

ESTUDIO DE LA PENETRACIÓN EN EL SUELO DE UN GRANULOVIRUS DE  
*Tecia solanivora* FORMULADO COMO UN CONCENTRADO EMULSIONABLE

CAMILO ANDRÉS SUÁREZ BARRIOS

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO DE GRADO

MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTA D.C.

2012

ESTUDIO DE LA PENETRACIÓN EN EL SUELO DE UN GRANULOVIRUS DE  
*Tecia solanivora* FORMULADO COMO UN CONCENTRADO EMULSIONABLE

CAMILO ANDRÉS SUÁREZ BARRIOS

---

Ingrid Schuler  
DECANO ACADÉMICO

---

Janeth del Carmen Arias  
DIRECTORA PROGRAMA MICROBIOLOGÍA

ESTUDIO DE LA PENETRACIÓN EN EL SUELO DE UN GRANULOVIRUS DE  
*Tecia solanivora* FORMULADO COMO UN CONCENTRADO EMULSIONABLE

CAMILO ANDRÉS SUÁREZ BARRIOS

---

Gloria Patricia Barrera  
Bacterióloga, cPhD  
DIRECTORA

---

Laura Fernanda Villamizar  
Química farmacéutica, PhD  
CODIRECTORA

---

Claudia Cuervo  
Bióloga, PhD  
EVALUADOR

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

**ARTICULO 23 DE LA RESOLUCIÓN No. 13 DE JULIO DE 1946:** “La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

## 1. INTRODUCCIÓN

En Colombia muchos de los productos de la canasta familiar son de origen agrícola por lo que la agricultura se constituye como un motor económico importante en el país. Dentro de los productos agrícolas, la papa es un importante componente en la dieta básica de la población, con 200.000 hectáreas sembradas por año, las cuales se encuentran distribuidas en 14 departamentos siendo los mayores productores Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia. (Ministerio de agricultura, 2008).

En Colombia los rendimientos de papa por hectárea, son muy bajos, (alrededor de 17,2 Toneladas) en comparación con los obtenidos en países como Nueva Zelanda y el Reino Unido donde se alcanzan valores de 34,2 y 36,9 toneladas por hectárea respectivamente y por países del MERCOSUR con rendimientos de 21,6 toneladas de papa por hectárea (Ministerio de agricultura, 2008). Aún así los rendimientos de Colombia se encuentran por encima de los rendimientos promedios de los demás países andinos (12,3 Ton/Ha) (Ministerio de Agricultura, 2008). El bajo rendimiento de producción en Colombia está relacionado con el uso de semilla de baja calidad, problemas de fertilización y problemas fitosanitarios. De los problemas fitosanitarios presentes en la papa, las enfermedades más comunes son la pudrición blanda y la sarna común causadas por bacterias, la roña, la rizoctoniasis o costra negra y la gota causadas por hongos, además de plagas como la polilla guatemalteca *Tecia solanivora*, el gusano blanco *Premnotrypes vorax* y el tiroteador *Naupactus sp.* (Moreno, 1996). Dentro de las plagas anteriormente mencionadas se destaca la polilla guatemalteca ya que afecta de manera directa el cultivo, alterando los rendimientos por el daño causado por la larva al tubérculo tanto en campo como en almacenamiento. Las pérdidas económicas pueden oscilar entre el 30 y el 100% debido al rechazo de tubérculos afectados por la plaga (Vargas *et al*, 2004; Niño, 2004).

El ciclo de vida de *Tecia solanivora* tarda de entre 64 y 93 días con un desarrollo holometábolo, pasando por los estadios de huevo, larva, pupa y polilla adulta (Herrera, 1998). Las larvas que emergen de los huevos depositados en la superficie del suelo, penetran por las porosidades del mismo hasta alcanzar el tubérculo, del cual se alimenta formando túneles y galerías causando el deterioro de la calidad (Herrera, 1998). Las estrategias de control del estadio larval del insecto se deben dirigir a etapas previas a su entrada al tubérculo, donde ocasiona el daño y por consiguiente causa pérdidas económicas (Salazar, 2009; Niño, 2004).

Para el control de *Tecia solanivora*, se utilizan tanto agentes químicos como biológicos. Dentro de los agentes químicos los más utilizados son: Fipronil,

Imadacloprid, Lambdacihalotrina, Avermectina y Clofenapir, los cuales presentan baja efectividad, con porcentajes de mortalidad entre el 20 y el 50% (Domínguez *et al*, 2010) y un riesgo potencial de contaminación ambiental. A raíz de los bajos porcentajes de efectividad del control químico, el control biológico ofrece una alternativa limpia y eficiente para disminuir la incidencia de *T. solanivora* en las áreas productoras (Cuartas *et al*, 2009).

Dentro del grupo de microorganismos entomopatógenos se ha destacado la utilización de virus de la familia Baculoviridae, más específicamente los granulovirus, los cuales han sido aislados en diferentes países de Suramérica como Ecuador, Colombia y Perú para controlar la plaga *T. solanivora* (Zeddám *et al*, 2003).

Los granulovirus se caracterizan por su alta especificidad, virulencia y patogenicidad frente a insectos del orden *Lepidoptera*. Además por la formación de cuerpos de inclusión en donde los viriones se encuentran envueltos en una matriz protéica cuya proteína mayoritaria es la granulina, la cual brinda protección frente a factores medio ambientales (Rohrmann, 2011). De acuerdo con las características descritas anteriormente, los granulovirus se han desarrollado como controladores biológicos y se ha implementado su utilización tanto en cultivo como en almacenamiento. Prueba de ello ha sido el desarrollo de un bioplaguicida en polvo formulado a partir del granulovirus aislado de *Phthorimaea operculella*, (otro lepidóptero de la familia Gelechiidae), diseñado para la protección de los tubérculos en almacén (Niño, 2004).

## 2. JUSTIFICACION

El cultivo de la papa representa un renglón importante para la economía de Colombia y una de las principales plagas que afecta su producción es la polilla guatemalteca de la papa o *Tecia solanivora*, que puede ocasionar pérdidas que oscilan entre el 30 y 70% del tubérculo en campo (Espinel *et al*, 2010)

Para el control eficiente y altamente sostenible de la polilla guatemalteca en campo, durante los últimos años Corpoica ha dedicado esfuerzos para el desarrollo de un bioplaguicida a base de una cepa nativa de granulovirus. Por lo anterior desarrolló dos productos formulados como un concentrado emulsionable y un granulado dispersable, que incluyen distintos excipientes, dentro de los que se destacan los filtros solares que le brindan al virus protección frente a la radiación ultravioleta del sol (Chaparro *et al*, 2010). Las formulaciones fueron evaluadas en campo para determinar la capacidad de contaminación de huevos de *T. solanivora* depositados en el suelo, seleccionando el concentrado emulsionable por presentar una eficacia del 83,3% (Gómez *et al*, 2011).

El concentrado emulsionable está diseñado para ser reconstituido en agua y aplicado mediante aspersión en la base de la planta. En un trabajo previo se seleccionó la dosis mínima efectiva en campo de  $1 \times 10^7$  CI/mL ajustados en un volumen de 400 litros, para ser aplicados en una hectárea con una frecuencia quincenal (Gómez *et al*, 2011).

Se considera que la acción del granulovirus sobre los huevos y las larvas ocurre en la superficie del suelo, sin embargo aún no se ha evaluado la capacidad de penetración del producto y su posible acción por debajo de la superficie. Sin embargo es posible que la presencia del producto a diferente profundidad, pueda ejercer algún control sobre la larva durante su trayecto a través del suelo antes de alcanzar el tubérculo

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Corpoica cuenta con un bioplaguicida a base de un granulovirus para el control de *T. solanivora*, el cual está formulado como un concentrado emulsionable de aplicación directa al suelo. En la actualidad no se conoce si el producto tiene la capacidad de ejercer su acción a diferentes profundidades del suelo o si su acción ocurre netamente en la superficie. Como parte de un estudio integral del producto desarrollado es necesario determinar si el producto a la dosis de aplicación recomendada, penetra en el suelo generando la posibilidad de que las larvas adquieran la enfermedad en el trayecto hasta los tubérculos.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 Cultivo de la papa

La papa es una planta herbácea perteneciente a la familia *Solanaceae*, género *Solanum* y especie *Solanum tuberosum*. Está provista de tres tipos de tallos; el primero es aéreo, donde se disponen las hojas; el segundo está compuesto por rizomas y es subterráneo el cual está conformado por raíces que brotan de la base del tallo aéreo y el tercero es el tubérculo, el cual también es subterráneo y se presenta como el engrosamiento de ciertos rizomas y funciona como órgano de almacenamiento de nutrientes (Faiguenbaum, 2000).

El cultivo de papa es uno de los más importantes en el país ya que es el producto agrícola de mayor actividad comercial en la zona fría, con grandes extensiones cultivadas (200.000 ha) y con una producción de 2'900.000 toneladas/año. Sin embargo, el bajo rendimiento en Colombia se debe principalmente al uso de semilla no certificada y de baja calidad y al ataque de plagas y enfermedades (Ministerio de agricultura, 2008).

Los problemas fitosanitarios en los cultivos de papa, se encuentran representados por enfermedades y plagas, las cuales son insectos de distintos órdenes y familias que atacan y se alimentan del tubérculo de la papa y/o de sus tallos y hojas. Donde uno de los insectos que generan mayor incidencia es la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Moreno, 1996).

### 4.2 *Tecia solanivora* (Povolny) (Gelechiidae)

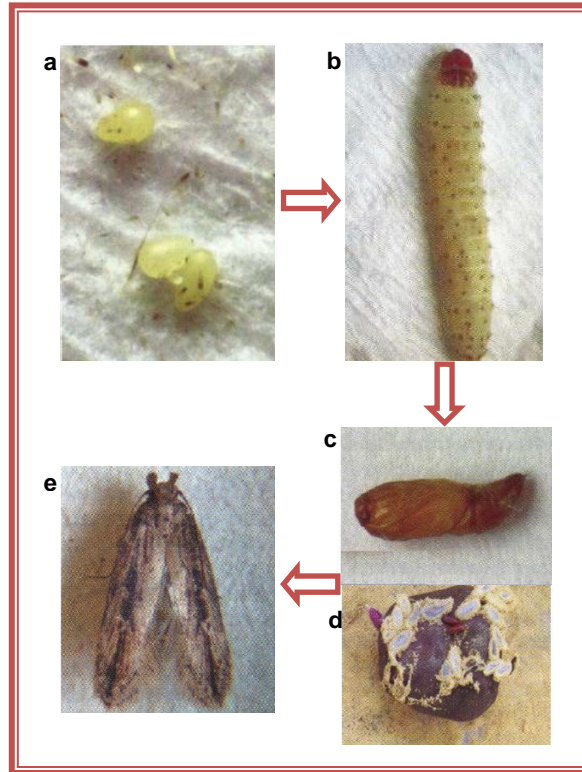
*Tecia solanivora* o la polilla guatemalteca de la papa como es conocida comúnmente, es un insecto del orden de los lepidópteros, perteneciente a la familia Gelechiidae que fue descrito por primera vez en Guatemala (Centroamérica) en 1973, por el entomólogo Dalibor Povolny (Vargas, 2004).

Este insecto plaga se alimenta de los tubérculos tanto en condiciones de cultivo como durante el almacenamiento de los mismos. Desde su primer reporte en 1973 se ha difundido a lo largo de varios países de Centroamérica y Suramérica. En 1985 se reportó por primera vez en Colombia, en el departamento del Norte de Santander, municipio de Chitagá, de aquí se diseminó a las distintas zonas productoras de papa en Boyacá y Cundinamarca (1991) y posteriormente en Antioquia (1994) (Vargas, *et al*, 2004).

#### 4.2.1 Ciclo de vida

*Tecia solanivora* durante su ciclo de vida, pasa por una metamorfosis completa (holometábolo) (Figura 1) que comprende cuatro estados de desarrollo: huevo,

larva, pupa y adulto. La duración de cada uno de estos estados dependerá de factores ambientales tales como la temperatura y la humedad relativa y consecuentemente la duración total del desarrollo, oscila entre 65 y 93 días (Herrera, 1998; Niño, 2004).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *T. solanivora*. a. Huevo, b. Larva, c. Pupa, d. Pupa sobre la superficie del tubérculo de la papa, e. Adulto (Villamizar *et al*, 2006, citado por Murcia, 2010).

#### 4.2.1.1 Huevo

Los huevos de *T. solanivora* presentan un tamaño de alrededor de 0,5 mm de diámetro y son de forma ovoide. Son principalmente de color blanco y a medida que se va desarrollando la larva en su interior se tornan de color amarillo oscuro. Son ovopositados de forma masiva en la superficie del suelo cerca a la base de la planta y su desarrollo en este estado es de alrededor de 9 a 15 días (Herrera, 1998; Niño, 2004; López – Ávila, 1996) (Figura 1a).

#### 4.2.1.2 Larva

Las larvas neonatas de la polilla guatemalteca emergen del huevo depositado en el suelo y presentan un tamaño aproximado de 1,4 mm. Son de color blanco con cabeza marrón (Figura 1b) y como otras larvas del orden lepidóptero presentan

geotropismo positivo, es decir que luego de que la larva emerge, ésta tenderá a descender a través de la materia orgánica del suelo, para hallar el tubérculo (Gouge *et al*, 1999). Las larvas que alcanzan el tubérculo, roen la epidermis y a través de un pequeño orificio acceden al interior del mismo, donde pasan por cuatro estadios intermedios o instares larvales que se alimentan de la papa formando túneles y galerías (Herrera, 1998). Cuando las larvas alcanzan el último estadio donde miden aproximadamente 14 mm y presentan color rosado, abandonan el tubérculo y se ubican cerca del suelo, donde construyen un capullo con seda, al cual se adhieren partículas de suelo para protegerse (López – Ávila, 1996).

#### **4.2.1.3 Pupa**

El proceso de metamorfosis de larva a pupa y de pupa a adulto, ocurre en un capullo (Figura 1c) que forma la larva de último instar, debido a que ésta produce una seda a la que se adhieren partículas de suelo y fibras vegetales (Figura 1d). Este estado puede durar entre 15 y 26 días (Herrera, 1998). Las pupas generalmente se forman dentro o fuera del tubérculo, adheridas a los empaques en donde se guarda la papa, en las paredes y grietas de los sitios de almacenamiento o en el suelo (Herrera, 1998).

#### **4.2.1.4 Adulto**

El adulto de *T. solanivora* es una pequeña polilla cuyo color varía del pardo oscuro al gris. La hembra mide 12 mm de largo por 3,4 mm de ancho, mientras el macho, mide 9,7 mm de largo por 2,9 mm de ancho. Las hembras pueden ovopositar de 150 a 360 huevos durante 10 días, ya sea de manera individual o en grupos (Herrera, 1998) (Figura 1e).

En los lugares de almacenamiento las hembras suelen ovopositar directamente sobre los tubérculos (Vargas, *et al*, 2004). En el campo, lo hacen en el suelo cercano a la base del tallo, en las hojas inferiores de la planta o en aquellos tubérculos mal cubiertos. Los adultos viven un promedio de 15 a 30 días, siendo un poco mayor el tiempo de vida de las hembras (Vargas, *et al*, 2004).

#### **4.2.2 Formación de galerías**

La larva es el estado del insecto que causa pérdidas económicas ya que luego de que éstas emergen y alcanzan el tubérculo, consumen la pulpa y forman galerías y túneles cuya profundidad se incrementa a medida que crecen y aumenta su densidad. A pesar de que el consumo por larva es bajo, aproximadamente un gramo, cuando se incrementa la densidad de larvas por tubérculo, llegan a consumir gran parte de la pulpa (Niño, 2004). Esto conlleva al deterioro de la

calidad de la papa y permite la entrada de organismos patógenos que prolifera por la presencia de excrementos larvales en el interior del tubérculo (Niño, 2004).

#### **4.2.3 Control de *Tecia solanivora***

Dentro del MIP (Manejo integrado de plagas) utilizado para el control de *Tecia solanivora* se encuentran implementados el control etológico, el control químico y el control biológico. El control químico es el método de elección por su bajo costo y fácil implementación. Sin embargo, varios de los agroquímicos utilizados como el Fipronil, el Imadacloprid, la Lambda cihalotrina, la Avermectina y el Clofenapir entre otros, han demostrado una baja efectividad, con porcentajes de mortalidad del 20% al 50%, (Domínguez *et al*, 2010), mientras que el control biológico se ha perfilado como una opción limpia y sostenible (Harrison *et al*, 2012).

Dentro de los bioplaguicidas, la utilización de virus entomopatógenos de la familia Baculoviridae, ofrece una opción efectiva para el control de lepidópteros, debido a su alta virulencia, patogenicidad y especificidad (Harrison *et al*, 2012).

### **4.3 Bioplaguicidas**

Los bioplaguicidas se definen como formulaciones utilizadas para el control biológico de plagas, encargadas de conservar microorganismos o componentes activos de los mismos y mejorar sus características o actividades biológicas por medio de aditivos que maximizan la viabilidad, optimizan la aplicación y protegen al organismo luego de la aplicación (Burges, 1998).

Su importancia radica en el reemplazo de productos químicos para el control de plagas (Fenoll *et al*, 2011).

Diversos factores determinan la penetración de los bioplaguicidas en el suelo y la adsorción al mismo, entre ellos la composición, la humedad, la temperatura y el pH. (Fenoll *et al*, 2011).

#### **4.3.1 Características de los bioplaguicidas**

La formulación de un agente de biocontrol está encaminado a mejorar cuatro características importantes para el cumplimiento de su función. La primera es la estabilización, para regular las propiedades físicas del formulado como el pH, la temperatura, los periodos de almacenamiento y características de pureza debido a que los contaminantes microbianos pueden alterar la estabilidad del formulado. La segunda característica está relacionada con el mecanismo de aplicación y es dependiente del tipo de formulado (sólido o líquido). Los formulados sólidos requieren dispositivos manuales calibrados que permitan aplicar de manera homogénea los formulados granulados o polvo de espolvoreo, mientras que los

formulados líquidos requieren de la dilución del producto (generalmente en agua) en volúmenes que pueden ser bajos, medios o altos y la elección de este volumen dependerá del tipo de cultivo y de la dosificación del formulado (Burges, 1998).

Así mismo, otros factores que influyen en los formulados líquidos son la maquinaria de aplicación y el atomizador que aplica el formulado sobre el cultivo ya que éste determinará el tamaño de la gota aplicada y en consecuencia el cubrimiento y la posibilidad de llegar al insecto blanco (Burges, 1998).

La tercera característica de las formulaciones hace referencia a las características de persistencia en el ambiente, donde los parámetros más importantes son la inactivación causada por la luz solar, por lo cual el formulado dentro de sus excipientes activos debe contar con un protector solar (Burges, 1998). La temperatura tiene un efecto que determina en gran medida la actividad metabólica de los microorganismos y como se había mencionado anteriormente afecta la estabilidad del formulado (Arthur, 1994). El efecto de la humedad al igual que la temperatura influye en la actividad metabólica de algunos microorganismos además de que determina la disponibilidad del plaguicida en el ambiente. El pH del medio puede afectar la integridad de la formulación o del ingrediente activo (Bolaños, 2009). Por último la pérdida del producto aplicado se puede dar debido a la interacción con el viento o por la lluvia y a procesos de escorrentía, entre otros (Arthur, 1994).

La cuarta característica está relacionada con la mejora en la acción insecticida ya que ciertos excipientes en el formulado pueden actuar sinérgicamente con el principio activo del microorganismo para potenciar el efecto insecticida o indirectamente estimular el consumo del formulado por parte de la plaga (Burges, 1998, Caballero *et al*, 2001).

#### **4.3.2 Tipos de formulaciones**

Existe una amplia variedad de formulaciones, las cuales pueden ser de tipo sólido o líquido.

Las formulaciones sólidas comprenden un amplio rango de productos, entre ellas polvo para espolvoreo, granulados y polvos humectables. La formulación y los excipientes a utilizar depende de las características físicas y metabólicas del organismo (Burges, 1998). Por otro lado las formulaciones líquidas se pueden clasificar en suspensiones concentradas, en emulsiones y en concentrados emulsionables. Éstos últimos se definen como formulaciones que llevan como soporte un solvente orgánico, agentes emulsificantes (derivados de nonil fenol) que mejoran sus características y otros coadyuvantes (Bolaños, 2009). Los solventes no son solubles en agua y se mezclan con ella con dificultad, pero la

presencia de los emulsificantes permite que puedan mezclarse en forma muy homogénea, formando emulsiones de aspecto lechoso (Arthur, 1994).

### **4.3.3 Factores que influyen en la penetración de las formulaciones en el suelo**

Existen tres factores importantes que pueden influir sobre la capacidad de penetración de un producto en el suelo: la composición, el pH y la humedad.

El suelo está compuesto por una fracción inorgánica, que contiene arcillas, con cargas negativas, que actúan como fijadores de la mayoría de formulados que poseen cargas positivas, afectando su biodisponibilidad. Por otro lado, la fracción orgánica (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas) con carga positiva contrarresta la carga negativa evitando que el formulado se adsorba a la fracción inorgánica. Además, el contenido de materia orgánica deberá ser superior al 2% para una óptima biodisponibilidad (Buelke *et al*, 2004).

El pH es un factor determinante en la estabilidad de bioplaguicidas compuestos a base de baculovirus ya que los cuerpos de inclusión son muy sensibles a la degradación en pH alcalino (9 – 11), esto puede repercutir en la penetración del formulado en el suelo ya que si la integridad del principio activo o de sus excipientes se ven afectados impedirá el acceso a distintas profundidades (Cuartas *et al*, 2009; Fenoll *et al*, 2011).

La humedad es el tercer factor determinante en la penetración de un producto en el suelo. Se denomina humedad a la cantidad de agua presente en el suelo y se relaciona con un concepto denominado capacidad de campo, el cual hace referencia a la cantidad máxima de agua que puede retener un suelo antes de entrar en solución (Köhne *et al*, 2009). La humedad y la capacidad de campo determinan si ocurre el proceso de lixiviación, definido como el arrastre de sustancias de manera vertical a través del suelo, el cual permite la penetración de los productos en éste (Köhne *et al*, 2009; Buelke *et al*, 2004).

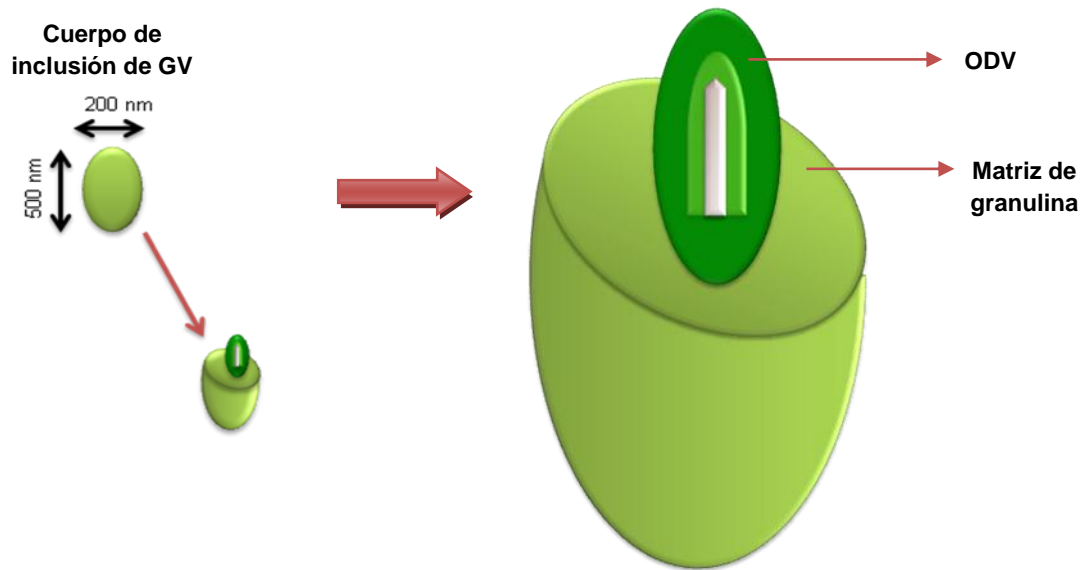
## **4.4 Baculovirus**

Los Baculovirus son virus entomopatógenos con ADN circular de doble cadena que se caracterizan por poseer viriones envueltos en cuerpos de inclusión protéicos (CIs), que presentan dos tipos morfológicos diferentes, los granulovirus (GV) y los nucleopoliedrovirus (NPV) (Zeddám *et al*, 2003).

### **4.4.1 Granulovirus**

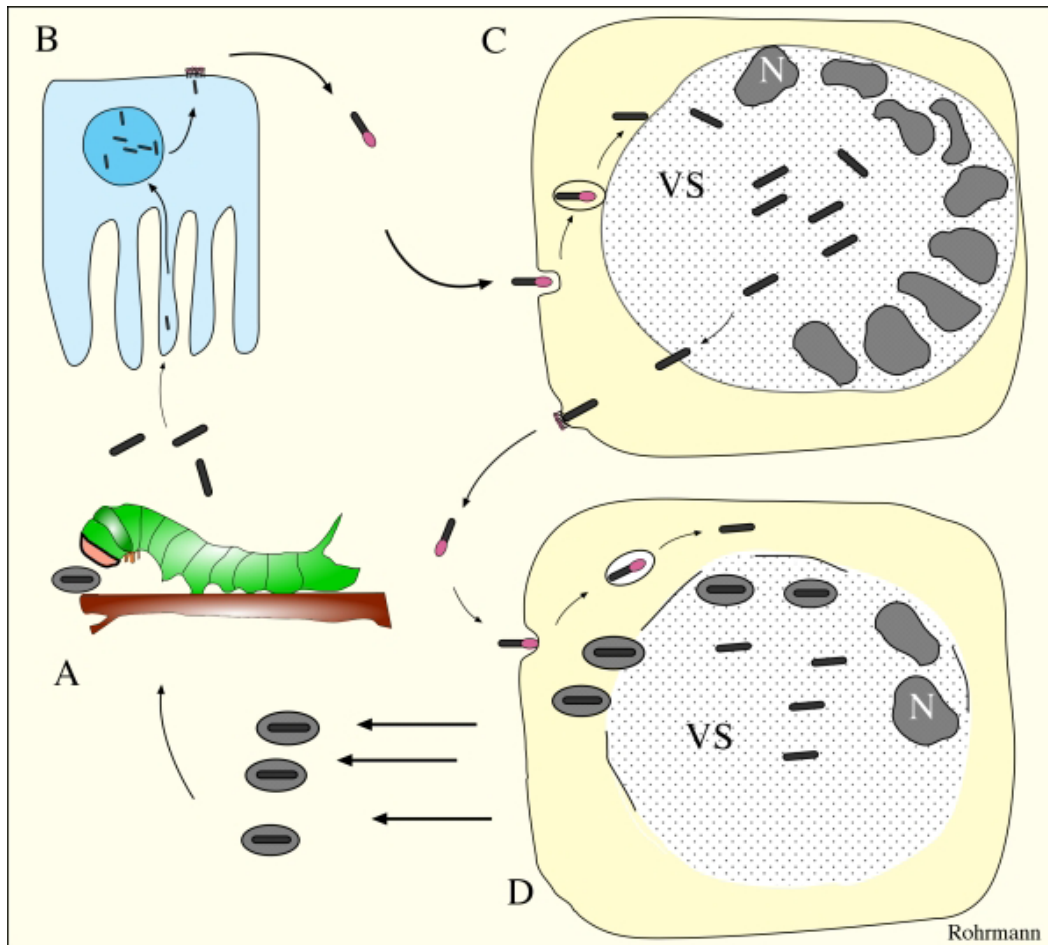
Los granulovirus presentan cuerpos de inclusión de forma ovoide con apariencia granular y un tamaño promedio de 0,2 por 0,5  $\mu\text{m}$  (Figura 2). Estos virus se

caracterizan por la presencia de un único virión por cuerpo de inclusión rodeado mayoritariamente por una proteína denominada granulina (Rohrmann, 2011).



**Figura 2.** Representación esquemática de Granulovirus (GV). Se observan las dimensiones del Cuerpo de inclusión conformado por una matriz de granulina y un Virus derivado de oclusión –ODV- (Palacios, G, 2009; citado por Murcia, 2010)

El ciclo de infección de los Baculovirus (Figura 3) se inicia con la ingestión de cuerpos de inclusión del virus por los hospederos. En el intestino medio de los insectos, debido al medio alcalino (pH 9-11), se disuelve la proteína que compone los CIs y se liberan los viriones que se unen a la membrana de las células epiteliales del mesenterón (Rohrmann, 2011). Los viriones se fusionan con la membrana celular y se inicia el proceso de replicación del ADN viral en el núcleo de la célula, para producir nuevos viriones denominados viriones brotados (VB), los cuales se diseminan por otros tejidos y causan una infección secundaria y sistémica (Rohrmann, 2011). Una vez la infección alcanza las etapas tardías, los cuerpos de inclusión se ensamblan nuevamente en el interior del insecto, con viriones denominados virus derivados de oclusión (ODV). Las larvas infectadas se desintegran por licuefacción del tegumento y los virus liberados tienen la capacidad de generar la transmisión horizontal entre insectos (Rohrmann, 2011).



**Figura 3.** Esquema del ciclo de infección. A. Ingestión del CI por *Tecia solanivora*. B. Infección en el intestino medio y propagación a otros tejidos. C. Infección secundaria a causa de virus brotados (VB) y diseminación a otros tejidos. D. Combinación núcleo-citoplasma. (Rohrmann, 2011).

#### 4.4.1.1 Cuantificación de granulovirus

Uno de los grandes inconvenientes con el trabajo con granulovirus es su cuantificación, ya que los cuerpos de inclusión son muy pequeños, lo cual dificulta su recuento. Sin embargo existen diversas metodologías para la cuantificación de baculovirus, entre ellas se encuentran reportadas el recuento en cámara de Neubauer y la espectrofotometría (Caballero *et al*, 2001; Matindoost *et al*, 2012).

En este sentido también se ha reportado la utilización y validación de una técnica de recuento de granulovirus mediante Q-PCR, para lo cual fueron diseñados dos cebadores y una sonda de tipo Taqman<sup>®</sup>, los cuales hibridan con un gen denominado *Gran*, codificante de la proteína granulina que se encuentra presente en los cuerpos de inclusión (Murcía, 2010). La técnica validada demostró ser una

herramienta eficaz de detección de granulovirus a partir de muestras de suelo presentando unos altos valores de reproducibilidad, especificidad y sensibilidad (Murcia, 2010).

#### **4.5 Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa (Q-PCR)**

La PCR es una técnica versátil de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en la década de los 80, que permitió amplificar pequeñas cantidades de ADN. (Mullis. 1985, citado por Lejona *et al*, 2006). A partir de este descubrimiento se desarrolló la técnica de PCR en tiempo real o Q-PCR, que consiste en la detección de fluorescencia, para identificar y cuantificar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos que están siendo amplificados por una ADN polimerasa en forma específica (Costa, 2004). La cuantificación se basa en la medida de la fluorescencia durante la fase exponencial de la PCR. La amplificación y detección se producen de manera simultánea, sin necesidad de ningún análisis post PCR (Costa, 2004).

La PCR es una herramienta muy versátil ya que entre sus aplicaciones se incluyen las medidas de la carga viral, estudios de expresión genética, diagnósticos clínicos y detección de patógenos, entre otros (Boeckma *et al*, 2009).

Existen diferentes estrategias para la cuantificación por PCR, las cuales incluyen agentes intercalantes como el SYBR Green y sondas específicas marcadas con fluorocromos como las sondas de hidrólisis Taqman y sondas tipo Molecular Beacons (Costa, 2004).

Las sondas Taqman son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Durante el ciclo de amplificación, la sonda se hibrida con su cadena complementaria y la ADN polimerasa con actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, lo cual produce la liberación del fluorocromo donador (Costa, 2004). Por lo tanto el donador y aceptor quedan alejados y la fluorescencia emitida por el donador es captada por un fluorómetro (Costa, 2004).

##### **4.5.2 Ciclo Umbral**

Las lecturas obtenidas en Q-PCR, son expresadas en términos de ciclo umbral, el cual se define como el menor número de ciclos, requeridos para alcanzar un punto en que la señal de la fluorescencia es registrada como estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo. Este concepto es en el que se expresan los resultados obtenidos por Q-PCR y es reportado para cada muestra y

se traduce a un resultado cuantitativo a través de la construcción de la curva de calibración o patrón (Costa, 2004).

#### **4.5.3 Curva patrón o de calibración**

Para la cuantificación de un ADN blanco mediante Q-PCR es necesario utilizar controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana, con el fin de construir la curva patrón o de calibración (Lee *et al*, 2006). La gráfica de la curva se basa en el incremento de fluorescencia en cada ciclo y refleja la cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (Lee *et al*, 2006).

La curva patrón se transforma a una configuración lineal que se basa en la ecuación de la recta  $Y = mx + b$ . Donde:  $Y = Ct$ ,  $m$ =pendiente,  $x = \log$  de la concentración de ADN y  $b$ = Intercepto en  $Y$  (Scott, 2006).

A partir de estos datos es posible determinar la eficiencia del ensayo, a través de la fórmula  $\text{Eficiencia} = 10^{-1/\text{pendiente}} - 1$  (Scott, 2006).

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la penetración en el suelo, de un granulovirus de *Tecia solanivora* formulado como un concentrado emulsionable

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la capacidad de penetración en el suelo, de un concentrado emulsionable a base de un granulovirus colombiano de *T. solanivora* mediante Q-PCR.
- Determinar la eficacia del producto que penetra en el suelo a diferentes profundidades.

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 Selección de suelo

Para la evaluación de la persistencia y penetración en suelo del concentrado emulsionable del virus se utilizaron dos tipos de suelo obtenidos de zonas productoras de papa (Siberia y Mosquera), los cuales fueron analizados para determinar sus características físico-químicas de pH, textura y porcentaje de materia orgánica.

La humedad de los 2 suelos fue ajustada a 35,5% y 35,1% respectivamente mediante la adición de agua destilada.

### 6.2 Montaje unidades experimentales

Para el montaje de las unidades experimentales se utilizaron tubos de PVC de 50 centímetros de alto con 16 centímetros de diámetro, los cuales se sellaron en uno de sus extremos con una bolsa plástica negra y se llenaron con el suelo. Dichas unidades fueron adaptadas con un puerto de muestreo ubicado a 10 centímetros y 30 centímetros de profundidad (Figura 4). El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento, para un total de 6 unidades experimentales.



**Figura 4.** Unidades experimentales utilizadas para evaluar la penetración del concentrado emulsionable en suelo.

#### 6.2.1 Aspersión del virus

El formulado concentrado emulsionable a base de granulovirus tiene una concentración de  $2 \times 10^9$  CI/mL, cuya dosis recomendada para aplicación en campo es de un litro de producto diluido en 400 litros de agua para una hectárea ( $5 \times 10^6$  CI/mL) (Gómez *et al*, 2011). Teniendo en cuenta el área de cada unidad experimental ( $201 \text{ cm}^2$ ) se aplicó una cantidad de 0,025 mg de producto diluidos

en 1 mL de agua, con un aspersor manual previamente calibrado. Debido a que los suelos de cultivo de papa no suelen regarse, no se utilizó ningún sistema de riego que ayudara a la penetración del virus, de esta manera se buscó emular las condiciones reales de penetración del bioplaguicida en el campo.

### **6.3 Toma de muestras**

Se tomaron 12 gramos de suelo a las 24 horas post-aplicación del formulado. Estas muestras fueron obtenidas de la superficie y de las 2 profundidades seleccionadas (10 y 30 cm) mediante un tubo de PVC delgado introducido por los puertos de muestreo, el cual permitió obtener suelo de toda la capa ubicada a dichas profundidades. El suelo fue depositado en bolsas plásticas y almacenado a temperatura de congelación (-20° C).

De los 12 gramos de suelo tomados por muestra, se dispusieron 10 gramos para el montaje de bioensayos mediante la técnica de aplicación superficial con brocha y se dispusieron 2 gramos para la extracción de ADN de suelo y el posterior montaje con Q-PCR.

### **6.4 Evaluación de la presencia del virus**

La presencia del virus fue determinada mediante la detección de un segmento de ADN del gen *Gran* por PCR cuantitativa (Q-PCR)(Murcia, 2010) a partir del ADN extraído del suelo de los tratamientos por medio de un kit comercial Power Soil de MOBIO®.

#### **6.4.1 Extracción de ADN a partir de muestras de suelo**

La extracción del ADN total de suelo se realizó mediante el kit comercial Power soil de MOBIO®. Se realizaron algunas modificaciones en el protocolo, como la adición de carbonato de sodio 0,5M para la liberación de cuerpos de inclusión. El ADN se resuspendió en un volumen final de 50µl con agua ultrapura (Anexo 1) (Murcia, 2010).

#### **6.4.2 Extracción de ADN a partir de virus purificado**

Para el control de la técnica de Q-PCR se utilizó como control positivo ADN de granulovirus cepa VG003 extraído a partir del procedimiento descrito por Murcia (2010) (Anexo 2).

#### **6.4.3 Preparación de ADN plasmídico**

Se utilizó un clon de la bacteria *E. coli* (DH5α), la cual contiene el plásmido TOPO 2.1 (Invitrogen) con un inserto del gen completo de granulina y perteneciente al laboratorio de Microbiología Molecular del Centro de Biotecnología y Bioindustria,

La bacteria fue multiplicada en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) con 5 µL (20 mg/mL) de ampicilina, en agitación continua a 37 °C por 16 horas.

Se realizó la extracción de ADN plasmídico con el Kit UltraClean ® 6 Minute Mini Plasmid Prep, luego se realizó la cuantificación por espectrofotometría a 260 nm (Biorad-Nanodrop). El ADN fue diluido de manera serial con base 10, obteniendo concentraciones de 102.53 ng/µl, 10,25 ng/µl, 1,02 ng/µl,  $1,02 \times 10^{-1}$  ng/µl,  $1,02 \times 10^{-2}$  ng/µl,  $1,02 \times 10^{-3}$  ng/µl,  $1,02 \times 10^{-4}$  ng/µl,  $1,02 \times 10^{-5}$  ng/µl.

#### 6.4.4 Q-PCR

A partir del ADN de las muestras de suelo para el montaje de Q-PCR se utilizó un sistema convencional comercial, con Taq Polimerasa, dinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y Cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) marca Promega. La sonda (5' / 56-FAM /TCTCAAGAGTTTGGGTTCGGTGCT/ 3IABIk\_FQ /3') fue diseñada con el 6-carboxi fluoresceína en el extremo 5', como fluoróforo reportero y un Quencher Iowa Black (diseñado por IDT) en el extremo 3', el cual posee un espectro de absorbancia entre 420 a 620 nm, ideal para fluoresceína (Murcia, 2010). Los cebadores fueron: Cebador reverso: 5' TCCTCGGGTACCATGTACTG 3' y Cebador directo: 5' CACTTGCGTCATCGACAA 3' que amplifican un segmento de 147 pb diseñados por Murcia (2010).

Como control negativo para la curva de validación, se utilizó agua ultra pura.

Las condiciones de amplificación correspondieron a 35 ciclos, a una temperatura de anillamiento para los cebadores de 52°C, una concentración de sonda de 0,36 µM y una concentración de  $MgCl_2$  de 25 mM, estandarizadas por Murcia (2010).

Se realizó un análisis por triplicado de las muestras de ADN de los tratamientos y de los estándares amplificados por Q-PCR, para determinar las condiciones de reproducibilidad.

##### 6.4.2.1 Cálculo de número de copias del gen

Para la cuantificación mediante Q-PCR, la fluorescencia emitida fue correlacionada en unidades de número de copias del gen, para lo cual se utilizó una fórmula de conversión de concentración de ADN (ng/µl) (Scott, 2006; citado por Murcia, 2010).

$$\frac{6.022 \times 10^{23}(\text{moléculas/mol}) \times 102,25 \text{ ng/}\mu\text{l}}{4647 \text{ pb} \times 660 \text{ daltons}} = \text{Número de copias del gen/}\mu\text{l}$$

Donde:

$6.022 \times 10^{23}$  (Moléculas/Mol): Número de Avogadro

102,25 ng/ $\mu$ l: Concentración de ADN plasmídico

4647 pb: Tamaño del plásmido y del inserto del gen *gran*

660 Da: Peso promedio de un solo par de bases

#### 6.4.2.2. Determinación del límite mínimo de detección

Las curvas patrón obtenidas a partir del Ct versus el log10 de la cantidad de ADN (Número de copias del gen) fueron usadas para determinar el límite de detección del ensayo. La curva estándar fue construída de acuerdo con el numeral 6.4.2.1.

#### 6.4.2.3. Determinación de la concentración expresada en CI/mL

Para la determinación de la concentración (CI/mL) correspondiente a un número de copias/ $\mu$ L determinado por la Q-PCR, se utilizó una fórmula utilizando el número de copias/ $\mu$ L obtenido, un factor de dilución, el volumen final de ADN obtenido de la extracción de ADN de GV a partir de suelo y una constante de 33,2 copias por gen totales. Y para la determinación de concentración expresada en CI/g se tuvieron en cuenta los mismos valores anteriormente mencionados, pero además se utilizó la cantidad de gramos de suelo que fueron inoculados con 1 mL de la suspensión viral (Murcia, 2010).

Cuerpos de inclusión/mL

$$\frac{\text{No. Copias}/\mu\text{l} * \text{Factor dIn} * \text{Volumen de extracción}}{33,2 \text{ copias por gen totales}} = \text{CI/ml}$$

Cuerpos de inclusión/gramo

$$\left[ \frac{\text{No. Copias}/\mu\text{l} * \text{Factor dIn} * \text{Volumen de extracción}}{33,2 \text{ copias por gen totales}} \right] / 0,25 \text{ grs} = \text{CI/g}$$

(Murcia, 2010)

#### 6.4.2.4. Validación de la curva de calibración o patrón

La curva de calibración o patrón se realizó con ocho diluciones de ADN plasmídico del gen de granulina los cuales fueron analizados por triplicado.

## **6.5 Evaluación de la actividad biológica del virus por medio de bioensayos**

Para determinar la actividad biológica y la eficacia del producto se realizaron bioensayos que contaron con un testigo absoluto donde se utilizaron papas sin inocular, un testigo tratado para el que se utilizaron papas a las que mediante la técnica de aplicación superficial con brocha, se les aplicó una suspensión de 10 gramos de suelo sin inocular en 10 mL de agua destilada. Para los tratamientos, los tubérculos se inocularon mediante la misma técnica utilizando una suspensión de 10 gramos de suelo proveniente de distintas profundidades (10 y 30 cm) de las unidades experimentales en 10 mL de agua destilada. Todas las papas se dispusieron en vasos plásticos individuales y se infestaron con 10 larvas neonatas de *T. solanivora*, se incubaron durante 20 días a temperatura ambiente y pasado este tiempo se realizó una evaluación destructiva y se determinó el porcentaje de mortalidad corrigiendo con respecto al tratamiento testigo tratado, determinando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider Orelli (Zar, 1999).

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 tratado.

El diseño experimental fue completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento.

### **6.5.1 Análisis estadístico**

La normalidad de los datos se verificó con una prueba de Shapiro-Wilk (95%) y la homocedasticidad fue determinada mediante una prueba de Barlett (95%). Cumplidos dichos principios se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente, comparaciones de medias mediante la prueba de diferencia mínima significativa de LSD. Para éste análisis se empleó el programa estadístico Statistix 8.1 (Anexo 4).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Análisis físico-químico de los suelos

El análisis físico-químico del suelo determina la composición, los valores de pH, humedad y materia orgánica presente en el suelo permitiendo la caracterización del mismo. Para ello, 1 Kg de suelo fue recogido y enviado al laboratorio integral de servicios para el sector agroalimentario (LISSALAB) de Corpoica para realizar un análisis físico-químico que incluyó los siguientes parámetros: pH, porcentaje de materia orgánica y humedad, los cuales obtuvieron valores similares para los dos suelos.

El análisis físico-químico del suelo determinó que éste posee un pH de 5,46 (Tabla 1) (Anexo 3), que lo clasifica como un suelo ácido y de acuerdo con lo descrito por Rhorman (2008) las proteínas del cuerpo de inclusión viral se degradan en medios con pH alcalino (9-11), por lo tanto se puede suponer que los cuerpos de inclusión del formulado a base de granulovirus no se afectaron por la condición del suelo. En este sentido, Murillo y colaboradores (2007) reportaron que la estabilidad de los cuerpos de inclusión de los baculovirus se ve afectada en pH alcalino y favorecida en pH neutro o ácido.

Otro factor determinante en la estabilidad del virus en el suelo es el contenido de materia orgánica, el cual fue de 17,84% (Tabla 1). Buelke y colaboradores (2004) describieron que la biodisponibilidad está relacionada con la penetración, debido a que a menor cantidad de arcillas y mayor cantidad de materia orgánica (superior al 2%), la adsorción a arcillas disminuirá y permitirá la biodisponibilidad del producto.

El tercer parámetro en suelo y encargado de la penetración es la humedad, la cual se ajustó previamente a capacidad de campo (35,5%), otorgándole características similares a las utilizadas en el cultivo. Sin embargo, la cantidad de agua adicionada, posiblemente no fue suficiente para producir un movimiento vertical del líquido a través del suelo y generar de esta manera un proceso de lixiviación que arrastrara el formulado. De acuerdo con lo descrito por Fenoll y colaboradores (2011), la superación de la capacidad de campo es necesaria para que se lleve a cabo un proceso de lixiviación que permita la penetración. Además Buelke y colaboradores (2004) mencionaron la importancia de la cinética del bioplaguicida a través del suelo por efecto de la lixiviación, como factor importante de la dispersión en el mismo.

**Tabla 1.** Características físico-químicas de las muestras del suelo.

<b>pH</b>	<b>Materia Orgánica (%)</b>	<b>Humedad (%)</b>
5,46	17,84	35,5

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, las características de pH, y materia orgánica del suelo utilizado, se consideran adecuadas para favorecer la estabilidad y la biodisponibilidad del formulado en el suelo. Sin embargo, las características de humedad sugieren una baja posibilidad de penetración del formulado en el suelo.

## **7.2 Evaluación de la presencia del virus**

### **7.2.1 Validación de la Curva de calibración**

La evaluación de la presencia del virus en las muestras de cada tratamiento se determinó por Q-PCR. Primero se calculó el número de copias del gen (Tabla 2) y se validó la técnica por medio de los valores de Ct obtenidos de los ADN estándares y su respectiva desviación estándar.

#### **7.2.1.1 Cálculo del número de copias del gen/ $\mu$ l**

Se estimaron los equivalentes de las concentraciones, en número de copias del gen de las 8 diluciones seriadas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Conversión de unidades de ng/ $\mu$ l a Número de copias del gen de las diluciones seriadas del patrón de ADN plasmídico.

<b>Dilución</b>	<b>Concentración (ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b>Número de copias/<math>\mu</math>L</b>
$10^{-1}$	102,25	$2 \times 10^{10}$
$10^{-2}$	10,225	$2 \times 10^9$
$10^{-3}$	1,0225	$2 \times 10^8$
$10^{-4}$	$1,02 \times 10^{-1}$	$2 \times 10^7$
$10^{-5}$	$1,02 \times 10^{-2}$	$2 \times 10^6$
$10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$2 \times 10^5$
$10^{-7}$	$1,02 \times 10^{-4}$	$2 \times 10^4$
$10^{-8}$	$1,02 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^3$

#### **7.2.1.2 Curva de calibración**

La evaluación de la presencia del virus en las muestras de cada tratamiento se determinó por Q-PCR. Se validó la técnica y la corrida por medio de los valores de

Ct obtenidos de los ADN estándares y su respectiva desviación estándar (Tabla 3).

Los resultados de la desviación estándar fueron bajos y oscilaron entre 0,235 (estándar 2) y 0,703 (estándar 3), indicando baja variabilidad con respecto al promedio de los valores de Ct. Este resultado permite concluir que la curva patrón de estándares se encontraba validada. Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos por los Ct de los estándares (Tabla 3) (Figura 5) la curva fue válida con 7 puntos, debido a que el estándar 8 no presentó la cantidad de ADN suficiente para generar señal de fluorescencia detectable por el lector del equipo y por consiguiente la muestra no amplificó.

**Tabla 3.** Valores de Ct promedios obtenidos por los ADN estándares que validaron el montaje de Q-PCR realizado.

Estándar	Ct	Ct promedio	Desviación estándar
Estándar 1	12,63	12,96	0,471
Estándar 1	13,30		
Estándar 1	12,96		
Estándar 2	14,89	14,66	0,235
Estándar 2	14,66		
Estándar 2	14,43		
Estándar 3	20,25	19,75	0,703
Estándar 3	19,26		
Estándar 3	19,75		
Estándar 4	23,01	22,49	0,546
Estándar 4	22,56		
Estándar 4	21,92		
Estándar 5	26,50	25,90	0,848
Estándar 5	25,31		
Estándar 5	25,78		
Estándar 6	29,87	29,54	0,378
Estándar 6	29,23		
Estándar 6	29,45		

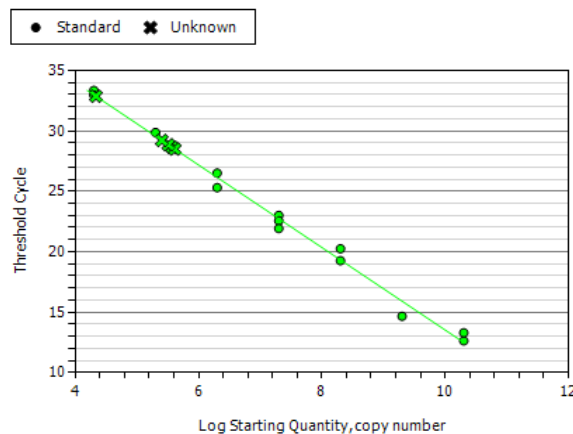
Estándar 7	33,24	33,15	0,272
Estándar 7	32,96		
Estándar 7	33,18		
Estándar 8	N/A	N/A	0,0
Estándar 8	N/A		
Estándar 8	N/A		

En la tabla 4 se observan los valores de la curva de calibración, la cual fue validada con base en los datos obtenidos con un coeficiente de correlación de 0,991 y una eficiencia del 96,3%. De acuerdo con lo afirmado por Whelan y colaboradores (2003) y Scott (2006), los valores obtenidos en la curva validan la técnica ya que la correlación debe ser cercana a 1 y la eficiencia debe tener un porcentaje entre 90 y 110%. Además la pendiente presenta un valor negativo de -3,413, que refiere a una adecuada relación inversamente proporcional del Ct y el número de copias.

En la figura 5 se observan representados como puntos los estándares y las x corresponden a las muestras control.

**Tabla 4.** Parámetros obtenidos en la ecuación a la recta y eficiencia de PCR que validó la técnica.

Coeficiente de Correlación	Pendiente	Intercepto en Y	Eficiencia de la PCR (%)
0,991	-3,413	47,656	96,3



**Figura 5.** Regresión lineal de los de los valores de Ct y el número de copias del gen de la corrida de Q-PCR

### 7.2.2. Análisis de reproducibilidad

La variabilidad de la técnica se determinó como las desviaciones estándar entre diferentes corridas (tres réplicas) y presentó valores bajos, inferiores a 1. La desviación estándar entre corridas está relacionada con factores de error, como diferencias en la manipulación y la eficiencia de la amplificación que influencia la variabilidad de los datos inter e intra ensayos, de acuerdo con lo afirmado por Scott (2006). Los resultados demuestran una alta reproducibilidad de la prueba.

**Tabla 5.** Desviación intracorridas del Ct de los triplicados de los estándares en las tres repeticiones.

Estándar	DS Ct Replica 1	DS Ct Replica 2	DS Ct Replica 3
$2 \times 10^{10}$	0,471	0,103	0,076
$2 \times 10^9$	0,235	0,243	0,282
$2 \times 10^8$	0,703	0,637	0,186
$2 \times 10^7$	0,546	0,727	0,046
$2 \times 10^6$	0,848	0,255	0,051
$2 \times 10^5$	0,378	0,268	0,053
$2 \times 10^4$	0,272	0,330	0,312

### 7.2.3 Ct promedio de las muestras de ADN

En la tabla 6 se observan los valores de Ct promedio obtenidos por los distintos tratamientos, el control positivo y el control negativo, Los tratamientos no presentaron valores de Ct, evidenciando que la cantidad de ADN es insuficiente para generar una señal de fluorescencia detectable por el equipo. El control negativo (NTC) no presentó fluorescencia lo cual verificó, la pureza de los reactivos utilizados en la reacción, mientras que el control positivo presentó un valor de Ct promedio de 12,87 que indica la presencia del amplimero, lo cual valida la funcionalidad de la sonda y los cebadores que hibridaron con el ADN del granulovirus. En trabajos previos, se determinó la alta especificidad de la prueba, la cual no amplifica para virus relacionados de la misma familia Baculoviridae, como nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (Murcia, 2010).

En las muestras de 10 y 30 cm existe la posibilidad de que el virus no haya penetrado por las condiciones de humedad del suelo y el bajo volumen aplicado. Esta podría ser la explicación de no obtener resultados de amplificación en estas muestras. Sin embargo no se detectó la presencia viral en la superficie la cual puede ser explicada por una muy baja concentración de virus, la cual es indetectable por este método.

**Tabla 6.** Valores de Ct promedio obtenidos de los distintos tratamientos, del control positivo y el control negativo (NTC = No template control).

Tratamiento	Ct promedio
Superficie Suelo	N/A
10 cm Suelo	N/A
30 cm Suelo	N/A
NTC	N/A
Control positivo (GV003)	12,87

#### **7.2.4. Determinación del límite mínimo de detección y de la concentración expresada en CI/mL y CI/g**

De acuerdo con lo reportado por Montalvo (2009) y Scott (2006), el límite de detección de la técnica se determinó a partir de las curvas patrón. Éste correspondió a  $2 \times 10^4$  Número de copias del gen, equivalente a  $3,01 \times 10^5$  CI/mL y a  $1,2 \times 10^6$  CI/g de acuerdo con las fórmulas establecidas por Murcia (2010), que tienen en cuenta la eficiencia del proceso de extracción de ADN a partir de muestras de suelo.

Según los resultados se determinó que las muestras de ADN extraídas del suelo de los tratamientos no amplificaron, posiblemente debido a la baja concentración del virus en la muestra. A pesar de que la ausencia viral a 10 y 30 cm de profundidad puede ser explicada por una falta de lixiviación y de penetración viral, la ausencia de virus en la superficie puede ser explicada por una baja concentración. Teniendo en cuenta que se aplicó solamente 1 mL del formulado a una concentración final de  $1 \times 10^7$  CI/mL en  $201 \text{ cm}^2$  (Gómez *et al.*, 2011) y que los 0.25g de muestra utilizados para la extracción de ADN corresponden al 0.1% del área inoculada, teóricamente la concentración de CI en la muestra sería cercano a  $4 \times 10^4$  CI/g, valor que es inferior al límite de detección de la prueba  $1,2 \times 10^6$  CI/g.

Es evidente que la mayor limitante de la metodología de Q-PCR se encuentra en la metodología de extracción de ADN a partir de muestras de suelo, en la cual influye drásticamente la eliminación de ácidos húmicos. Los tratamientos efectuados para la eliminación de ácidos húmicos puede ser la causa de la pérdida de material viral en la muestra (Murcia *et al.* 2010)

### 7.3 Evaluación de la actividad biológica del virus

Los resultados obtenidos en los bioensayos, en el cual se inocularon los tubérculos con suelo de diferentes profundidades obtenido de las unidades experimentales, se presentan en la tabla 7.

**Tabla 7.** Larvas vivas y muertas encontradas en el testigo absoluto, testigo de suelo y tratamientos en el bioensayo.

LARVAS VIVAS				LARVAS MUERTAS			
Testigo Absoluto	Testigo de Suelo	Suelo (10 cm)	Suelo (30 cm)	Testigo Absoluto	Testigo de Suelo	Suelo (10 cm)	Suelo (30 cm)
9	7	3	7	1	3	7	3
9	8	5	7	1	2	5	3
9	6	8	4	1	4	2	6
10	-	8	7	0	-	2	3
8	-	7	7	2	-	3	3
-	-	4	6	-	-	6	4
-	-	5	6	-	-	5	4
-	-	3	6	-	-	7	4
-	-	6	4	-	-	4	6

La mortalidad en los tratamientos inoculados con muestras de suelo de 10 cm y 30 cm de profundidad fue del 45,6% y 40% respectivamente. El testigo absoluto presentó una mortalidad del 10%, siendo este valor la tercera parte de la mortalidad obtenida con el testigo tratado el cual alcanzó una mortalidad del 30% (Tabla 7).

Los porcentajes de mortalidad de los tratamientos y el testigo tratado fueron corregidos con el testigo absoluto calculando la eficacia con la fórmula de Schneider-Orelli (Zar, 1999), resultados que se presentan en la tabla 8.

Los datos fueron normales y presentan homogeneidad de varianza (Anexo 4). El análisis de varianza (Anexo 4) no detectó diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los tratamientos, ni entre éstos y el testigo tratado con suelo sin inocular.

Esto puede sugerir que la mortalidad de las larvas de *T. solanivora* obtenida en los tratamientos (10 cm y 30 cm) no correspondió a la actividad biocontroladora del virus, sino a un efecto de la capa de suelo que recubrió las papas, y posiblemente actuó como una barrera de entrada impidiendo el ingreso de las larvas al interior del tubérculo. Además la cantidad de producto aplicado a cada unidad experimental (0,025 mg) y la técnica de aplicación superficial de suelo con brocha en la que se utilizaron 10 gramos de suelo tomados del muestreo, posiblemente

no aportaron la cantidad de virus necesaria para causar la enfermedad en las larvas. Sin embargo Gómez y colaboradores (2011) reportaron una mortalidad en casa de malla del 96% usando la misma dosificación del formulado que se manejó en el presente estudio, con una concentración de  $1 \times 10^7$  CI/mL, la cual fue suficiente para causar síntomas en las larvas depositadas en la superficie, lo que puede sugerir que la actividad insecticida hace efecto a nivel de la superficie pero no a las profundidades utilizadas en los tratamientos.

**Tabla 8.** Efecto de la actividad biológica del producto sobre la eficacia y mortalidad.

<b>Tratamientos</b>	<b>Mortalidad (%)</b>	<b>Eficacia (%)</b>
Testigo absoluto	10	-
Testigo de Suelo	30	22,2
Suelo 1	45,6	39,5
Suelo 2	40	34,3

Finalmente se determinó que posiblemente el formulado no penetró el suelo, ya que la humedad ajustada en los cultivos de papa a capacidad de campo no retiene la suficiente cantidad de agua para producir un proceso de lixiviación del formulado, esto se evidencia en la no infección de las larvas del bioensayo y en la no amplificación de las muestras de suelo a distintas profundidades.

## 8. CONCLUSIONES

La metodología de Q-PCR implementada en este estudio, para la detección y cuantificación de granulovirus de *T. solanivora* presentó un alto nivel de eficiencia, reproducibilidad y especificidad.

La metodología de Q-PCR implementada en este estudio, fue insuficiente para detectar granulovirus de *T. solanivora* aplicados como concentrado emulsionable a la dosis recomendada.

El concentrado emulsionable a la dosis recomendada para ser aplicado en campo no tiene la capacidad de penetrar en el suelo, mientras este se encuentre a humedad menor o igual a su capacidad de campo.

La actividad insecticida del concentrado emulsionable aplicada a la dosis recomendada se limita a la superficie del suelo, estando dirigida a la contaminación de huevos y larvas, debido a que este no puede penetrar a estratos más profundos.

## 9. RECOMENDACIONES

Para evaluar la presencia del formulado se recomienda explorar la utilización de metodologías alternas que no involucren procesos de extracción de ADN (metodologías inmunológicas), ya que para posteriores análisis como los de persistencia del concentrado emulsionable es necesaria para detectar el virus.

Se recomienda evaluar procedimientos de extracción de ADN de granulovirus a partir de muestras de suelo, con el objetivo de mejorar la eficiencia..

Se recomienda cambiar el método de aplicación del concentrado emulsionable en suelo si se requiere que el formulado penetre, de esta manera la metodología por aspersión puede ser reemplazada por una alterna que permita el movimiento del producto de manera vertical en el suelo.

## 10.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ARTHUR, F. 1994. Residual efficacy of cyfluthrin emulsifiable concentrate and wettable powder formulations on porous concrete and on concrete sealed with commercial products prior to insecticide application. *Journal of Stored Products Research*. **30** (1). Page 79-86.
- BOECKMAN, F.; BRISSON, M. TAN, L. 2009. Real Time PCR: General Considerations. Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules CA 95547 USA Page 1-4.
- BOLAÑOS, C. 2009. Estudio de la estabilidad de dos levaduras nativas en medios acuosos isotónicos. Tesis pregrado. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- BUELKE, S. BROWN, D. FRYER, C. 2004. Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. *Chemosphere*. **57**. Page 481 – 490.
- BURGESS, H.D. 1998. Formulation of microbial biopesticides. *Kluwer academic publishers*. London, United Kingdom. Page 1 – 33.
- CABALLERO, P. LÓPEZ-FERBER, WILLIAMS, T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control de plagas. *Editorial phytoma*. España. Page 15-161, 479-518.
- CHAPARRO, M. ESPINEL, C. COTES, A. VILLAMIZAR, L. 2010. Fotoestabilidad y actividad insecticida de dos formulaciones de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Revista Colombiana de Entomología*. **36** (1). Page 25-30.
- COSTA, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (pcr) a tiempo real. *Enfermedades infecciosas en microbiología clínica*. **22** (5). Page 299-305.
- CUARTAS, P. VILLAMIZAR, L. ESPINEL, C. COTES, A. 2009. Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana De Entomología*. **35** (2). Page 122 - 129
- DOMÍNGUEZ, I. CARRERO, C. RAMÍREZ, W. 2010. Evaluación del efecto de insecticidas sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Agricultura andina* **17**. Page 61-73
- ESPINEL, C. LERY, X. VILLAMIZAR, L. GOMEZ, J. ZEDDAM, J. COTES, A. LÓPEZ-FERBER, M. 2010. Genetic and biological analysis of colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera:Gelechiidae). *Applied and environmental microbiology* **76**; (22).

- Ministerio de Agricultura y desarrollo rural. 2008. La cadena de la papa en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica. Observatorio de agrocadenas Colombia.
- FAIGUENBAUM M, H., ZUNINO, P. 2000. Biología de Cultivos Anuales, Papa. Sistema caulinar. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- FENOLL, J. RUIZ, E. FLORES, P. HELLIN, P, NAVARRO S. 2011. Reduction of the movement and persistence of pesticides in soil through common agronomic practices. *Chemosphere* **85** (8). Page 1375-1382
- GOMEZ, J. VILLAMIZAR, L. ESPINEL, C., COTES, A. 2009. Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista corporica* **10** (2). Page 152 – 158
- GOMEZ, J. MORENO, C. VEGA, K. COTES, A.M. VILLAMIZAR, L. 2011. Formulation effect over insecticidal activity of *Phthorimaea operculella* granulovirus VG003 for controlling *Tecia solanivora*. *Insect pathogens and entomopathogenic nematodes* **66**. Page 441-445
- GOUGE, D. LEE, L. HENNEBERRY, T. 1999. Parasitism of diapausing pink bollworm *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae by entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Crop Protection* **18**. Page 531 – 537.
- HARRISON, R. HOOVER, K. 2012. Chapter 4 - Baculoviruses and Other Occluded Insect Viruses. *Insect Pathology. Second Edition*. Page 73-131
- HERRERA, C. FIERRO, L. 1998. Manejo integrado del cultivo de papa. Manual técnico. Editorial Produmedios. Colombia.
- Integrated ADN Technologies – IDT. 2010. qPCR Application Guide- Experimental overview, protocol, troubleshooting. Page 73
- KÖHNE, J. KÖHNE, S. ŠIMŮNEK, J. 2009. A review of model applications for structured soils: b) Pesticide transport. *Journal of Contaminant Hydrology* **104**. Page 36–60.
- LEE, C. KIM, J. SHIN, S. HWANG, S. 2006. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **123**. Page 273–280.
- LEJONA, S. BENETTI, M. FAY, F. FAY, O. 2006. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. *Anuario fundación Dr. J. R. Villavicencio*. **14**. Page 33 – 37.
- LÓPEZ-ÁVILA, A. 1996. Capítulo III. Plagas y enfermedades. Insectos plagas del cultivo de la papa en Colombia y su manejo. En: papas

colombianas con el mejor entorno ambiental. *Editorial comunicaciones y asociados Ltda.* Bogotá-Colombia. Page 146-154

- MATINDOOST, L. CHAN, L. MEI, Y. NIELSEN, L. REID, S. 2012. Suspension culture titration: A simple method for measuring baculovirus titers. *Journal of Virological Methods*. Page 1 – 9
- MONTALVO-CORRAL, M. RESÉNDIZ, M. SANTOS-LÓPEZ, G, VALLEJO, V. REYES-LEYVA, J. HERNÁNDEZ, J. 2009. Standardization of a molecular detection method of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **43** (1). Page 49-52.
- MORENO, J. 1996. Capítulo II. Problemática del cultivo de la papa en Cundinamarca y Boyacá. Trabajos de investigación y agronomía en papa. *Editorial Comunicaciones y asociados Ltda. Bogotá, Colombia.* Page 93-102.
- MURCIA, J. 2010. Desarrollo de una técnica de QPCR para la búsqueda y el seguimiento del granulovirus de *Phthorimaea operculella* en campo. *Evento: XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. Ponencia: Libro.*
- MURILLO, R. MUÑOZ, D. RUÍZ-PORTERO, M. ALCÁZAR, M. BELDA, J. WILLIAMS, T. CABALLERO, P. 2007. Abundance and genetic structure of nucleopolyedrovirus populations un greenhouse substrate reservoirs. *Biological Control* **42**. Page 216-225.
- NIÑO, L. 2004. Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en centro y Suramérica. *Suplemento revista latinoamericana de la papa.* Page 1-18.
- ROHRMANN, G. 2011. Baculovirus molecular biology. Chapter 3. baculovirus replication cycle: Effects on cells and insects. [enlinea] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK49506/> [citado el 14/04/12]
- SALAZAR, C. 2009. Evaluación de extractos de plantas para el manejo de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) en cultivos de papa en Nariño, Colombia. *Agronomía Colombiana.*
- SCOTT, P. 2006. Data analysis and reporting. En: Real-Time PCR. Editor Tefvik, D. Ed. Taylor & Francis. Page 332.
- VARGAS, B. RUBIO, S. LOPEZ, A. 2004. Estudios de hábitos y comportamiento de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidoptera: gelechiidae) en papa almacenada. *Revista colombiana de entomología* **30** (2). Page 211-217.
- WHELAN, J. RUSSELL, N. Whelan, M. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods* **278**. Page 261– 269.
- ZAR, J. 1999. Biostatistical analysis. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. Page 663

- ZEDDAM, J. VASQUEZ-SOBERON, R. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas.* **29**. Page 659-66

## 11.ANEXOS

### ANEXO 1

#### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE GRANULOVIRUS A PARTIR DE SUELO

1. Agregar 0,25 g de suelo previamente inoculado a los tubos PowerBead.
2. Dar vortex
3. Agregar 60µl de la solución C1 y Carbonato de sodio al 0,5 M
4. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos.
5. Agitar con Bead Beater nivel 3 por 10 minutos
6. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto
7. Transferir el sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 ml
8. Adicionar 250µl de la Solución C2 y dar vortex por 5 segundos. Incubar a 4°C por 5 minutos.
9. Trasferir 600 µl de sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 ml
10. Agregar 200µl de la solución C3 y dar vortex. Incubar a 4°C por 5 minutos.
11. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto
12. Transferir 750 µl de sobrenadante a un tubo de colección limpio de 2 ml
13. Adicionar 1200µl de la solución C4 y dar vortex por 5 segundos
14. Adicionar 675µl de esta suspensión a la columna con el filtro y centrifugar a 10000 g por 1 minuto.
15. Descartar el líquido que pasa a través del filtro y adicionar 675µl del sobrenadante a la columna con el filtro y centrifugar a 10000 g por 1 minuto.
16. Adicionar el sobrenadante restante a la columna con el filtro y centrifugar a 10000 g por 1 minuto.
17. Adicionar 500µl de la solución C5 y centrifugar a 10000 g por 1 minuto.
18. Descartar el líquido que pasa a través del filtro
19. Centrifugar de nuevo a 10000 g por 1 minuto.
20. Transferir cuidadosamente el filtro a un tubo de colección limpio de 2 ml
21. Adicionar 50 µl de agua ultrapura de PCR en el centro de la membrana.
22. Centrifugar a 10000 g por 1 minuto
23. Descartar el filtro y el ADN está listo para usar.
24. Almacenar el ADN a -20°C

## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE BACULOVIRUS CON FENOL: CLOROFORMO

1. Adicionar 100  $\mu$ l de virus purificado en un tubo eppendorf limpio.
2. Agregar 100  $\mu$ l de Carbonato de sodio 0,5 M, 50  $\mu$ l de SDS al 10% y 250  $\mu$ l de agua ultrapura. Homogenizar e incubar en baño serológico durante 10 minutos a 60 °C.
3. Observar si la solución es transparente para continuar con el paso 4 de no ser así agregar 30  $\mu$ l de Carbonato de sodio 0,5M y volver a incubar a 60 °C por 10 minutos.
4. Adicionar 50  $\mu$ l de proteinasa K (10mg/ml), homogenizar e incubar en baño serológico a 50°C por 15 minutos.
5. Adicionar 500  $\mu$ l de fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1) y mezclar suavemente por inversiones manuales por 2 minutos.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos
7. Recuperar la fase orgánica en un tubo eppendorf nuevo y repetir los pasos 5 a 7 una sola vez.
8. Adicionar 384  $\mu$ l de cloroformo y 16  $\mu$ l de isoamil alcohol y mezclar suavemente por inversiones manuales por 2 minutos.
9. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos
10. Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y adicionar acetato de sodio 3M (40  $\mu$ l) y etanol absoluto frío (1000  $\mu$ l) y mezclar suavemente por inversiones manuales por 2 minutos.
11. Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos
12. Descartar sobrenadante
13. Agregar 500  $\mu$ l de etanol al 75%
14. Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos
15. Eliminar etanol con la micropipeta  
Resuspender en 100  $\mu$ l de agua ultrapura.

## ANEXO 4

S = Testigo de Suelo

S1 = Suelo 1

S2 = Suelo 2

### Análisis de varianza (ANOVA)

STATISTIX FOR WINDOWS

06/15/12, 8:10

ONE-WAY AOV FOR: S S1 S2

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
-----	----	-----	-----	-----	-----
BETWEEN	2	691.057	345.528	1.14	0.3429
WITHIN	18	5471.60	303.978		
TOTAL	20	6162.65			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF	-----	-----	-----
EQUAL VARIANCES	2.06	2	0.3567
COCHRAN'S Q	0.6018		
LARGEST VAR / SMALLEST VAR	3.7921		
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS	6.46347		
EFFECTIVE CELL SIZE	6.4		

SAMPLE GROUP

VARIABLE	MEAN	SIZE	STD DEV
-----	-----	-----	-----
S	22.200	3	11.100
S1	39.500	9	21.615
S2	33.322	9	13.636
TOTAL	34.381	21	17.435

CASES INCLUDED 21 MISSING CASES 6