O. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *Journal of Economic Entomology* 64: 850-853.
- IGNOFFO, C.; RICE, W.; McINTOSH, A. 1989. Inactivation of nonoccluded an occluded baculoviruses and baculoviruses – DNA exposed to simulated sunlight. *Environmental Entomology* 18 (1): 177-183.
- IGNOFFO, C.; GARCIA, C.; SAATHOFF, S. 1997. Sunlight stability and rain-fatness of formulations of Baculovirus *Heliothis*. *Environmental Entomology* 26 (6): 1470-1474.
- KRAMER, J. 1992. Fluorescent whitening agents. pp. 351-366. En: de Oude, N. T. (Ed.). *The handbook of environmental chemistry. Vol. 3, Parte F, Anthropogenic compounds. Detergents.* Springer-Verlag. Berlin.
- LASA, R.; RUIZ, C.; ALCAZAR, M.; BELDA, J.; CABALLERO, P.; TREVOR, W. 2006. Efficacy of optical brightener formulations of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) as a biological insecticide in greenhouses in southern Spain. *Biological Control* 40: 89-96.
- MARTIGNONI, M.; IWAI, P. 1985. Laboratory evaluation of new ultraviolet absorbers for protection of douglas-fir tussock moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Baculovirus. *Journal of Economic Entomology* 78: 982-987.
- MARTÍNEZ, A.; SIMÓN, O.; WILLIAMS, T.; CABALLERO, P. 2003. Effect of optical brighteners on the insecticidal activity of a nucleopolyhedrovirus in three instars of *Spodoptera frugiperda*. *The Netherlands Entomological Society* 109: 139-146.
- MATTHIESSEN J, CHRISTIAN R, GRACE T, FILSHIE K. 1978. Large-Scale field propagation and the purification of the granulos virus of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bulletin of Entomological Research* 68: 385-391.
- OKUNO, S.; TAKATSUKA, J.; NAKAI, M.; OTOTAKE, S.; MASUI, A.; KUNIMI, Y. 2002. Viral-enhancing activity of various stilbene-derived brighteners for a *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) nucleopolyhedrovirus. *Biological Control* 26: 146-152.
- SHAPIRO, M.; POH, P.; BELL, R. 1983. Ultraviolet protection of the Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrovirus. *Environmental Entomology* 12: 982-985.
- SHAPIRO, M. 1992. Use of optical brighteners as radiation protectants for Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology* 85 (5): 1682-1686.
- SPORLEDER, M.; ZEGARRA, O.; KROSCHER, J.; HUBER, J.; LAGNAOUI, A. 2000. Assessment of the inactivation time of *Phthorimaea operculella* granulovirus (PoGV) at different intensities of natural irradiation. pp. 123-127. Centro Internacional de la Papa. Lima. Perú.
- TAMEZ, P.; ZAMUDIO, V.; MARTÍNEZ, J.; RODRÍGUEZ, C.; TAMEZ, R.; GÓMEZ, R. 2006. Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia-UANL* 9 (2): 149-156.
- WANG, P.; GRANADOS, R. 2000. Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30 (2): 135-143.
- ZAR, J. 1999. *Biostatistical analysis. Cuarta edición.* Prentice Hall. New Jersey. 663 p.

Recibido: 2-sep-2009 • Aceptado: 8-may-2010