HAL
open science

Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs Phthorimaea operculella et Tecia solanivora (Lepidoptera gelechiidae)

Carlos Espinel-Correal Espinel-Correal

To cite this version:

Carlos Espinel-Correal Espinel-Correal. Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs Phthorimaea operculella et Tecia solanivora (Lepidoptera gelechiidae). Autre. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2010. Français. NNT : 2010EMSE0594 . tel-00609279

HAL Id: tel-00609279

https://theses.hal.science/tel-00609279

Submitted on 18 Jul 2011

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : **2010 EMSE 0594.**

THÈSE

présentée par

Carlos ESPINEL – CORREAL

pour obtenir le grade de
Docteur de l'École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne

Spécialité : Sciences et Ingénierie de l'Environnement

Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs *Phthorimaea operculella* et *Tecia solanivora* (Lepidoptera : Gelechiidae)

Soutenue à Alès le 17 décembre 2010

Président	Primitivo CABALLERO	Pr. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, Espagne
Rapporteurs	Catherine REGNAULT-ROGER	Pr . Université de Pau et Pays de l'Adour. Pau.
	Primitivo CABALLERO	Pr. Universidad Pública de Navarra. Pamplona, Espagne
Examinateurs	Elisabeth HERNIOU	CR. CNRS/Université de Tours.
Directeurs de thèse	Jacques BOURGOIS	Pr. ENSMSE. Saint Etienne
	Miguel LOPEZ-FERBER,	Pr. Ecole des Mines d'Alès
	Xavier LERY	CR. IRD. Saint Christol les Alès

Spécialités doctorales :	**Responsables :**
SCIENCES ET GENIE DES MATERIAUX	J. DRIVER Directeur de recherche – Centre SMS
MECANIQUE ET INGENIERIE	A. VAUTRIN Professeur – Centre SMS
GENIE DES PROCEDES	G. THOMAS Professeur – Centre SPIN
SCIENCES DE LA TERRE	B. GUY Maître de recherche – Centre SPIN
SCIENCES ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT	J. BOURGOIS Professeur – Centre SITE
MATHEMATIQUES APPLIQUEES	E. TOUBOUL Ingénieur – Centre G2I
INFORMATIQUE	O. BOISSIER Professeur – Centre G2I
IMAGE, VISION, SIGNAL	JC. PINOLI Professeur – Centre CIS
GENIE INDUSTRIEL	P. BURLAT Professeur – Centre G2I
MICROELECTRONIQUE	Ph. COLLOT Professeur – Centre CMP

Enseignants-chercheurs et chercheurs autorisés à diriger des thèses de doctorat (titulaires d'un doctorat d'État ou d'une HDR)

AVRIL	Stéphane	MA	Mécanique & Ingénierie	CIS
BATTON-HUBERT	Mireille	MA	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BENABEN	Patrick	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CMP
BERNACHE-ASSOLANT	Didier	PR 0	Génie des Procédés	CIS
BIGOT	Jean-Pierre	MR	Génie des Procédés	SPIN
BILAL	Essaïd	DR	Sciences de la Terre	SPIN
BOISSIER	Olivier	PR 1	Informatique	G2I
BOUCHER	Xavier	MA	Génie Industriel	G2I
BOUDAREL	Marie-Reine	PR 2	Génie Industriel	DF
BOURGOIS	Jacques	PR 0	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BRODHAG	Christian	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
BURLAT	Patrick	PR 2	Génie industriel	G2I
COLLOT	Philippe	PR 1	Microélectronique	CMP
COURNIL	Michel	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
DAUZERE-PERES	Stéphane	PR 1	Génie industriel	CMP
DARRIEULAT	Michel	IGM	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DECHOMETS	Roland	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
DESRAYAUD	Christophe	MA	Mécanique & Ingénierie	SMS
DELAFOSSE	David	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
DOLGUI	Alexandre	PR 1	Génie Industriel	G2I
DRAPIER	Sylvain	PR 2	Mécanique & Ingénierie	SMS
DRIVER	Julian	DR 0	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FEILLET	Dominique	PR 2	Génie Industriel	CMP
FOREST	Bernard	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	CIS
FORMISYN	Pascal	PR 1	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
FORTUNIER	Roland	PR 1	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
FRACZKIEWICZ	Anna	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GARCIA	Daniel	MR	Génie des Procédés	SPIN
GIRARDOT	Jean-Jacques	MR	Informatique	G2I
GOEURIOT	Dominique	MR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
GRAILLOT	Didier	DR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
GROSSEAU	Philippe	MR	Génie des Procédés	SPIN
GRUY	Frédéric	MR	Génie des Procédés	SPIN
GUY	Bernard	MR	Sciences de la Terre	SPIN
GUYONNET	René	DR	Génie des Procédés	SPIN
HERRI	Jean-Michel	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
INAL	Karim	PR 2	Microélectronique	CMP
KLÖCKER	Helmut	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
LAFOREST	Valérie	CR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
LERICHE	Rodolphe	CR CNRS	Mécanique et Ingénierie	SMS
LI	Jean-Michel	EC (CCIMP)	Microélectronique	CMP
LONDICHE	Henry	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
MALLIARAS	George Grégory	PR 1	Microélectronique	CMP
MOLIMARD	Jérôme	MA	Mécanique et Ingénierie	SMS
MONTHEILLET	Frank	DR 1 CNRS	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
PERIER-CAMBY	Laurent	PR 2	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Christophe	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PIJOLAT	Michèle	PR 1	Génie des Procédés	SPIN
PINOLI	Jean-Charles	PR 0	Image, Vision, Signal	CIS
STOLARZ	Jacques	CR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
SZAFNICKI	Konrad	MR	Sciences & Génie de l'Environnement	SITE
THOMAS	Gérard	PR 0	Génie des Procédés	SPIN
TRIA	Assia		Microélectronique	CMP
VALDIVIESO	François	MA	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
VAUTRIN	Alain	PR 0	Mécanique & Ingénierie	SMS
VIRICELLE	Jean-Paul	MR	Génie des procédés	SPIN
WOLSKI	Krzysztof	DR	Sciences & Génie des Matériaux	SMS
XIE	Xiaolan	PR 1	Génie industriel	CIS

Glossaire :

PR 0	Professeur classe exceptionnelle
PR 1	Professeur 1ère catégorie
PR 2	Professeur 2ème catégorie
MA(MDC)	Maître assistant
DR	Directeur de recherche
Ing.	Ingénieur
MR(DR2)	Maître de recherche
CR	Chargé de recherche
EC	Enseignant-chercheur
IGM	Ingénieur général des mines

Centres .

SMS	Sciences des Matériaux et des Structures
SPIN	Sciences des Processus Industriels et Naturels
SITE	Sciences Information et Technologies pour l'Environnement
G2I	Génie Industriel et Informatique
CMP	Centre de Microélectronique de Provence
CIS	Centre Ingénierie et Santé

Dernière mise à jour le : 9 mars 2010

A Tété et Juandi

Remerciements

Avant de présenter ce travail, Je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont permis de le réaliser ou qui m'ont fait l'honneur de le juger…

J'exprime, tout d'abord, ma sincère reconnaissance à Monsieur Miguel LÓPEZ-FERBER Directeur du LGEI, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour avoir accepté de diriger ce travail, pour sa disponibilité et générosité et pour m'avoir accordé sa confiance depuis mon arrivée.

Toute ma gratitude à M. Xavier LERY chercheur IRD, pour son accueil dans son équipe au sein du laboratoire de St. Christol-les-Alès, pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse avec une grande disponibilité. Merci pour sa générosité, son encouragement et pour la confiance qu'il m'a témoignée.

Je voudrais exprimer ma gratitude à M. Jacques BOURGOIS, de l'Ecole de Mines de Saint Etienne, qui a accepté de co-diriger ce travail et m'a permis l'inscription dans l'Ecole Doctorale Science-Ingénierie-Santé.

Je voudrais remercier les rapporteurs qui ont accepté de juger ce travail : M. Primitivo CABALLERO, Professeur à l'Université Publique de Navarre et Mme. Catherine REGNAULT-ROGER Professeur à l'Université de Pau et des pays de l'Adour.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à tous les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font, Mme. Catherine REGNAULT-ROGER, Mme. Elisabeth HERNIOU, M. Primitivo CABALLERO, M. Jaques BOURGOIS, M. Xavier LERY et M. Miguel LÓPEZ-FERBER.

Je tiens à exprimer ma gratitude à trois institutions, qui ont permis la réalisation de ce travail dans les conditions les plus favorables. L'Ecole des Mines d'Alès, qui a financé mon séjour en France par l'obtention d'une allocation de recherche. Au personnel, aux secrétaires de l'Ecole et du LGEI et à l'association des internationaux de l'Ecole des Mines d'Alès (AIMA), spécialement à Mme. Annie Moulin, pour son accueil, son aide, sa collaboration et sa sympathie. L'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et la Corporation Colombienne de la Recherche Agricole (CORPOICA) qui ont contribué, grâce à une étroite collaboration à mettre à ma disposition les ressources nécessaires pendant mes séjours en France et en Colombie.

Un remerciement particulier à Christine BLACHERE-LOPEZ, pour sa gentillesse et surtout sa participation efficace et généreuse au moment de la mise en forme de ce mémoire.

Un grand merci à l'ensemble du personnel du laboratoire Baculovirus et Thérapie du CNRS à Saint Christol-les-Alès, pour son accueil et la sympathie qu'ils m'ont témoignée tout au long de ce travail, et très particulièrement à sa directrice Mme. Martine CERUTTI pour sa disponibilité et sa collaboration.

A Alba Marina, Laura, Juliana, Gaby, Claudia, John et à tout le personnel du laboratoire de Contrôle Biologique de CORPOICA, en Colombie, pour leur collaboration et le support

technique donné lors des essais biologiques et l'élevage de *Tecia solanivora.*

J'adresse mes vifs remerciements à tous ceux qui m'ont aidé et accueilli chaleureusement, à Sandra (pour ses conseils sur la difficile langue française), à Nohora et Michel (amoureux de la pomme de terre « criolla »), à Oria, Diego, et tous les camarades de la Maison des élèves pendant ces trois ans.

Enfin, je dédie particulièrement cette thèse a Tété et Juandi, mon épouse et mon fils, qui ont traversé courageusement cette épreuve de trois ans, pour leurs efforts, pour leurs encouragements et pour l'amour qui nous soutient.

Sommaire

Remerciements 5
Sommaire 7
Table des figures et tableaux 11

Introduction 17

Chapitre I. Données bibliographiques 21
1.1. Dynamique des populations des espèces invasives 21
1.1.1. Définition d'espèce invasive 21
1.1.2. Conséquences écologiques et évolutives d'une invasion 21
1.1.3. Les étapes d'une invasion 22
1.2. Les teignes de la pomme de terre 23
1.2.1. La teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* 24
1.2.1.1. Introduction 24
1.2.1.2. Description 25
1.2.1.3. Biologie 26
1.2.1.4. Dégâts 26
1.2.2. La teigne du Guatemala *Tecia solanivora* 27
1.2.2.1. Introduction 27
1.2.2.2. Description 27
1.2.2.3. Biologie 28
1.2.2.4. Dégâts 29
1.2.2.5. La teigne du Guatemala comme espèce envahissante 30
1.3. Méthodes de contrôle des teignes de la pomme de terre *Phthorimaea operculella* et *Tecia solanivora* 31
1.3.1. Contrôle cultural 32
1.3.2. Contrôle éthologique 32
1.3.3. Lutte chimique 33
1.3.4. Lutte biologique 33
1.4. Les baculovirus dans la lutte biologique 34
1.4.1. Généralités 35
1.4.2. Classification et structure des Baculovirus 36
1.4.3. Pathologie de l'infection 40
1.4.4. Composition génétique des populations virales 46
1.4.5. Le granulovirus de *Phthorimaea operculella* : Un virus contre les teignes de la pomme de terre (PhopGV) 49
1.4.5.1. Découverte et isolement 49
1.4.5.2. Efficacité 50
1.5. Les insecticides biologiques 53
1.5.1. Le marché 53

1.5.2. Contraintes et limitations 55
1.5.3. Avantages 58
1.5.4. Production en masse 60

Chapitre 2. Matériel et Méthodes 64
2.1 Matériel biologique 64
2.1.1. Les insectes 64
2.1.2. Les isolats viraux de PhopGV 64
2.2. Méthodes 65
2.2.1. Essais biologiques 65
2.2.2. Etude des mélanges génotypiques 66
2.2.2.1. Mélanges naturels 66
2.2.2.2. Populations expérimentales 66
2.2.3. Amplification sur larves 67
2.2.4. Productivité virale 67
2.2.5. Analyse des données 68
2.2.6. Analyse de l'ADN viral 68
2.2.6.1. Purification des corps d'inclusion (OB) 68
2.2.6.2. Purification et extraction de l'ADN viral 68
2.2.6.3. Caractérisation par enzymes de restriction 69
2.2.6.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) 69

Chapitre 3. Analyse génétique et biologique 71
3.1. Introduction 71
3.2. Résultats 72
3.2.1. Analyse des profils enzymatiques des isolats viraux colombiens 72
3.2.2. Analyse des 2 zones variables du génome des PhopGV colombiens 76
3.2.3. Analyse de la pathogénicité des isolats colombiens sur des hôtes alternatifs 77
3.3. Discussion 81
3.4 Conclusion 88

Chapitre 4 : Evolution de l'activité biologique et de la composition génétique des mélanges génotypiques 89
4.1. Introduction 89
4.2 Résultats 90
4.2.1. Evolution des isolats colombiens mélangés naturellement sur les hôtes *P. operculella* et *T. solanivora* 90
4.2.1.1. Efficacité des mélanges naturels sur larves de *P. operculella* 90
4.2.1.2. Efficacité des mélanges naturels sur larves de *T. solanivora* 93
4.2.1.3. Composition génotypique des mélanges naturels sur larves de *P. operculella et T. solanivora* 94
4.2.2. Evolution de l'activité biologique et composition génotypique des populations expérimentales 97

4.2.2.1. Efficacité des populations expérimentales sur larves de *P. operculella* 98
4.2.2.2. Efficacité des populations expérimentales sur larves de *T. solanivora* 99
4.2.2.3. Comparaison de l'efficacité des populations expérimentales sur les deux hôtes *P. operculella et T. solanivora* 101
4.2.2.4. Influence du changement d'hôte lors des passages successifs. 106
4.2.2.5. Composition génotypique des mélanges artificiels sur larves de *P. operculella* et *T. solanivora* 107
4.3. Discussion 107
4.4. Conclusions 116

Chapitre 5 : Analyse de la production de corps d'inclusion d'isolats de PhopGV sur des larves de *P. operculella et T. solanivora* **118**
5.1 Introduction 118
5.2. Résultats 118
5.2.1. Productivité sur *P. operculella* des isolats VG001 et VG005 119

5.2.2. Productivité des isolats Pérou et VG003 et des populations expérimentales sur *P. operculella* 120

5.2.3. Productivité des isolats Pérou et VG003, et des populations expérimentales sur *T. solanivora* 121
5.2.4. Comparaison de la productivité des populations expérimentales au cours des cycles de réplication entre les deux hôtes 122
5.3. Discussion 123
5.4. Conclusion 126

6. Conclusion générale **128**

7. Références bibliographiques **132**

8. Annexes **147**
Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora y Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) 149
Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora (Povolny)* (Lepidoptera: Gelechiidae). 159
A *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV) containing several genotypes is highly efficient on *Tecia solanivora* 168
Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*. 174
Genetic and Biological Analysis of Colombian *Phthorimaea operculella Granulovirus* (PhopGV) Isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) 180

Figures et tableaux

Figure 1. Développement de la teigne de la pomme de terre *P. operculella.* 1a : œufs (chorion transparent) et larve de stade 1. 2b : larve (stade 4), 2c : pupe, 2d : adulte. Photo : X. Léry. 25

Figure 2. Développement de la teigne du Guatemala *T. solanivora.* 3a: œufs, 3b : larve (stade 4) et pupe, 3c : Adulte. Photo : C. Espinel 28

Figure 3. Dégâts produits par les larves de *T. solanivora* : formation de galeries et pourrissement à cause de l'infection secondaire par des microorganismes. Photo : C. Espinel; P. Cuartas. 29

Figure 4. 1a : Route invasive de *T. solanivora* en Amérique. 1b : Invasion de la teigne du Guatemala en Colombie. En bleu, les principales zones productrices de pomme de terre. 31

Figure 5. Morphologie des baculovirus. NPV à enveloppement multiple (MNPV), NPV à enveloppement simple (SNPV), et granulovirus (GV). 37

Figure 6. Structure des virions : ODV, la forme incluse du virus et BV, le virus bourgeonnant. Adapté de Slack et Arif (2007). 38

Figure 7. Cycle de réplication des baculovirus. MP : membrane péritrophique. BV : virion bourgeonnant (budded virion). ODV : virion occlus (occlusion derived virion). D'après Slack et Arif, 2007. 40

Figure 8. Signes de l'infection du PhopGV sur les larves des teignes de la pomme de terre : *P. operculella* (1 : Larve saine, 2 : Larve infectée) (Photo : X. Léry) et *T. solanivora* (3 : Larve saine, 4 : Larve infectée) (Photo : C. Espinel). 44

Figure 9. Marché global des biopesticides en 2005. (B.t : *Bacillus thuringiensis* serotypes) (Mc.Spadden 2005). 53

Figure 10. Marché mondial des agents de contrôle biologique, participation par continent en 2005. (NAFTA : Etats-Unis, Canada, Mexique) (Guillon 2005) 54

Figure 11. Zones géographiques où les PhopGV colombiens ont été isolés. En bleu, les principales zones productrices de la pomme de terre. 65

Figure 12. Schéma des essais de l'activité biologique des mélanges artificiels des isolats Pérou (A) et VG003 (B). Dans chaque essai biologique, on évalue les trois mélanges artificiels. P = passage. 67

Figure 13. Electrophorèses sur gel d'agarose 1% de l'ADN des isolats colombiens (VG001, VG002, VG003, VG004, VG005) et référence #1346 digéré par l'enzyme SmaI. L'étoile indique la bande submolaire. M : Marqueur de poids moléculaire λ/HindIII. bp : paires de bases. 73

Figure 14. PCR semi-quantitative des isolats colombiens du PhopGV et référence #1346. Gènes 90-91. M (Marker). 76

Figure 15. Vue d'alignement des deux polymorphismes trouvés dans la région ORF 90-91. Type 1 correspond à la séquence complète publiée (accession numéro NC004062). Le fragment de 840 pb représenté sur la figure correspond à la région des nucléotides (nt) 78 001 à 78 840 sur la séquence complète. 77

Figure 16. PCR semi-quantitative des isolats colombiens du PhopGV et référence #1346. Gène 129. M (Marker). 78

Figure 17. Vue d'alignement des différents variants du gène egt trouvés dans PhopGV. Type 1 correspond à la séquence complète publiée (accession numéro NC004062). Le fragment de 1900 pb représenté sur la figure correspond à la région des nucléotides (nt) 116 301 à 118 200 de la séquence complète. 78

Figure 18. Comparaison de la pathogénicité des isolats Pérou et VG003 sur les hôtes *P. operculella et T. solanivora.* 80

Figure 19. Mortalité en fonction de la concentration en PhopGV colombiens et référence, sur *T. solanivora.* 80

Figure 20. Mortalité en fonction de la concentration en PhopGV colombiens et référence, sur *P. operculella.* 81

Figure 21. Activité biologique des passages de l'isolat VG001 et de l'isolat Pérou, appliqués sur *P. operculella*. P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P6 : Passage 6. 92

Figure 22. Activité biologique des passages de l'isolat VG005 et de l'isolat Pérou, appliqués sur *P. operculella*. P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P6 : Passage 6. 92

Figure 23. Comparaison de l'activité biologique des isolats VG001 et VG005 pour chaque passage sur *P. operculella.* A) Passage 1 ; B) Passage 2 ; C) Passage 6. 93

Figure 24. Comparaison de l'activité biologique des isolats VG001 et VG005 sur *T. solanivora.* 94

Figure 25. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* M : Marqueur ; P : Passage. 95

Figure 26. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* M : Marqueur ; P : Passage. 95

Figure 27. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora.* M : Marqueur ; P : Passage. 95

Figure 28. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage. 95

Figure 29. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage. 96

Figure 30. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage. 96

Figure 31. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage. 96

Figure 32. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage. 96

Figure 33. Activité biologique des passages de la population 10 : 90, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *P. operculella.* P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5 97

Figure 34. Activité biologique des passages de la population expérimentale 50 : 50, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *P. operculella*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5. 99

Figure 35. Activité biologique des passages de la population expérimentale 90 : 10, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *P. operculella.* P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5. 99

Figure 36. Comparaison de l'activité biologique des populations expérimentales 10 : 90, 50 : 50 et 90 : 10, des isolats Pérou et VG003 pour chaque passage sur *P. operculella*. A) Passage 0; B) Passage 1; C) Passage 2 ; D) Passage 5. 101

Figure 37. Activité biologique des passages de la population expérimentale 10 : 90, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *T. solanivora*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5. 102

Figure 38. Activité biologique des passages de la population expérimentale 50 : 50, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *T. solanivora*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5. 102

Figure 39. Activité biologique des passages du mélange 90 : 10, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *T. solanivora*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5. 103

Figure 40. Comparaison de l'activité biologique des mélanges 10 : 90, 50 : 50 et 90 : 10, des isolats Pérou et VG003 pour chaque passage sur *T. solanivora*. A) Passage 0; B) Passage 1; C) Passage 2 ; D) Passage 5. 103

Figure 41. Comparaison de l'activité biologique du passage 0 des mélanges artificiels sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora*. A) Mix 10 : 90 ; B) Mix 50 : 50 ; C) Mix 90 : 10. 104

Figure 42. Comparaison de l'activité biologique du passage 1 des mélanges artificiels sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora*. A) Mix 10 : 90 ; B) Mix 50 : 50 ; C) Mix 90 : 10. 104

Figure 43. Comparaison de l'activité biologique du passage 2 des populations expérimentales sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora*. A) 10 : 90 ; B) 50 : 50 ; C) 90 : 10. 105

Figure 44. Comparaison de l'activité biologique des passages 3 et 5 des populations expérimentales sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora,* respectivement. A) 10 : 90 ; B) 50 : 50 ; C) 90 : 10. 105

Figure 45. Activité biologique du Mix Retro par rapport à la population 50 : 50, P0 sur *P. operculella* et P1 sur *T. solanivora*. P= passage. 107

Figure 46. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* M : Marqueur ; P : Passage. 108

Figure 47. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* M : Marqueur ; P : Passage. 108

Figure 48. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* 108

Figure 49. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora.* 108

Figure 50. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora.* 109

Figure 51. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora.* 109

Figure 52. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* M : Marqueur ; P : Passage. 110

Figure 53. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* M : Marqueur ; P : Passage. 110

Figure 54. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella.* M : Marqueur ; P : Passage. 110

Figure 55. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora.* M : Marqueur ; P : Passage. 110

Figure 56. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage. 111

Figure 57. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora.* M : Marqueur ; P : Passage. 111

Figure 58. Productivité des isolats sauvages VG001 et VG005 au cours des passages sur larves de *P. operculella.* Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey, α=0,05). 119

Figure 59. Productivité virale (OB/mg de poids larvaire) des populations expérimentales obtenues par mélange des isolats Pérou et VG003 au cours des passages sur *P. operculella.* A) Mix 10 : 90 ; B) Mix 50 : 50 ; C) Mix 90 : 10. P : Passage. Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey, α=0,05). 120

Figure 60. Productivité virale (OB/mg de poids larvaire) des populations expérimentales obtenues par mélange des isolats Pérou et VG003 au cours des passages sur *T. solanivora.* A) Mix 10 : 90 ; B) Mix 50 : 50 ; C) Mix 90 : 10. P : Passage. Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey, α=0,05). 121

Figure 61. Comparaison de la productivité virale (OB/mg de poids larvaire) des populations expérimentales obtenues par mélange des isolats Pérou et VG003 au cours des passages sur les deux hôtes. A) Passage 0 ; B) Passage 2 ; C) Passage 3. Mix : Mélange. Po : *P. operculella ; Ts : T. solanivora*. Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey, α=0,05). 123

Tableau 1. Agents de contrôle biologique à base de baculovirus dans le monde 62

Tableau 2. Comparaison des fragments de restriction NsiI, NruI, HpaI, Bst API et MluI de l'ADN des isolats colombiens et référence #1346. Les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004, sont mis dans la colonne 2, du fait qu'il n'y a pas de différences parmi eux. 74

Tableau 3. Comparaison des fragments de restriction BstEII, DraIII, BamHI, NdeI et HindIII de l'ADN des isolats colombiens et référence #1346. Les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004, sont mis dans la colonne 2, du fait qu'il n'y a pas de différences parmi eux. 75

Tableau 4. Activité biologique des isolats Pérou et VG003 sur *T. solanivora* et *P. operculella.* Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté. 79

Tableau 5. Activité biologique au cours des passages des isolats mélangés naturellement VG001 et VG005, et des isolats VG003 et Pérou sur *P. operculella.* Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté. 91

Tableau 6. Activité biologique des isolats VG001, VG005, VG003 et Pérou sur *T. solanivora*. Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté. 93

Tableau 7. Activité biologique au cours des passages des populations expérimentales sur *P. operculella*. Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté**.** 98

Tableau 8. Activité biologique au cours des passages des mélanges artificiels de Pérou et VG003 sur *T. solanivora*. Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté. 100

Tableau 9. Activité biologique du Mix Retro sur *T. solanivora.* Les résultats sont comparés avec les efficacités de la population 50 : 50 P0 sur *P. operculella* et P1 sur *T. solanivora.* Entre parenthèses : intervalles. χ^2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté. 106

Tableau 10. Productivité virale et efficacité des isolats VG001 et VG005 sur *P. operculella.* CL=Concentration létale. OB=Corps d'inclusion. 120

Tableau 11. Parallèle entre les valeurs de la productivité virale et l'efficacité (CL_{50} et CL_{90}) des populations expérimentales et des isolats Pérou et VG003 sur les deux hôtes. CL=Concentration létale. OB=Corps d'inclusion. 124

Introduction

La pomme de terre est l'une des ressources alimentaires majeures en Amérique Centrale et en Amérique du sud. En Colombie, sa culture représente une importante source d'emploi. Environ 180 000 hectares sont cultivés, fournissant les ressources à 95000 familles. La production se distribue entre la consommation familiale, le commerce de proximité et une partie importante pour la transformation industrielle et l'exportation.

Plusieurs centaines de milliers de fermiers sont touchés annuellement par les ravages causés aux pommes de terre par les ravageurs de cette culture. Parmi les insectes, le complexe des teignes de la pomme de terre occasionne les pertes plus importantes. Les deux teignes principales sont *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera : Gelechiidae) et *Tecia (Scrobipalpopsis) solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera : Gelechiidae). La première est distribuée dans plusieurs régions tropicales et subtropicales du monde et cause des dégâts au feuillage en champ et aux tubercules principalement en conditions de stockage.

La teigne du Guatemala, *T. solanivora*, est récemment devenue le principal ravageur de cette culture en Amérique centrale et au nord de l'Amérique du sud (Venezuela, Colombie, Equateur). Cet insecte a été introduit au Venezuela à partir de l'importation de semence infestée, et a envahi progressivement la Colombie et l'Equateur, principalement via le commerce de semences.

Les insecticides chimiques sont la principale stratégie du contrôle. Cependant, leur utilisation massive et continue a provoqué divers inconvénients, comme les risques de contamination ou accumulation dans le sol, l'eau et les denrées récoltées, le développement de résistances ou encore les risques pour la santé des travailleurs agricoles. C'est ainsi que le développement de méthodes alternatives (moins polluantes) de contrôle de ces ravageurs est envisagé.

Les baculovirus, et spécialement les granulovirus, présentent un intérêt considérable comme outil pour le contrôle des teignes la pomme de terre. Un virus de granulose a été trouvé sur *Phthorimaea operculella*. Il a été appelle *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV). Ce virus a été utilisé avec succès pour le contrôle des infestations de *P. operculella*. Des études précédentes ont montré une variabilité génétique des isolats provenant de différentes populations du monde. D'un autre côté, l'absence de méthodes de contrôle appropriées pour *T. solanivora* a orienté l'échantillonnage des granulovirus isolés de cet insecte.

La Corporation Colombienne de la Recherche Agricole, CORPOICA, a conduit une campagne de prospection et a récolté 5 isolats de granulovirus sur des larves de *T. solanivora* de différentes régions géographiques de Colombie. Ces isolats se sont avérés génétiquement proches du PhopGV. Le fait de trouver des isolats de PhopGV nous conduit à utiliser le complexe granulovirus/teignes de la pomme de terre comme modèle d'analyse de l'évolution des populations virales, au niveau de leur variabilité génotypique et de leurs caractéristiques biologiques, au cours de l'adaptation à une espèce alternative invasive.

Les résultats de ce travail prennent en compte deux approches, le point de vue des recherches en biologie évolutive des interactions pathogène-hôte, et celui, beaucoup plus appliqué, de la protection des cultures par l'utilisation individuelle ou en mélange de ces isolats pour la lutte biologique comme principe actif d'un agent de contrôle biologique –autrement appelé biopesticide- (BCA dans le reste du manuscrit, pour Biological Control Agent, en suivant la terminologie de l'Organisation Internationale de Contrôle Biologique, OILB/IOBC) pour le contrôle de ces ravageurs.

Après un chapitre bibliographique où seront exposés des généralités sur les espèces envahissantes, la description des teignes de la pomme de terre, les baculovirus dans la lutte biologique, ainsi que des données sur les BCA, nous exposerons dans les quatre chapitres suivants les méthodes et les résultats du travail de ce mémoire.

Dans le premier chapitre de résultats, Chapitre 3, l'analyse de la variabilité génétique et de la pathogénicité des isolats colombiens issus de *T. solanivora* a été réalisée. A partir des données d'une étude préalable, nous avons suivi et confirmé la variabilité des isolats par analyse des profils de restriction, par PCR, puis par le séquençage de deux régions du génome viral. En parallèle, des essais biologiques de laboratoire avec une méthode d'application par aspersion, ont permis de comparer l'efficacité de ces isolats sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora*. La mise en perspective de ces deux types de résultats, variabilité génétique et pathogénicité constitue le cœur de ce chapitre, qui amène comme possibilité la sélection d'un isolat comme principe actif pour un BCA.

Dans le chapitre suivant, Chapitre 4, à partir des résultats de l'activité biologique des isolats mélangés naturellement, l'étude de l'interaction pathogène-hôte a été abordée. L'objectif était de répondre à la question : Lors de mélanges (naturels ou artificiels), de deux génotypes adaptés à des espèces hôtes différentes, quelle est l'évolution au cours des cycles de réplication sur l'un ou l'autre des hôtes ? A partir des isolats viraux naturels trouvés en Colombie, et de populations virales construites au laboratoire, nous avons tenté de répondre à cette question en termes de proportion génotypique et d'activité biologique.

Le Chapitre 5 présente l'étude de la productivité virale des PhopGVs sur les deux hôtes. Nous avons effectué l'analyse de la production de granules par mg de tissu larvaire et l'influence du nombre de cycles de réplication et de l'hôte sur cette productivité. Ce facteur est un aspect très important dans le cadre du développement de BCA et est considéré comme un point critique dans la production industrielle.

Le chapitre 6 est consacré à une discussion générale de nos résultats, aux conclusions et aux perspectives ouvertes par ce travail.

Chapitre I. Données bibliographiques

1. 1. Dynamique des populations des espèces invasives

1.1.1. Définition d'espèce invasive

Une espèce invasive ou envahissante peut être définie comme une espèce introduite qui cause des impacts négatifs sur l'environnement, les activités ou la santé humaine. Dans la population de l'espèce introduite, seule une petite proportion s'établit et se disperse. Donc, une invasion biologique peut être considérée comme l'événement durant lequel une population est mobilisée au delà de son seuil naturel de densité de population ou de sa zone naturelle de dispersion potentielle (Lee 2002). Un envahisseur n'est pas forcément un « nouveau venu », mais un individu qui cause un nouvel impact dans l'environnement considéré (Davis et Thompson 2000).

1.1.2. Conséquences écologiques et évolutives d'une invasion

Les espèces envahissantes sont une menace pour les écosystèmes en affectant leur biodiversité (espèces natives), la structure de leurs communautés et l'intégrité de l'écosystème. Cet effet ne se réduit pas aux écosystèmes « naturels », mais s'étend aussi aux écosystèmes exploités (agriculture, ou pêche), pouvant avoir des effets sur la santé publique. Les espèces envahissantes induisent des coûts économiques pour les éradiquer. Par exemple, les coûts associés aux invasions les plus connues (mauvaises herbes, ravageurs et pathogènes des plantes) sont de 137 milliards de dollars américains par an aux Etats-Unis (Lee 2002).

Les interactions entre espèces natives et envahissantes peuvent être directes (prédation, parasitisme, compétition, mutualisme) ou indirectes (altération de l'habitat, activation d'interactions trophiques) et peuvent occasionner des changements dans la biologie des populations (naissances, mortalité, migration, disparition) des espèces natives (Sakai *et al.* 2001). De la même manière, elles peuvent induire des changements génétiques et évolutifs. La dérive génétique et la sélection naturelle à cause des interactions biotiques et des facteurs abiotiques dans le nouvel environnement peuvent

causer une *évolution rapide* chez les espèces envahissantes, mais aussi chez les espèces natives. Dans les cas extrêmes, cela peut aboutir à une hybridation inter ou intra spécifique, occasionnant l'extinction de l'espèce native (Sakai *et al.* 2001) ou la génération de nouveaux génotypes. Ces modifications peuvent avoir comme effets un développement plus rapide, une taille plus grande ou un accroissement de l'agressivité (Lee 2002).

Une caractéristique habituelle concomitante au processus de colonisation est l'apparition de goulots d'étranglement dans la population (« bottleneck[1]») en raison de la faible quantité de colonialistes initiale (Sakai *et al.* 2001). Quel que soit le moyen d'introduction de l'espèce invasive (dispersion naturelle ou par vecteur humain), la population introduite est composée par un échantillon limité de génotypes originaires d'une ou plusieurs populations de la zone d'origine, (Pulliandre *et al.* 2007). De plus, la dérive subie pendant la colonisation peut réduire encore davantage la diversité génétique de la population récemment établie. La réduction de la diversité génétique peut occasionner une *endogamie*, éventuellement limitant la croissance de la population et réduisant sa probabilité de persistance. Elle peut aussi limiter sa capacité d'évolution car une espèce envahissante peut être pré-adaptée à certains aspects de son nouvel environnement (Sakai *et al.* 2001).

1.1.3. Les étapes d'une invasion

Plusieurs étapes sont nécessaires pour qu'une introduction se fasse avec succès (Sakai *et al.* 2001):

Introduction de l'espèce dans le nouvel habitat : La majorité des introductions d'espèces envahissantes sur des zones géographiques fortement éloignées est le résultat direct ou indirect d'activités humaines. Les facteurs sociaux et économiques sont souvent aussi critiques que les facteurs biologiques dans l'introduction d'espèces

[1] Bottelneck effet: Lorsqu'une population expérimente une réduction drastique du nombre d'individus, la descendance de cette population aura une variabilité génétique faible comparée à la population d'origine. Ceci est comparable à un effet d'échantillonnage d'un faible nombre d'individus.

exotiques. Les introductions accidentelles peuvent se faire via les opérateurs de commerce (navires, avions, camions), via les hôtes (transport de végétaux ou semis infectés ou infestés, d'animaux,), ou des produits dérivés (farines, terreaux, …). De même, les pratiques agricoles (pâture, élevage) peuvent favoriser l'établissement des espèces envahissantes car elles créent des zones perturbées pour les colonisateurs. Lorsque dans les agro-écosystèmes les ravageurs sont exposés à ces pratiques agronomiques durant plusieurs générations, il en résulte une sélection des caractéristiques qui rendent les envahisseurs plus persistants et nocifs.

Colonisation initiale et établissement de l'espèce envahissante : Il est important que l'espèce colonisatrice ait une plasticité phénotypique, car elle doit s'adapter à différentes conditions environnementales. Après la colonisation initiale, une population viable auto suffisante doit impérativement avoir une bonne compétitivité pour exploiter les ressources locales.

Dispersion à de nouveaux habitats : Une fois l'établissement pérennisé, les espèces envahissantes doivent se disséminer en utilisant deux types de dispersion : *dispersion par diffusion* entre environnements adjacents ou proches (courte distance) et *dispersion par sauts*, entre zones largement séparées par une barrière (longue distance) (Davis et Thompson 2000).

En absence d'interactions interspécifiques entre les espèces envahissantes et des espèces natives, les premières peuvent prospérer dans leur nouvel habitat et devenir des *ravageurs*. S'il y a absence de prédateurs ou de pathogènes d'une espèce envahissante, une croissance rapide de la population se produit, car les ressources disponibles s'accroissent ainsi que la compétitivité et la capacité d'envahissement du colonisateur (Sakai *et al.* 2000).

1.2. Les teignes de la pomme de terre

Le complexe des teignes de la pomme de terre occasionne des pertes importantes dans cette culture. Les dégâts sont faits sur les tubercules et réduisent sa valeur commerciale, car ils ne peuvent être utilisés ni comme semences ni pour la consommation humaine ou animale. Ces teignes sont des lépidoptères de petite taille

de la famille Gelechiidae. *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) et *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) sont les plus importantes du point de vue économique et de distribution mondiale ; tandis que *Symmestrichema* (*tangolias) plaesiosema* (Gyen, 1913 ; Turner, 1919), est endémique des Andes.

1.2.1. La teigne de la pomme de terre *Phthorimaea operculella*

1.2.1.1. Introduction

La teigne de la pomme de terre *Phthorimaea* (*Gelechia*) *operculella (*Zeller, 1873) (Lepidoptera : Gelechiidae) est un des insectes ravageurs les plus importants sur cette culture dans plusieurs régions tropicales et subtropicales du monde. Elle cause des dégâts aux feuilles et aux tubercules de la plante en plein champ, mais les principaux dégâts sont observés dans les stockages des tubercules (Sporleder *et al*. 2005).

En 1845, elle a été mentionnée pour la première fois en Tasmanie, où des dégâts sur des tubercules de la pomme de terre ont été observés. La première description en a été faite par Zeller (1873) à partir d'un spécimen trouvé au Texas. Puis, sa présence a été relevée en Californie (EU) à partir de 1881 (Ortega et Fernandez 2000).

Le premier rapport mentionnant la présence de *P. operculella* en Colombie a été fait par Gallegos en 1946 sur une culture de tabac, mais des dégâts ont aussi été trouvés sur des cultures de pomme de terre au nord-ouest du pays (Ortega et Fernandez 2000).

Cet insecte est une espèce cosmopolite originaire d'Amérique du sud, point d'origine de la pomme de terre et du tabac (CIP 1992). *P. operculella* est adaptée aux régions tropicales et subtropicales du monde (http://www.nhm.ac.uk/jdsml/research-curation/research/projects/lepindex/detail.dsml?TaxonNo=103748%2e0). Elle se trouve du sud de l'Europe jusqu'à l'Australie et la Nouvelle- Zélande, et des États-Unis jusqu'au Japon. Les populations se rencontrent en champ jusqu'à des températures voisines de 16ºC et jusqu'à des altitudes de 2 000 mètres. Des informations d'infestations sévères sont aussi mentionnées dans des zones plus froides, comme les terres hautes de Colombie, du Kenya, du Népal, du Pérou et du Venezuela (Ortega et

Fernandez 2000).

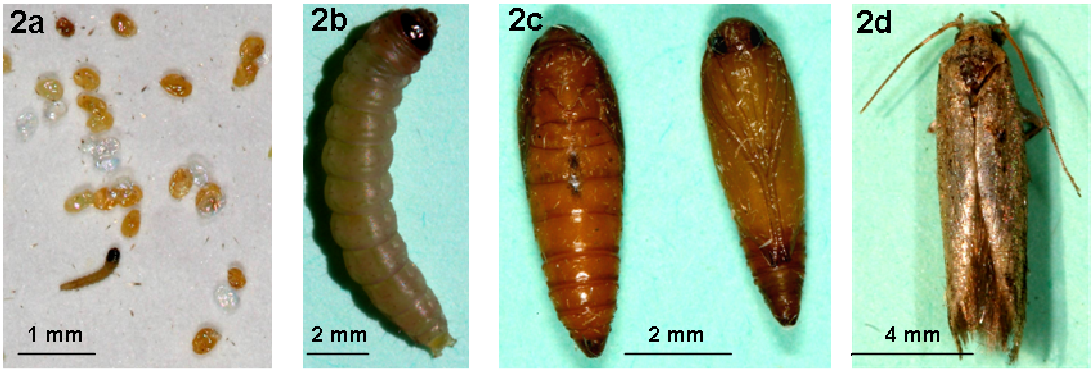

Figure 1. Développement de la teigne de la pomme de terre *P. operculella*. 1a : œufs (chorion transparent) et larve de stade 1. 2b : larve (stade 4), 2c : pupe, 2d : adulte. Photo : X. Léry**.**

1.2.1.2. Description

L'adulte est considéré comme un micro-lépidoptère. Le papillon mesure 10 mm de longueur avec une envergure de 12 à 15 mm. L'abdomen est gris. Ses ailes antérieures de couleur gris-brunâtre terne, sont étroites, lancéolées et maculées de petites mouchetures. Les ailes postérieures sont plus courtes que les antérieures et présentent des bordures frangées (http://www.inra.fr/hyppz/RAVAGEUR/3phtope.htm).

Les œufs très légèrement ovoïdes mesurent environ 0,45 mm de diamètre. Ils ont une surface lisse et leur texture est molle. Au moment de l'oviposition, la coloration est blanche nacrée et vire progressivement au jaune au orange, puis au brun avant l'éclosion.

L'état larvaire comporte 4 stades (Cuartas *et al.* 2009). La larve de stade 1 récemment émergée mesure environ 1,30 mm pour atteindre 10 à 12 mm au stade L4 de son développement. La couleur générale est jaunâtre avec la tête et le prothorax marron. Cette coloration reste pendant la plus grande partie de son développement mais peut varier en fonction de son type d'alimentation. Une fois la période larvaire terminée, commence la phase de pré-pupe où la larve prend une coloration rosée puis verdâtre. La pupe de couleur jaune à brun-rouge en phase terminale mesure 7 à 10 mm (Estrada et Sierra 1997) (Figure 1).

1.2.1.3. Biologie

P. operculella effectue une métamorphose complète en quatre étapes de développement ; œuf, larve, pupe et adulte. La durée de chaque étape dépend largement des conditions environnementales dont la température et l'humidité sont les facteurs les plus influents. Le cycle de vie total peut varier de 22 à 55 jours, ce qui aboutit à l'obtention de 2 à 12 générations par an. Pendant le jour, les adultes se cachent sous le feuillage et au début de la nuit leur activité commence avec des vols saccadés pour aboutir à l'accouplement. La fécondité de la femelle est d'environ 200 œufs pendant sa vie. Les œufs sont pondus en plusieurs endroits ; les feuilles, la tige ou les tubercules ; et peuvent être aussi déposés sur un substrat quelconque, comme les sacs de fibre dans lesquels sont stockés les tubercules, une motte de terre ou différents débris. Les œufs éclosent et les larves pénètrent dans les organes végétatifs de la plante (López-Avila, 1996 ; Estrada et Sierra, 1997).

1.2.1.4. Dégâts

En Colombie, avant l'arrivée de la teigne du Guatemala, *T. solanivora, P. operculella* était un des principaux ravageurs de cette culture. La teigne est un ravageur qui, à l'état de larve, occasionne des dégâts sur le feuillage, les tiges, les pétioles et les tubercules. En plein champ, les larves font la première attaque dès la germination du plant. La larve abîme initialement les bourgeons terminaux, en les liants avec des fils de soie, se nourrit des pétioles par forage. La larve peut aussi vivre en forant la tige (Estrada et Sierra 1997).

On observe de fortes infestations en moins de 90 jours. La première attaque se fait sur les feuilles initiales et au point de croissance du tubercule-semence lorsque ces dernières n'ont pas été couvertes proprement. La seconde attaque se produit entre le buttage et la floraison sans conséquence négatives sur le rendement, et la troisième attaque a lieu juste avant la récolte, sur les tubercules exposés, ce qui entraînera l'infestation dans les entrepôts (Ortega et Fernandez 2000).

Lorsque l'infestation se produit sur le feuillage, les dégâts affaiblissent les plantes, ce qui peut entrainer la mort du plant dans les cas extrêmes. Ces attaques causent de toute façon des baisses du rendement de la culture. On a pu montrer qu'il y a une corrélation positive entre la perte du rendement et le niveau des dégâts. Il a été déterminé que lorsque 100% de feuillage est détruit durant l'étape de floraison, la perte du rendement commercial est de 50%, avec 80% de perte de tubercules de première catégorie. Avec des dégâts supérieurs à 25%, la qualité finale des tubercules est affectée (Ortega et Fernandez 2000).

Les dégâts les plus significatifs sont occasionnés sur les tubercules en stockage, ce qui affecte la qualité et le poids des tubercules. Les dégâts sont un rétrécissement des tubercules causé par l'accroissement de la transpiration, et l'infection secondaire par des microorganismes. Les études sur les dégâts potentiels en stockage indiquent qu'une population faible de *P. operculella* (60 larves pour 20 Kg de pomme de terre) peut attaquer 100% des tubercules en seulement 110 jours (Ortega et Fernandez 2000).

1.2.2. La teigne du Guatemala *Tecia solanivora*

1.2.2.1. Introduction

La teigne du Guatemala, *Tecia* (*Scrobipalpopsis*) *solanivora* (Povolny, 1973) est devenue le principal ravageur de la culture de la pomme de terre en Amérique centrale et dans le nord des Andes, au Venezuela, en Colombie et en Equateur. Les caractéristiques biologiques de *T. solanivora* font également de cette espèce un ravageur potentiel pour les productions européennes de pommes de terre (http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Tecia_solanivora/DS_Tecia_solanivora.pdf).

1.2.2.2. Description

T. solanivora a été décrite pour la première fois par Povolny (1973) comme *Scrobipalpopsis solanivora*, à partir de larves collectées au Costa Rica. Comme *P. operculella*, la teigne du Guatemala est considérée comme un micro-lépidoptère. Un dimorphisme sexuel évident est observé, aussi bien en taille qu'en coloration. Le

papillon femelle mesure 12 mm de long et le male environ 10 mm. La tête et le thorax sont marrons (mâle) et gris brunâtre (femelle). Les ailes antérieures sont de couleur marron sombre (mâle) et marron clair (femelle) avec une trame de trois macules longitudinales brillantes, plus marquée chez les femelles. Les ailes postérieures sont gris clair chez les males et les femelles avec des franges marginales grises à noires (OEPP/EPPO 2005).

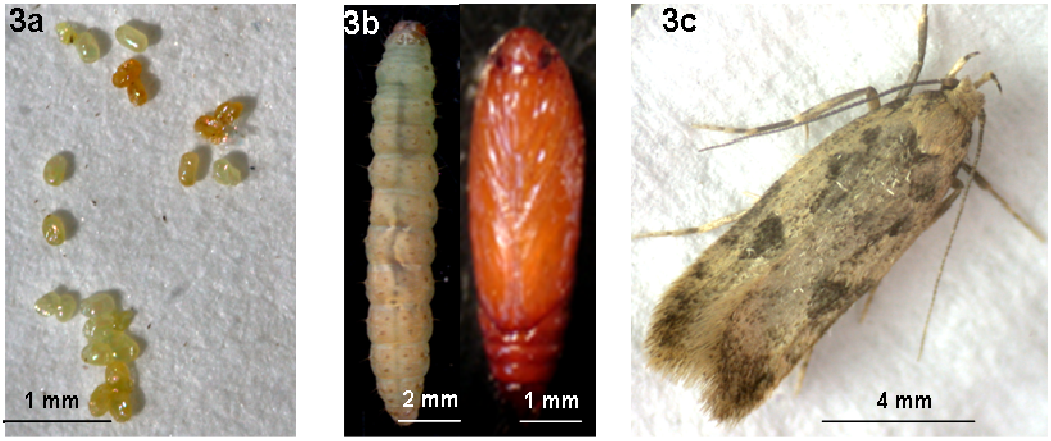

Figure 2. Développement de la teigne du Guatemala *T. solanivora*. 3a: œufs, 3b : larve (stade 4) et pupe, 3c : Adulte. Photo : C. Espinel.

Les œufs, de forme ovale, mesurent 0,46 à 0,6 mm de long et 0,39 à 0,43 de large. Ils sont de coloration blanche perlée au moment de l'oviposition, et virent au blanc mat jusqu'à brun au moment de l'éclosion (López-Ávila et Espitia 2000).

T. solanivora passe par quatre stades larvaires (Espinel *et al.* 2009a). La larve de premier stade mesurant 1,2 à 1,4 mm est très claire avec la tête et le prothorax marron. Au 4ème stade, la larve mesure 12,4 à 14,2 mm de long. Sa couleur générale est rouge écarlate dans la région dorsale, s'atténuant au rose pâle latéralement. Lorsque la larve se change en pupe, la coloration devient verte pour finir en brun-rouge. La pupe femelle mesure environ 8,52 mm de long et la pupe mâle 7,83 mm (Sotelo 1997) (Figure 2).

1.2.2.3. Biologie

Le cycle de vie de *T. solanivora* varie en fonction de la température ambiante et peut durer de 55 à 93 jours. Les adultes sont difficiles à observer à cause de leur mimétisme. Pendant le jour, ils restent cachés sous le feuillage ou les mottes de terre et volent

uniquement dans la pénombre aux premières heures du jour ou de la nuit, heures auxquelles ils copulent et posent les œufs sur les tubercules ou à proximité. La fécondité de la femelle est de 180 à 235 œufs environ pendant sa vie et 80% des œufs sont pondus dans les 10 premiers jours. En champ, ils sont pondus en masse sur la base de la tige, ou l'aire de tubérisation, alors qu'en stockage, ils sont pondus directement sur les tubercules (Araque et García 1999).

Figure 3. Dégâts produits par les larves de *T. solanivora* : formation de galeries et pourrissement à cause de l'infection secondaire par des microorganismes. Photo : C. Espinel ; P. Cuartas.

Dans le champ, les larves issues des œufs pondus à la base des tiges pénètrent dans la terre et se déplacent jusqu'à trouver les tubercules. Si la terre est craquelée, suite à des périodes de sécheresse, les adultes peuvent pondre les œufs plus proches des tubercules, facilitant d'autant l'infestation par les larves neonates (Barreto *et al*., 2003b). Les œufs éclosent et les larves pénètrent dans les tubercules à l'intérieur desquels elles se nourrissent. Elles ne se nourrissent pas de la tige ou des feuilles, comme c'est le cas pour *P. operculella*. Les pré-pupes sortent du tubercule et construisent un cocon à l'intérieur duquel se forme la pupe (Sotelo 1997).

La variation de la densité de la population dépend des conditions climatiques parmi lesquelles les précipitations sont la donnée la plus importante. Selon les études réalisées, la densité d'adultes est fonction inverse des précipitations et de l'altitude (Barreto *et al*. 2003a).

1.2.2.4. Dégâts

Les larves peuvent occasionner de gros dégâts aux tubercules, en champ et dans les stockages. On ne connait pas de plante hôte alternative.

Lorsque la larve émerge, elle se dirige vers les tubercules pour se nourrir. Elle forme des galeries à l'intérieur desquelles elle laisse excréments et exuvies. Les dégâts augmentent en fonction de la taille de la larve, finissant par provoquer des infections secondaires par microorganismes (Figure 3).

En champ, l'infestation commence au début de la tubérisation et augmente en fonction de l'augmentation de la taille des tubercules. Les dégâts sont plus importants au bord de la parcelle. Cependant, à mesure que la culture se développe, la population de la teigne augmente et les dégâts sont aussi présents au centre de la parcelle (Galindo et Español 2003).

Les dégâts les plus significatifs sont occasionnés sur les tubercules stockés en entrepôts rustiques à température ambiante durant 60 jours et plus. Dans ce cas, les pertes sont évaluées entre 30 et 86%, et peuvent même atteindre 100% (Sotelo, 1997).

1.2.2.5. La teigne du Guatemala comme espèce envahissante

La première description de *T. solanivora* fût au Costa Rica (Povolny, 1973). Les larves ont été introduites au Costa Rica dans un chargement de semences de pommes de terre provenant du Guatemala en 1970. Niño (2004) décrit des dégâts produits sur des pommes de terre par cet insecte au Guatemala dès 1956. A partir des données et des rapports existants, l'aire d'origine estimée de *T. solanivora* se trouve entre l'isthme de Tehuantepec au Mexique et le nord du Honduras et du Guatemala (Puillandre *et al*. 2007).

Après l'introduction accidentelle au Costa Rica en 1970, cet insecte a été introduit au Panamá en 1973. En même temps, des populations de la teigne ont été détectées au Honduras et au Salvador (Niño 2004). En 1983, *T. solanivora* a été introduite au Venezuela par l'importation de semences de pommes de terre hautement infestées provenant du Costa Rica ; en 1985, elle a été détecté en Colombie, à la frontière nord-est avec le Venezuela ; puis, en 1991, sa présence a été rapportée dans les départements du centre de la Colombie (principaux producteurs de pomme de terre du pays). En 1996

cet insecte est arrivé en Equateur (Puillandre *et al*. 2007). Il n'y a pas pour l'instant de rapport d'invasion au Pérou. En 1999, *T. solanivora* a été trouvée localement aux Îles Canaries en Espagne (Carnero *et al.* 2008) (Figure 4).

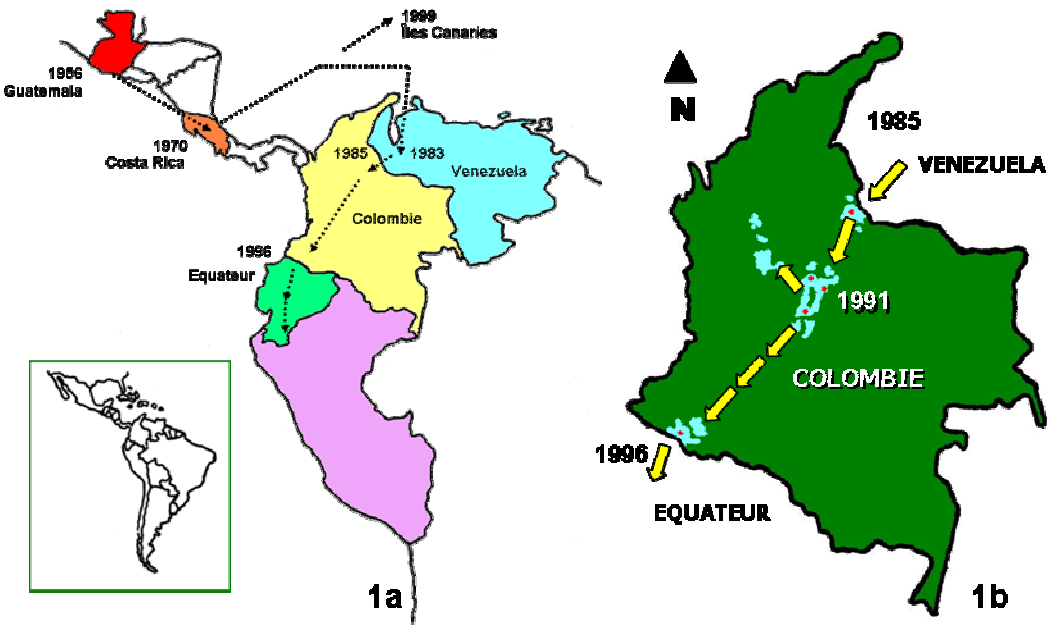

Figure 4. 1a : Route invasive de *T. solanivora* en Amérique. 1b : Invasion de la teigne du Guatemala en Colombie. En bleu, les principales zones productrices de pomme de terre.

En Colombie, *T. solanivora* s'est adaptée aux différentes conditions agricoles et écologiques présentes dans toutes les régions de production de la pomme de terre. Les zones se situent entre 1800 m et 3200 m d'altitude, avec des températures comprises entre 6ºC et 24ºC. Les précipitations se situent entre 500 et 2500 mm avec une humidité relative entre 60% et 100% (Araque et García 1999).

1.3. Méthodes de contrôle des teignes de la pomme de terre Phthorimaea operculella et Tecia solanivora

Plusieurs méthodes sont possibles pour le contrôle des teignes de la pomme de terre. Elles peuvent être classées en fonction des technologies utilisées en approches culturales, éthologiques, chimiques et biologiques. Souvent, un bon contrôle est obtenu par l'association de plusieurs de ces approches, mais ces approches ne sont pas toujours compatibles entre elles.

1.3.1. Contrôle cultural

Ce type de pratique est destiné à détruire les sources d'infestation des ravageurs, en créant des conditions défavorables à leur développement, pour stopper la génération de descendance.

Une des meilleures pratiques pour le contrôle de *T. solanivora* consiste en une plantation profonde en couvrant les semences après une bonne préparation du sol, un buttage haut afin d'avoir une distance suffisante entre la terre et les tubercules pour éviter l'attaque des insectes, et enfin un maintien du sol humide afin d'éviter la formation de fissures qui permettent le refuge des teignes et la ponte des œufs (Corredor et Flórez, 2003)

Un point important est de faire la récolte à temps en séparant les tubercules sains de ceux abîmés et de détruire immédiatement ces derniers afin d'éviter que les tubercules infectés ne soient la source d'infestations ultérieures (Ortega et Fernandez 2000).

Il est aussi important de faire un nettoyage et une désinfection systématique de l'entrepôt prévu pour le stockage et d'opérer une surveillance soigneuse durant la durée d'entreposage pour éviter tout développement des insectes. Le vol d'adultes dans l'entrepôt est un critère d'alerte. L'utilisation de trappes à phéromones est préconisée dans ces conditions.

Une autre pratique culturale est l'alternance de cultures pour éviter la production continue de générations de teignes pendant l'année. Par exemple, en Colombie, la culture de la pomme de terre s'effectue en alternance avec des cultures de maïs, de légumes ou d'herbe de pâturage. Dans le cas de *T. solanivora*, la seule plante hôte connue est la pomme de terre (OEPP/EPPO, 2005), tandis que pour *P. operculella,* 60 autres plantes hôtes existent, tant sauvages que cultivées, la plupart appartenant aux Solanacées (Das and Raman, 1994).

1.3.2. Contrôle éthologique

Des pièges contenant la phéromone sexuelle synthétique de la femelle sont utilisés

pour capturer les adultes. Ils se placent autour et à l'intérieur de la culture. Généralement les agriculteurs les utilisent aussi pour surveiller le taux de teignes et ainsi obtenir les informations nécessaires pour prendre des décisions de contrôle comme l'usage des insecticides (Niño 2004).

Une variante aux pièges à phéromone est l'interruption de la copulation des adultes. Elle consiste en l'introduction de multiples émetteurs d'une phéromone à de hautes concentrations dans l'intention de saturer l'air et de confondre les mâles (confusion sexuelle). En Colombie, des essais ont été faits pour évaluer cette technique pour le contrôle de la population de *T. solanivora* en champ et en stockage, avec des résultats prometteurs (Bosa *et al.* 2005).

1.3.3. Lutte chimique

La lutte chimique a été employée par pulvérisations du feuillage et du sol, et par pulvérisations ou fumigations des tubercules pendant leur stockage. Il n'existe pas d'insecticides chimiques spécifiques pour les teignes de la pomme de terre. En Colombie, différentes molécules actives ont été utilisées, mais la majorité avec un bas niveau de contrôle. Après évaluations en champ,[2] il ne reste que 4 insecticides utilisés avec un relatif succès, mais présentant des résultats variables. Les plus utilisés sont à base de Pyrethroides, Acéphate, Chlorpyrifos et Profenofos, avec des caractéristiques toxicologiques allant de modérément à extrêmement toxique. L'utilisation de ces insecticides peut occasionner des problèmes environnementaux pour la faune utile, l'eau, le sol, et pour la santé humaine due aux effets cancérogènes de ces insecticides chimiques. Leur utilisation dans le long terme peut aussi conduire à la sélection de populations d'insectes résistants (phénomène souvent appelé « apparition » ou « développement » de résistances) impliquant l'utilisation de doses de plus en plus élevées (Arévalo et Castro 2003).

1.3.4. Lutte biologique

Le contrôle biologique est un des principaux moyens de lutte intégrée. *P. operculella* est attaquée par différentes espèces de parasitoïdes, appartenant à quatre familles, Braconidae (11 espèces), Ichneumonidae (4 espèces), Encyrtidae (3 espèces) et

Trichogrammatidae (1 espèce). La présence de cette diversité (19 espèces au total) dans l'aire andine est cohérente avec une origine de *P. operculella* dans les Andes (Ortega et Fernández 2000). Dans le cas de *T. solanivora*, les travaux de Rubio et collaborateurs (Rubio *et al.* 2004) décrivent l'utilisation de la guêpe *Thrichogramma lopezandinensis* (Hymenoptera : Trichogrammatidae) en condition de stockage avec un relatif succès, bien que cet insecte ne soit pas un parasitoïde originel de *T. solanivora.* De la même manière, il existe des études du contrôle biologique de *T. solanivora* avec les nématodes *Steinernema feltiae* (Filipjev, 1934) Wouts, Mracek, Gerdin & Bedding, 1982 (Rhabditida: Steinernematidae), et *Heterorhabditis* spp. (Rhabditida: Heterorhabditidae). On a pu obtenir des mortalités de 50 à 100% après 24 heures d'exposition à *S. feltiae* et il a été démontré que les deux nématodes peuvent compléter leur cycle de vie dans l'hôte (Xuejuan *et al.* 2000 ; Saenz 2003).

Une autre méthode de contrôle biologique est l'utilisation de micro-organismes entomopathogènes, la bactérie *Bacillus thuringiensis* et le virus de la granulose ou granulovirus (*Baculovirus*) (Ortega et Fernández 2000).

Dans le cas de *B. thuringiensis*, l'efficacité des formulations commerciales sur *P. operculella* en tubercules en conservation a été démontrée, même-si leur coût et leur faible stabilité en font une alternative peu intéressante pour une utilisation à grande échelle (Ortega et Fernández 2000). L'utilisation des baculovirus, et notamment des granulovirus en lutte biologique contre les teignes de la pomme de terre, a été considérée par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), comme une des alternatives prometteuses pour leur contrôle (CIP 1992).

1.4. Les baculovirus dans la lutte biologique

Parmi les agents infectieux s'attaquant aux invertébrés, les virus constituent un groupe important, tant en nombre d'espèces attaquées, qu'en diversité de familles virales. Plus de 1 100 virus pathogènes d'invertébrés ont été décrits à ce jour. Parmi les infections produites par des virus s'attaquant aux arthropodes (insectes, crustacés et arachnides),

celles à baculovirus sont les plus étudiées. L'intérêt des baculovirus est multiple. Ils produisent des infections létales chez des insectes de grande importance économique, qu'il s'agisse d'insectes utiles (comme le ver à soie, *Bombyx mori*) ou de ravageurs des cultures (Moscardi, 1999 ; Caballero *et al.*, 2001). De plus, leur utilisation en biotechnologie comme vecteur d'expression de protéines recombinantes a révélé leur intérêt hors du champ agronomique (Kost *et al.*, 2005 ; Condreay et Kost, 2007).

1.4.1. Généralités

L'industrie de la soie a eu une grande importance en Europe, depuis le développement de l'industrie de la soie en Italie vers le XII siècle, et sa diffusion vers la France. L'importance de cette industrie a conduit à une observation approfondie des conditions de l'élevage du ver à soie, *Bombyx mori*, ainsi que des maladies et parasites associés. C'est ainsi que la première description d'une maladie à baculovirus vient des éleveurs du vers à soie. Dans son livre De Bombyce, M. J. Vida (1523) décrit en vers en latin les symptômes d'une infection à baculovirus, et il établit une hypothèse sur l'origine infectieuse de cette maladie, la flacherie du ver à soie.

Des pullulations cycliques peuvent être observées chez plusieurs insectes nuisibles, par exemple chez *Lymantria dispar* (le bombyx disparate), chez *Lymantria monarcha*, ou chez l'hymernoptère *Gilpina hercynae* (la mouche à scie européenne de l'épinette, european spruce sawfly). La diminution rapide de la population d'insectes est fréquemment associée à une mortalité massive dans les stades larvaires (épizootie), conséquence du développement de maladies à baculovirus. L'idée de mimer ces processus naturels dans la protection des cultures n'est pas nouvelle. L'utilisation des Baculovirus pour le contrôle d'insectes a été dirigée majoritairement contre les Lépidoptères, bien qu'il y ait d'autres exemples de succès contre des Hyménoptères en forêts (notamment *Neodiprion sertifer* et *Neodiprion lecontei*). Les premiers essais pour contrôler des insectes à l'aide des Baculovirus ont eu lieu en 1892, avec l'application d'un nucléopolyédrovirus (NPV) pour le controle de *Lymantria monacha* (Lepidoptera : Lymantridae) dans une forêt de pins en Allemagne (Gehren, 1892), et en 1913, avec le NPV du bombyx disparate *L. dispar* (Lepidoptera : Lymantridae) (Moscardi 1999).

1.4.2. Classification et structure des Baculovirus

La taxinomie des baculovirus évolue rapidement. Nous suivrons ici la dernière proposition du Comité International de Taxinomie des Virus (ICTV). Les informations sur la structure et le déroulement du cycle des baculovirus peuvent se trouver facilement. Le livre de G. Rohrmann « Baculovirus Molecular Biology » de 2008 donne une vision assez complète et actualisée. Il est librement accessible sur http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir.

1.4.2. Classification et structure des Baculovirus

La taxinomie des baculovirus évolue rapidement. Nous suivrons ici la dernière proposition du Comité International de Taxinomie des Virus (ICTV). Les informations sur la structure et le déroulement du cycle des baculovirus peuvent se trouver facilement. Le livre de G. Rohrmann « Baculovirus Molecular Biology » de 2008 donne une vision assez complète et actualisée. Il est librement accessible sur http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir.

Historiquement, le critère majeur pour établir la classification de la famille des Baculoviridae a été la morphologie du corps d'inclusion (CI) (ou OB=occlusion body). Tous les virus regroupés dans la famille des Baculoviridae possèdent des OB. Il s'agit des formes de résistance permettant le passage du virus d'un insecte à un autre, avec un séjour plus ou moins long dans l'environnement extérieur. Jusqu'à récemment, la famille Baculoviridae se divisait en deux genres : les *nucléopolyédrovirus* (NPV) dont le corps d'inclusion de 1 à 5 µm (polyèdres) inclut plusieurs virions et les *granulovirus* (GV) dont le corps d'inclusion (granule) inclut généralement un seul virion est de forme ovoïde de 450 par 250 nm et de taille moyenne (Caballero *et al.* 2001) (Figure 5). Cette classification a été modifiée à partir de 2009, suite à des analyses de comparaison des génomes (http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009). La nouvelle classification inclut quatre genres dans la famille des *Baculoviridae*, *Alphabaculovirus*, incluant les NPV de lépidoptères, *Betabaculovirus*, équivalent à l'ancien genre *Granulovirus*, *Gammabaculovirus*, qui regroupe les baculovirus des hyménoptères, et *Deltabaculovirus*, qui inclut le seul virus de diptère connu, le *Culex nigripalpus*

nucleopolyhedrovirus. (Jehle *et al.*, 2006 ; van Oers et Vlak, 2007). Les *Alphabaculovirus*, *Gammabaculovirus* et *Deltabaculovirus* produisent des corps d'inclusion de type « Polyèdre », et les *Betabaculovirus* de type « Granule ».

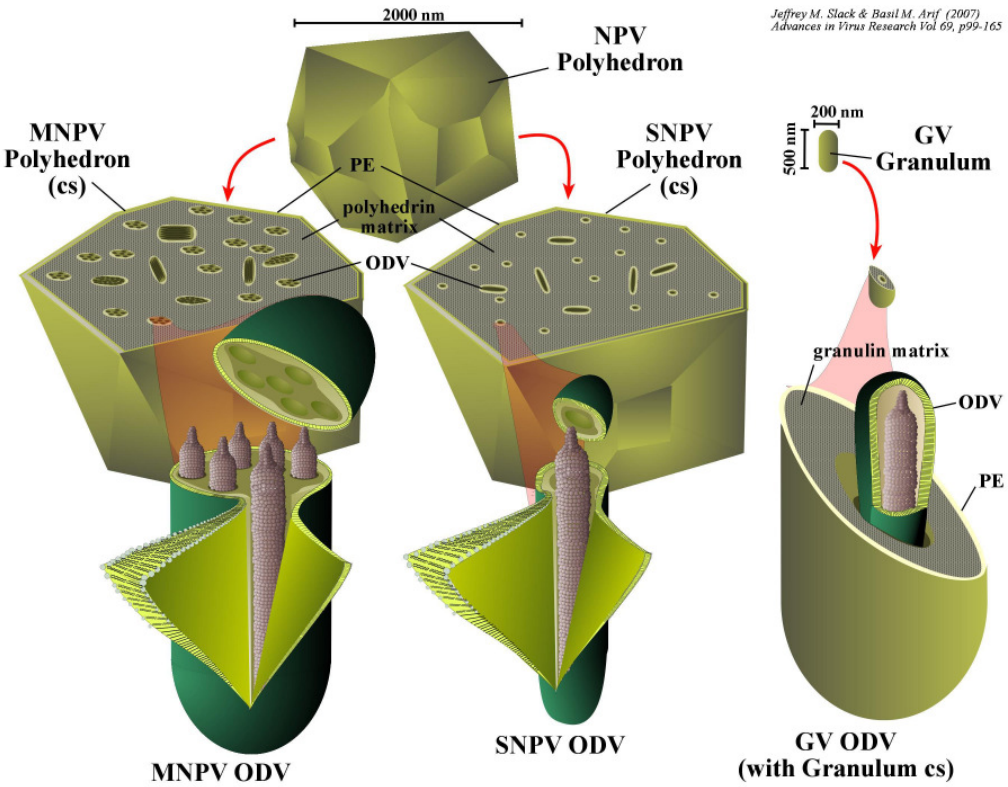

Figure 5. Morphologie des baculovirus. NPV à enveloppement multiple (MNPV), NPV à enveloppement simple (SNPV), et granulovirus (GV).

Un polyèdre peut contenir plusieurs virions (appelés virions dérivés du corps d'inclusion, ou « occlusion derived virus », ODV). Chez les *Alphabaculovirus*, les ODV peuvent contenir une ou plusieurs nucleocapsides. Ce caractère n'est pas considéré comme un critère taxinomique, mais est reflété dans le nom des virus (simple NPV ou Multiple NPV). Les OB des granulovirus (GV) ne contiennent qu'un seul virion, qui ne contient qu'une seule nucleocapside (Figure 5). Ces différences phénotypiques conditionnent certaines caractéristiques de la transmission des virus.

Les baculovirus sont des virus à ADN double brin circulaire dont la taille est comprise entre 90 et 180 Kb selon les espèces. Le génome viral est condensé grâce à la protéine P6.9, ou protéine basique (riche en arginine). Ce matériel est enfermé dans une *nucleocapside*, dont le composant principal est la protéine VP39. La nucleocapside a une

structure de symétrie hélicoïdale qui confère au baculovirus une forme de bâtonnet caractéristique, avec un diamètre entre 30 et 60 nm et une longueur entre 250 et 300 nm, qui varie en fonction de la taille du génome des différents virus (Caballero *et al.* 2001 ; López-Ferber et Devauchelle 2005).

La nucleocapside cylindrique est enveloppée pour former le virion. Une particularité des baculovirus est l'existence de deux types de virions pendant le cycle viral qui jouent des rôles différents dans l'infection. Les ODV ont été décrits plus haut. Ces virions sont protégés dans le corps d'inclusion, et ne peuvent être libérés que dans les conditions alcalines du tube digestif de l'insecte. Par conséquent, ces structures ne permettent pas l'infection d'une cellule aux cellules voisines à l'intérieur de l'organisme. La deuxième forme virale a ce rôle de colonisation des cellules à l'intérieur de l'individu. Cette forme virale n'est pas protégée, mais libre. Elle est produite par bourgeonnement de la membrane cytoplasmique dans la cellule infectée, d'où son nom, *virion bourgeonnant* (budded virion, BV). (Caballero *et al.* 2001 ; López-Ferber et Devauchelle 2005) (Figure 6).

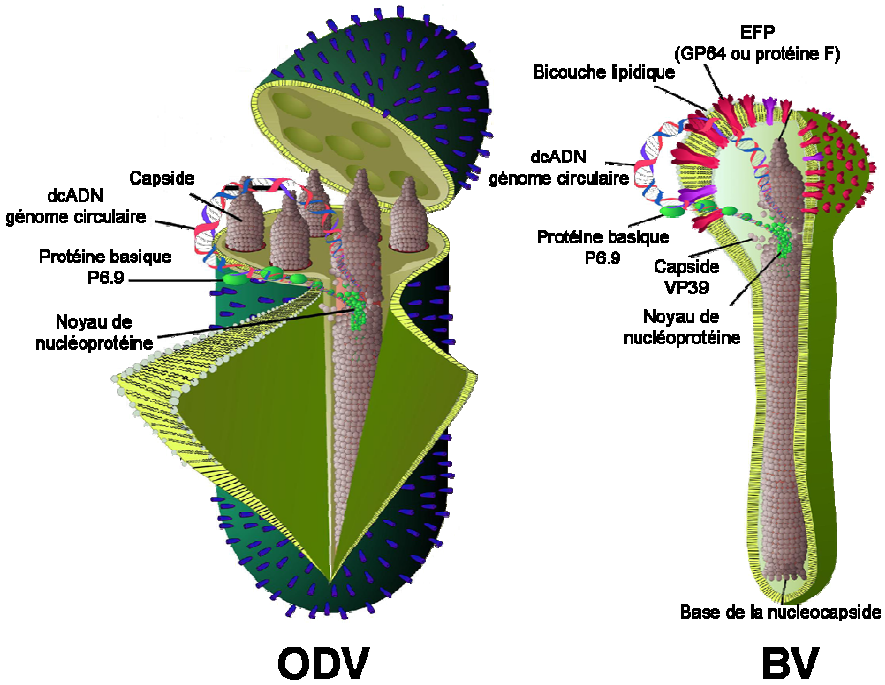

Figure 6. Structure des virions : ODV, la forme incluse du virus et BV, le virus bourgeonnant. Adapté de Slack et Arif (2007).

Les deux formes virales sont produites dans toutes les cellules infectées de façon séquentielle. Premièrement les BV, pour envahir l'insecte hôte, puis, les OB, pour garantir la transmission entre individus.

BV et ODV contiennent le même génome mais diffèrent dans leur structure et composition en lipides, acides gras et protéines (Braunagel et Summers, 1994). Les BV ne contiennent qu'une nucleocapside par virion, ce qui n'est pas toujours le cas pour les ODV. L'origine de l'enveloppe est différente en fonction du type viral. La membrane des ODV est formée à partir de la membrane nucléaire de la cellule hôte. Pour le BV, il s'agit d'une membrane cytoplasmique modifiée par ajout de certaines protéines codées par le virus, responsables notamment de la pénétration dans les cellules.

L'enveloppe des ODV contient des protéines uniques, notamment celles responsables de l'entrée dans les cellules intestinales. Ces protéines ont été collectivement appelés PIF (« per os infectivity factors »). La mieux caractérisée est P74 (ou PIF-0) (Kuzio *et al*., 1989; Slack *et al*., 2010). L'entrée des virions dans les cellules intestinales se fait par fusion directe de la membrane de l'enveloppe virale et la membrane cytoplasmique au niveau des microvillosités intestinales de la bordure en brosse. Cette fusion a lieu dans un environnement basique. Jusqu'à présent, 4 gènes viraux ont été décrits comme *pif*. Ces gènes sont conservés dans tous les baculovirus, ce qui rend ce mécanisme distinctif de la famille *Baculoviridae* (cf. 4.3) (Caballero *et al.* 2001).

La pénétration des BV dans les cellules se fait via la fusion des membranes virales et cellulaires en milieu acide, dans des vésicules de pinocytose. La protéine F (enveloppe fusion protein) est le produit d'un gène conservé chez tous les baculovirus, responsable de cette fusion. Dans certains *Alphabaculovirus*, un gène codant pour une deuxième protéine, beaucoup plus active, est présent. Il s'agit de la protéine GP64. Le gène *gp64* permet de séparer les *Alphabaculovirus* en deux groupes, le groupe 1, possédant le gène, et le groupe II, ne le possédant pas (Herniou *et al*., 2003). La concentration des protéines de fusion dans la partie apicale du BV donne origine à des structures clairement visibles en microscopie électronique, les peplomères, sortes de spicules

(Gutiérrez et López-Ferber 2004).

1.4.3. Pathologie de l'infection

Le cycle d'infection commence lorsque les larves de l'insecte ingèrent les OB présents dans leur alimentation (feuilles, fruits, …), puis se poursuit avec la dispersion à l'intérieur de l'insecte et se termine avec la libération des nouveaux CI qui contiennent les particules infectieuses. Le processus peut se diviser en deux étapes principales en fonction du type cellulaire infecté et de la forme virale qui infecte, infection primaire, et infection secondaire. En fonction de la séquence d'expression des gènes viraux dans la cellule infectée, on distingue quatre phases, très précoce, précoce, tardive et très tardive (ou α, β, γ, et δ, respectivement).

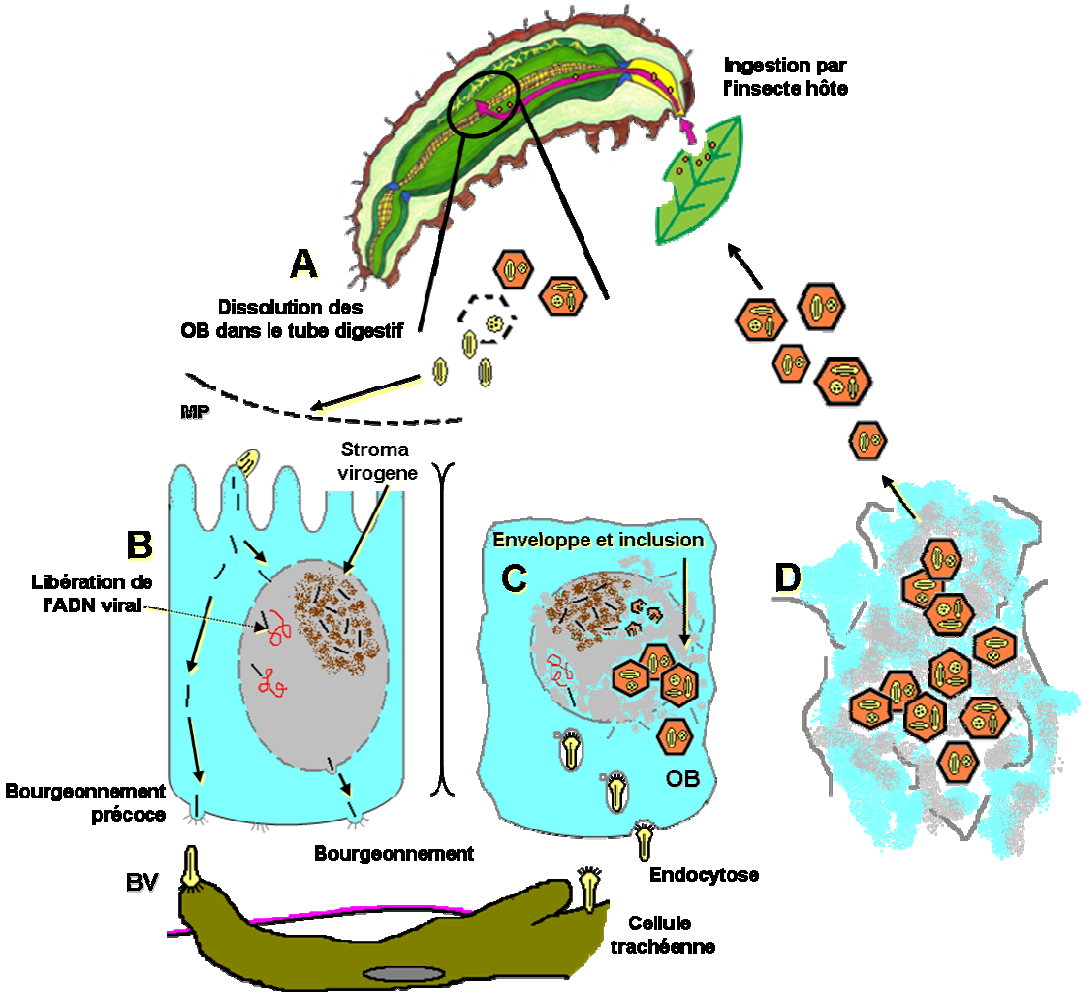

Figure 7. Cycle de réplication des baculovirus. MP : membrane péritrophique. BV : virion bourgeonnant (budded virion). OB : occlusion bodies.

Infection primaire : Une fois ingérés, les OB se dissolvent très vite dans l'intestin moyen des larves en raison d'un pH fortement basique (pH>10) et les virions (ODV) et les protéines constituant les OB sont ainsi libérés (Sciocco de Cap 2001) (Figure 7A). La première barrière à franchir pour atteindre les cellules épithéliales est la membrane péritrophique, composée de chitine et de mucines (Wang et Granados 2001). Cette structure est à la fois une protection contre l'abrasion due aux particules ingérées et une barrière contre le passage des agents pathogènes (López-Ferber et Devauchelle 2005). Chez certains baculovirus il a été décrit une protéine nommée *enhancine* (métalloprotéase) qui dégrade la mucine présente dans la membrane péritrophique. Des gènes codant pour ce type de protéine ont été retrouvés dans la plupart des granulovirus et dans certains NPV notamment ceux de *Lymantria dispar* et *Mamestra configurata* (Lepidoptera : Noctuidae) (Li *et al* 2003). D'autres gènes, sans homologie de séquence avec ceux déjà décrits, peuvent se trouver dans les génomes des baculovirus.

- Après avoir traversé la membrane péritrophique, les ODV se fixent aux microvillosités des cellules cylindriques de l'épithélium de l'intestin moyen et les nucléocapsides entrent ensuite dans le cytoplasme par une fusion directe de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire (Horton et Burand 1993) (Figure 7B). Les protéines appelées PIF décrites jusqu'à présent sont la P74 (PIF-0), PIF-1 , PIF-2, PIF-3 et PIF 4. Les quatre premières ont bien été localisées dans l'enveloppe des ODVs (Kikhno *et al.* 2002 ; van Oers et Vlak 2007).PIF-1, PIF-2 et PIF-3 forment des complexes très stables dispersés à la surface de l'ODV. PIF-0 s'associe à ces complexes, de façon moins stable (Peng *et al.*, 2010). Après fusion avec la membrane cellulaire des microvillosités, la nucléocapside atteint le noyau dans un intervalle de temps court, temps nécessaire à l'induction de la formation de câbles d'actine qui se dirigent souvent vers le noyau (Charlton et Volkman 1993), grâce à l'action de deux protéines de la nucléocapside (P39 et P78/83) qui fixent l'actine.

Les travaux de Washburn *et al.* (2003) montrent que, dans les MNPV, une partie des nucléocapsides migrerait directement vers la région basale de la cellule, sans passer par le noyau, tandis que les autres migreraient vers le noyau où la réplication virale a lieu (Figure 7B). Parmi les premières protéines virales produites dans le noyau on trouve les glycoprotéines de fusion responsables du pouvoir infectieux des BV. Les protéines migrent vers la membrane cellulaire pour permettre la formation de nouveaux BV à partir des nucleocapsides ayant traversé la cellule sans réplication. Ce mécanisme permet ainsi le démarrage rapide des infections secondaires, avant la fin de la réplication virale de l'infection primaire. Les BV ainsi générés peuvent être considérés comme des virions pseudotypés, car les protéines présentes dans leur enveloppe n'ont pas été codifiées par leur génome. Ce processus confère un avantage sélectif du au renouvellement très rapide des cellules de la bordure en brosse du tube digestif de la larve. Ces cellules, soumises à des niveaux d'activité métabolique importants, et à des fortes agressions physiques (abrasion par le déplacement du bol alimentaire) se renouvellent rapidement par desquamation. Le virus a donc un temps limité pour dépasser le stade de l'infection primaire.

Pour que ce processus puisse avoir lieu il faut qu'une cellule intestinale puisse recevoir plus d'une nucleocapside. Chez les MNPV, la présence de plusieurs nucleocapsides dans un même virion garantit cette multiplicité.

Infection secondaire : Il existe certains points d'interrogation sur la voie principale de dissémination de l'infection dans l'hémocoele de la larve. Certains auteurs pensent que des BV pourraient passer directement dans l'hémolymphe. Or, la lame basale qui enveloppe l'intestin, formé de fibres de chitine a des pores trop petits pour le passage des BV. Par contre, les cellules trachéennes traversent cette lame pour oxygéner l'intestin. La propagation des BV vers les différents tissus pourrait se faire par l'intermédiaire de ce système (Engelhard *et al.* 1994) (Figure 7B). Pratiquement tous les tissus de la larve sont infectés, notamment les hémocytes, et les niveaux d'infection les plus importants se trouvent dans les cellules des corps gras.

La réplication du génome viral se fait dans le noyau des cellules. Lorsque les nucléocapsides (provenant des BV ou des ODV) arrivent au niveau des pores nucléaires, l'ADN viral est libéré et l'expression des gènes commence, structurée en quatre phases (Durantel *et al.* 1998) : une phase très précoce, une phase précoce, une phase tardive et une phase très tardive. Le déroulement chez le mieux étudié des baculovirus, *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, en cultures cellulaires est le suivant.

- Dans la phase très précoce, (0 à 15 min après infection) des gènes viraux impliqués dans le contrôle des activités de la cellule sont exprimés. Il s'agit de transactivateurs viraux, dont les promoteurs sont de type cellulaire, et donc reconnus par l'ARN polymerase II cellulaire. Leur rôle est de dévier la reconnaissance des promoteurs cellulaires vers celle des promoteurs viraux.

- Dans la phase précoce (15 min à 8 heures après infection) sont synthétisées les protéines virales nécessaires à la formation des BV (EFP, gp64, protéine F), la plupart des protéines inhibitrices de réactions cellulaires et de l'organisme (inhibiteurs d'apoptose, inhibiteurs de la mue de la larve, …) ainsi que les protéines nécessaires à la régulation du cycle viral, et notamment à l'expression des gènes tardifs. En effet, les gènes tardifs et très tardifs sont sous le contrôle de promoteurs non reconnus par l'ARN polymérase II de la cellule, et une polymérase virale est synthétisée. A la fin de cette phase a lieu la réplication du génome viral.

- Dans la phase tardive (8 à 20 heures après infection) les protéines entrant dans la structure des nucleocapsides et des BV sont exprimées. Dans le stroma virogène, visible dans le noyau des cellules, les nucléocapsides s'assemblent. Les nucléocapsides nouvellement formées sont exportées en dehors du noyau vers la membrane basale pour former des BV et commencer l'infection secondaire.

- Environ 20 heures après l'infection, le stroma virogène se condense et l'infection évolue vers la production des OB. Les nucléocapsides arrêtent leur migration vers la membrane cytoplasmique, et restent dans le noyau. L'inclusion des virions dans leur enveloppe protéique de granuline ou de polyédrine, démarre environ 24 heures après l'infection (Slack et Arif, 2007) (Figure 7C). A la fin de l'infection (48 à 72 heures après l'infection), les cellules se désintègrent, libérant les OB dans le milieu (dans la cavité interne s'il s'agit d'une larve) et une liquéfaction de tous les tissus se produit (Figure 7D). Dans le cas des granulovirus, les larves prennent une coloration blanchâtre sur tout le corps (Figure 8) (Sciocco de Cap 2001). Le tégument larvaire est détruit grâce aux chitinases et catepsines codées par les virus, et les corps d'inclusion sont répandus dans l'environnement, permettant le démarrage d'un nouveau cycle (López-Ferber et Devauchelle 2005).

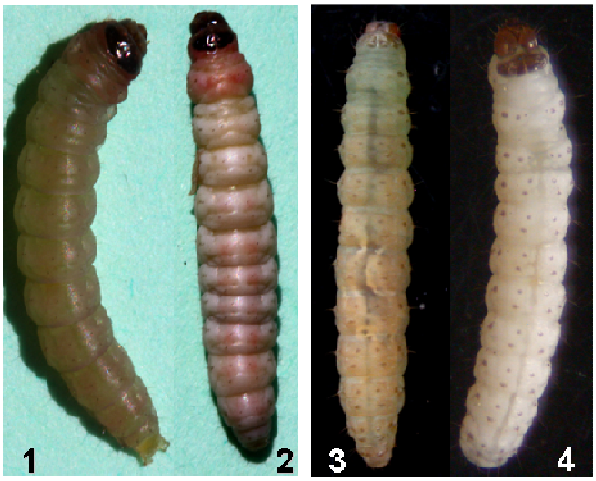

Figure 8. Signes de l'infection du PhopGV sur les larves des teignes de la pomme de terre : *P. operculella* (1 : Larve saine, 2 : Larve infectée) (Photo : X. Léry) et *T. solanivora* (3 : Larve saine, 4 : Larve infectée) (Photo : C. Espinel).

Durant le processus d'infection, des changements métaboliques se produisent chez les larves infectées : un délai dans le développement de la larve (du à l'inhibition de la mue), l'augmentation du poids, l'augmentation de la durée des stades larvaires et l'inhibition de l'ecdysis (Sciocco de Cap 2001). De plus, des changements du comportement de la larve sont clairement perceptibles. Chez les insectes foreurs, en fin d'infection les larves sortent à l'air. Chez *L. monarcha*, les larves montent au sommet des arbres (au lieu de descendre pour faire leur chrysalide), et explosent dans les branches supérieures dans une position caractéristique, qui permet la dispersion des

OB dans les branches subjacentes. Ce comportement a donné le nom de la maladie en allemand, le « wipfelkranheit ».

Il existe des différences dans les processus d'infection de NPVs et GVs. Chez les NPVs, la réplication se produit dans le noyau en formant au centre le stroma virogène (une structure dense similaire à la chromatine), puis il y a formation des BVs et plus tard, des ODVs, toujours dans le noyau, dont la membrane reste visible. Chez les GVs, la réplication commence dans le noyau, mais le stroma se concentre à sa périphérie, immédiatement après, la membrane nucléaire se désintègre et un mélange entre le nucléoplasme et le cytoplasme s'opère. La réplication continue dans l'ensemble de la cellule (Sciocco de Cap 2001).

D'après Federici (1997), trois types de GV ont été décrits en fonction du tropisme d'infection que présentent les tissus infectés:

- Le type I, est représenté par le *Trichoplusia ni* GV (TnGV), ainsi que d'autres granulovirus qui infectent des lépidoptères Noctuidés. Il envahit l'intestin moyen transitoirement et reste dans le corps gras. Il n'y a pas de rupture du tégument larvaire et le virus tue son hôte entre 10 et 35 jours.

- Le type II, représenté par *Cydia pomonella* GV (CpGV) est caractérisé par une infection généralisée et des caractéristiques pathologiques similaires à celles produites par les NPVs chez les lépidoptères. Les tissus les plus affectés sont le corps gras, les trachées et l'épiderme. Le type II tue son hôte entre 5 et 6 jours et produit la liquéfaction et la rupture de tégument.

- Le type III, représenté par le seul *Harrisinia brillians* GV (HbGV) infectant la famille des Zygaenidae, produit des infections limitées à l'intestin moyen aussi bien chez la larve que chez l'adulte. La mort de l'insecte se produit entre 4 et 7 jours.

1.4.4. Composition génétique des populations virales

La présence de bandes inframolaires dans les gels après digestion du génome par des endonucleases de restriction chez les souches sauvages des baculovirus, indiquant une hétérogénéité génétique dans les populations virales, a été constatée depuis longtemps, que cela soit chez les NPV (Harvey et Volkman 1983), ou chez les GV (Crook *et al.*, 1985), chez les derniers avec une plus faible étendue. Néanmoins les études récentes confirment que l'existence d'une variabilité génétique est généralisée, qu'il s'agisse de populations d'une même espèce virale de GVs isolées chez des insectes différents (isolats géographiques ou temporels), ou chez un même insecte (Léry *et al.* 1998; Rezapanah *et al.* 2008 ; Eberle *et al.* 2009 ; Erlandson 2009).

La variabilité génétique parmi les espèces de baculovirus est fréquemment observée sur des virus isolés à partir de populations d'insectes géographiquement ou temporellement distantes, mais on peut aussi l'observer entre des insectes collectés en même temps et sur une même localisation (van Oers et Vlak 2007). Les études sur le baculovirus de *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae), OpbrNPV, dans les îles Orkney (Grande Bretagne) ont montré une grande variabilité génétique (26 génotypes dans 200 cadavres analysés provenant de 11 sites géographiques). Cependant, un seul génotype était présent dans chaque individu dans la majorité des échantillons (Graham *et al.*, 2004). En contraste, chez le baculovirus de *Panolis flamea*, PaflNPV, jusqu'à 24 génotypes ont été isolés d'une seule larve infectée (Cory *et al.*, 2005).

Cette variabilité est attendue pour les populations virales en raison des périodes entre chaque génération très courtes qui produisent une progénie très importante à chaque cycle de réplication ou passage [1 seul génome entrant dans une larve d'insecte conduit à 10^{10} génomes en sortie ; 5×10^{7} polyèdres (Simón *et al.*, 2008) ou $4\text{-}5\times10^{9}$ (Zeddam *et* al., 1999) granules, en moyenne]. En raison du nombre élevé de ces réplications au cours d'un cycle d'infection, les possibilités de l'occurrence de mutations sont nombreuses, même si le génome des baculovirus, à ADN, est aussi stable que celui des cellules hôte. Une autre source de variabilité est la recombinaison, conduisant à des délétions, des

inversions, des duplications et/ou à l'acquisition de l'ADN de l'hôte ou d'organismes internes (Muñoz et Caballero 2001). Les baculovirus ont montré une grande capacité de recombinaison. Ainsi, Croizier and Ribeiro (1992) ont montré que l'infection d'une culture cellulaire avec un mélange de virus génétiquement marqués conduisait à l'apparition de presque toutes les combinaisons possibles en un seul cycle de réplication cellulaire. Des résultats similaires ont été obtenus *in vivo*. Ce processus de recombinaisons semble lié au mécanisme de réplication de l'ADN circulaire du virus, faisant intervenir des helicases et endonucléases (Kamita *et al*., 2003).

De nombreuses études expérimentales mettent en évidence des échanges génétiques entre les génomes des baculovirus par recombinaison d'homologue lorsque deux variants d'espèces de baculovirus ou deux espèces de baculovirus étroitement liées co-infectent un hôte commun *in vivo* ou *in vitro* (Erlandson 2009). Il en est de même en ce qui concerne les échanges avec le génome de l'hôte, et peut être avec ceux d'autres parasites présents sur le même hôte. La présence d'éléments génétiques mobiles (transposons) a été confirmée chez les baculovirus (Jehle *et al*., 1998). Ces éléments mobiles peuvent transporter des informations génétiques entre deux génomes, celui de la cellule hôte et celui du virus, entre deux virus, ou au sein du même génome viral, lors de leur transposition, conduisant à des insertions ou duplications.

Le différent niveau de variabilité génétique entre les NPV et les GV peut être en relation avec le mode de transmission entre individus. Le démarrage de l'infection dans une larve demande en général un nombre limité, voire un seul OB ; la présence de plusieurs virions dans le même OB, et l'encapsidation multiple, dans le cas des MNPVs, permettent l'infection de chaque larve par un échantillon de génotypes présent dans la population d'origine. Cette stratégie facilite la variabilité à l'intérieur de la larve, et par conséquent, les échanges entre génomes viraux par recombinaison. Par contre, chez les GV, la règle est que chaque génome est isolé dans un granule. Quelques exceptions à cette règle ont été décrites (Falcon et Hess 1985 ; Vargas-Osuna *et al.* 1994) ; leur importance dans le processus de génération et maintien de la diversité génétique reste à évaluer. La variabilité disponible serait nécessairement moindre, et les échanges possibles entre génomes seraient réduits, surtout hors des périodes de

pandémie, ou la densité des OB dans l'environnement est faible, et les probabilités pour une larve de rencontrer plusieurs OB sont réduites.

Du point de vue des populations virales, deux structurations extrêmes sont possibles, une structuration dans laquelle chaque génotype se trouve isolé dans un hôte, et développe une lignée de descendants ; et une distribution en population mixte, dans laquelle les génotypes se mélangent en continu à chaque génération, en générant en continu de nouveaux variants, qui se retrouvent éventuellement en compétition au sein de chaque larve. Ces deux types extrêmes, avec toutes les possibilités intermédiaires, conduisent à des stratégies d'évolution virale différentes. (Domingo *et al.*, 1998).

Comme les OB sont produits à l'intérieur de la cellule, pour qu'il puisse y avoir un brassage des génomes viraux il est nécessaire que plusieurs génotypes puissent rentrer dans la même cellule. Cette infection multiple avait été soupçonnée, car des phénomènes de sauvetage avaient été décrits : un génotype génétiquement modifié défectif dans le gène de la polyhédrine pouvait se transmettre par voie orale, ce qui implique son intégration dans des OB dans des conditions de laboratoire, c'est-à-dire, avec des multiplicités d'infection élevées (Hamblin *et al.*, 1990). Dans les conditions naturelles, deux sortes de multiplicité d'infection (multiplicity of infection, MOI) doivent être distinguées, celle au niveau de la larve, - c'est-à-dire, combien d'OB, ou plus précisément, combien de virions et de génotypes sont à l'origine de l'infection dans l'individu ?, et celle au niveau de chaque cellule –combien de BV ou combien de génotype infectent, en moyenne, chaque cellule de l'insecte ?-. C'est seulement si ces deux MOI sont supérieures à 1 qu'une variabilité par échange peut être envisagée. Des analyses ont été faites sur larve pour déterminer le nombre moyen de virions entrant dans une cellule. Le travail de Bull, Godfray et O'Reilly (2001) a permis d'établir que la MOI moyenne est de 4,3. Cette multiplicité permet le maintien de génotypes défectifs au cours du temps (Bull, Godfray and O'Reilly, 2003). Récemment il a été possible de démontrer que de fait, les différents génotypes se trouvent dans le même OB, voire dans le même virion (Clavijo *et al.*, 2010), ce qui permet de garantir la variabilité à l'intérieur de chaque larve.

Une fois cette variabilité générée, la question de son maintien doit être posée. S'agit-il de la génération continue des variants au long de chaque cycle de réplication, et d'un échantillonnage extrême (goulot d'étranglement) lors du passage d'un individu à l'autre ? ou au contraire, y a-t-il une structure de la population qui se maintient, et dans ce cas, quelles en sont les raisons ?

Une population d'origine naturelle du *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV) (Escribano *et al*., 1999) a été étudiée *in extenso*. Neuf génotypes, dont certains défectifs, ont été identifiés puis isolés (Simón *et al*., 2004). Des combinaisons de deux ou plusieurs génotypes ont été analysées en ce qui concerne leur efficacité biologique, et les changements des fréquences de chaque génotype au cours des cycles d'infection. La structure génétique de la population se maintient au cours du temps. Lorsque des populations expérimentales ont été faites avec deux génotypes, une coopération entre génotypes a été démontrée : l'ensemble arrivant à infecter l'hôte mieux que chaque génotype séparément (Lopez-Ferber *et al*., 2003). Lors de modification des fréquences de chacun des génotypes, ces fréquences tendent à un seul point d'équilibre, correspondant à leur fréquence dans la population virale d'origine (Simón *et al*., 2006). Dans cet exemple, le maintien d'au moins une partie de la diversité génétique est important pour l'efficacité maximale de cette population.

Dans d'autres cas, l'image n'est pas aussi claire. Chez *Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus*, virus proche de SfMNPV, des variants génétiques ont aussi été détectées, mais leur éventuelle contribution à une augmentation de l'efficacité biologique n'a pas pu être trouvée (Muñoz *et al*., 1998).

1.4.5. Le granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV) : Un virus contre les teignes de la pomme de terre

1.4.5.1. Découverte et isolement

De nombreux granulovirus isolés chez *P. operculella* ont été testés contre ce ravageur dans le monde et en général avec succès. A partir du premier rapport d'infection de larves de *P. operculella* au Sri Lanka (Steinhaus et Marsh 1967), d'autres isolats ont été

trouvés dans différents pays, comme en Australie (1969), en Afrique du Sud (1974), en Nouvelle-Zélande et en Inde (1979), au Pérou (1988), au Yémen (1990), au Kenya (1992), en Tunisie (1992), en Bolivie (1995) en Indonésie (1999) (Zeddam *et al.*1999) et au Costa Rica (Gómez *et al.* 2008). Depuis la dernière décennie, des GV ont été isolés à partir de *T. solanivora* et ont été testés au Costa Rica (Com. Pers. Gómez, Y.), au Venezuela (Niño *et al.* 2005), en Equateur (Zeddam *et al.* 2005) et en Colombie (Villamizar *et al.* 2008). Les études biologiques et moléculaires menées sur les isolats montrent que tous ces GVs ont des caractéristiques similaires au PhopGV isolé de *P. operculella* (Com. Pers. Léry, X.).

Le PhopGV fait partie des 41 génomes de baculovirus complètement séquencés (à la date de juin 2007) (van Oers et Vlak 2007). Le PhopGV a été séquencé à partir d'un isolat provenant de Tunisie, référencé dans nos collections comme isolat #1346. La séquence a été déposée dans GenBank (NC004062) (Croizier *et al.* 2004). Il contient 119217 pb et 130 ORFs potentielles ont été identifiées.

1.4.5.2. Efficacité

Les données publiées sur l'efficacité du PhopGV sur *P. operculella* ont été très variables jusqu'à ces dernières années, en grande partie car les isolats utilisés étaient différents et mal caractérisés. Les protocoles d'évaluation étaient différents, incluant la méthode d'application du virus (immersion des tubercules dans une suspension virale, aspersion des feuilles), l'état de développement des larves de l'insecte, le mode de calcul des doses utilisées, et la description précise de l'isolat viral. Souvent, la dose virale était exprimée en équivalent larvaires (EqL) (le virus contenu dans x larves dispersé dans un volume y d'eau), ou en corps d'inclusion (OB)/ml, dont la concentration est calculée après purification et comptage par spectrophotométrie. Ces approches donnent des résultats approximatifs et peu reproductibles (variabilité dans la taille des larves et dans la quantité de virus adsorbé à la surface des tubercules ou des feuilles lors du trempage).

Avec *P. operculella*, en utilisant la méthode d'aspersion de feuilles contaminées d'un

PhopGV péruvien, la concentration létale 50 (CL_{50}) est de 0,016 EqL/l sur larves néonates. Sur larves L2 – L3, la mortalité induite par trois isolats différents de PhopGV d'Indonésie varie entre 82 et 87% avec une CL_{50} entre 15 et 18 EqL/100 ml, estimée par immersion des tubercules dans une suspension virale (Zeddam *et al* 1999).

Kroschel *et al.* (1996a) ont obtenu une CL_{50} de $7,3x10^4$ OB/ml sur des tubercules après immersion en laboratoire dans une suspension contenant un PhopGV isolé au Yémen. Lorsque l'évaluation a été faite en champ, la mortalité des larves de *P. operculella* a été de 82,5 à 85,3% (Kroschel *et al.* 1996b).

Dans des essais faits en Indonésie en conditions de stockage, l'infestation des larves de *P. operculella* a été réduite de 90%, par rapport au contrôle, avec une formulation de PhopGV utilisée à 40 EqL/l d'eau additionnée de talc (Setiawati *et al.* 2000).

Au Pérou, le PhopGV a été utilisé en suspension aqueuse pour l'appliquer par aspersion et en poudre sèche pour l'appliquer par saupoudrage. Cette formulation a été utilisée pour des traitements en champ. Il en résulte une mortalité larvaire de 70 à 100% et une persistance du virus jusqu'à 60 jours après l'application (CIP, 1992). En Colombie, Pérez *et al.* (1988) ont obtenu 96% de mortalité sur des larves au laboratoire, avec un PhopGV appliqué à une concentration de $4,89x10^6$ CI/ml.

En Bolivie, l'effet de plusieurs formulations et d'un produit commercial développé par le Centre International de la Pomme de terre (CIP) appelé MATAPOL®, ont été évalués sur *P. operculella*. La meilleure efficacité a été obtenue avec le MATAPOL® sur des stockages de tubercules (Crespo *et al.* 2005).

Pour le contrôle de la teigne du Guatemala, différents isolats viraux obtenus aussi bien sur *P. operculella* que *T. solanivora* ont été utilisés. Au Venezuela, un variant isolé sur *T. solanivora* a été évalué en champ. Un mélange du virus avec de l'eau (20 larves/l d'eau) et un agent dispersant, a été appliqué par aspersion (3 applications par cycle de culture de pomme de terre) et a occasionné des niveaux de mortalité des larves entre 32 et 82%

(Niño *et al.* 2005). En conditions de laboratoire, Niño et Notz (2000) ont essayé une formulation avec du talc appliquée sur les tubercules, et obtenu entre 98 et 100% de mortalité des larves.

En Colombie, en appliquant un insecticide biologique basé sur un isolat péruvien provenant de *P. operculella*, la mortalité a été supérieure à 90% (CL_{50} 3,4 OB/mm^2). D'autres études avaient cependant montré une absence d'efficacité des PhopGV isolés de *P. operculella* lorsque ces essais avaient été faits sur des hôtes alternatifs, comme *T. solanivora* (Pollet *et al.* 2003 ; Rebaudo *et al.* 2006). Des études ultérieures ont démontré que la haute efficacité sur *T. solanivora* dans ce cas particulier était due à la présence d'au moins deux génotypes viraux différents dans le principe actif du biopesticide, le génotype péruvien et un génotype issu probablement de populations virales adaptées à *T. solanivora* en champ (Espinel *et al.* 2009b).

La disparité des résultats obtenus précédemment provenait de l'absence d'une caractérisation de chacun des isolats utilisés (dans les publications on parle souvent du baculovirus de Phthorimaea, sans plus de précisions), ainsi que de l'absence d'une méthode précise d'évaluation de l'efficacité biologique du PhopGV sur les teignes de la pomme de terre. La mise au point d'une méthode faite par Carrera *et al.* (2008), qui consiste en un dispositif de contamination des tubercules par nébulisation pour évaluer l'infection des larves par voie orale, a permis d'obtenir des résultats fiables et reproductibles dans différents laboratoires, en France, en Equateur, au Costa Rica et en Colombie. Par exemple, la CL_{50} de l'isolat de référence #1346 sur *P. operculella* a été de 16,68 CI/ml en France, de 16,62 CI/ml en Equateur et de 17,76 CI/ml au Costa Rica (X. Léry, Communication personnelle).

Ces deux contraintes levées, une étude systématique de la capacité de chaque isolat à contrôler l'un ou l'autre des hôtes alternatifs devient possible.

1.5. Les insecticides biologiques

1.5.1. Le marché

La demande en insecticides biologiques est en train d'augmenter significativement dans le monde. En effet, il y a une conscience publique de l'environnement et des restrictions qui portent sur la diminution de déchets que les agences régulatrices ont imposées en particulier à cause du risque que représentent les produits chimiques synthétiques sur la santé (Agronews 2010).

Le marché global des pesticides chimiques de synthèses estimé à 26,7 milliards de dollars américains en 2005 a baissé à 25,3 milliards de dollars en 2010, avec un taux de croissance annuelle moyen (TCAM) de 1,1%. Le marché des biopesticides croît rapidement, de 672 millions de dollars en 2005 à un peu plus de 1 milliard de dollars en 2010, avec un TCAM de 9,9%. La croissance maximale a eu lieu en Europe avec un TCAM de 15% (de 135 millions de dollars en 2005 à 270 millions en 2010), suivi par l'Asie avec un TCAM de 12% et l'Amérique Latine avec un TCAM de 5% (de 70 millions de dollars en 2005 à 88 millions en 2010) (Agronews 2010) (Figure 9 et 10).

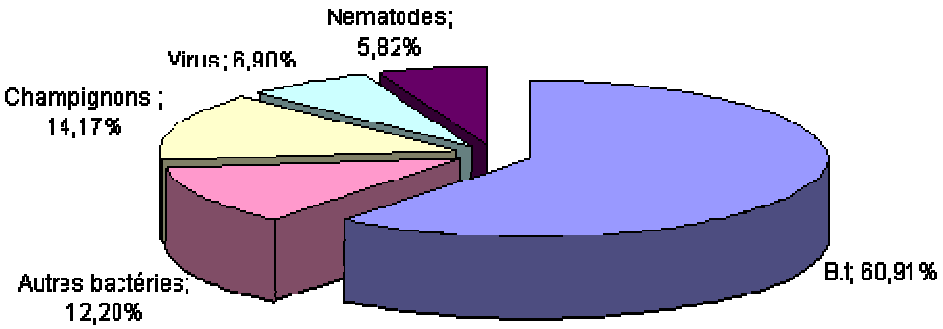

Figure 9. Marché global des biopesticides en 2005. (B.t : *Bacillus thuringiensis* serotypes) (Mc.Spadden 2005).

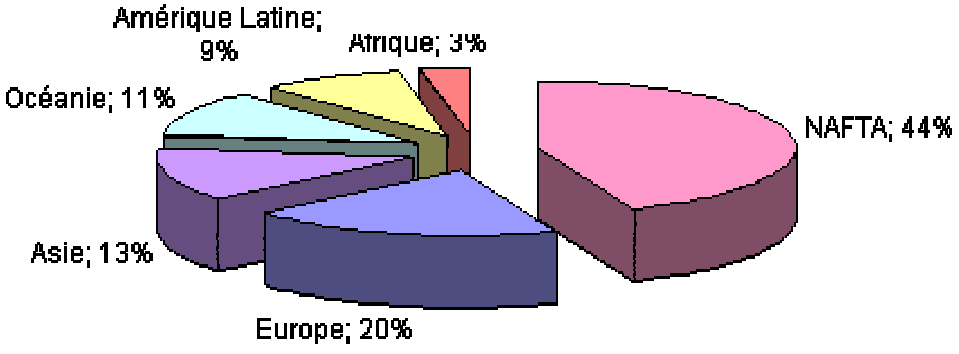

Figure 10. Marché mondial des agents de contrôle biologique, participation par continent en 2005. (NAFTA : Etats-Unis, Canada, Mexique) (Guillon 2005)

Bien que plus de 1000 différents produits ou technologies soient disponibles au travers de plus de 350 fabricants dans le monde, l'utilisation d'agents de contrôle biologique (ACB) est encore très faible. Ils représentent environ 2 à 4% du marché de la protection des cultures. Mais il existe de bonnes opportunités pour inclure des biopesticides non seulement dans les cultures organiques, mais aussi dans les grosses productions commerciales, comme outil de protection intégrée de cultures en complément d'autres approches (notamment chimiques) (Guillon 2005).

Dans le cas des baculovirus, l'utilisation dans les régions tempérées d'Europe, des Etats-Unis et du Canada dans des systèmes de production extensives, s'est limitée au contrôle de ravageurs forestiers ou à quelques petits marchés spécialisés. Par contre, la situation dans les pays en voie de développement paraît plus prometteuse (Cherry et Williams 2001). Le premier agent de contrôle de populations d'insectes à base de baculovirus (*Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus*, HearNPV) a été enregistré aux Etats-Unis en 1975, le Elcar®, qui contrôle aussi *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera : Noctuidae). Ce développement a été à la base de l'émergence d'autres agents de contrôle biologique basés sur les baculovirus dans le monde (Moscardi 1999). Actuellement, plus d'une vingtaine d'espèces de baculovirus sont présentes sur le marché (Tableau 1), et sont commercialisées pour le contrôle des ravageurs de grandes

cultures, de cultures maraichères, fruitières et forestières.

L'utilisation du NPV d'*Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) pour le contrôle de ce ravageur du soja au Brésil, a été le meilleur exemple de succès documenté (Moscardi 1999 ; Cherry et Williams 2001). Le programme de lutte contre cet insecte a commencé en 1980, et en 2005 l'aire traitée était de 100 000 hectares en appliquant une dose de $1,5x10^{11}$ OB/hectare, une seule fois par cycle de culture (Rohrmann 2008).

1.5.2. Contraintes et limitations

L'un des problèmes clé pour le développement d'agents de contrôle biologique, et plus spécifiquement pour les baculovirus, est la comparaison avec les insecticides chimiques. Les modes de fonctionnement de ces deux agents de contrôle, les ACB et les insecticides chimiques étant différents, la transposition des attentes de l'un vers l'autre n'est pas toujours possible. Cependant, la demande des agriculteurs est clairement le reflet de leurs habitudes avec les produits chimiques. Si on veut développer massivement le contrôle biologique, il faut pouvoir répondre à ce type d'attente.

Les insecticides chimiques ciblent le système nerveux, le système digestif ou le système endocrine des insectes. Ils agissent par contact, plus rarement par ingestion, et leur effet est rapide. Ils ne sont pas spécifiques pour une espèce ou un groupe limité d'espèces d'insecte.

Par rapport à ces caractéristiques, les baculovirus ont les caractéristiques suivantes :

Spécificité d'hôte élevée : Du fait de cette spécificité, le marché potentiel se restreint. La spécificité peut être un atout lorsqu'il s'agit de contrôler l'insecte nuisible tout en préservant des insectes utiles, comme les polinisateurs. Par contre, elle peut être un handicap lorsqu'il faut contrôler des complexes de ravageurs comme *Helicoverpa* / *Heliothis* spp. dans une même culture, ou dans le cas de Geléchiides attaquant la pomme de terre et la tomate représentés par *Tuta absoluta* (Meyrick) ou *P. operculella*, si un seul baculovirus ne peut pas contrôler toutes les espèces présentes. Du point de

vue industriel, des baculovirus à spectre d'hôte le plus large possible peuvent être intéressants, une production unique pour plusieurs espèces traitées, ce qui se rapproche des insecticides chimiques. (Guillon 2005).

Mode d'action lent : Une infection à baculovirus prend plusieurs jours pour tuer l'hôte. Il est donc impossible de concurrencer un insecticide chimique à action immédiate. L'utilisation des baculovirus demande une connaissance du cycle du ravageur, et un suivi détaillé de celui-ci. Il est ainsi possible d'appliquer le virus avant que le ravageur ne dépasse le seuil économique. Une autre option est de faire plusieurs applications de doses plus faibles à des temps rapprochés (Cherry et Williams 2001).

Baisse de la persistance en champ : En particulier à cause de la sensibilité des virus aux UVs. Cet aspect a été amélioré grâce à l'utilisation de substances photoprotectrices et de formulations de micro encapsulation du virus (Cherry et Williams 2001).

Production massive in vivo *onéreuse et systèmes* in vitro *encore en développement* : Généralement les insectes sont élevés en milieux artificiels ou naturels (pommes de terre pour *P. operculella* ou *T. solanivora*). Dans quelques cas, la production en champ avec infection généralisée et récolte ultérieure des insectes infectés a été tentée, mais cela comporte le risque de contamination avec d'autres pathogènes (Cherry et Williams 2001).

Coût d'enregistrement très élevé d'un biopesticide : 0,5 à 2,5 millions d'euros, c'est le coût d'une homologation. Cela reste l'obstacle le plus important pour le développement de nouveaux produits. De plus, la structure globale du marché des ACB est significativement différente de l'industrie traditionnelle agrochimique. Dans le cas de production d'ACB, la plupart des entreprises sont de taille petite ou moyenne par rapport aux marchés agrochimiques concentrés sur 7 compagnies multinationales (Guillon 2005). Une pratique commune dans les pays en voie de développement est la vente de

biopesticides sans licence, à cause de l'absence de ressources pour établir des politiques appropriées et donner des informations techniques précises pour la gestion des demandes d'enregistrement des nouveaux biopesticides (Cherry et Williams 2001).

Résistance : La résistance est un facteur important qui peut limiter l'utilisation de biopesticides à base de baculovirus. Celle-ci peut être définie comme « le développement de la capacité à tolérer des doses d'inoculum qui normalement provoquent la maladie ou la mort chez la majorité des individus dans une population normale de la même espèce » (IRAC[2]). Les cas de résistance observés dans un système virus-hôte reflètent une histoire co-évolutive avec acquisition de résistance de la part de l'hôte et acquisition des gènes capables de vaincre ces résistances chez le virus (Sosa-Gómez et Moscardi 2001).

Il existe 2 cas de résistance bien documentés des systèmes ravageur-baculovirus ; la résistance d'*Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera : Noctuidae) à AgMNPV et la résistance du carpocapse à *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV).

Des études, réalisées simultanément par le Brésil et les Etats-Unis, ont montré qu'il est possible d'obtenir en laboratoire des populations d'*A. gemmatalis* résistantes à AgMNPV sous certaines conditions d'isolement et de pression de sélection (exposition constante à CL_{80}). Les populations du Brésil ont présenté un facteur de résistance (FR) (quotient entre le CL_{50} de la population résistante et de la population sensible) de plus de 2000 fois. En contraste, la population des Etats-Unis, n'atteint qu'un FR d'environ 5. Ces niveaux de résistance sont dus à la pression de sélection élevée appliquée durant 16 générations, et/ou peut être au fait qu'au Brésil, l'insecte a déjà été

[2] IRAC: Insecticide Resistance Action Committee. (www.irac-online.org, consulté en août 2010)

exposé naturellement au AgMNPV. Bien que, dans les conditions de laboratoire, le phénomène de résistance ait été détecté par pression de sélection, il n'existe pas d'indices de la présence de résistance à l'AgMNPV en champ. Cependant, il faut être vigilant et limiter les méthodes qui permettent l'augmentation du risque de leur apparition (Sosa-Gómez et Moscardi 2001).

Le carpocapse de la pomme, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera : Tortricidae) est le principal insecte ravageur des vergers de pommiers et poiriers. A partir de l'enregistrement du CpGV, son utilisation a été augmentée en raison de l'intérêt que lui portait l'agriculture biologique et à la résistance récurrente aux insecticides chimiques. En 2003, la résistance au CpGV a été confirmée en vergers organiques en Allemagne et en France, puis en Italie, en Hollande et en Suisse. Cette résistance est due à l'utilisation constante des produits commerciaux disponibles en Europe à base d'une souche mexicaine de CpGV ayant une haute homogénéité génétique. A chaque cycle de production les insectes ont été exposés au même virus (Asser-Kaiser *et al.* 2007). Il est important d'augmenter la vigilance et de surveiller cette résistance.

Par exemple, l'application de produits à base d'isolats différents ou avec un mélange d'isolats pour compenser le taux faible de variabilité présent chez les granulovirus, peut permettre de contourner cette résistance (Berling *et al.* 2009).

1.5.3. Avantages

Il est utopique d'envisager qu'un biopesticide donné à base de baculovirus ou d'autre microorganisme sera efficace dans toutes les conditions, contre tous les ravageurs, sur toutes les cultures et pour tous les systèmes agricoles. Néanmoins, leur utilisation sur différentes cultures comporte des bienfaits comme la réduction ou l'arrêt de l'utilisation d'insecticides chimiques (dans le cas de l'agriculture biologique). Les

biopesticides sont moins ou pratiquement non toxiques par rapport aux pesticides chimiques. Ils favorisent l'amélioration de la qualité de vie des travailleurs agricoles, et permettent d'offrir des produits plus sains aux consommateurs. Ils ont également une meilleure image auprès des consommateurs, dans le cas d'une entreprise de produits « Bio». La dégradation rapide des biopesticides diminue aussi les risques de pollution.

La plus grande spécificité d'action peut aider à maintenir la biodiversité des biotopes, en favorisant la conservation des ennemis naturels de l'insecte-cible. De même, l'utilisation des biopesticides diminue les risques de développer une résistance chez les insectes, si on prend en compte les actions pour la prévenir (cf. 1.5.2. Résistance).

En plus des contraintes pour le développement des biopesticides à base de baculovirus, il est important de dire que son utilisation intelligente exige une compréhension intégrée de la biologie, de l'écologie et du comportement de l'insecte que l'on souhaite contrôler (Cherry et Williams 2001).

Pour le succès de la stratégie, il faut prendre en compte plusieurs aspects importants, comme la dose virale appliquée à l'équilibre : la plus faible dose virale qui permet le meilleur contrôle; et la quantité optimale à appliquer, et au bon moment, en général dans les stades plus jeunes, pour profiter d'une plus grande sensibilité au virus. La fréquence d'application est importante car elle est influencée par la persistance de l'inoculum en champ et le synchronisme avec les stades de développement du ravageur. Des applications fréquentes de doses basses au lieu de doses élevées appliquées moins souvent, peuvent donner de meilleurs résultats de contrôle (Cherry et Williams 2001), mais risquent aussi de favoriser le développement de résistances.

La formulation du principe actif est très importante, car il est indispensable d'apporter les virus aux sites où les larves sont susceptibles de les ingérer, et garantir leur conservation pendant un temps suffisant. Donc une formulation doit répondre à des critères importants comme la capacité de stabiliser le virus pendant la période de stockage, et la facilité d'utilisation du produit par l'agriculteur. La formulation doit

aussi optimiser l'application et l'ingestion du virus par le ravageur, augmenter l'activité insecticide et optimiser la persistance dans l'environnement (Williams et Cisneros 2001).

1.5.4. Production en masse

L'utilisation des biopesticides à base de baculovirus dans la lutte intégrée requiert de la production en masse à grande échelle, avec une chaîne de production stricte et le contrôle de qualité du produit final (López-Ferber et Devauchelle 2005).

La production sur cultures cellulaires en fermenteurs, la production sur des larves dans des unités spécialisées et la production en champ dans des parcelles naturellement attaquées par les chenilles (cf.1.5.2.Production massive), sont les trois possibilités de production en masse (Claus et Sciocco de Cap 2001).

La production *in vitro* demande l'existence de cultures cellulaires avec des conditions spécifiques, et peut aboutir à une contrainte, comme dans le cas des PhopGVs, car il n'y a pas encore de lignées cellulaires suffisamment productrices.

Pour le PhopGV, on utilise la production en larves sur milieu naturel (tubercules de pomme de terre). L'idéal est la production sur milieu artificiel qui permet un contrôle précis de l'inoculum de départ, comme dans le cas de la production industrielle de granulose contre le carpocapse des fruitiers (López-Ferber et Devauchelle 2005). Pour la production des biopesticides à base de PhopGV contre les teignes de la pomme de terre, à la date d'aujourd'hui, plusieurs milieux artificiels ont été testés sans succès (données non publiées).

Le Centre International de la pomme de terre (CIP) au Pérou préconise l'utilisation des biopesticides à base de PhopGVs produits de façon artisanale par les agriculteurs. Une formulation aqueuse préparée par trituration de 20 larves infectées par le virus dans 1 litre d'eau contenant un agent dispersant. Pour la formulation en poudre, on ajoute le talc à la préparation précédente, on sèche et on moud, pour obtenir le produit destiné à l'application sur les tubercules en stockage (CIP 1992). Dans ce procédé, le contrôle

de qualité fait défaut car on ne connaît pas la souche virale (la composition génétique de la population virale peut être variable d'une récolte à l'autre), ni la concentration virale initiale, et surtout, il existe un risque de contamination avec d'autres microorganismes.

Dans le cas de la Corporation Colombienne de la Recherche Agricole (CORPOICA), le procédé de production d'un biopesticide enregistré à base de PhopGV reprend l'idée de la production artisanale du CIP et l'adapte à un système de production semi-industrielle avec des étapes contrôlées. La production se compose de l'unité d'élevage, l'infection des œufs de l'insecte avec le virus, l'infestation des tubercules avec les œufs, l'extraction des larves des tubercules et le mélange des larves infectées avec les ingrédients propres de la formulation. En plus de la formulation en poudre, CORPOICA développe deux formulations pour l'application du virus en champ ; une formulation granulaire à dissoudre dans l'eau et une émulsion (Com. Pers. L. Villamizar).

Tableau 1. Pesticides à base de baculovirus dans le monde.

Hôte/Ravageurs	Baculovirus	Culture	Nom commercial	Pays
Adoxophyes orana	GV	Pomme	Capex 2®	Suisse
Adoxophyes sp.	NPV	Thé		Japon
Anagrapha falcifera	NPV	Coton/Maraîchères		Etats-Unis
Anticarsia gemmatalis	MNPV	Soja	Baculoviron ®	Brésil
			Baculovirus Nitral ®	Brésil
			Coopervirus ®	Brésil
			Protege ®	Brésil
Autographa californica	MNPV	Maraîchères	VPN 80 ®	Guatemala
Plutella xylostella			Gusano ®	Etats-Unis
Pseudoplusia includens				
Spodoptera exigua				
Trichoplusia ni				
Cydia pomonella	GV	Pomme, poire	Carpovirusine ®	France
			Carpovirus plus ®	Argentine
			Cyd-X ®	Etats-Unis
			Granupom ®	Belgique
			Madex ®	Suisse
			Virosoft ®	Canada
Erinnyis ello	GV	Manioc		Brésil
				Venezuela
Helicoverpa zea	NPV	Coton	Elcar ®	Etats-Unis
Helicoverpa virescens			Gemstar ®	Etats-Unis
Helicoverpa armigera	NPV	Coton, tomate	Heliokill ®	Inde
			Biovirus ®	Inde
			Helivax-NPV ®	Inde
			BioV2 ®	Thaïlande
			Virin-HS ®	Russie
Hypantrea cunea	NPV	Forêt	Virin-ABB ®	Russie
Lymantria dispar	NPV	Forêt	Gypcheck ®	Etats-Unis
			Disparvirus ®	Canada
			Virin-ENSH ®	Russie
Mamestra brassicae	NPV	Chou	Mamestrin ®	France
			Virin-EKS ®	Russie
Orgyia pseudotsugata	MNPV	Forêt	TM Biocontrol 1 ®	Etats-Unis
			Virtuss ®	Canada
Phthorimaea operculella	GV	Pomme de terre	PTM Baculovirus ®	Pérou
			PTM Baculovirus ®	Egypte
			PTM Baculovirus ®	Tunisie
			Baculovirus Corpoica ®	Colombie
			Matapol plus ®	Bolivie
Plodia interpunctella	GV	Raisin / amande		Etats-Unis
Spodoptera exigua	MNPV	Maraîchères	Spetix ®	Suisse
			Spod-X ®	Etats-Unis
Spodoptera littoralis	MNPV	Grandes cultures	Spodo-cide ®	Inde
		Maraîchères	Littovir ®	Guatemala
		Coton	Spodopterim ®	U. Européen
Spodoptera frugiperda	NPV	Maïs		Brésil
Spodoptera sunia	NPV	Maraîchères	VPN 82 ®	Guatemala

Chapitre 2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Les insectes

Dans ce travail, nous utilisons des larves de deux espèces de teignes de la pomme de terre, *Phthorimaea operculella* et *Tecia solanivora*. L'élevage de *P. operculella* se fait sur des tubercules de pomme de terre (var. *Agatha*) à une température constante de 27°C ±1°C et une photopériode de 18 heures. La colonie est élevée au Laboratoire de Recherche (UR072) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) à Saint Christol lez-ales, France. L'élevage de *T. solanivora* se fait sur des tubercules de pomme de terre (var. *Parda pastusa*) à une température constante de 27°C ±1°C et une photopériode de 16 heures. La colonie est élevée au Centre de Biotechnologie et Bioindustries (CBB) de la Corporation Colombienne de la Recherche Agricole (CORPOICA) en Colombie.

2.1.2. Les isolats viraux de PhopGV

Isolat #1346 : Cet isolat viral est utilisé comme référence dans la caractérisation moléculaire des isolats colombiens. Ce virus est un isolat Tunisien complètement séquencé, GenBank (NC004062) (Croizier *et al.* 2004).

Isolat Pérou : Cet isolat est utilisé seul ou dans des mélanges pour les essais biologiques conduits sur les deux hôtes. Il est génétiquement très proche de l'isolat Tunisien #1346 (Résultat non publié). Ce virus est originaire de La Molina, Pérou, et a été aimablement fourni par le Centre International de la Pomme de terre (CIP) au Pérou. Il constitue le principe actif d'un biopesticide utilisé pour le contrôle de *T. solanivora* en tubercules stockés.

Isolats colombiens. Ils proviennent d'un échantillonnage fait par CORPOICA dans différentes zones productrices de la pomme de terre en Colombie. Ces isolats ont été isolés de larves de la teigne du Guatemala *T. solanivora*. Leurs codes et origines géographiques sont VG001 provient de Túquerres (sud-ouest, à la frontière avec l'Equateur) ; VG002, VG003 et VG004, proviennent de Chocontá, Funza et Carmen de Carupa, respectivement (centre de la Colombie) et VG005 de Chitagá (nord-est, à la

frontière avec le Venezuela) (Figure 11).

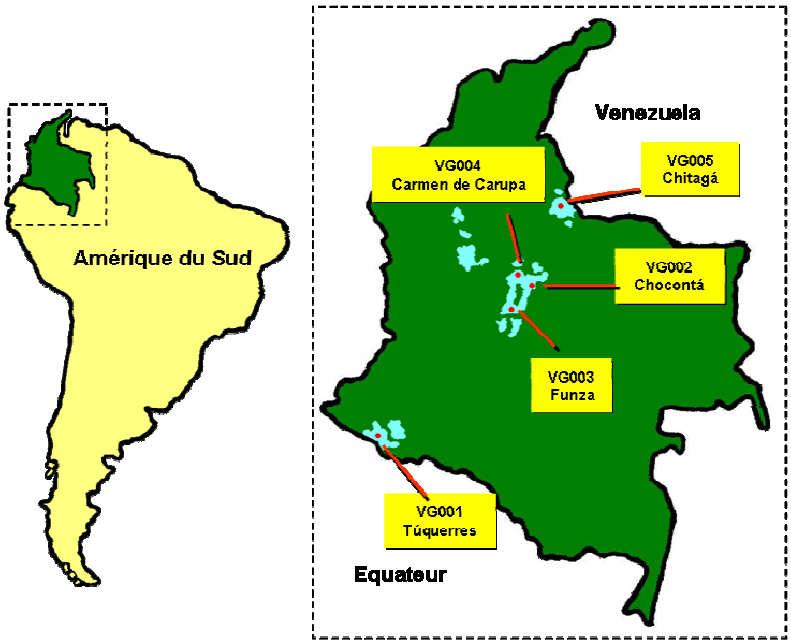

Figure 11. Zones géographiques où les PhopGV colombiens ont été isolés. En bleu, les principales zones productrices de la pomme de terre.

2.2. Méthodes

2.2.1. Essais biologiques

Les essais pour la détermination de la concentration en virus létale pour 50% des individus (CL_{50}) sont conduits sur des larves néonates de *P. operculella* et *T. solanivora* et ont été réalisés en utilisant la méthode d'application par nébulisation (Carrera *et al.* 2008). Huit suspensions purifiées de corps d'inclusion (OB) des différents PhopGVs, en plus du témoin traité à l'eau distillée, ont été appliquées de façon homogène ($1,5x10^4$; $5x10^4$; $1,5x10^5$; $5x10^5$; $5x10^6$; $5x10^7$; $5x10^8$; $5x\ 10^9$ CI/2 ml d'eau). Les concentrations finales d'OB appliquées sur la surface des pommes de terre sont de 0,015, 0,05, 0,15, 0,5, 5, 50, 500 et 5000 OB/mm^2, respectivement. Deux tubercules sont utilisés pour chaque concentration et au moins trois répliques par concentration sont effectuées. 30 larves sont déposées par essai, pour un total de 90 larves par concentration. Les larves néonates sont placées directement sur les tubercules. Les boîtes contenant les tubercules sont mises à incuber à 27°C pendant 20 jours. Les larves mortes ou infectées sont récupérées régulièrement durant cette période. Après 20 jours, les larves infectées, les pupes et/ou les adultes sont comptabilisés. Les larves infectées sont stockées à -24°C

jusqu'à la purification des granules.

2.2.2. Etude des mélanges génotypiques

2.2.2.1. Mélanges naturels

A partir des résultats obtenus avec les isolats colombiens VG001 et VG005 isolés de *T. solanivora* (Chapitre 3), des études pour suivre une possible évolution des mélanges naturels ont été réalisées. Neuf passages successifs des isolats sont effectués par amplification (cf. 2.2.3) sur des larves de chaque hôte. Trois essais biologiques sont réalisés : P0 (P : passage), P1 et P5, afin d'évaluer l'effet des passages sur l'activité biologique en présence de *P. operculella*.

2.2.2.2. Populations expérimentales

Des mélanges artificiels sont effectués avec l'isolat #Pérou provenant de *P. operculella* et #VG003 provenant de *T. solanivora*, en utilisant trois proportions différentes : 10% Pérou + 90% VG003 (10 : 90); 50% Pérou + 50% VG003 (50 : 50) et 90% Pérou + 10% VG003 (90 : 10). La première application sur les 2 hôtes testés est considérée comme le passage zéro (mélange des isolats). Afin de suivre une éventuelle évolution des mélanges des isolats viraux et d'en calculer l'effet, des essais biologiques avec passages successifs ont été réalisés sur des larves des deux hôtes. Les OB provenant des mélanges sont purifiés et sont utilisés comme inoculum viral pour le passage suivant. Cinq passages successifs sont effectués et sont représentés comme « AB » (Figure 12). Chaque cycle viral est initié à partir de l'inoculum viral du cycle précédent, soit à partir d'un essai biologique, soit par amplification. Le procédé méthodologique utilisé pour cette évaluation est le même que celui décrit dans le paragraphe 2.2.1.

Avec *P. operculella,* quatre essais biologiques ont été effectués : Passage 0 (P0), passage 1 (P1), passage 2 (P2) et passage 5 (P5). Les passages 2 et 4 ont été faits par amplification (cf. 2.2.3). Avec *T. solanivora*, des essais biologiques des passages 0, 1, 2 et 3 ont été effectués (Figure 12).

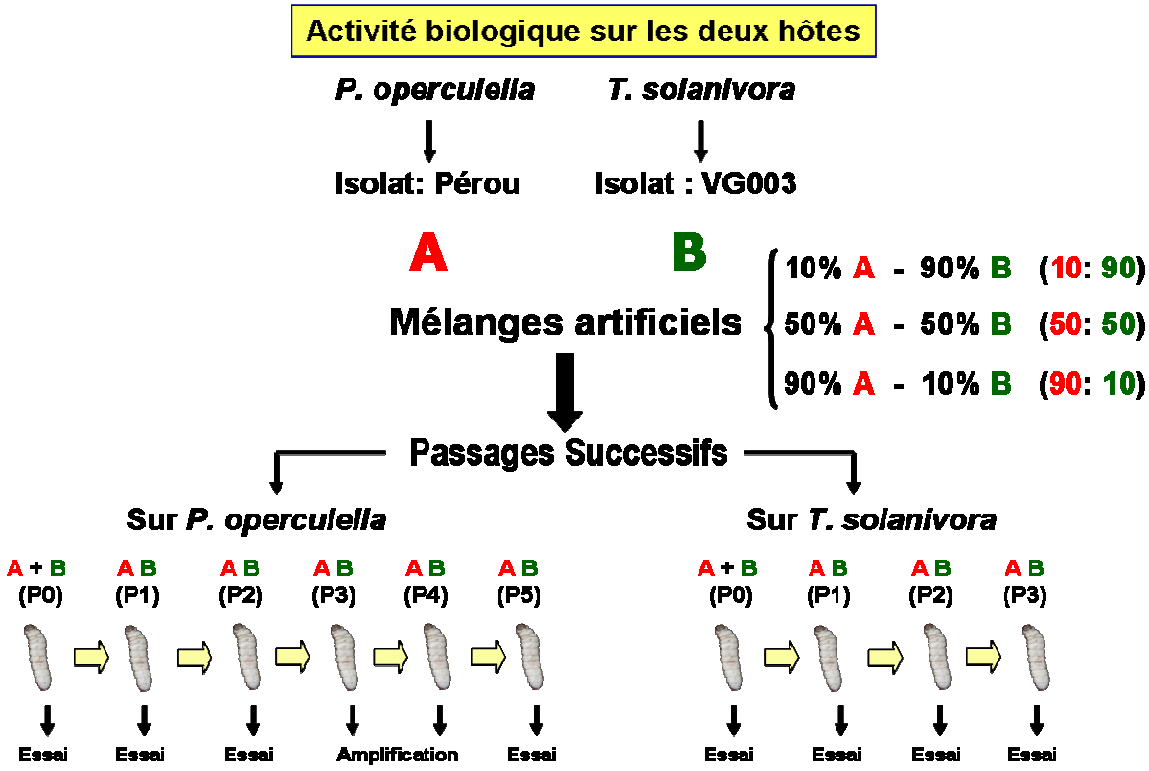

Figure 12. Schèma des essais de l'activité biologique des mélanges artificiels des isolats Pérou (A) et VG003 (B). Dans chaque essai biologique, on évalue les trois mélanges artificiels. P = passage.

2.2.3. Amplification sur larves

L'amplification des virus est réalisée *in vivo* par multiplication des isolats (seuls ou mélangés) sur des larves de chaque hôte. Environ 120 larves néonates sont placées sur les tubercules sur lesquels a été appliquée préalablement une suspension virale de $1x10^6$ OB/tubercule de 120 g de poids, à l'aide d'un pinceau. Après 20 à 25 jours, les larves infectées sont récupérées et conservées congelées jusqu'à la purification des virus (cf. 2.2.6.1).

2.2.4. Productivité virale

La production de granules, pour chaque passage des isolats évalués, a été calculée en collectant les larves mortes lors des essais biologiques (au moins 15 larves par réplication soit environ 75 larves par traitement) ou des amplifications. Le poids de chaque groupe de larves du même stade a été déterminé, puis la purification des OB a été effectuée (cf.2.2.6.1). En fonction de la concentration d'OB (OB/ml) et le poids des larves, la productivité en OB par mg de poids larvaire a été estimée.

2.2.5. Analyse de données

La mortalité des larves dans les essais biologiques est analysée selon une transformation log-probit afin de déterminer la relation entre la concentration et la mortalité (Finney 1971) à l'aide du logiciel POLO-Plus 1.0 (LeOra Software, 2002-2010).

Les différences de productivité virale parmi les isolats sont analysées par l'étude de variance (ANAVA), le test de Tukey et /ou la variante non paramétrique de Kruskal-Wallis, si nécessaire, à l'aide du logiciel Statistix 1.0 (Analytical software, 1996).

2.2.6. Analyse de l'ADN viral

2.2.6.1. Purification des corps d'inclusion (OB)

Les corps d'inclusion des larves infectées obtenus à partir des essais biologiques ou des amplifications sont purifiés d'après la méthode modifiée de Matthiessen *et al*. (1978). Les larves sont homogénéisées dans l'eau distillée avec SDS 0.1%. La suspension est centrifugée 5 min à 750 g. Le surnageant est centrifugé 20 minutes à 20.000 g. Le culot est suspendu dans 1 ml d'eau distillé et est placé dans un gradient linaire de sucrose 30-70% et centrifugé 20 minutes à 22.500 g. La bande blanche des OB est collectée et diluée dans l'eau distillé et centrifugée 20 minutes à 20.000 g. Le culot des OB purifiés est resuspendu dans 2 ml d'eau distillée et conservé au congélateur à -20°C. La détermination du titre viral est réalisée par spectrophotométrie (450 nm) Zeddam *et al.* (2003) d'après la formule :

$$4{,}8 \; x \;\; \text{DO} \; (450 \; nm) x \; dilution \; x \; 10^8 \; = \; \text{Corps d'inclusion /ml}$$

2.2.6.2. Purification et extraction de l'ADN viral

Les granules purifiés sont dissous dans 2M Na_2CO_3 et l'ADN est extrait par la méthode au phénol-chloroforme isoamyl alcool. L'ADN est précipité en ajoutant de l'acétate de sodium 3M et de l'éthanol 100%. Après deux cycles de centrifugation à 12.000 g 10 minutes, le culot est dissous dans un tampon Tris-EDTA (10mM Tris, 0.1 mM EDTA) à 56° C durant 2h. La concentration de l'ADN est déterminée par spectrophotométrie à une absorbance de 260 nm.

2.2.6.3. Caractérisation par enzymes de restriction

L'analyse du génome viral des isolats colombiens a été faite par l'étude de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP). Les profils de restriction obtenus avec 11 endonucleases (*Bam* HI, *Bst* EII, *Bst* API, *Dra* III, *Hind* III, *Hpa* I, *Mlu* I, *Nde* I, *Nru* I, *Nsi* I et *Sma* I) sont réalisés selon les recommandations du fournisseur (Promega). Les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) dans du tampon TAE (0.04M Tris, 0.001 M EDTA, pH 8.0) à 80V pendant 4 heures environ, en utilisant le marqueur de poids moléculaire Lambda ADN/*Hind*III. Les fragments d'ADN sont visualisés sous une lampe UV après coloration au bromure d'éthidium.

2.2.6.4. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

L'amplification par PCR des 2 régions variables du PhopGV qui ont montré une variation significative de la séquence (Lery *et al.* 2005) est faite en utilisant des amorces spécifiques permettant l'étude des gènes variables. Ces régions sont localisées dans l'ORF viral 129 (gène *egt*) et dans les ORF 90-91 chevauchantes. Les couples d'amorces PhpoGV90-1 : 5'– GATTTACCGGCGGGCACCAATCTCGAAG -3' et PhopGV90-2 : 5'– ACAGACGTAAATGCCAACGATCGTGCAG – 3' et les couples d'amorces PhopGV129-1 : 5' – GCGATGATGAGAATGGCAATGTGAAGAC – 3' et PhopGV129-2 : 5' – TGCCTGCTGTGCTCGACAACAATAGACC – 3', sont utilisés pour amplifier ces régions.

Pour l'analyse des génotypes des mélanges naturels et artificiels (Chapitre 4), en plus des couples d'amorces PhopGV90-1 et PhopGV90-2, on a utilisé les couples d'amorces PhopGV129-7 : 5' – CGAGTCGAGCCAATTTTGTTTGCGTAAT – 3' et PhopGV129-2 : 5' – TGCCTGCTGTGCTCGACAACAATAGACC – 3'.

L'amplification comprend un cycle de 5 minutes à 95° C, puis 20 cycles de la séquence : 1 minute à 95° C, 1 minute à 57° C, 1 minute à 72° C, et 1 cycle de 5 minutes à 73° C. Les produits de la réaction sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (2%) dans un tampon TAE à 150 V pendant 1 h 30 environ. Les fragments sont visualisés

après coloration au bromure d'éthidium sous une lampe U.V.

Les valeurs des proportions relatives des fragments d'ADN (Chapitre IV), sont estimées par l'analyse densitométrique des intensités de chaque produit de PCR à l'aide du logiciel PhotoCapt Mw, V.10.01 (Vilber Lowmat 1999-2001). Afin de réaliser cette analyse, les OB des larves qui proviennent des essais biologiques appliqués avec des concentrations virales entre 50 CI/mm^2 et 5000 CI/mm^2, équivalentes environ aux CL_{70-100} sont purifiés. Puis l'ADN viral est extrait de ces OB, et sert de matrice aux réactions de PCR. Les produits des réactions de PCR sont analysés par électrophorèse sur deux gels d'agarose (2%) différents. La valeur indiquée est la moyenne de ces deux analyses.

Chapitre 3 : Analyse génétique et biologique des isolats colombiens de PhopGV

3.1. Introduction

La teigne du Guatemala est considérée comme le principal ravageur des cultures de pomme de terre en Amérique centrale et en Amérique du Sud, elle est également présente dans les îles Canaries. Cet insecte invasif provoque des dégâts très importants, jusqu'à 100% de pertes en conditions de champ et de stockage. *T. solanivora* a été introduite au Venezuela par l'importation de semences infestées et a occupé des niches où une autre teigne de la pomme de terre, *P. operculella*, était présente. Aujourd'hui, dans certaines localités *T. solanivora* a déplacé complètement *P. operculella*. Dans d'autres endroits, on peut trouver les deux espèces de ravageurs.

L'utilisation massive des insecticides chimiques est l'objet de critiques de plus en plus fortes, à cause des risques pour la santé et l'environnement. De plus, la propagation de résistances rend certains de ces produits inopérants. Les granulovirus sont considérés comme un outil d'intérêt pour le contrôle de ces ravageurs, depuis le succès de l'utilisation d'un granulovirus isolé sur *P. operculella* pour le contrôle de ces teignes dans différents pays en conditions de stockage. Au fil des années, des isolats de PhopGV ont été décrits dans différentes régions du monde où se trouve *P. operculella.* Ces isolats sont génétiquement proches. Ils appartiennent tous à la même espèce, *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV). L'absence de méthodes de contrôle spécifiques pour *T. solanivora* a motivé la Corporation Colombienne de la Recherche Agricole (CORPOICA) à réaliser une prospection de virus sur cet insecte en Colombie. CORPOICA a pu identifier 5 isolats viraux provenant de différentes régions du pays.

Au moyen d'une collaboration entre l'Ecole des Mines d'Alès, l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) et CORPOICA, des travaux préliminaires de caractérisation des isolats ont été entrepris. Ce chapitre reprend et approfondit les travaux de caractérisation génétique et d'activité biologique -en termes de

pathogénicité- sur les isolats colombiens. L'objectif final est de sélectionner des souches candidates à une utilisation comme ingrédient actif d'un biopesticide pour le contrôle des insectes cibles. De plus, une caractérisation génétique permettra d'analyser la diversité intrinsèque, et donc, de déterminer la réserve de variabilité pouvant être mobilisée par ces isolats pour le contrôle de ces deux espèces de ravageurs.

3.2. Résultats

3.2.1. Analyse des profils enzymatiques des isolats viraux colombiens

Avec toutes les enzymes utilisées, les profils de restriction de l'ADN des isolats colombiens sont très proches de ceux de l'isolat de référence #1346, confirmant que les virus isolés de *T. solanivora* en Colombie sont des PhopGV.

L'isolat VG001, qui provient du sud-ouest de la Colombie (à la frontière avec l'Equateur), et les trois isolats qui proviennent du centre de la Colombie (VG002, VG003 et VG004) sont similaires avec toutes les enzymes testées, à l'exception de *Sma* I. Néanmoins, les digestions ont révélé des polymorphismes entre ces isolats (VG001, VG002, VG003 et VG004) et les isolats VG005 (du nord-est, à la frontière avec le Venezuela) et #1346 (l'isolat de référence).

La digestion avec *Sma* I montre que le fragment D de 5 830 pb n'est pas présent dans VG005 et #1346. En revanche, un fragment de 7 469 pb (C'), a été détecté dans ces isolats et est aussi présent en quantité submolaire dans l'isolat VG001, mais il est absent dans les isolats du centre de la Colombie (VG002, VG003 et VG004) (Figure 13).

Les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004, ont révélé des différences génotypiques avec l'enzyme *Nsi*I par rapport aux isolats VG005 et #1346 au niveau du fragment L. Un fragment de 2 900 pb est présent dans les premières au lieu d'un fragment de 2 800 pb. Le profil *Nru*I des isolats colombiens est identique, mais diffère de l'isolat de référence #1346. Le fragment P de 1 982 pb présent dans #1346 est absent dans les isolats colombiens. Le fragment D de 10034 pb dans #1346 est remplacé par un fragment de 12 000 pb dans les isolats colombiens. D'autres différences sont présentes

dans les fragments H et J (petites délétions) et le fragment I (insertion). La digestion *Hpa*I de l'ADN des isolats VG001, VG002, VG003 et VG004 a révélé des différences par rapport à l'isolat du nord-est de la Colombie, VG005, dans les fragments F et M (Tableau 2).

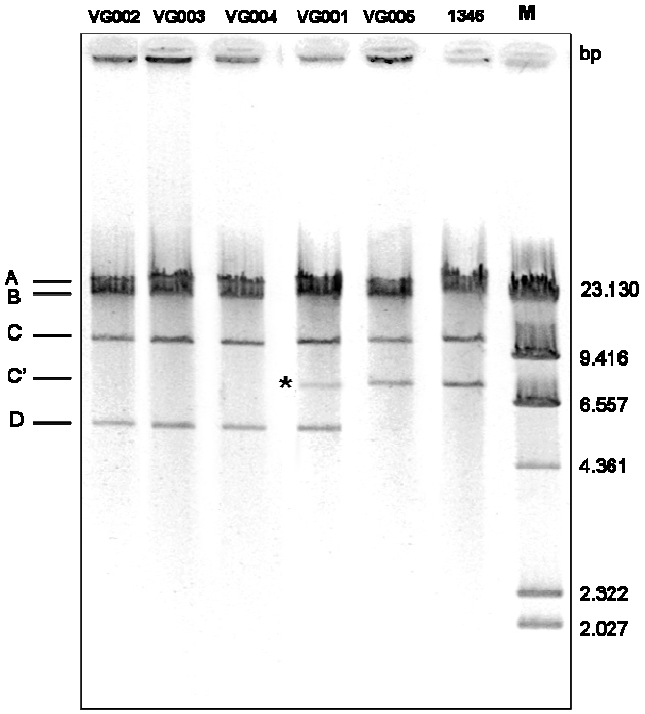

Figure 13. Electrophorèses sur gel d'agarose 1% de l'ADN des isolats colombiens (VG001, VG002, VG003, VG004, VG005) et référence #1346 digéré par l'enzyme SmaI. L'étoile indique la bande submolaire. M : Marqueur de poids moléculaire λ/HindIII. bp : paires de bases.

Le profil *Bst*API a révélé la présence de nouveaux fragments dans tous les isolats colombiens, de 2 500 pb (J) et de 1 800 pb (K') (présent comme fragment submolaire dans l'isolat VG005). Ces fragments ne sont pas présents dans #1346. De plus, une délétion de 1 800 pb (D) est présente dans VG001 et les isolats du centre de la Colombie (Tableau 2). Le profil *Mlu*I présente deux différences pour les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004 par rapport à #1346, dans les fragments L de 3 620 pb et V de 475 pb. Il y a une délétion de 200 pb en L et une insertion de 200 pb dans le fragment V (Tableau 2).

Les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004 sont différents de l'isolat de référence dans le profil *Bst*EII. Il y a une insertion de 200 pb dans le fragment H, une délétion de 150 pb dans le fragment I, et une insertion de 50 pb dans le fragment J. L'isolat VG005 n'est

pas différent de #1346 (Tableau 3). Le profil *Dra*III présente des différences pour les isolats mentionnés précédemment. Le fragment I montre une petite délétion de 93 pb et le fragment J montre une petite insertion de 48 pb (Tableau 3).

Tableau 2. Comparaison des fragments de restriction NsiI, NruI, HpaI, Bst API et MluI de l'ADN des isolats colombiens et référence #1346. Les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004, sont mis dans la colonne 2, du fait qu'il n'y a pas de différences parmi eux.

Fragment	**NsiI**			**NruI**			**HpaI**			**BstApI**			**MluI**		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	23160	=	=	18349	=	=	25448	=	=	22736	=	=	20354	=	=
B	19681	=	=	14772	=	=	13198	=	=	18509	=	=	18078	=	=
C	16857	=	=	14325	=	=	13025	=	=	14368	=	=	10707	=	=
D	9925	=	=	10034	12016	12016	11563	=	=	13266	11466	=	10542	=	=
E	6498	=	=	9333	=	=	8285	=	=	10606	=	=	9762	=	=
F	6420	=	=	7210	=	=	7597	7800	=	10152	=	=	6309	=	=
G	4830	=	=	6996	=	=	6623	=	=	9308	=	=	5749	=	=
H	4751	=	=	6399	6300	6300	4333	=	=	9297	=	=	4676	=	=
I	4439	=	=	6104	6250	6250	4077	=	=	2978	=	=	4670	=	=
J	4434	=	=	5511	5450	5450	4061	=	=	2774	=	=	4381	=	=
J'										"-"	2550	2550			
K	3020	=	=	4541	=	=	4008	=	=	2434	"-"	"-"	4191	=	=
K'										"-"	1800	*1800*			
L	2771	2925	=	4294	=	=	3584	=	=	955	=	=	3620	3410	=
M	2094	=	=	2350	=	=	3566	3350	=	874	=	=	2953	=	=
N	2084	=	=	2129	=	=	3284	=	=	579	=	=	2929	=	=
O	1886	=	=	2109	=	=	2283	=	=	265	=	=	2848	=	=
P	1536	=	=	1982	"-"	"-"	1294	=	=	107	=	=	2513	=	=
Q	1504	=	=	1067	=	=	1003	=	=	9	=	=	1365	=	=
R	1488	=	=	895	=	=	456	=	=				1174	=	=
S	1343	=	=	627	=	=	351	=	=				722	=	=
T	456	=	=	180	=	=							620	=	=
U													579	=	=
V													475	650	=
n	20	20	20	20	19	19	19	19	19	17	18	18	22	22	22

La valeur représente la taille estimée en pb. (1)#1346; (2) VG001; VG002; VG003 et VG004 ; (3) VG005. (n) nombre de fragments. ("-") fragment absent. *En italique*: bande submolaire.

Un nouveau fragment de 6 400 pb (H') est présent pour les isolats colombiens dans le profil *Bam*HI, par rapport à l'isolat de référence #1346. Le fragment J de 2 901 pb de

#1346 devient 2 830 pb, et le fragment K semble légèrement plus court (2 750 pb) dans les isolats du sud-ouest et du centre de la Colombie. Le fragment I de 6114 pb est absent dans les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004 (Tableau 3).

Tableau 3. Comparaison des fragments de restriction BstEII, DraIII, BamHI, NdeI et HindIII de l'ADN des isolats colombiens et référence #1346. Les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004, sont mis dans la colonne 2, du fait qu'il n'y a pas de différences parmi eux.

Fragment	**BstEII**			**DraIII**			**BamHI**			**NdeI**			**HindIII**		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	23243	=	=	19485	=	=	29906	=	=	23302	=	=	22634	=	=
B	17886	=	=	16565	=	=	17766	=	=	18456	"-"	=	14177	=	=
C	16610	=	=	14344	=	=	11561	=	=	18165	=	=	10705	=	=
D	12351	=	=	12533	=	=	10577	=	=	9829	9600	=	8969	=	=
E	12281	=	=	12448	=	=	10129	=	=	9010	=	=	7248	=	=
E'										"-"	8950	"-"			
F	7668	=	=	11449	=	=	8725	=	=	8131	=	=	7126	7060	=
G	6590	=	=	11356	=	=	7792	=	=	6746	=	=	6275	=	=
H	6218	6400	=	8409	=	=	7789	=	=	6463	6700	=	5736	=	=
H'							"-"	6400	6400						
I	4614	4450	=	4168	4075	=	6114	"-"	=	5994	=	=	4627	=	=
I'										"-"	5390	"-"			
J	4267	4325	=	3385	3433	=	2901	2830	=	5376	=	=	4020	=	=
J'										"-"	4120	4120			
K	3470	=	=	2494	=	=	2806	2750	=	3348	=	=	3644	3580	=
L	1984	=	=	2096	=	=	943	=	=	1929	=	=	3474	=	=
M	1869	=	=				870	=	=	1342	=	=	3298	=	=
N	166	=	=				712	=	=	1126	=	=	3216	=	=
O							626	=	=				2476	=	=
P													2072	=	=
Q													2036	=	=
R													1449	=	=
S													1441	=	=
T													1266	=	=
U													881	=	=
V													812	=	=
W													791	=	=
X													384	=	=
Y													324	=	=
Z													89	=	=
AA													47	=	=
n	14	14	14	12	12	12	15	15	16	14	16	15	27	27	27

Le profil *Nde*I présente plusieurs différences. Dans les isolats VG001, VG002, VG003 et VG004, le fragment de 18 456 pb (B) est absent et il y a une délétion et une insertion de 230 pb dans chacun des fragments D et H. Deux nouveaux fragments de 8 950 pb (E') et 5 390 pb (I') ont été détectés. Dans tous les isolats colombiens, un nouveau fragment

de 4 120 pb (J') est présent par rapport à #1346 où il est absent (Tableau 3). Des petites délétions sont présentes dans les fragments F et K des isolats VG001, VG002, VG003 et VG004, avec le profil *Hind*III (Tableau 3).

3.2.2. Analyse des 2 zones variables du génome des PhopGV colombiens

L'apparition systématique de bandes submolaires dans les isolats colombiens VG001 et VG005 suggère que ces isolats peuvent être mélangés. Cette hypothèse a été confirmée par PCR et par séquençages. Deux régions ont été ainsi analysées, celle des gènes 90-91 et celle incluant le gène 129, *egt* (ecdysteroid glucosyl transférase). Après amplification par PCR d'un fragment dans la région des gènes 90-91, en utilisant les amorces PhopGV90-1 et PhopGV90-2 (Figure 14), une bande de 787 pb est visible dans l'isolat de référence #1346. Pour les isolats du centre de la Colombie (VG002, VG003 et VG004) ces deux amorces amplifient un fragment de 619 pb. Dans les isolats du sud-ouest (VG001) et nord-est (VG005), deux fragments sont présents, à 787 et 619 pb, dans une proportion de 10-90% et 90-10%, respectivement. Le séquençage montre que la différence entre les bandes 619 et 787 pb est causée par une délétion dans la région de l'ORF 90-91 (Figure 15).

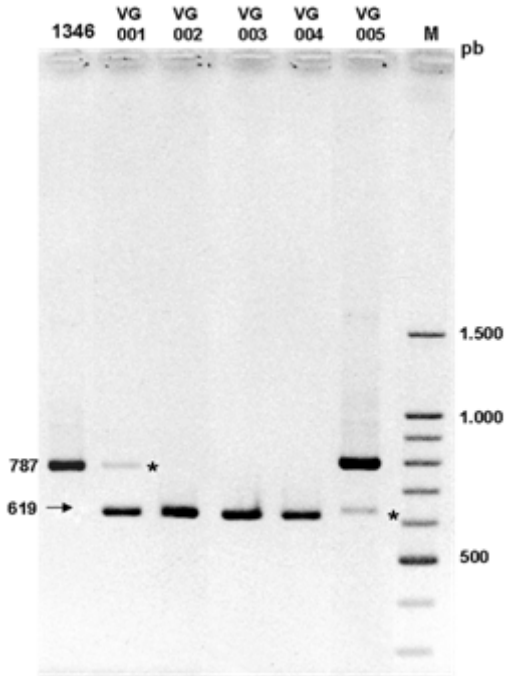

Figure 14. PCR semi-quantitative des isolats colombiens du PhopGV et réfé rence #1346.
M : Marqueur de poids moléculaire.

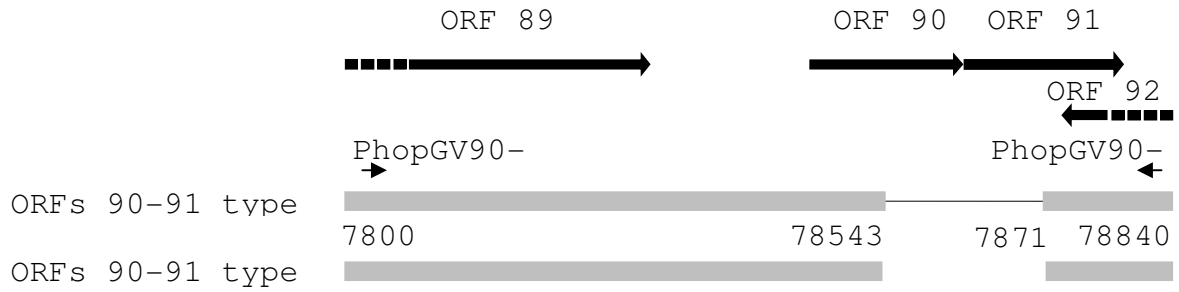

Figure 15. Vue d'alignement des deux polymorphismes trouvés dans la région ORF 90-91. Type 1 correspond à la séquence complète publiée (accession numéro NC004062). Le fragment de 840 pb représenté sur la figure correspond à la région des nucléotides (nt) 78 001 à 78 840 sur la séquence complète.

L'utilisation des amorces PhopGV129-1 et PhopGV129-2 donne des résultats plus complexes. Trois fragments sont générés sur l'isolat #1346. La séquence publiée correspond au fragment le plus grand de 937 pb (région *egt* type 1, Figure 17). Il ne paraît pas le plus abondant sur le gel. Le fragment de 723 pb (région *egt* type 2, Figure 17) correspond à une délétion de 214 pb par rapport au type 1. Le fragment de 569 pb qui est à peine visible sur le gel (Figure 16) correspond à une délétion additionnelle de 154 pb (région *egt* type 4, Figure 17). Tous les isolats colombiens exhibent une bande à 1 023 pb (région *egt* type 3), résultat d'une insertion de 86 pb dans la séquence type 1. De plus, des fragments de faible intensité de 869 pb sont présents, résultat d'une insertion de 86 pb, et d'une délétion de 214 bp par rapport à la séquence de référence (région *egt* type 5, Figure 17). L'isolat VG005 est le seul à présenter le gène *egt* type 2, qui est similaire à celui présent dans l'isolat #1346. Le variant *egt* type 4 est partagée par VG001 et VG005. Ces insertions et délétions sont localisées dans les séquences qui codent pour EGT, soit sur une variation de la capacité de codage de 286 à 450 aminoacides.

3.2.3. Analyse de la pathogénicité des isolats colombiens sur des hôtes alternatifs

Les isolats viraux colombiens VG001, VG003 et VG005, provenant de *T. solanivora* ont été testés sommairement sur les deux hôtes, *T. solanivora* et *P. operculella*. L'isolat VG003 a été choisi car il est caractéristique des isolats du centre du pays et, dans une étude préalable sur *T. solanivora* en Colombie, il a montré des caractéristiques biologiques et technologiques prometteuses (Chaparro *et al.*, 2010). D'après les résultats présentés

dans la section 3.2.1 et 3.2.2, les isolats colombiens, et parmi eux VG001 et VG005, montrent un mélange naturel apparent qui pourrait jouer un rôle important du point de vue de leur capacité à contrôler ces deux teignes. Dans les essais d'activité biologique, on a utilisé l'isolat « Pérou » comme référence, d'après les caractéristiques mentionnées (matériel et méthodes 2.1.2).

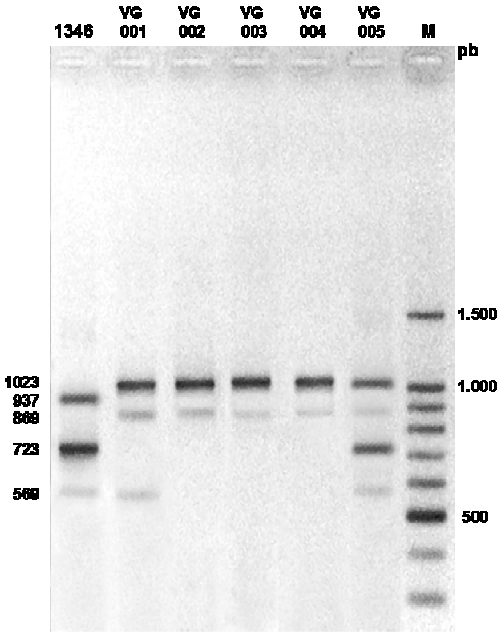

Figure 16. PCR semi-quantitative des isolats colombiens du PhopGV et référence #1346. Gène 129. M : Marqueur de poids moléculaire.

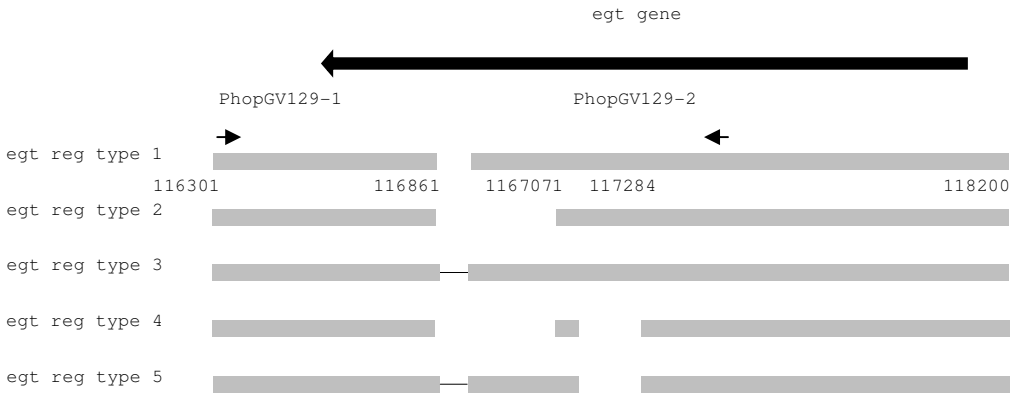

Figure 17. Vue d'alignement des différents variants du gène egt trouvés dans PhopGV. Type 1 correspond à la séquence complète publiée (accession numéro NC004062). Le fragment de 1900 pb représenté sur la figure correspond à la région des nucléotides (nt) 116 301 à 118 200 de la séquence complète.

L'isolat sans mélange apparent, Pérou (isolé sur *P. operculella*) et l'isolat colombien non mélangé naturellement VG003 (isolé sur *T. solanivora*) ont été testés en détail sur les

deux espèces de teignes afin d'analyser l'efficacité du PhopGV sur les hôtes originels et alternatifs. Les valeurs de CL_{50} obtenues sont comprises entre 6,62 OB/mm² et 30,1 OB/mm² et celles obtenues pour les CL_{90} sont comprises entre 258,74 CI/mm² et 13 806,38 OB/mm² (Tableau 4). L'efficacité de l'isolat péruvien est significativement inférieure sur son hôte alternatif *T. solanivora* (χ^2 = 9,89 ; dll= 2 ; P >0,05) ; il n'a pas été possible d'obtenir 100% de mortalité. Les pentes des droites sont considérées parallèles (χ^2 = 2,74 ; dll= 1 ; P < 0,05). Au contraire, l'isolat VG003 est 4 fois plus pathogénique sur l'hôte sur lequel il a été isolé (*T. solanivora*). Sur *P. operculella,* l'efficacité de l'isolat colombien VG003 est 4,5 fois inférieure à celle de l'isolat péruvien (χ^2 = 29,27 ; dll= 2 ; P < 0,05) (Figure 18).

Tableau 4. Activité biologique des isolats Pérou et VG003 sur *T. solanivora* et *P. operculella*. Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté.

Isolat	Nº de OBs/mm² (95% IC)		Pente ± SE	χ^2	ddl	*P*
	CL_{50}	CL_{90}				
VG001 sur *T. solanivora*	1,16 (0,34 – 2,78)	379,30 (141,36-1675,25)	0,51 ± 0,06	0,14	3	0,97
VG001 sur *P. operculella*	4 (2,60 – 6,07)	1265,6 (450,77-5649,6)	0,55± 0,04	0,39	5	0,08
VG003 sur *T. solanivora*	6,93 (4,22 –11,37)	423,64 (191,63-1275,45)	0,71 ± 0,07	1,53	6	0,96
VG003 sur *P. operculella*	26,19 (17,2 – 39,3)	2558,35 (1317,82-5944,00)	0,68 ± 0,04	1,69	5	0,89
VG005 sur *T. solanivora*	1,85 (0,71 – 0,82)	282,07 (116,49-1024,99)	0,58 ± 0,07	0,41	3	0,94
VG005 sur *P. operculella*	0,76 (0,41-1,25)	110,59 (50,41-336,40)	0,62 ± 0,05	0,27	4	0,07
Pérou sur *T. solanivora*	30,1 (15,33 – 63,48)	13806,38 (3468,89-111218,40)	0,48 ± 0,05	3,73	6	0,71
Pérou sur *P. operculella*	6,62 (4,5 – 9,48)	258,74 (155,06-491,42)	0,75 ± 0,10	3,73	3	0,80

Pour les isolats du sud-ouest et nord-est de la Colombie (VG001 et VG005), les valeurs de CL_{50} obtenues sont comprises entre 0,76 OB/mm² et 4 OB/mm² et celles obtenues pour les CL_{90} sont comprises entre 110,59 OB/mm² et 1265,6 OB/mm² (Tableau 4).

Sur *T. solanivora,* les isolats VG001 et VG005 sont significativement différents de l'isolat VG003 (χ^2 = 16,73 ; dll= 4 ; P < 0,05) ou l'isolat péruvien (χ^2 = 55,78; ddl = 4; P < 0,05). L'analyse de puissance montre que ces isolats sont 4 fois et 3,2 fois plus pathogéniques que l'isolat du centre de la Colombie, et 16 et 19,2 fois, respectivement, plus pathogéniques que l'isolat de référence (χ^2 = 1,63; ddl = 2; P < 0,05) (Figure 19).

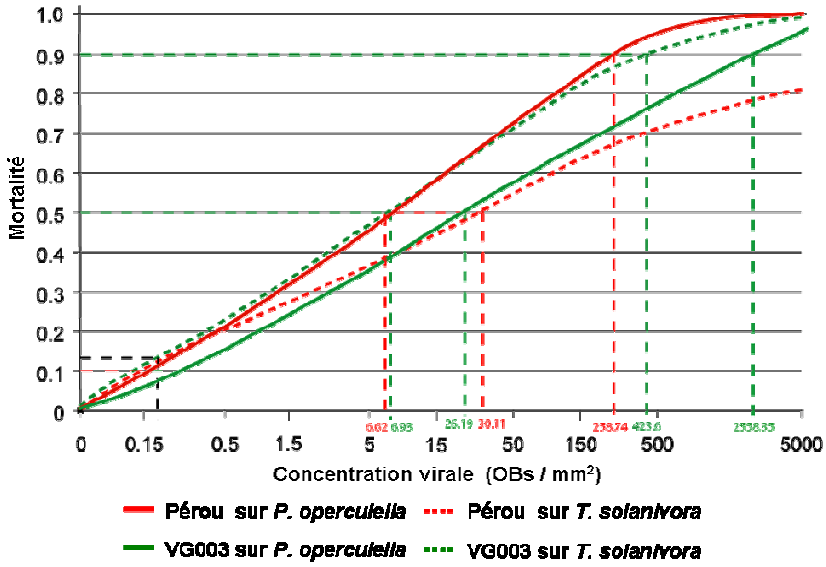

Figure 18. Comparaison de la pathogénicité des isolats Pérou et VG003 sur les hôtes *P. operculella* et *T. solanivora*.

Sur l'hôte *P. operculella*, les isolats colombiens présentent des différences significatives ($\chi^2 = 103$; ddl = 4; $P < 0,05$) ; l'analyse de puissance montre que VG001 et VG005 sont 5,8 et 27,7 fois, respectivement, plus pathogéniques que VG003. Bien que les isolats colombiens ne soient pas isolées de cette teigne, l'efficacité biologique de VG001 et VG005 est significativement supérieure à celle de l'isolat péruvien ($\chi^2 = 40,5$; ddl = 4; $P < 0,05$), en étant 1,3 et 6,2 plus efficace, respectivement (Figure 20).

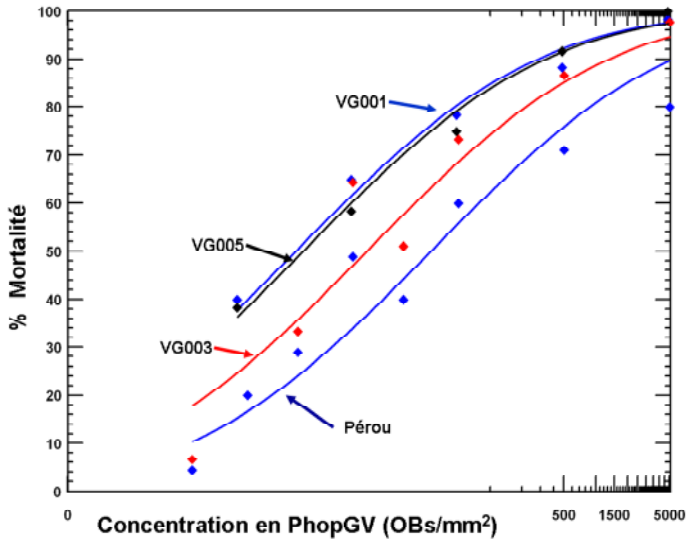

Figure 19. Mortalité en fonction de la concentration en PhopGV colombiens et référence, sur *T. solanivora*.

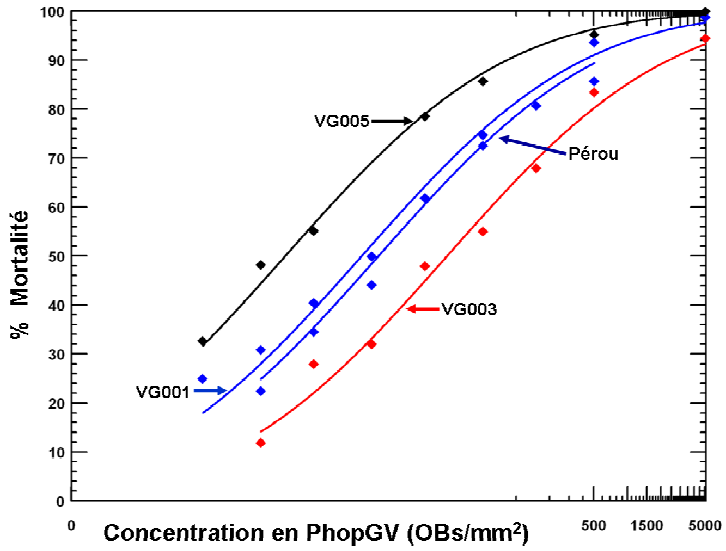

Figure 20. Mortalité en fonction de la concentration en PhopGV colombiens et référence, sur *P. operculell*a.

3.3. Discussion

Les profils de restriction suggèrent que les virus isolés des larves de *T. solanivora* correspondent à des variants génétiques du PhopGV. Tandis que les profils de restriction ont montré des différences parmi les isolats au niveau du génome, le séquençage des deux régions variables a établi que ces isolats sont des mélanges de génotypes viraux. Ainsi, le profil REN observé pour chaque isolat colombien de PhopGV correspond au génotype viral prédominant. Toutefois, l'existence de bandes submolaires a suggéré la présence de génotypes minoritaires, ce qui a été confirmé par le séquençage des amplicons de PCR dans les régions incluant les ORF 90-91 et 129. Cette analyse a permis d'identifier deux marqueurs au niveau de la région 90-91, et cinq marqueurs dans celle de l'ORF 129. Les trois isolats du centre de la Colombie (VG002, VG003 et VG004) sont homogènes en ce qui concerne les marqueurs pour la région 90-91, mais présentent une diversité intrinsèque par rapport à la région 129 : les mêmes deux marqueurs sont présents dans ces isolats. Les isolats du sud-ouest (VG001) et du nord-est (VG005) sont hétérogènes par rapport aux marqueurs de la région 90-91, les proportions respectives de ces marqueurs sont inversées dans les deux isolats. En ce qui concerne les marqueurs de la région 129, les isolats VG001 et VG005 sont plus divers que ceux du Centre de la Colombie (3 et 4 marqueurs présents, respectivement).

La variabilité génotypique dans les populations de baculovirus a été étudiée par plusieurs auteurs (Shapiro *et al.,* 1991 ; Muñoz et Caballero, 2001 ; Erlandson, 2009). Elle est observée sur des virus isolés à partir de populations d'insectes géographiquement distantes, mais on peut la trouver aussi sur une même localisation (van Oers et Vlak 2007). Takatsuka *et al.,* (2003) rapporte des différences génotypiques dans des NPVs isolés de *Spodoptera litura* (SpltNPV) dans des populations d'insectes au Japon, au Viêt-Nam, en Malasie et en Inde. Ebling et Kaupp (1995) ont caractérisé 6 isolats géographiques de *Malacosoma disstria* NPV (MadiNPV) de populations différentes. Bien que toutes aient des profils REN apparentés, trois isolats contiennent plusieurs variants génotypiques si l'on se base sur la présence de fragments de restriction submolaires. Il existe de nombreuses études de NPVs associés avec des lépidoptères ravageurs de systèmes forestiers qui montrent des tendances similaires avec de multiples souches de NPV isolées de populations géographiquement différentes.

La diversité génétique peut également se retrouver au sein d'un seul individu hôte, comme dans le cas du NPV de *Panolis flamea* (Lepidoptera : Noctuidae) (PaflNPV), où le clonage sur un individu a permis d'isoler 24 génotypes différents (Cory *et al.,* 2005).

De la même manière, dans un échantillonnage sur des populations de la teigne d'hiver *Operophtera brumata* (Lepidoptera : Geometridae) aux îles Orkney (Ecosse), Graham *et al.,* (2004) ont détecté Operophtera brumata nucleopolyhedrovirus (OpbuNPV) pour 11 des 13 populations examinées ; ils ont identifié 26 variants génotypiques dans ces populations, mais chaque larve n'est infectée que par un seul variant. Dans un autre cas, l'isolation de NPV à partir de collections de larves individuelles de *Malacosoma californicum pluviale* (Lepidoptera : Lasiocampidae) dans des populations géographiquement isolées, montrent 14 variants génétiques parmi 48 isolats (Cooper *et al.,* 2003).

Chez les NPV la variabilité est plus commune que chez les GV. De plus, chez les MNPV, la présence de plusieurs génomes à l'intérieur même du virion facilite encore cette variabilité. L'encapsidation et l'enveloppement multiples permettent l'infection

de chaque larve par un échantillon plus représentatif de la population d'origine, tout en préservant une multiplicité d'infection réduite au niveau de la particule physique (le corps d'inclusion, OB).

Chez les granulovirus (GVs), la variabilité semble être plus faible, car il n'existe pas d'encapsidation multiple, sauf quelques exceptions (Falcon et Hess, 1985 ; Vargas-Osuna *et al.*, 1994) ; néanmoins, des études montrent la variabilité entre populations d'une même espèce de GV isolée chez un même hôte ou chez des hôtes différents. Une diversité génétique à l'intérieur d'une larve implique la rencontre avec plusieurs OB et le succès dans l'infection par les virions qu'ils contiennent.

Bien que les granulovirus soient souvent considérés comme ayant un spectre d'hôtes restreint, Goto *et al.*, (1992) ont montré que des GVs isolés sur six espèces de Noctuides sont des variants du granulovirus de *Xestia c-nigrum* (XecnGV) avec des changements minimes dans les profils REN. Chacune de ces variants s'avère pathogène pour les larves de *X. c-nigrum*.

Crook *et al.*, (1985), à partir de sept isolats géographiques de *Cydia pomonella* GV (CpGV) de différentes régions du monde, ont trouvé très peu de variabilité ; la plupart correspondent à l'isolat mexicain (CpGV-M) et celui-ci diffère peu d'un isolat russe (CpGV-R) et d'un anglais (CpGV-E). Néanmoins, Eberle *et al.*, (2009), ont caractérisé neuf isolats de CpGV. Les génotypes observés ont été classifiés en quatre grands groupes. Le groupe le plus abondant étant CpGV-M et des variants de CpGV–E. Un quatrième groupe a été identifié. Les quatre génotypes principaux décrivent la diversité génétique de CpGV et quelques isolats géographiques semblent comporter différents mélanges de ces génotypes.

Crook (1986), a identifié au moins 11 variants génotypiques basés sur les profils REN provenant de 15 isolats géographiques du granulovirus d'*Artogeia rapae* (ArGV). Pour deux isolats, des bandes submolaires sont présentes, suggérant de multiples variants génotypiques.

Parnel *et al.,* (2002), ont analysé 14 isolats du granulovirus de *Plutella xylostella* (PlxyGV) provenant de différentes régions du Kenya. Bien que des similarités aient été présentes, les profils ont révélé entre 2 et 6 grandes différences de bandes parmi les isolats, voire pour des isolats collectés dans le même lieu.

Sur les granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV), divers travaux ont été réalisés. Vickers *et al.,* (1991), ont identifié trois variants génotypiques parmi huit isolats géographiques. Léry *et al.*, (1998), après d'une analyse d'isolats de différentes régions du monde, ont trouvé trois variants génotypiques. Zeddam *et al.,* (1999), après un échantillonnage dans différentes régions de l'Indonésie, ont trouvé trois isolats ayant des différences génotypiques minimales entre eux et par rapport à l'isolat Tunisien de référence.

P. operculella a été la principale teigne de la pomme de terre établie dans l'ouest de l'Amérique du Sud (Colombie comprise) avant l'invasion de *T. solanivora* en 1985 (Pollet *et al.,* 2003). Les isolats de PhopGV qui se trouvent dans la région devaient donc être adaptés à *P. operculella*. L'invasion par la teigne du Guatemala *T. solanivora* a probablement fait suite à un ou plusieurs évènements d'introduction provoqués par des vecteurs humains (commerce de semences infestées) (Puillandre, 2007). Sa dispersion vers le Sud peut être retracée dans une perspective temporelle, depuis le Venezuela vers la Colombie.

D'après Sakai *et al.,* (2001), les espèces invasives -et on peut considérer *T. solanivora* comme espèce invasive colonisatrice-, doivent avoir une agressivité accrue (Lee, 2002) pour exploiter les ressources disponibles, en provoquant soit la cohabitation, soit le déplacement des espèces natives. L'invasion de *T. solanivora* a du produire ces effets sur les populations établies de *P. operculella*.

Des populations de PhopGV adaptées à *P. operculella* ont du être soumises à des pressions de sélection pour permettre leur réplication sur *T. solanivora*. L'évolution de ces populations virales dépendra du devenir de chacune des espèces hôtes. Ainsi,

comme les deux espèces coexistent dans quelques régions, une évolution et une sélection de populations virales ou de variants génotypiques permettant à la population virale de s'adapter et de se répliquer dans les deux hôtes a pu survenir. Dans d'autres régions, par contre, l'élimination de *P. operculella* doit s'accompagner d'une adaptation du virus au nouvel hôte, avec perte possible de la capacité de réplication sur ce premier hôte. De plus, cette adaptation doit être fonction de la période de contact avec *T. solanivora*. Sous cette hypothèse, les populations virales les plus proches du Venezuela devraient être les plus adaptées à *T. solanivora*.

Le principal endroit de production de pomme de terre en Colombie est la région centrale du pays, laquelle est caractérisée par un échange commercial avec d'autres zones de production, principalement un commerce de semences du tubercule. Tous les virus isolés dans le centre de la Colombie sont similaires entre eux, mais sont différents du PhopGV de référence #1346. Dans les deux autres isolats (VG001 et VG005), le mélange de génotypes a été prouvé, puisqu'on retrouve deux profils génotypiques, le premier similaire au profil du PhopGV de référence #1346 et le deuxième similaire aux profils trouvés dans le centre de la Colombie (isolats VG002, VG003 et VG004).

Il est important de signaler que chaque isolat colombien provient d'un seul échantillon larvaire. De ce fait, l'observation de la présence de mélanges de génotypes peut suggérer l'existence d'interactions co-évolutives parmi les différents variants de PhopGVs dans leurs hôtes, comme cela a été décrit pour certains NPVs (López-Ferber *et al.*, 2003).

La seule relation trouvée entre les génomes des différents isolats (analysés par des profils de restriction et par séquençage des fragments de PCR) et leur pathogénicité sur chaque hôte, est l'insertion de 86 pb dans le gène *egt* sur tous les isolats colombiens. L'isolation de variants purs à partir de ces populations virales, suivie d'une analyse des paramètres d'efficacité biologique de chaque variant est techniquement hors de porté à ce jour. Par conséquent, on ne peut pas conclure à un lien de cause à effet direct entre cette insertion et la capacité à infecter cet hôte alternatif. La déduction d'une telle relation à partir de la corrélation observée est sujette à caution puisque le nombre de

variants analysés est relativement faible.

Des différences en efficacité virale sur les deux hôtes ont été trouvées entre VG003 et VG005, et ces isolats diffèrent pour 10 enzymes testés. Mais à l'inverse, des différences en pathogénicité ont été trouvées entre VG001 et VG003 bien que ces isolats présentent des profils REN similaires. Donc, les différences d'activité biologique peuvent avoir des origines multiples, probablement dues à des mutations ponctuelles qui ne peuvent pas être révélées par les profils de restriction de l'ADN viral. De même, VG001 et VG003 sont similaires dans les régions séquencées, et diffèrent seulement par l'absence de l'egt type 4 dans VG003.

L'augmentation de la pathogénicité sur *T. solanivora* que VG003 isolé de *T. solanivora* présente par rapport à celle de l'isolat péruvien, provenant de *P. operculella*, et vice versa, confirme des études préalables qui indiquent qu'un PhopGV isolé de *P. operculella* qui n'a pas eu de contact préalable avec *T. solanivora*, a une pathogénicité inférieure sur cet hôte alternatif (Rebaudo *et al.*, 2006). Ce phénomène a été observé chez les NPVs. Par exemple, le MNPV d'*Anticarsia gemmantalis* (AgMNPV), en plus d'infecter la teigne *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), est capable d'infecter d'autres espèces comme *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae); mais sur cet hôte alternatif, la pathogénicité est significativement inférieure (Ribeiro *et al.*, 1997). La pathogénicité de VG003 est complémentaire de celle de l'isolat Pérou pour les deux hôtes, (environ 6 pour l'hôte original, et 27 pour l'hôte hétérologue), ce qui suggère que VG003 est bien adapté à *T. solanivora*.

VG001 et VG005 sont les isolats viraux les plus pathogéniques et ont été isolés dans des endroits où les deux hôtes sont présents. Ils apparaissent comme des mélanges génotypiques. L'infection par des génotypes multiples d'un pathogène peut générer une compétition entre ces génotypes et permettre une exploitation plus rapide des ressources de l'hôte par l'un des génotypes, qui peut entrainer une pathogénicité accrue (Frank, 1996).

Au contraire, leur pathogénicité supérieure pourrait être due à des interactions coopératives entre génotypes pouvant aboutir à une meilleure exploitation des ressources entrainant une augmentation du pouvoir pathogène et de la productivité virale (Hodgson *et al.,* 2004). Ce type d'association a été observée chez le MNPV de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae), où le mélange de deux génotypes peut être plus efficace que les seuls génotypes clonés (López-Ferber *et al.,* 2003 ; Simon *et al.,* 2006). Dans ce cas précis, l'un des génotypes, défectif, est incapable d'infecter la larve en absence d'un génotype « complet », et pourtant, sa présence est nécessaire pour avoir une efficacité maximale au niveau de la population virale (Clavijo *et al.,* 2009).

L'utilisation d'isolats génétiquement homogènes ou de clones peut favoriser le développement de résistance, par rapport à l'utilisation de mélanges génotypiques naturels ou élaborés en laboratoire. Par exemple, l'isolat Mexicain génétiquement homogène du *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) a été utilisé fortement dans des vergers en Europe pour contrôler le carpocapse *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera:Tortricidae). Récemment, des phénomènes de résistance en conditions de champ ont été décrits dans différentes régions, et la recherche de nouvelles souches pour le contrôle de cette résistance a été entreprise (Asser-Kaiser *et al.,* 2007 ; Berling *et al*., 2009).

Les deux isolats ayant une adaptation « optimale » à leur hôte, l'isolat Pérou pour *P. operculella* et l'isolat VG003 pour *T. solanivora*, ne sont pas ceux qui présentent, même pour ces hôtes, les pathogénicités maximales. Dans une perspective d'utilisation industrielle, une réduction de la quantité du virus nécessaire pour contrôler de façon satisfaisante (diminuer les dommages au delà du seuil de nuisance économique) est un objectif. Dans le cas étudié, les isolats VG001 ou VG005 ont, pour les deux hôtes, des efficacités supérieures à VG003 ou Pérou. Ceci est vrai pour les DL_{50}, mais plus encore pour les DL_{90}, qui fournissent une approximation plus réaliste des doses nécessaires en champ. De plus, VG001 et VG005 contrôlent les deux hôtes à la fois, ce qui les rend *a priori*, prometteurs pour le développement d'un agent de contrôle biologique. Une telle activité a, sans doute, des conséquences sur d'autres paramètres du cycle viral. Ils

seront étudiés dans les chapitres suivants.

3.4. Conclusion

La variabilité génétique chez PhopGV est évidente dans les isolats provenant de différents pays du monde. D'après les profils trouvés, très proches du *Phthorimaea operculella granulovirus* de référence (#1346), les isolats colombiens peuvent être considérés comme des variants du PhopGV.

Les analyses génétiques et biologiques montrent l'existence d'une diversité génétique importante chez les PhopGV colombiens. Tous les isolats sont composés de plusieurs variants génotypiques. La pathogénicité induite sur les deux hôtes est différente en fonction de l'isolat considéré. Néanmoins, on ne peut pas conclure qu'il existe une corrélation directe entre la variabilité du génome et l'efficacité.

VG003 semble être le virus le plus adapté à *T. solanivora*, car lorsqu'on le teste sur *P. operculella* l'efficacité se réduit significativement. Les isolats VG001 et VG005 sont les plus prometteurs pour les utiliser comme ingrédients actifs d'un biopesticide, ils sont très actifs sur les deux hôtes testés.

Chapitre 4 : Evolution de l'activité biologique et de la composition génétique des mélanges génotypiques

4.1. Introduction

D'après les résultats du chapitre 3, on constate que les isolats colombiens de PhopGV recueillis en 2004 sur des larves de *T. solanivora* présentent une variabilité génotypique et phénotypique détectable par des analyses du génome (RFLP ou séquençage) et par la mesure de leurs efficacités biologiques sur les deux hôtes, *T. solanivora* et *P. operculella*. Jusqu'aux années 1990, *T. solanivora* n'était pas présente en Colombie. C'est depuis que cette teigne s'est introduite à partir du Venezuela, et s'est propagée du Nord vers le Sud. L'isolat « Pérou », tout comme l'isolat de référence #1346, ont été recueillis sur des larves de *P. operculella* dans des régions ou *T. solanivora* n'est pas présente. Ces deux isolats, bien adaptés à *P. operculella*, présentent une faible efficacité contre *T. solanivora*. En contraste, l'isolat VG003, du centre de la Colombie, semble plus adapté à *T. solanivora* qu'à *P. operculella*. En effet, son efficacité sur ce dernier hôte est très faible. Les isolats VG001 et VG005 sont efficaces sur les deux hôtes, mieux que « Pérou » et VG003 sur leur hôte de préférence.

L'adaptation des populations virales à des nouveaux hôtes est un processus de sélection naturelle avec un cycle temporal rapide, ce qui nous permet de suivre ces processus « en direct ». De plus, comme leurs hôtes sont petits, il est possible de répliquer les expériences, en faisant varier les conditions expérimentales, permettant ainsi le test d'hypothèses de sélection. Dans le cas d'étude qui nous occupe, l'invasion de l'Amérique du Sud, et plus particulièrement de la Colombie, par *T. solanivora* doit nous permettre de suivre ces processus d'adaptation sur le terrain, puis d'essayer de les reproduire en laboratoire.

Plusieurs facteurs pourraient déterminer l'adaptabilité des génotypes aux hôtes, des mutations, des recombinaisons ou l'acquisition de matériel génétique. Cette variabilité sera filtrée par la pression de sélection (dans notre cas, la capacité à se multiplier sur un

hôte donné pour aboutir à une évolution et une sélection des génotypes plus adaptés).

Dans le chapitre précédent, nous avons pu démonter que les populations virales isolées en Colombie sont constituées de plusieurs génotypes. Il a été observé auparavant que les génotypes présents dans une population virale peuvent interagir, au delà des processus de génération de nouveaux variants génétiques par recombinaison. Ces interactions, positives (synergisme) ou négatives (compétition) peuvent avoir comme conséquence une modification de l'efficacité globale de la population dans sa réplication sur un hôte donné, et une modification sur les fréquences relatives de chacun des génotypes viraux présents.

Dans ce chapitre, nous progresserons dans l'étude de l'interaction pathogène-hôte en nous centrant sur ces processus de sélection, au moyen de l'analyse de la dynamique de la descendance virale à la suite des cycles de réplication sur l'un, l'autre ou les deux hôtes, des populations virales contenant naturellement un mélange de génotypes (VG001 et VG005) et de populations artificielles, obtenues par mélange de génotypes adaptés à chaque espèce d'insecte (Pérou et VG003) en proportions différentes.

4.2. Résultats

4.2.1. Evolution des isolats colombiens mélangés naturellement sur les hôtes *P.* operculella et *T. solanivora*

4.2.1.1. Efficacité des mélanges naturels sur larves de *P. operculella*

L'activité biologique de l'isolat VG001, contenant un mélange de génotypes est variable au cours des cycles de réplication sur *P. operculella*, mais toujours supérieure à celle de l'isolat Pérou, trouvé originellement sur cet hôte (χ^2 = 78,5 ; ddl= 6 ; P< 0.05) (Tableau 5). Il existe une variation au cours des passages sur l'hôte *P. operculella*, mais aucune tendance ne se dégage clairement. La figure 21 représente graphiquement ces mêmes données. Il est ainsi possible de s'apercevoir de la dispersion relative des résultats. Lors du second passage, VG001 apparait comme beaucoup plus actif; sa puissance relative par rapport à l'isolat Pérou est de 26,48 fois. Les passages 1 et 3 donnent des puissances de 1,6 à 3 fois. Les limites de confiance des CL_{50} de ces deux passages se superposent. Si on compare ces isolats au niveau des CL_{90}, ces tendances n'apparaissent plus. L'isolat

Pérou est celui qui a la plus forte activité, avec 259 OB/mm². (Tableau 5). Toutefois, les ajustements obtenus révèlent la différence claire entre le passage 2 (P2) et le reste des essais. Nous n'avons pas d'explication pour l'extrême pathogenicité du passage 2. Il n'a pas été possible de répéter cette expérience, et donc de confirmer qu'il ne s'agit pas d'un artefact expérimental.

L'efficacité de l'isolat VG005 au cours des passages sur *P. operculella* montre aussi des différences significatives par rapport à l'isolat Pérou (χ^2 = 56,7 ; ddl= 6 ; P<0.05). La variation entre passages est moins importante que dans le cas précédent, et l'analyse statistique détecte des différences significatives (χ^2 = 22,71; ddl= 4 ; P<0.05) (Figure 22). Dans ce cas, on observe une (faible) perte graduelle d'efficacité au cours des passages. Le P1 du VG005 est 8,7 fois, le P2 est 4,5 fois et le P6 est 3,6 fois plus pathogène que l'isolat de référence, tant au niveau global qu'au niveau des CL50 ou CL90 (Tableau 5).

Tableau 5. Activité biologique au cours des passages des isolats mélangés naturellement VG001 et VG005, et des isolats VG003 et Pérou sur *P. operculella*. Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté.

Isolat	Nº d'OBs/mm² (95% IC)		Pente ± SE	X^2	ddl	*P*
	CL_{50}	CL_{90}				
VG001 P1	4 (2,38 – 6,6)	1265,6 (450,77 - 5649,6)	0,558 ± 0,046	0,39	5	0,99
VG001 P2	0,25 (0,07 – 0,67)	8219,9 (954,5 - 309700)	0,330 ± 0,020	1,31	5	0,92
VG001 P6	2,18 (1,10 – 4,58)	5715,6 (1207,4 - 54982)	0,401 ± 0,032	2,0	5	0,81
VG005 P1	0,76 (0,36 – 1,37)	110,6 (50,4 – 336,4)	0,620 ± 0,060	0,27	5	0,99
VG005 P2	1,46 (0,71 – 3,07)	2722,2 (611,4 - 24242)	0,429 ± 0,02	4,04	5	0,79
VG005 P6	1,91 (1 – 3,77)	3940,7 (940,92 - 30772)	0,419 ± 0,033	1,56	5	0,98
VG003	26,1 (17,2 – 39,3)	2558,35 (1317,82 - 5944,00)	0,680 ± 0,040	1,69	5	0,89
Pérou	6,62 (4,5 – 9,48)	258,74 (155,06-491,42)	0,75 ± 0,10	3,73	3	0,803

Indépendamment des variations observées au cours des passages pour ces isolats, il est intéressant de remarquer que les différences d'efficacité présentes dans le premier passage s'estompent au bout de 6 passages. Dans la Figure 23c on voit la superposition parfaite des courbes de réponse.

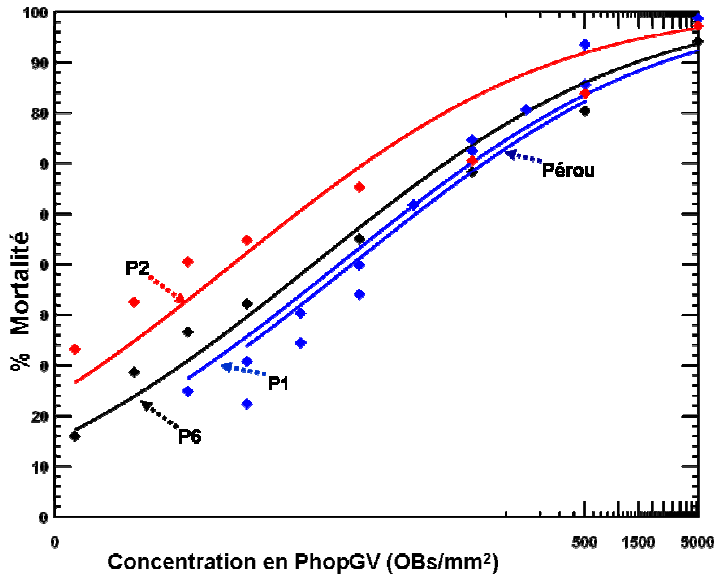

Figure 21. Activité biologique des passages de l'isolat VG001 et de l'isolat Pérou, appliqués sur *P. operculella*. P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P6 : Passage 6.

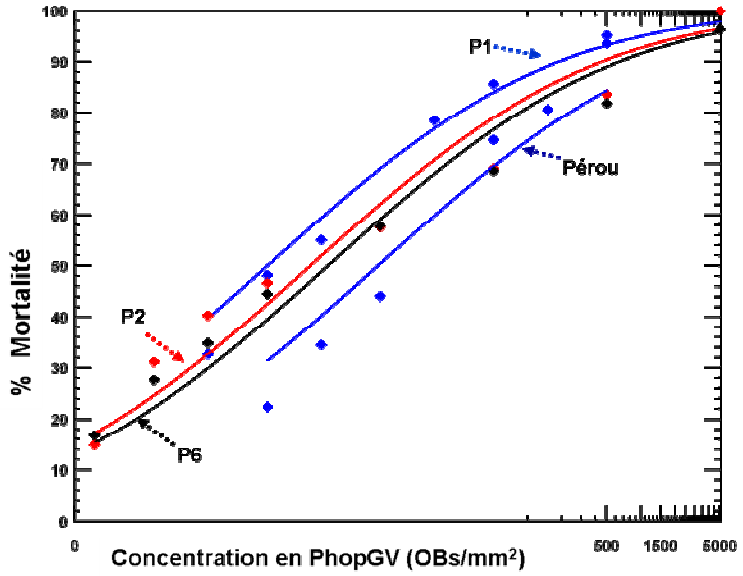

Figure 22. Activité biologique des passages de l'isolat VG005 et de l'isolat Pérou, appliqués sur *P. operculella*. P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P6 : Passage 6.

Si ces résultats sont le reflet de la réalité, et non dues à la variabilité des essais biologiques, nous observons en direct un ajustement à l'un des hôtes possibles de deux populations avec le même potentiel (à terme, leur efficacité est similaire), mais avec des histoires différentes.

4.2.1.2. Efficacité des mélanges naturels sur larves de *T. solanivora*

A cause de problèmes logistiques difficiles à surmonter, l'activité biologique des isolats mélangés naturellement n'a été déterminée que sur le premier passage. L'analyse des proportions génotypiques a été faite à partir des amplifications. Comme conséquence, nous n'avons pas pu analyser si les comportements observés sur *P. operculella* sont inversés sur cet hôte -ce qui tendrait à prouver une hypothèse de différence d'adaptation- ou pas. La poursuite de ce travail est l'un des programmes à réaliser dans le futur.

L'activité biologique des isolats VG001 et VG005 a présenté des différences significatives par rapport aux isolats VG003 (théoriquement plus adapté à cet hôte) et Pérou (χ^2 = 45,7 ; ddl= 6 ; P<0.05) (Tableau 6 ; Figure 24). Mais entre VG001 et VG005 on ne met pas en évidence de différence significative (χ^2 = 0,73 ; dll= 2 ; P = 0.696). Les pentes des droites sont considérées parallèles (χ^2 = 4,68 ; dll= 3 ; P = 0.196) et l'analyses de puissance permet d'établir que les isolats VG001 et VG005 sont 5,8 et 3,6 fois significativement plus pathogéniques que VG003, respectivement (χ^2 = 17,5 ; dll= 4 ; P = 0.002). Comme indiqué plus haut, l'isolat Péruvien, qui n'avait pas été en contact avec *T. solanivora*, montre une efficacité inférieure sur cet hôte (Tableau 6).

Tableau 6. Activité biologique des isolats VG001, VG005, VG003 et Pérou sur *T. solanivora*. Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté.

Isolat	Nº d'OBs/mm² (95% IC)		Pente ± SE	X^2	ddl	*P*
	CL_{50}	CL_{90}				
VG001 P1	1,19 (0,28 – 3,0)	1265,6 (450,77 - 5649,6)	0,553 ± 0,056	0,14	3	0,96
VG005 P1	1,91 (0,62 – 4,18)	459,2 (146,4 – 3315,8)	0,520 ± 0,061	0,41	3	0,94
Pérou	30,11 (18,66 –50,28)	13806,38 (4950,04 – 54299,4)	0,482 ± 0,039	3,73	6	0,71
VG003	6,93 (4,89 – 9,80)	423,64 (236,25 – 883,72)	0,718 ± 0,049	1,53	6	0,96

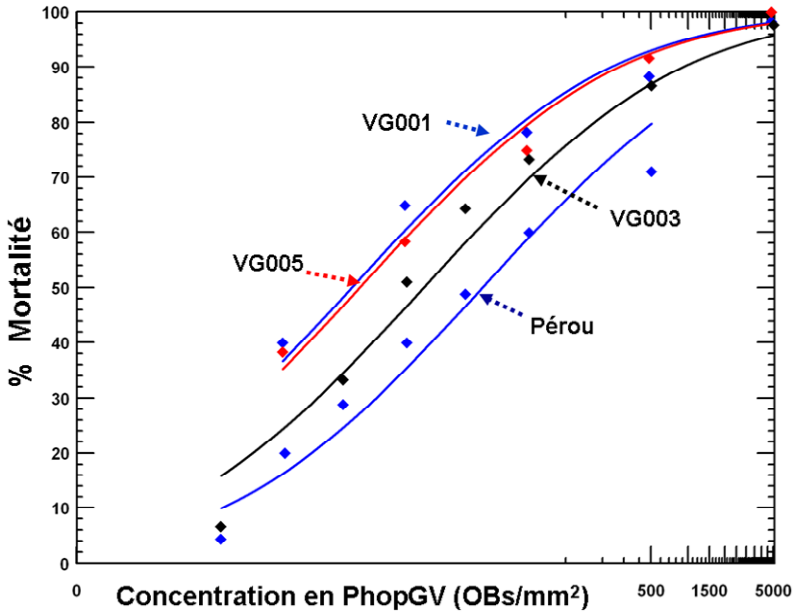

Figure 24. Comparaison de l'activité biologique des isolats VG001 et VG005 sur *T. solanivora*.

4.2.1.3. Composition génotypique des mélanges naturels sur larves de *P. operculella* et *T. solanivora*

Sur les isolats VG001 et VG005, les proportions relatives de chaque marqueur génotypique ont été estimées sur les deux hôtes à partir de l'analyse densitométrique des amplicons de PCR avant la phase de saturation. D'après l'analyse des gènes 90-91 réalisée dans le Chapitre 3 (Figure 14), l'isolat VG001 (du sud-ouest de la Colombie) est mélangé naturellement avec une proportion de 10% du marqueur présent dans le génotype de référence #1346 et dans l'isolat Pérou et 90% du marqueur présent dans le génotype commun à tous les isolats du centre de la Colombie (représenté par VG003). En revanche, l'isolat VG005 (du nord-est de la Colombie) présente un mélange inverse, avec une proportion de 90% du marqueur du génotype de référence et 10% du marqueur du génotype typiquement colombien.

Nous avons essayé de voir s'il y avait une corrélation entre les fréquences de ces marqueurs dans les populations virales, mais aussi entre ces fréquences et l'efficacité des populations sur chacun des hôtes.

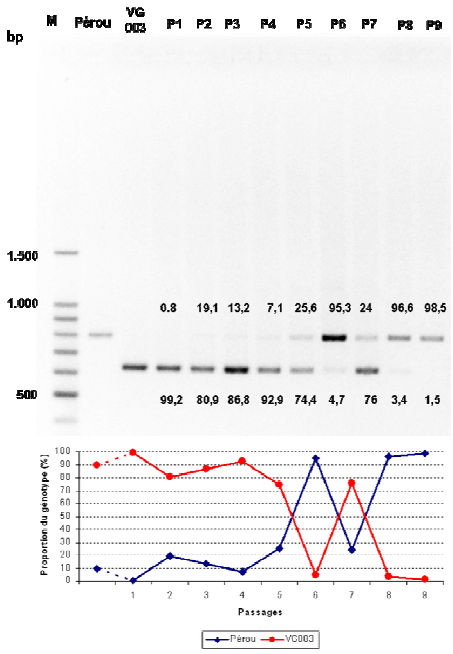

Figure 25. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

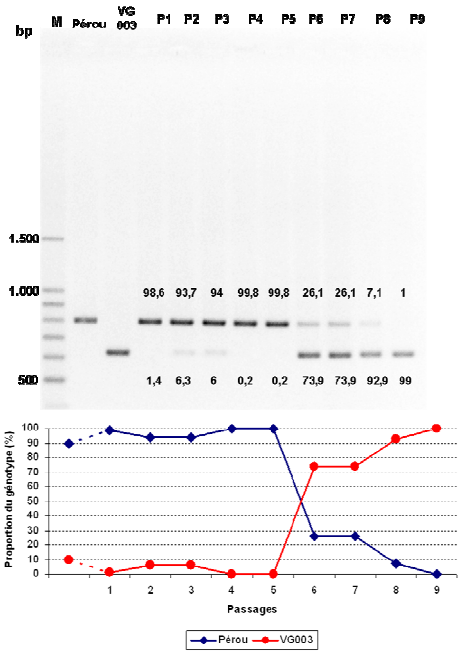

Figure 26. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*.
M : Marqueur ; P : Passage.

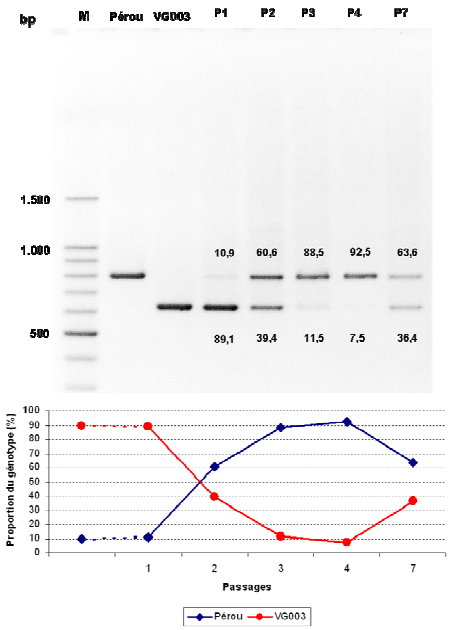

Figure 27. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage.

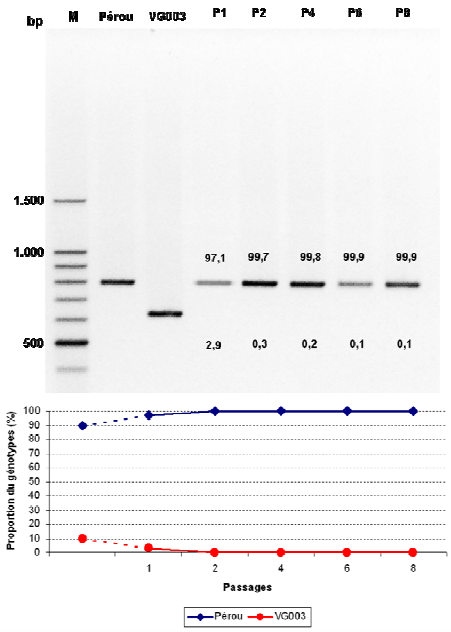

Figure 28. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage.

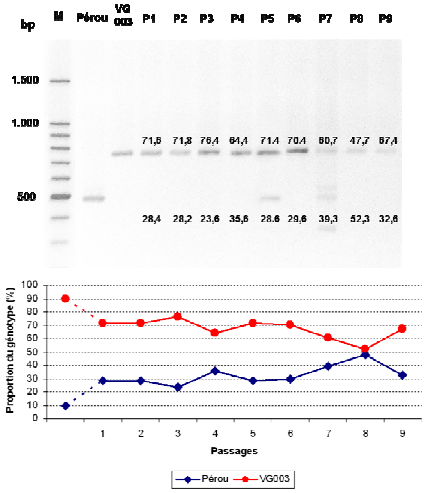

Figure 29. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

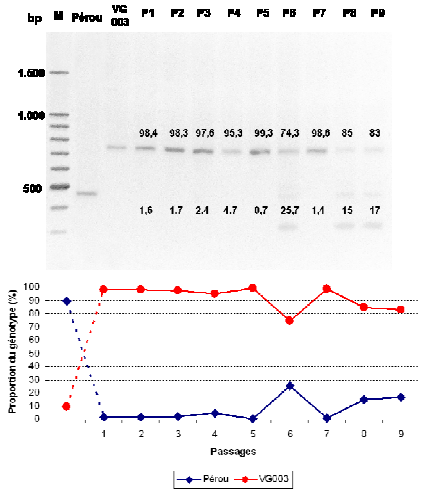

Figure 30. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

A cette fin, nous avons analysé les deux marqueurs sur les deux populations, amplifiés sur les deux hôtes. Les figures 25 à 32 montrent les résultats obtenus. Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les différentes variables étudiées (nombre de passages, efficacité biologique, hôte de multiplication).

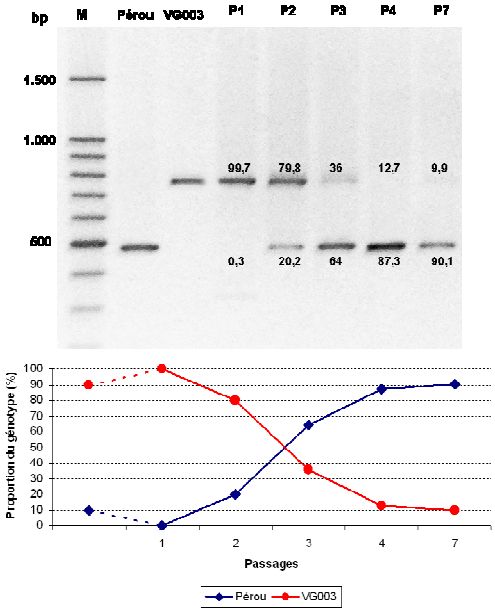

Figure 31. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG001 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage.

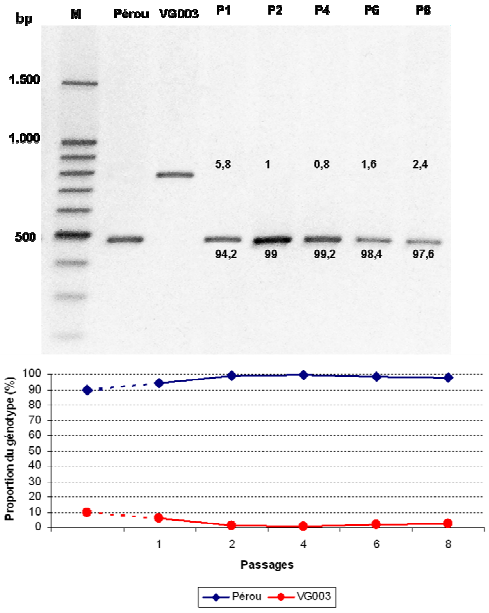

Figure 32. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication de l'isolat VG005 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage.

La fonction des gènes 90-91 n'a pas été déterminée. Par contre, le gène 129 a des homologues dans la plupart des baculovirus, l'*egt*, pour ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. L'enzyme codifiée par ce gène agit au niveau de la larve infectée en détruisant l'ecdysone, hormone de la mue. Une variabilité dans ce gène pourrait se traduire par une modification dans le mode d'action du virus. Cet effet a été à l'origine de la découverte du gène chez AcMNPV (O'Reilly et Miller, 1989).

4.2.2. Evolution de l'activité biologique et composition génotypique des populations expérimentales

Pour essayer de mimer les isolats VG001 et VG005, des populations expérimentales ont été construites à partir des isolats viraux Pérou et VG003, en les mélangeant en trois proportions différentes sur des larves des deux hôtes *P. operculella* et *T. solanivora*, afin d'analyser l'effet de ces mélanges sur l'activité biologique. Pour étudier une éventuelle adaptation à un ou l'autre des hôtes, qui serait reflétée par la modification de l'efficacité virale, des passages successifs sur les deux hôtes ont été réalisés.

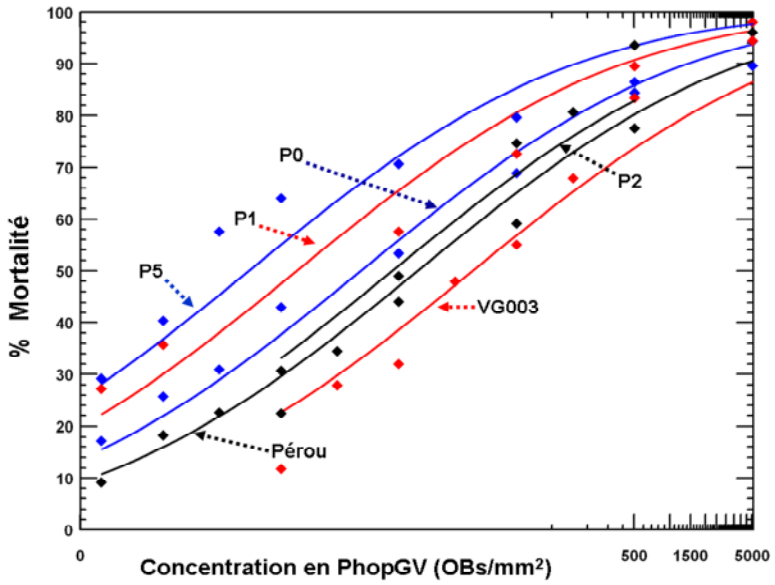

Figure 33. Activité biologique des passages de la population 10 : 90, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *P. operculella*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5.

Tableau 7. Activité biologique au cours des passages des populations expérimentales sur *P. operculella*. Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté.

Population	Nº d'OBs/mm² (95% IC)		Pente ± SE	X^2	ddl	*P*
	CL_{50}	CL_{90}				
Pérou	6,62 (4,5 – 9,48)	258,74 (155,05 - 491,42)	0,75 ± 0,10	3,73	3	0,80
VG003	26,19 (17,2 – 39,3)	2558,35 (1317,82 - 5944,00)	0,68 ± 0,04	1,69	5	0,89
10/90 P0	2,36 (1,13 – 4,93)	3837,79 (1016,30 – 24413,73)	0,399 ± 0,03	0,86	6	0,99
10/90 P1	0,57 (0,13 – 1,19)	764,25 (148,50 – 9767,19)	0,410 ± 0,03	1,39	4	0,84
10/90 P2	7,15 (5,10 – 18,3)	8770,16 (2032,04 – 71614,92)	0,431 ± 0,04	1,17	6	0,97
10/90 P5	0,16 (0,04 – 0,45)	738,62 (120,17-18166)	0,351 ± 0,03	2,9	6	0,82
50/50 P0	1,23 (0,41 – 2,60)	164,55 (77,11 - 510,05)	0,603 ± 0,05	2,53	6	0,86
50/50 P1	0,53 (0,22 – 1,17)	275,37 (80,89 - 1609,30)	0,472 ± 0,03	5,26	6	0,51
50/50 P2	0,91 (0,34 – 2,26)	999 (232,277 – 8969,22)	0,422 ±0,03	2,77	6	0,84
50/50 P5	1,48 (0,82 – 2,67)	1447,28 (509,864 – 5689,75)	0,429 ± 0,03	1,05	6	0,98
90/10 P0	0,28 (0,12 – 0,55)	182,77 (68,32 – 690,35)	0,456 ± 0,04	0,23	6	0,99
90/10 P1	0,30 (0,14 – 0,57)	164,21 (70,33 – 492,09)	0,470 ± 0,031	0,36	6	0,99
90/10 P2	0,10 (0,03 – 0,24)	362,57 (93,84 – 2748,62)	0,362 ± 0,042	0,21	5	0,99
90/10 P5	0,43 (0,14 – 1,10)	12714 (1512,3 – 466960)	0,346 ± 0,035	2,49	5	0,87

La population 10 :90 (10% Pérou : 90% VG003) est équivalente à VG001 dans les proportions des marqueurs génotypiques. La population 90 :10 (90% Pérou : 10% VG003), correspond à VG005. Finalement, une troisième population, de composition intermédiaire, 50 :50 a été construite.

4.2.2.1. Efficacité des populations expérimentales sur larves de *P. operculella*

La pathogénicité des trois populations expérimentales montre des différences significatives par rapport aux isolats Pérou et VG003 évalués individuellement sur *P. operculella* (χ^2 = 210 ; ddl= 10 ; P < 0.05 pour 10 :90 ; χ^2 = 200 ; ddl= 10 ; P < 0.05 pour 50 :50, et χ^2 = 264 ; ddl= 10 ; P < 0.05 pour 90 :10). Comme lors des analyses précédentes, il y a une variation significative au cours des passages, la puissance étant au minimum 2,8 par rapport à l'isolat Pérou sur le même hôte, et pouvant atteindre 23,6 (Tableau 7 ; Figures 33 à 35). Dans la Figure 36 on représente les mêmes données groupées cette fois en fonction du nombre de passages. En contraste avec nos observations sur VG001 et VG005 (Figure 23) aucune convergence n'est observée.

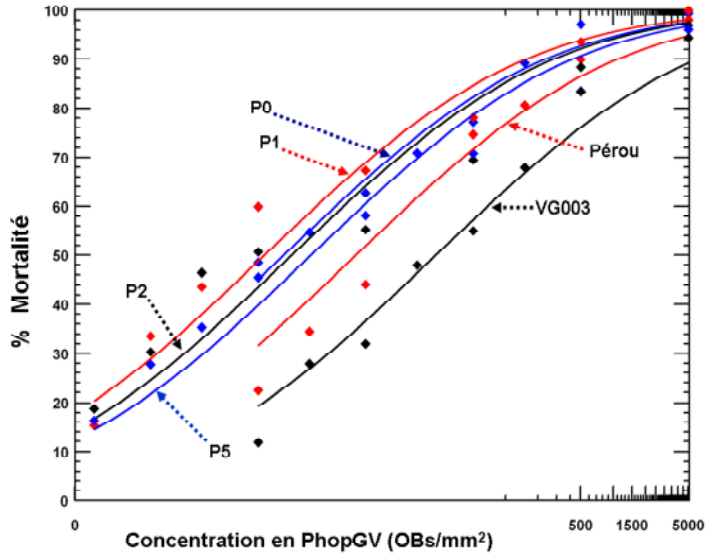

Figure 34. Activité biologique des passages de la population expérimentale 50 : 50, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *P. operculella*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5.

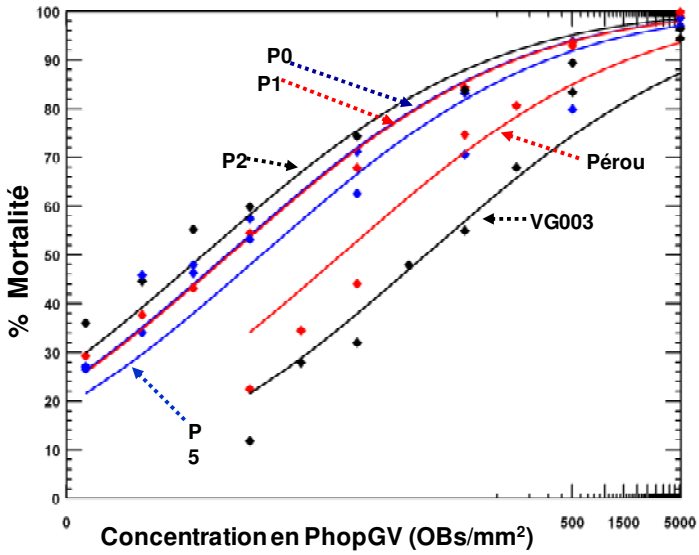

Figure 35. Activité biologique des passages de la population expérimentale 90 : 10, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *P. operculella*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5.

4.2.2.2. Efficacité des populations expérimentales sur larves de *T. solanivora*

La pathogénicité des populations expérimentales est significativement supérieure à celle des isolats évalués individuellement, VG003 (χ^2 = 25,5 ; ddl= 6 ; P < 0.05) et Pérou (χ^2 = 56,6; ddl= 6 ; P < 0.05) (Tableau 8). Les différences d'efficacité sont cependant inférieures sur cet hôte à celles obtenues sur *P. operculella*. Ces données sont représentées graphiquement dans les Figures 37 à 39.

Tableau 8. Activité biologique au cours des passages des mélanges artificiels de Pérou et VG003 sur *T. solanivora.* Entre parenthèses : intervalles. χ2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté.

Population	Nº d'OBs/mm² (95% IC)		Pente ± SE	X^2	ddl	*P*
	CL_{50}	CL_{90}				
Pérou	30,11 (18,66 – 50,28)	13806,38 (4950,04 – 54299,4)	0,482 ± 0,039	3,73	6	0,71
VG003	6,93 (4,89 – 9,80)	423,64 (236,25 – 883,72)	0,718 ± 0,049	1,53	6	0,96
10/90 P0	5 (3,36 – 7,38)	600,70 (237,88 – 2278,64)	0,616 ± 0,065	0,70	6	0,99
10/90 P1	12,29 (6,32 – 26,49)	1080,2 (304,72 – 9288,6)	0,712 ± 0,086	0,50	4	0,99
10/90 P2	5,82 (3,82 – 8,87)	118 (62,95 – 285,05)	0,989 ± 0,097	0,59	6	0,99
10/90 P3	2,19 (0,73 – 5,38)	93,77 (28,28-1042,9)	0,799 ± 0,087	4,4	6	0,62
50/50 P0	2,66 (1,86 – 3,70)	136,36 (79,03 - 273,23)	0,750 ± 0,078	0,89	6	0,98
50/50 P1	4,13 (1,97 –8,44)	431,23 (129,03 – 3498,1)	0,672 ± 0,089	0,54	5	0,99
50/50 P2	3,66 (2,27 – 5,85)	159,94 (74,08 – 487,9)	0,799 ±0,080	0,24	5	0,99
50/50 P3	4,72 (2,93 – 7,61)	216 (98,22 – 677,14)	0,793 ± 0,078	1,54	5	0,96
90/10 P0	1,25 (0,77 – 1,90)	155 (82,52 – 353,92)	0,624 ± 0,072	0,22	6	0,99
90/10 P1	3,18 (1,43 – 6,60)	446,23 (126,94 – 4127,6)	0,637 ± 0,085	0,35	6	0,99
90/10 P2	3,65 (2,50 – 5,31)	60,1 (33,85 – 133,54)	1,056 ± 0,104	0,55	6	0,99
90/10 P3	6,17 (3,86 – 9,99)	257,86 (116,33 – 816,36)	0,813 ± 0,079	0,62	6	0,99

Sur *T. solanivora*, la population expérimentale 10 : 90 (correspondant à l'isolat VG001, le moins bien adapté à *T. solanivora*), apparait comme la moins efficace au départ. Il n'y a pas de différence entre les populations 90 : 10 (correspondant à VG005) et 50 :50 (Figure 40). Au cours des passages, cette population évolue vers une efficacité supérieure à celle des deux autres (Figure 40D).

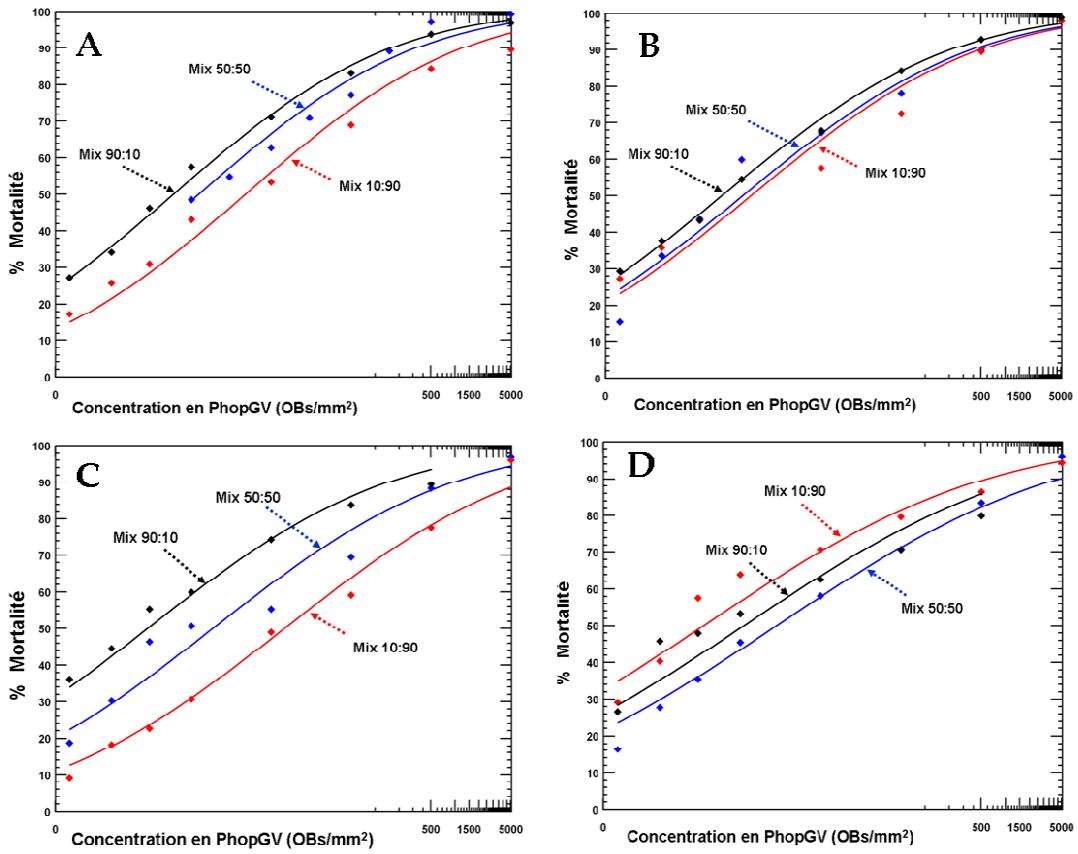

Figure 36. Comparaison de l'activité biologique des populations expérimentales 10 : 90, 50 : 50 et 90 : 10, des isolats Pérou et VG003 pour chaque passage sur *P. operculella*.
A) Passage 0; B) Passage 1; C) Passage 2 ; D) Passage 5.

4.2.2.3. Comparaison de l'efficacité des populations expérimentales sur les deux hôtes *P. operculella* et *T. solanivora*

Dans la perspective de développement d'un agent de contrôle biologique utilisable sur les deux hôtes potentiels, l'efficacité la plus haute sur les deux hôtes est souhaitable. Les Figures 41 à 44 montrent les efficacités de chaque mix au cours des passages sur chacun des hôtes (5 passages sur *P. operculella* et trois passages sur *T. solanivora*). En P0 on observe une efficacité similaire sur les deux hôtes pour la population 50 :50 (χ^2 = 5,11; ddl= 2 ; P=0,077), mais pas sur les autres. Par contre, au cours des passages, la population 10 :90 devient la plus intéressante, même si son efficacité est toujours plus importante sur *P. operculella* (LC_{50} = 0,16 au P5) que sur *T. solanivora* (LC_{50} = 2,19 au P3).

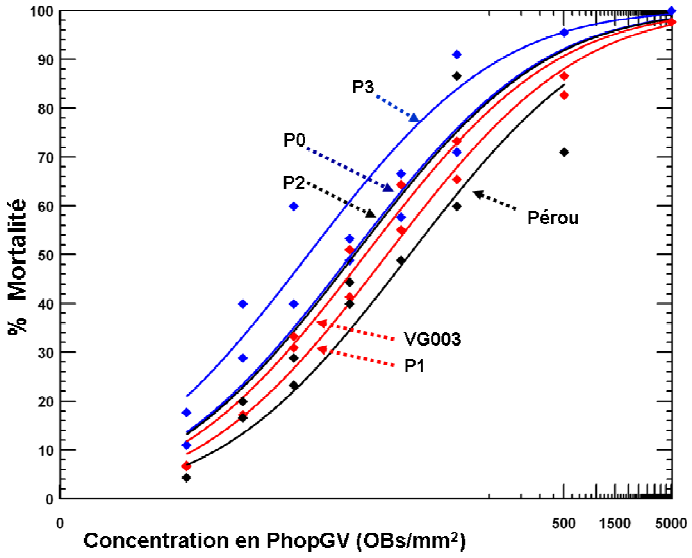

Figure 37. Activité biologique des passages de la population expérimentale 10 : 90, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *T. solanivora*.
P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5.

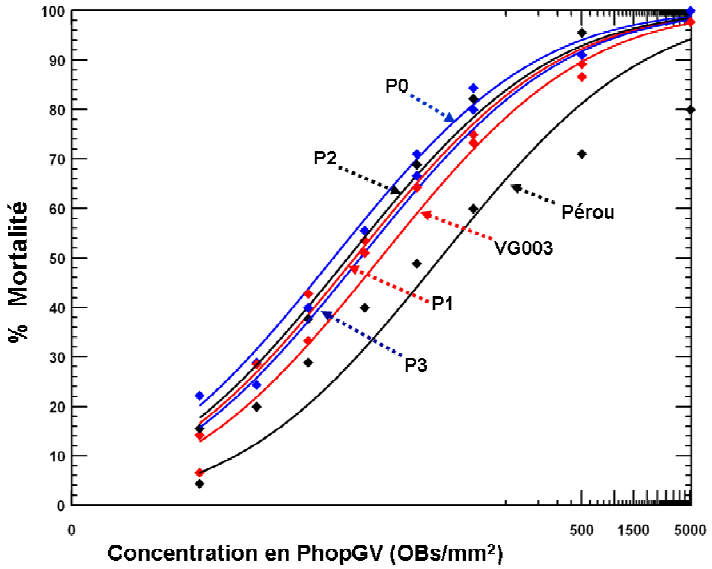

Figure 38. Activité biologique des passages de la population expérimentale 50 : 50, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *T. solanivora*.
P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5.

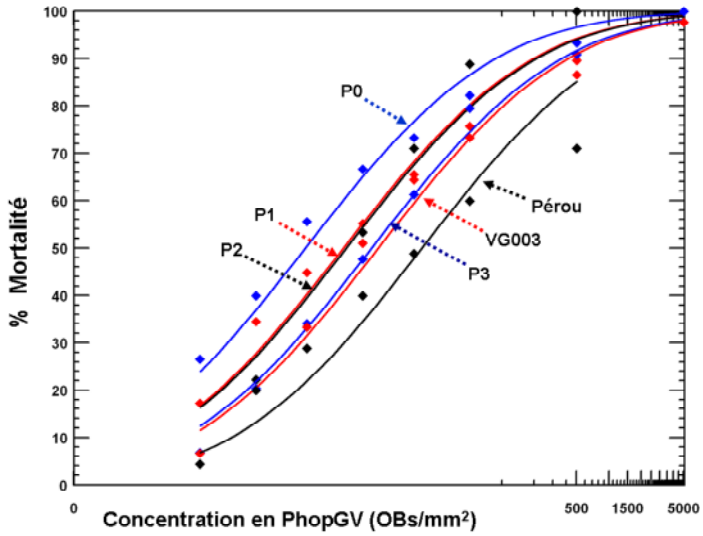

Figure 39. Activité biologique des passages du mélange 90 : 10, et des isolats Pérou et VG003 appliqués individuellement sur *T. solanivora*. P0 : Passage 0 ; P1 : Passage 1 ; P2 : Passage 2 ; P5 : Passage 5.

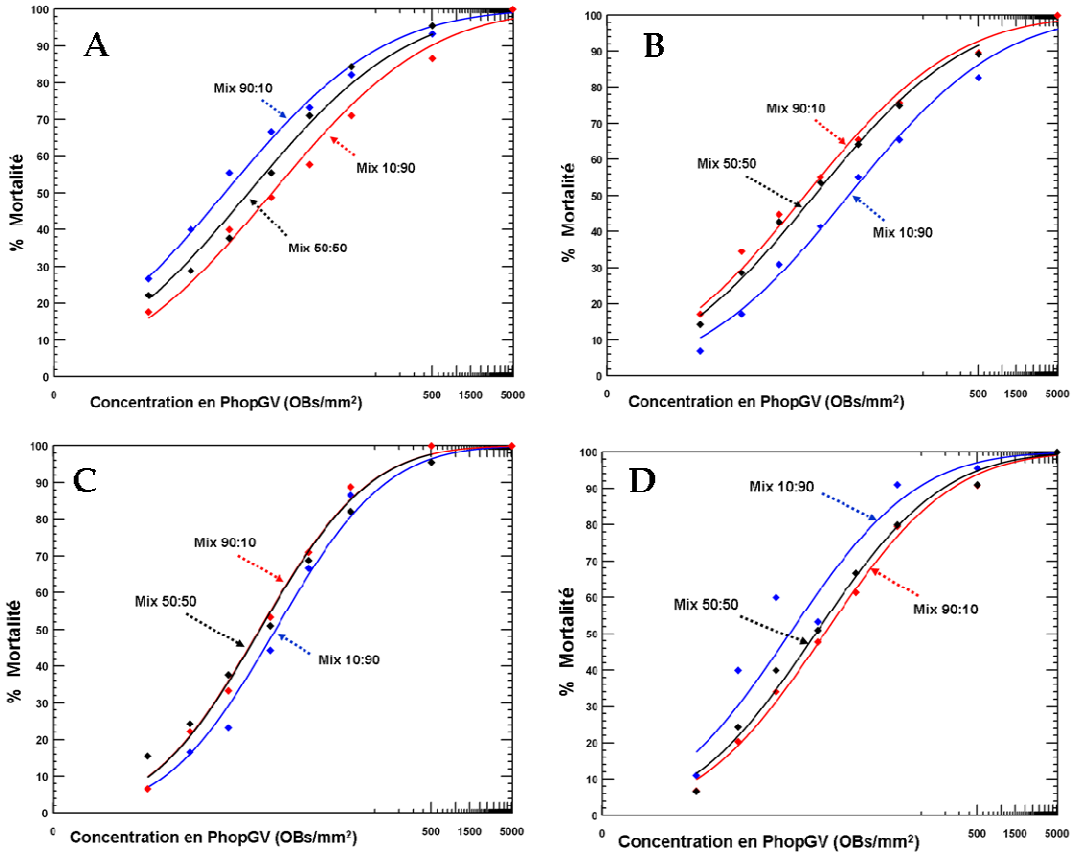

Figure 40. Comparaison de l'activité biologique des mélanges 10 : 90, 50 : 50 et 90 : 10, des isolats Pérou et VG003 pour chaque passage sur *T. solanivora*.
A) Passage 0; B) Passage 1; C) Passage 2 ; D) Passage 5.

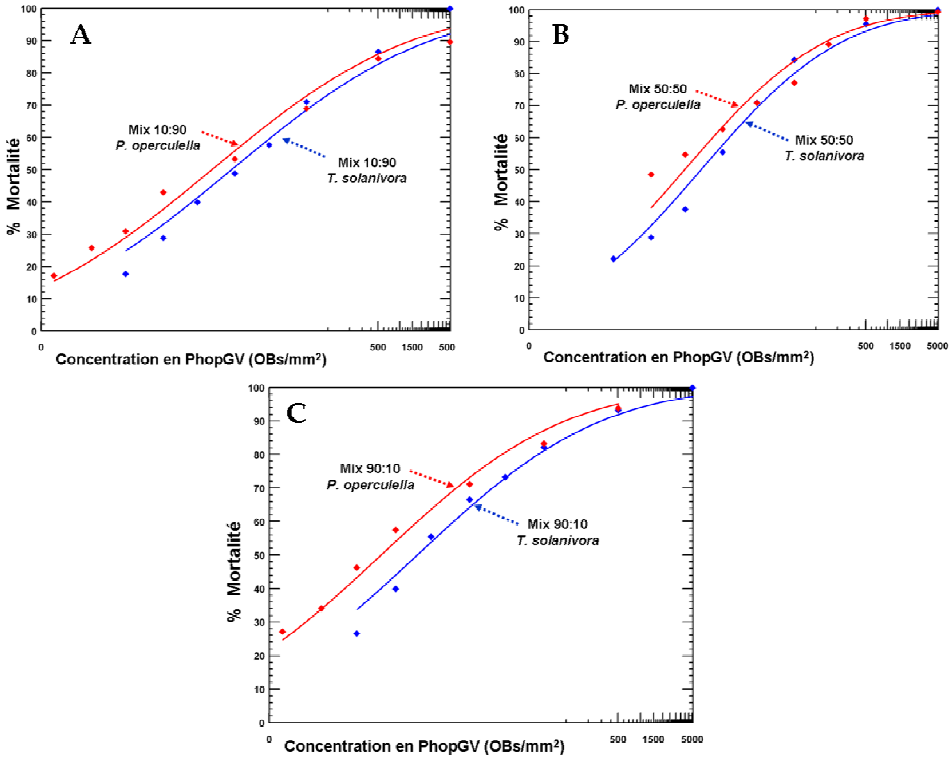

Figure 41. Comparaison de l'activité biologique du passage 0 des mélanges artificiels sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora*. A) Mix 10 : 90 ; B) Mix 50 : 50 ; C) Mix 90 : 10.

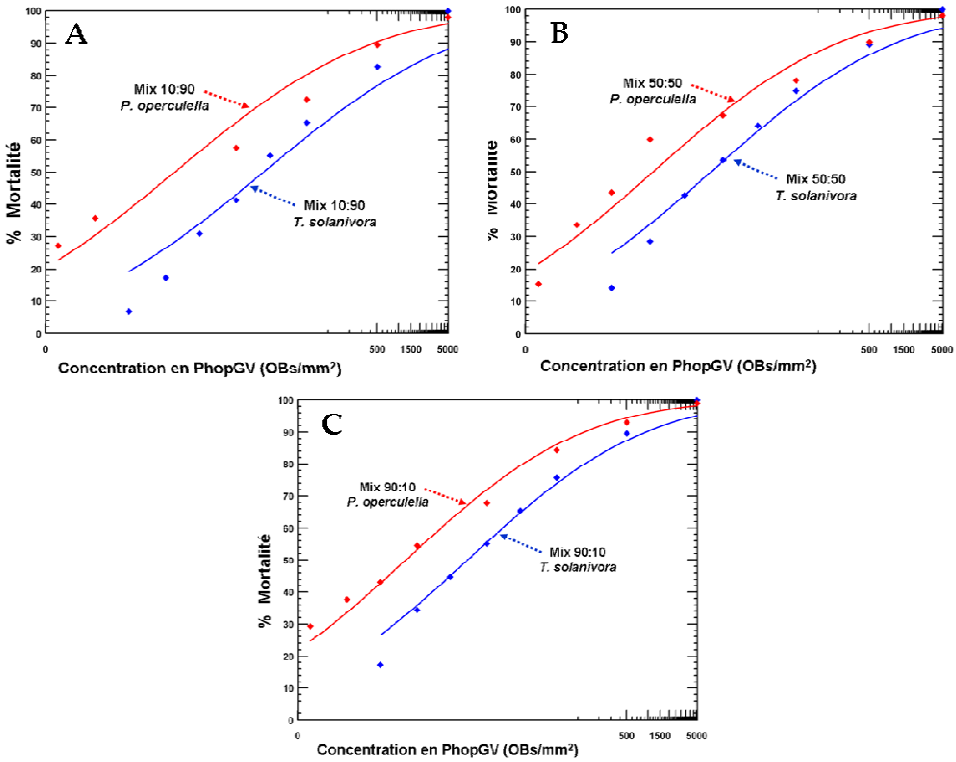

Figure 42. Comparaison de l'activité biologique du passage 1 des mélanges artificiels sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora*. A) Mix 10 : 90 ; B) Mix 50 : 50 ; C) Mix 90 : 10**.**

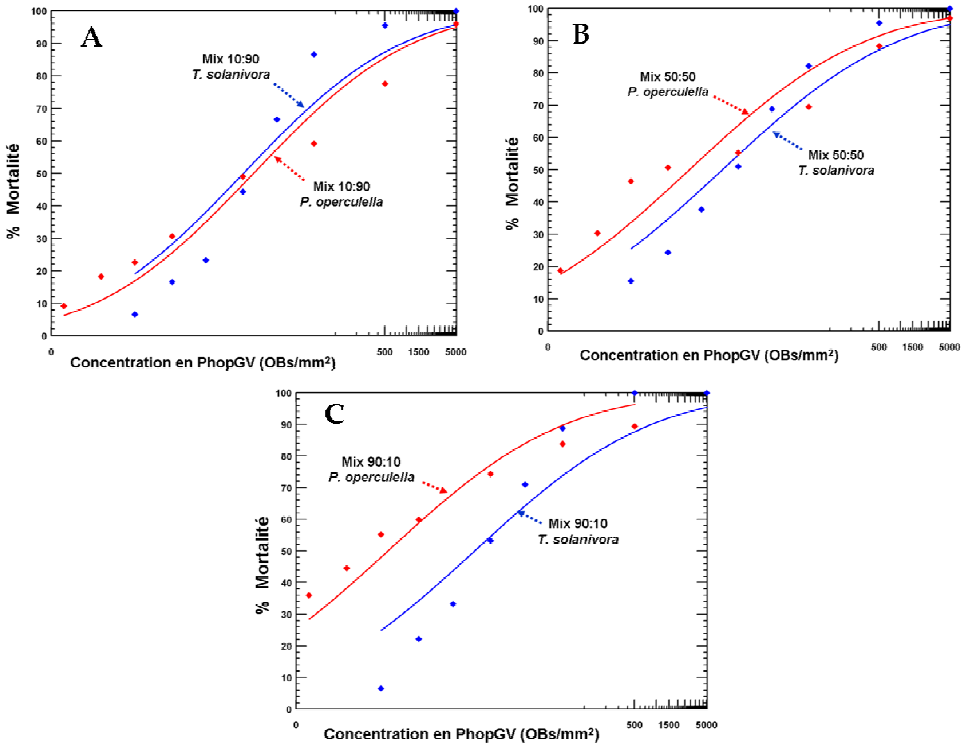

Figure 43. Comparaison de l'activité biologique du passage 2 des populations expérimentales sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora*. A) 10 : 90 ; B) 50 : 50 ; C) 90 : 10.

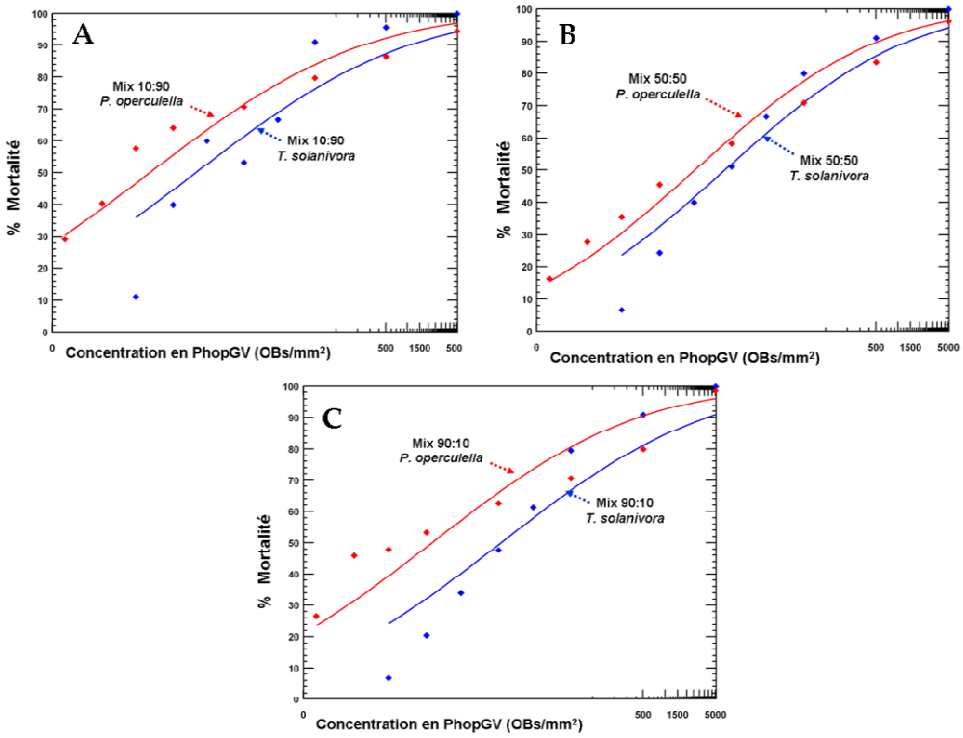

Figure 44. Comparaison de l'activité biologique des passages 3 et 5 des populations expérimentales sur les deux hôtes, *P. operculella* et *T. solanivora,* respectivement. A) 10 : 90 ; B) 50 : 50 ; C) 90 : 10.

4.2.2.4. Influence du changement d'hôte lors des passages successifs.

Dans les essais précédents, l'efficacité biologique des populations virales soumises à des passages successifs était testée sur le même hôte ayant servi à l'amplification. La présence des deux hôtes dans la même localité est l'un des arguments clé permettant d'expliquer le maintien de la diversité virale.

Pour répondre à cette question, la population virale P0 du mélange 50 : 50 amplifié sur *P. operculella* a été testée sur *T. solanivora*. Les OB produits ont été nommés « P1 Mix Retro ». Le Tableau 9 et la Figure 45, montrent les résultats d'efficacité. Lorsqu'on le compare avec le passage 1 du mélange issu de *T. solanivora* (essai du chapitre 4.2.2.3), on trouve une efficacité du Mix Retro 6,6 fois plus élevée (χ^2 = 20,89; ddl= 2 ; P<0,05).

Les résultats de cette expérience sont à développer pour les populations ayant suivi plusieurs cycles d'amplification, sur l'un et l'autre des hôtes. Cependant, ces résultats montrent qu'il y a une augmentation dans le pouvoir pathogène de la population 50 :50 indépendamment de l'hôte de multiplication (comparaison entre les lignes 1 et 3 du Tableau 9). Il n'y a pas perte de ce pouvoir lors d'une amplification sur l'hôte alternatif (comparaisons entre les lignes 1 et 4 du Tableau 9). Cette observation est de grande importance du point de vue industriel, car elle permet d'envisager une production industrielle sur l'hôte le plus approprié, et pas nécessairement sur l'hôte à combattre.

Tableau 9. Activité biologique du Mix Retro sur *T. solanivora.* Les résultats sont comparés avec les efficacités de la population 50 : 50 passage 0 sur *P. operculella* et P1 sur *T. solanivora.* Entre parenthèses : intervalles. χ^2 : Chi carré. ddl : degrés de liberté.

Population	Nº d'OBs/mm² (95% IC)		Pente ± SE	X^2	ddl	*P*
	CL_{50}	CL_{90}				
Mix Retro sur *T. solanivora*	0,62 (0,29 – 1,08)	41,55 (19,44 – 132,73)	0,701 ± 0,09	1,91	5	0,85
50/50 P0 sur *P. operculella*	1,23 (0,41 – 2,60)	164,55 (77,11 – 510,05)	0,603 ± 0,05	2,53	6	0,86
50/50 P1 sur *P. operculella*	0,53 (0,22 – 1,17)	275,37 (80,89 - 1609,30)	0,472 ± 0,03	5,26	6	0,51
50/50 P1 sur *T. solanivora*	4,13 (1,97 –8,44)	431,23 (129,03 – 3498,1)	0,672 ± 0,089	0,54	5	0,99

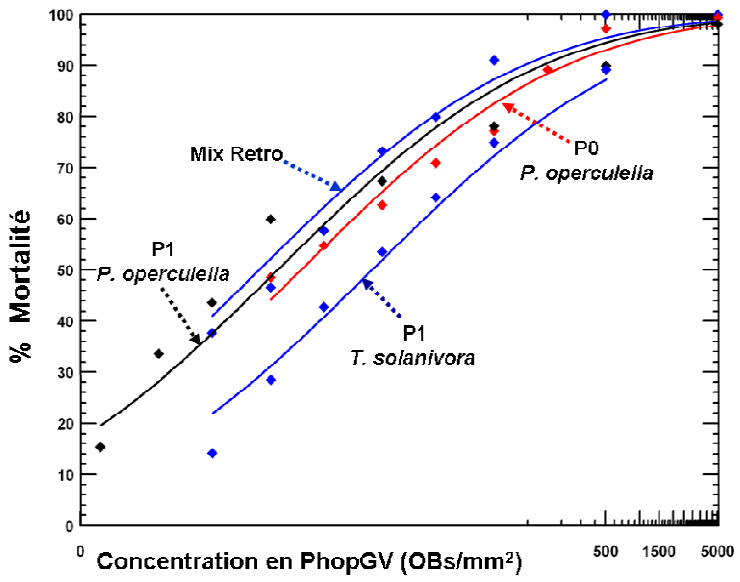

Figure 45. Activité biologique du Mix Retro par rapport à la population 50 : 50, P0 sur *P. operculella* et P1 sur *T. solanivora.* P= passage.

4.2.2.5. Composition génotypique des mélanges artificiels sur larves de *P. operculella* et *T. solanivora*

Comme dans le cas des isolats naturels VG001 et VG005, dans les populations expérimentales les fréquences des allèles des deux marqueurs génotypiques ne sont pas corrélées entre elles ni avec les changements dans l'efficacité biologique. Les Figures 46 à 57 résument les variations dans ces marqueurs.

4.3. Discussion

En général, les populations virales composées de mélanges de génotypes, soit provenant des isolats mélangés naturellement comme VG001 et VG005, soit des populations expérimentales mélangés artificiellement à différentes proportions (Pérou et VG003), montrent une augmentation de l'efficacité sur les deux hôtes, par rapport aux isolats bien adaptés à leur hôte respectif. Bien que l'on puisse constater une légère fluctuation, la pathogénicité des mélanges se maintient supérieure au cours de cycles de réplication.

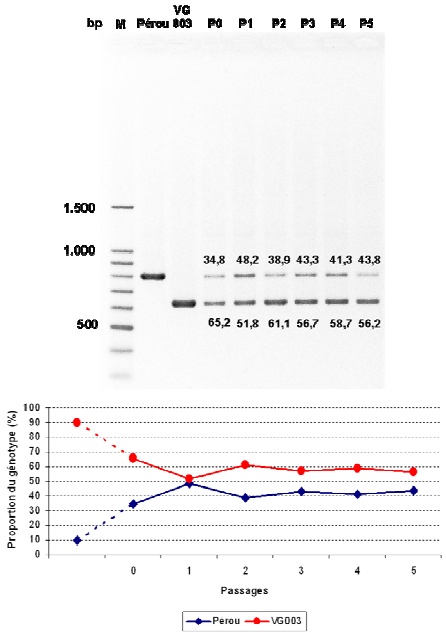

Figure 46. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

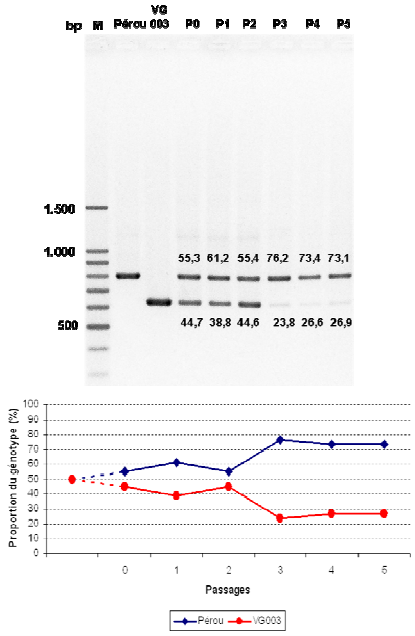

Figure 47. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

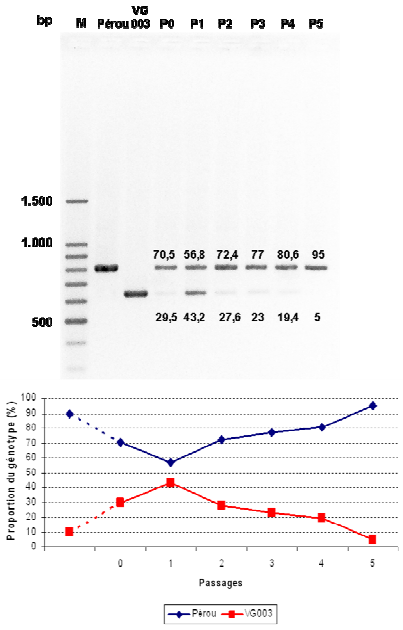

Figure 48. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*.

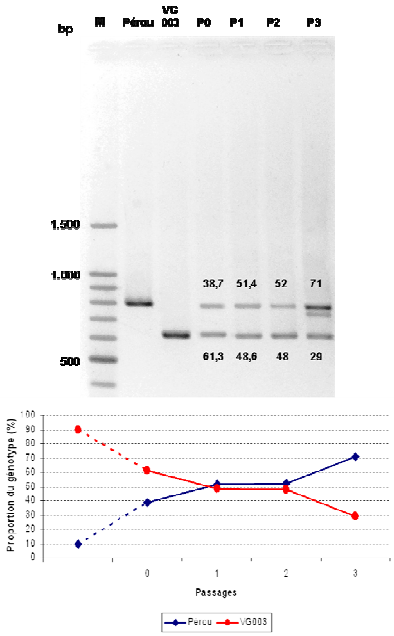

Figure 49. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*.

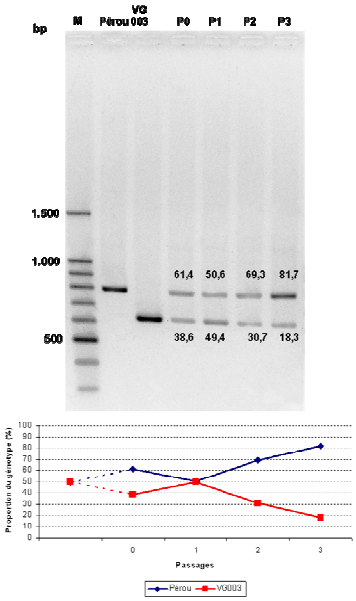

Figure 50. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*.

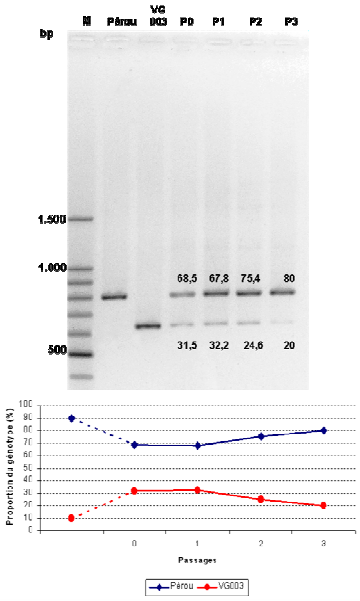

Figure 51. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gènes 90-91) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*.

Il y a plusieurs exemples d'interactions lors de co-infections entre génotypes viraux. Ces génotypes peuvent être des espèces différentes, ou des variants d'une même espèce virale. L'interaction entre les génotypes peut avoir lieu tout au long du cycle viral, de l'entrée dans la larve hôte, jusqu'à la réplication dans la cellule.

Chez les GVs (*Anticarsia gemmatalis* GV (AgGV) ; *Trichoplusia ni* GV (TnGV) ; *Xentia c-nigrum* GV (XecnGV)) et certains NPVs (*Lymantria dispar* MNPV (LdMNPV) ; *Mamestra configurata* NPV (MacoNPV)), ont été identifiés des facteurs de synergisme, appelés « enhancing factors » qui permettent d'améliorer l'efficacité des isolats en infections mélangées (Li *et al.*, 2003). Ces enhancines agissent au niveau du passage de la membrane péritrophique. Elles se trouvent dans les OBs, et sont libérées lors de leur dissolution dans l'intestin. Ces enzymes peuvent agir en *trans*, c'est-à-dire, le mélange d'OB contenant et ne contenant pas d'ehnancine permet le passage de tous les génotypes. LdMNPV code pour deux *enhancines*, la délétion de l'une d'elles produit une réduction de la puissance de 2 à 3 fois, mais si la délétion se produit entre les deux, elle occasionne une réduction de 12 fois (Rohrmann, 2008b).

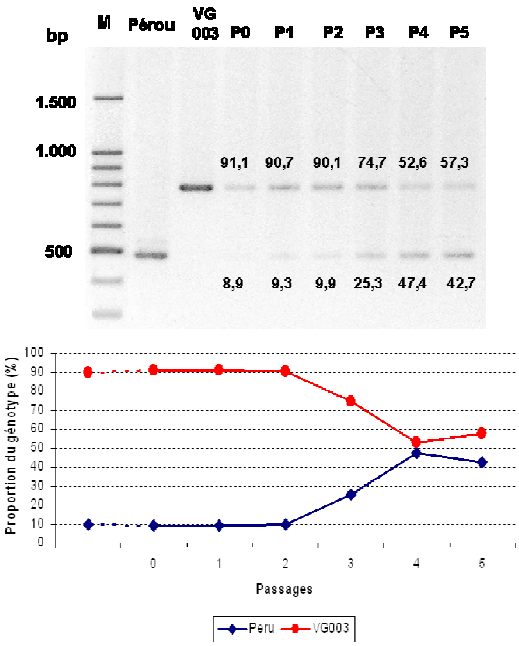

Figure 52. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

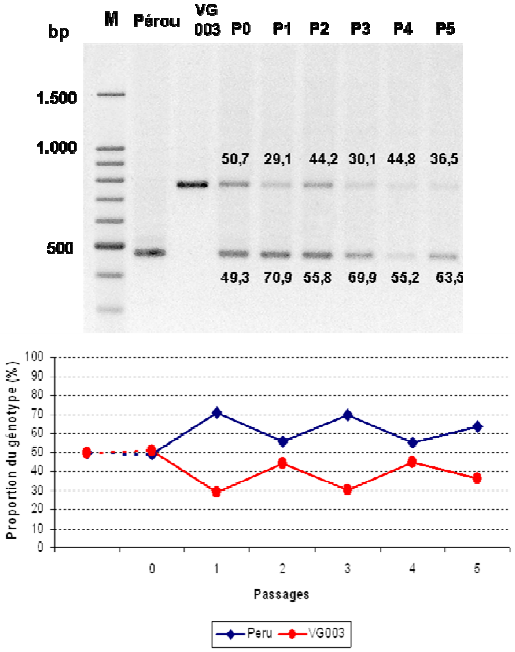

Figure 53. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

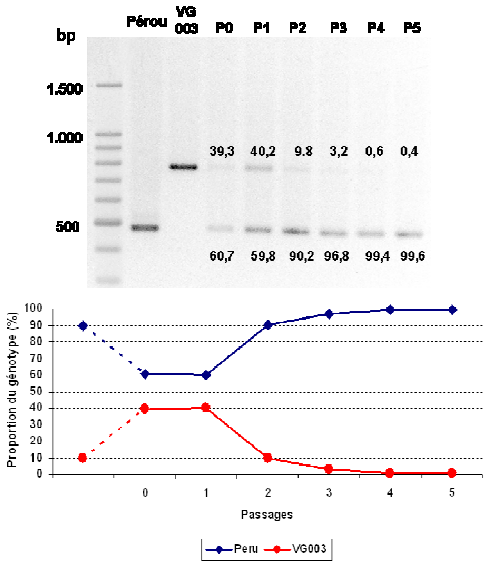

Figure 54. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *P. operculella*. M : Marqueur ; P : Passage.

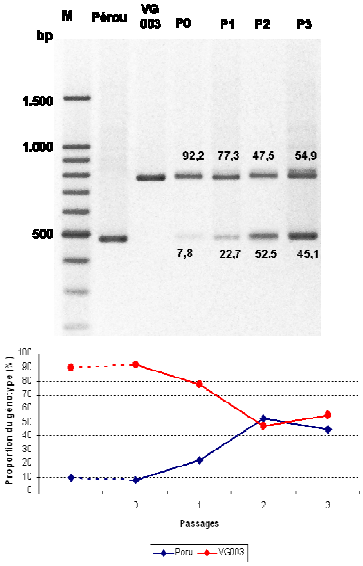

Figure 55. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 10 : 90 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage.

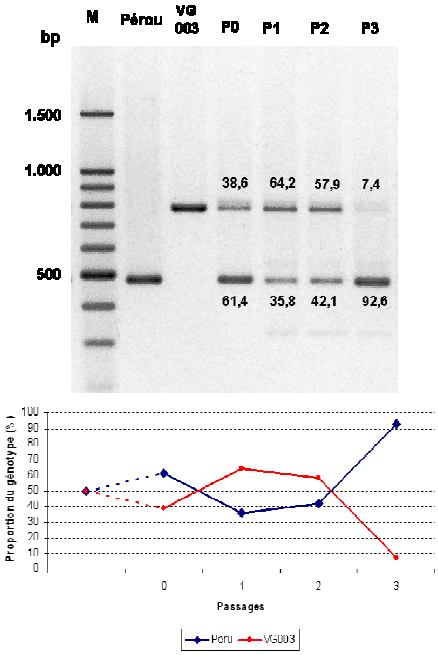

Figure 56. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 50 : 50 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage.

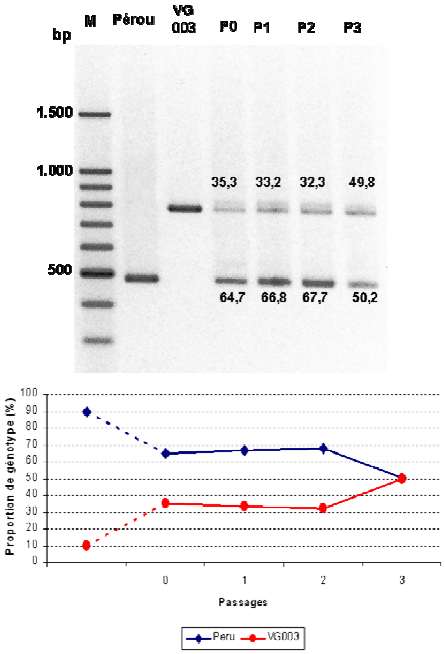

Figure 57. PCR semi-quantitative de l'ADN (Gène 129) des cycles de réplication du Mix 90 : 10 et dynamique de la composition génotypique au cours des passages sur larves de *T. solanivora*. M : Marqueur ; P : Passage.

Des phénomènes de synergisme ont été observés chez *Helicoverpa zea* (Boddie), *Spodoptera exigua* (Hübner) et *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) lors d'une infection simultanée par LdMNPV et des virus de la polyédrose nucléaire issus de ces insectes, HzMNPV, SeMNPV et SfMNPV. La puissance a augmenté 8,7; 7,5 et 10,3 fois, respectivement (Shapiro et Shepard 2006).

Chez un isolat de SfMNPV provenant du Nicaragua, une coopération entre différents génotypes a pu être mise en évidence. L'efficacité de la population virale, composée d'au moins neuf génotypes, est toujours supérieure à celle de chacun des génotypes isolés. Ainsi, l'infection par le génotype pur SfNIC-B, qui sert de référence, correspond à seulement 30% de l'efficacité de l'isolat d'origine. La co-infection avec un génotype SfNIC-C, permet d'augmenter l'efficacité du mélange jusqu'au niveau de celle de la population d'origine (Frank 2003 ; López-Ferber *et al.*, 2003 ; Simon *et al.*, 2005). Dans ce cas, l'augmentation d'efficacité n'a pas lieu lors du mélange des OB. Il faut, au contraire, que les deux variants se soient multipliés dans la même cellule.

La présence de génotypes mélangés n'assure pas toujours une efficacité supérieure. Certains variants sont des « parasites » au sein de la population. Il s'agit souvent de génotypes défectifs, qui tirent parti des composants produits par les autres génotypes pour leur propre réplication. Par exemple, chez un SeMNPV, Muñoz *et al.,* (1998) ont analysé plusieurs variants génotypiques et ils ont trouvé que l'activité biologique d'un variant pur était supérieure à celle de l'isolat sauvage dont il était issus. Dans cet isolat, la présence de variants défectifs a été confirmée. De même, lorsque les génotypes défectueux trouvés chez ce NPV sont mélangés avec l'isolat sauvage, la proportion de génotypes parasitiques augmente au cours des passages et la pathogénicité de la population expérimentale diminue (Muñoz y Caballero, 2000). Chez *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV), Arends *et al.,* (2005), ont trouvé que des infections de génotypes mélangés aboutissent à une pathogénicité moindre par rapport à celle de certains génotypes isolés.

Dans ce chapitre, nous avons analysé l'efficacité de deux isolats viraux qui présentent naturellement un mélange génotypique, par rapport à deux autres isolats, qui apparaissent comme génotypiquement homogènes, et ceci pour chacun de deux hôtes potentiels. Dans un deuxième temps, nous avons construit des populations expérimentales, en essayant de reproduire le comportement des mélanges naturels.

Nous sommes partis de l'hypothèse que l'isolat viral « Pérou », qui n'a jamais été en contact avec l'hôte *T. solanivora*, est le mieux adapté à son hôte, *P. operculella*. On observe que l'efficacité de l'isolat Pérou sur ce second hôte est très faible. De façon analogue, nous considérons que l'isolat VG003 est le mieux adapté à *T. solanivora* ; il présente une efficacité moindre pour *P. operculella*. Les deux isolats présentant des mélanges génotypiques sont capables de contrôler les deux hôtes de façon satisfaisante. Dans les conditions naturelles, ces isolats se trouvent confrontés à des alternances de chacun des hôtes. Il leur est nécessaire de pouvoir se multiplier sur les deux hôtes.

Mais, le maintien de cette capacité à se multiplier sur les deux hôtes dépend-il de l'alternance d'hôtes ? Autrement dit, la multiplication systématique sur un hôte

conduit-elle à une spécialisation sur cet hôte, avec perte d'efficacité sur l'autre ? La durée d'une thèse, ne nous a pas permis de faire un grand nombre de générations. Au bout de 6 générations sur *P. operculella*, nous n'avons pas détecté de changement dans l'efficacité de ces isolats mélangés. Les contraintes d'élevage de *T. solanivora*, interdit en Europe, nous ont limité à un seul passage, permettant seulement la confirmation de nos observations précédentes.

Nous avons construit des populations virales expérimentales en mélangeant en trois proportions les deux isolats génétiquement homogènes (dans la limite de nos observations), et adaptés à chaque hôte. Les mélanges se sont avérés globalement au moins aussi pathogènes que les isolats purs pour chacun des hôtes, même si pour des conditions de pandémie (mortalités de 90%), l'isolat Pérou, adapté à *P. operculella*, est plus efficace sur son hôte.

Nous avons testé un changement cyclique d'hôte pendant une seule génération. Les résultats obtenus montent une augmentation de cette pathogénicité. Il est clair que nous ne pouvons pas extrapoler ces observations, mais l'efficacité des isolats naturels VG001 et VG005, sur les deux hôtes nous permet de déduire qu'il y a une corrélation entre le changement cyclique d'hôte et l'efficacité de ces isolats.

Nous avons essayé de suivre l'évolution de la composition génétique de ces populations au cours des passages sur les différents hôtes. A cette fin, nous avons utilisé les deux marqueurs génotypiques polymorphes que nous avons pu identifier.

La détection d'un polymorphisme au niveau du gène *egt* était prometteuse. En effet, ce gène codifie l'enzyme ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. Sa délétion ou inactivation conduit à une augmentation de la virulence des virus dans tous les cas ou cela a pu être testé (O'Reilly et Miller, 1991 ; O'Reilly, 1995, Bonning et Hamock, 1996). Cette observation nous a conduits à formuler l'hypothèse qu'une des modifications possibles permettant l'adaptation à un nouvel hôte pouvait impliquer le gène *egt*. Si une telle relation de causalité existait, on devrait s'attendre à une corrélation entre les

fréquences d'un des allèles du gène *egt* trouvés dans nos populations virales, et l'efficacité biologique sur un hôte. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle corrélation. De surcroit, il n'y a pas non plus de corrélation avec les variations des fréquences des allèles dans l'autre locus marqueur, au niveau des gènes 90-91, dont la fonction est inconnue à ce jour.

Les variations de fréquence des deux marqueurs ne sont donc pas corrélées entre elles, ni avec les variations observées dans l'efficacité biologique.

La capacité de recombinaison des baculovirus a été évoquée dans le Chapitre 1. Les résultats que nous obtenons sont à mettre en relation avec cette capacité. Même si le gène *egt* peut être au moins partiellement responsable des variations d'efficacité observées, de toute évidence, d'autres gènes viraux doivent contribuer dans une plus grande mesure. La variabilité au niveau de ces gènes n'a pas été détectée par les méthodes que nous avons employées, seul un séquençage complet des différents génomes pourrait peut être nous permettre d'aller plus loin.

Des nombreux travaux théoriques existent sur le comportement des mélanges génotypiques et l'incidence de ces mélanges dans l'efficacité reproductive. Ainsi, l'efficacité reproductive (fitness) d'un génotype pathogène est partiellement déterminée par le complexe des interactions : génotype du pathogène x génotype de l'hôte x environnement qui peut être affecté par la concurrence pour les ressources de l'hôte ou sa réponse immune (Seppälä *et al.*, 2009).

Mais, l'efficacité reproductive des pathogènes peut être supérieure en présence d'une coïnfection ou lors d'infections par des mélanges de génotypes (Hodgson *et al.*, 2004). Par exemple, si l'infection hétérogène requiert que l'hôte augmente considérablement les ressources pour obtenir une réponse du système immune, il est possible que d'autres systèmes se fragilisent, et favorisent l'attaque du pathogène (Seppälä *et al.*, 2009). De même, la coïnfection pourrait générer des interactions directes ou indirectes qui aboutissent à des pressions de sélection qui modifient des traits phénotypiques

comme la pathogénicité. En général, la virulence ou la pathogénicité prennent une position centrale comme variable explicative de la réponse sur les modèles théoriques des interactions pathogènes-hôtes. La théorie classique prédit que la concurrence entre isolats (génotypes), sélectionnerait, dans la plupart des cas, une pathogénicité ou virulence supérieure (Balmer *et al.,* 2009). De même, la théorie conventionnelle de la virulence adaptative dit que les infections des génotypes mélangés causeraient un grand impact sur l'efficacité reproductive de l'hôte (e.g. pathogénicité) et accroîtraient le taux d'utilisation des ressources de l'hôte (e.g. productivité supérieure / temps). Néanmoins, lors d'infections où la mort de l'hôte est nécessaire pour la transmission, comme chez les baculovirus, l'infection doit être maximisée. Ce serait un exemple sur lequel l'échange communément assumé entre le taux d'exploitation et la virulence, n'est pas valide (Hodgson *et al.,* 2004).

Le modèle utilisé dans notre étude, celui d'une espèce envahissante face au complexe hôte/pathogène présent dans son nouvel habitat nous a permis d'aborder quelques aspects du processus adaptatif, en mettant en parallèle les observations dans les populations naturelles et expérimentales.

L'étude des interactions pathogène-hôte sur le modèle PhopGV-teignes de la pomme de terre est aussi très importante en raison de l'impact économique direct sur cette culture, sur laquelle on peut trouver un complexe d'espèces de teignes qui représentent un défi pour les conditions adaptatives du virus et pour l'efficacité du contrôle. La flexibilité des génotypes de ces isolats pour s'adapter à des hôtes alternatifs ouvre la porte pour les utiliser sur un autre ravageur de la même famille que *P. operculella* et *T. solanivora* (Gelechiidae), la teigne de la tomate *Tuta absoluta* (Povolny). Cet insecte cause des dégâts importants et des pertes entre 50% et 100% (OEPP/EPPO 2005) en Amérique centrale et Amérique du sud, mais à l'inverse de *T. solanivora*, cet insecte est déjà présent dans les pays du pourtour méditerranéen, européens et africains, et est une espèce invasive dont la O.E.P.P[*]. recommande la réglementation (liste A1) (Germain *et al.,* 2009). Un rapport récent (Moura *et al.,* 2010) décrit l'infection de larves de *T. absoluta* avec un PhopGV issu de *P. operculella* au Brésil.

4.4. Conclusions

Les conclusions de ce chapitre peuvent se poser sous deux points de vue, le biologique et l'appliqué. En se basant sur les résultats des essais biologiques, on peut établir que l'hétérogénéité génotypique des isolats colombiens du PhopGV, présente de façon naturelle ou obtenue artificiellement en coïnfections, conditionne l'efficacité.

La possibilité d'obtenir des populations virales actives sur les deux hôtes ouvre des perspectives dans le contrôle de ces ravageurs, qui peuvent se trouver associés. Comme cette double spécificité ne s'accompagne pas d'une perte d'efficacité sur chaque hôte, il ne sera pas nécessaire, pour optimiser le traitement, de savoir quel hôte (ou les deux) est présent.

De plus, les trois mélanges artificiels appliqués montrent une pathogénicité supérieure ; il faut souligner que le mélange 90 : 10 (90 % génotype du Pérou : 10 % génotype du VG003) est prometteur, à cause de la puissance supérieure sur les deux hôtes. De même, parmi les isolats sauvages, VG001 et surtout VG005, sont prometteurs comme ingrédients actifs d'un biopesticide.

Les cycles de réplication virale n'ont pas présenté d'influence notoire sur l'efficacité des mélanges. En général, celle-ci se maintient à des valeurs supérieures à celles des isolats théoriquement adaptés à chaque hôte. En conséquence, la flexibilité observée dans ces isolats nous offre plusieurs possibilités à prendre en compte dans un procédé de production industrielle d'un agent de contrôle biologique. Cet aspect est renforcé du fait que l'activité biologique ne se réduit pas (elle augmente plutôt) lorsque le virus est produit sur un hôte et utilisé sur l'autre.

Il sera important d'analyser les autres facteurs conditionnant la viabilité d'une production industrielle, et notamment la productivité sur chacun des hôtes potentiels. Ces points seront abordés dans le chapitre suivant.

Chapitre 5 : Analyse de la production de corps d'inclusion d'isolats de PhopGV sur des larves de *P. operculella et T. solanivora*

5.1. Introduction

Le développement d'un biopesticide à base de PhopGV doit prendre en compte divers points critiques dans le procédé technologique, comme la sélection de l'inoculum viral, la sélection de l'hôte sur lequel produire le virus (si la production *in vivo* a été choisie), les conditions environnementales de la production, la formulation ou encore le contrôle de la qualité du produit.

Dans le choix de l'inoculum viral, en plus de l'origine du virus et de son activité biologique contre le ou les insectes ciblés, il faut prendre en compte la productivité virale. Ce paramètre conditionne la faisabilité industrielle, et par conséquent est utilisé du point de vue technologique comme critère de sélection des isolats potentiels.

Du point de vue évolutif, il est important de connaître l'influence sur la production de descendance virale de facteurs comme l'interaction des génotypes viraux ou leur adaptation au changement de l'hôte.

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence que des isolats naturels, ou des populations virales expérimentales obtenues par mélange d'isolats, sont capables de contrôler les deux insectes ciblés, *P. operculella* et *T. solanivora*. Dans ce chapitre on analyse la productivité de ces isolats et populations dans chacun des hôtes. Bien que la détermination du temps létal n'ait pas pu être calculée, la relation entre pathogénicité et productivité virale sera discutée.

5.2. Résultats

La productivité virale, exprimée en corps d'inclusion par mg de poids larvaire (OB/mg poids larvaire), a été estimée sur des larves provenant d'essais biologiques sur les deux hôtes, réalisés dans le Chapitre 4 , ainsi que, dans le cas de *P. operculella*, provenant des

amplifications d'isolats individuels ou des mélanges sur larves de cet insecte (passages 3 et 4 des mélanges artificiels) (cf. Chapitre 2, 2.3).

5.2.1. Productivité sur *P. operculella* des isolats VG001 et VG005

La figure 58 résume la productivité de ces isolats sur *P. operculella* au cours des passages successifs. En moyenne, la productivité est de 2,23x10^8 OB/mg poids larvaire pour VG001 et 1,96x10^8 OB/mg poids larvaire pour VG005, pour un poids moyen des larves de 5,45 mg pour VG001 et 5,9 mg pour VG005. La productivité virale des isolats au cours des passages sur cet hôte varie de façon significative (Figure 58). Le premier passage sur *P. operculella* de VG005, est moins productif que les autres. Il est intéressant de signaler que ce passage est celui qui présente la plus grande efficacité (Tableau 10). En ce qui concerne le P2 de VG001, il s'agit de la même expérience citée au 4.2.1.1. Dans toutes les expériences résumées dans le Tableau 10, une pathogénicité plus élevée s'accompagne d'une productivité moindre, sauf pour ce P2 de VG001.

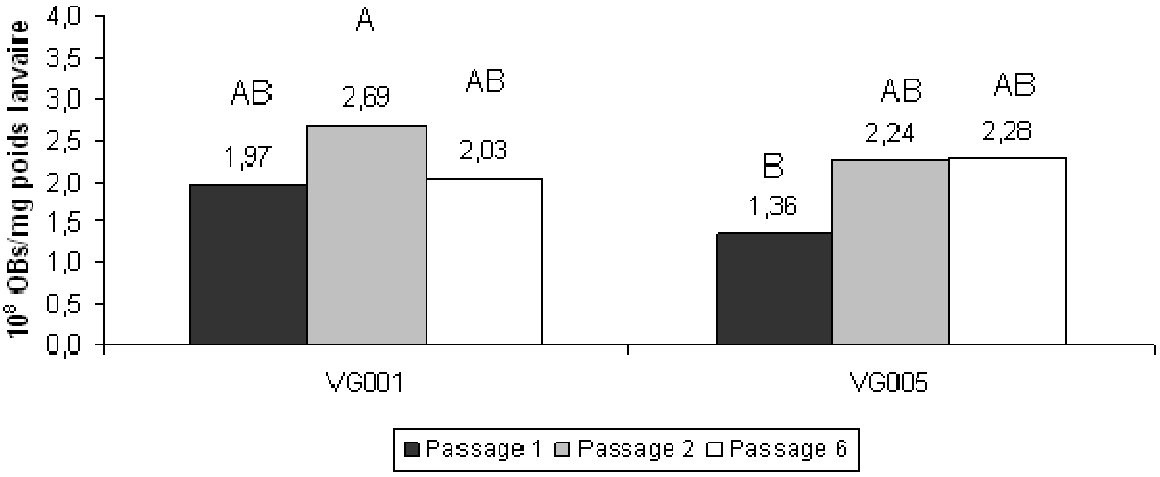

Figure 58. Productivité des isolats sauvages VG001 et VG005 au cours des passages sur larves de *P. operculella.* Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey α=0,05)

Tableau 10. Productivité virale et efficacité des isolats VG001 et VG005 sur *P. operculella*. CL=Concentration létale. OB=Corps d'inclusion.

		CL_{50} OB/mm^2	CL_{90} OB/mm^2	Productivité 109 OBs/mg poids larvaire	Poids moyen des larves (mg)
VG001	P1	4	1256,6	1,97	7,22
	P2	0,25	8219,9	2,69	4,03
	P6	2,18	5715,6	2,03	5,11
VG005	P1	0,76	110,6	1,36	8,16
	P2	1,46	2722,2	2,24	4,03
	P6	1,91	3940,7	2,28	5,51

5.2.2. Productivité des isolats Pérou et VG003 et des populations expérimentales sur *P. operculella*

La productivité virale des isolats Pérou et VG003 amplifiés individuellement est de 1,89x10^8 OB/mg de poids larvaire pour l'isolat Pérou et 2,02x10^8 OB/mg de poids larvaire pour l'isolat VG003. Ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes (F= 0,22 ; P= 0,651 ; ddl= 10). Les poids moyens des larves sont de 8,7 mg et 7,4 mg, respectivement.

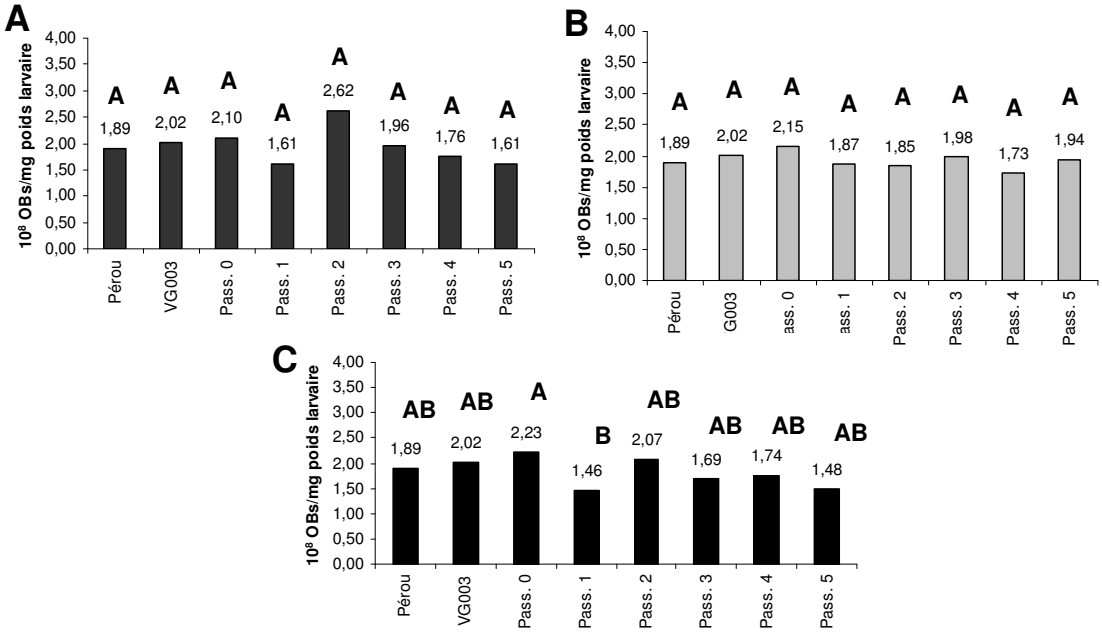

Figure 59. Productivité virale (OB/mg de poids larvaire) des populations expérimentales obtenues par mélange des isolats Pérou et VG003 au cours des passages sur *P. operculella*. A) Mix 10 :90 ; B) Mix 50 :50 ; C) Mix 90 :10. Pass : Passage. Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey α=0,05).

Lors de l'utilisation de populations virales expérimentales, la productivité ne change pas de façon importante (Figure 59). Seule une différence apparait pour la population 90 : 10 au P1.

5.2.3. Productivité des isolats Pérou et VG003, et des populations expérimentales sur *T. solanivora*

L'isolat Pérou n'est pas adapté à cet hôte. Cependant, la productivité n'est pas mauvaise. Par contre, il faut utiliser des inocula importants car son efficacité est basse. En fin d'infection, les larves sont beaucoup plus grandes que celles infectées par VG003.

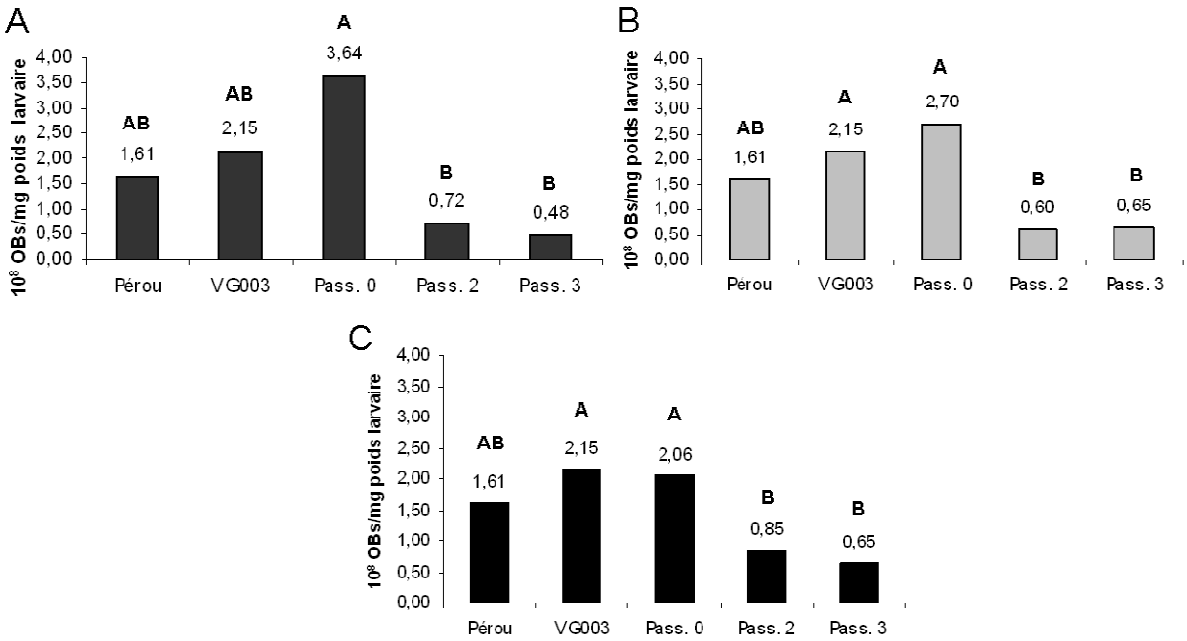

Figure 60. Productivité virale (OB/mg de poids larvaire) des populations expérimentales obtenues par mélange des isolats Pérou et VG003 au cours des passages sur *T. solanivora.* A) Mix 10 : 90 ; B) Mix 50 : 50 ; C) Mix 90 : 10. Pass : Passage. Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey, α=0,05).

En ce qui concerne les populations expérimentales, la productivité a été suivie sur trois cycles de réplication. Dans les trois populations artificielles, la productivité diminue de façon significative après le P0. La production de P0 est toujours la plus élevée, mais pas significativement différente de celle de VG003 seul. L'isolat Pérou présente un niveau de production intermédiaire entre les deux précédents et les P2 et P3. (Figure 60).

Il n'y a pas de différence significative entre les isolats appliqués individuellement et les populations expérimentales (mélange de ces isolats) en P0 (F= 2,08; P= 0,1719 ; ddl= 13).

5.2.4. Comparaison de la productivité des populations expérimentales au cours des cycles de réplication entre les deux hôtes

La productivité peut être analysée de plusieurs points de vue, en nombre d'OB par individu infecté, par mg de larve, ou encore par rendement par rapport à l'inoculum utilisé. Aucune différence n'a pu être mise en évidence entre la productivité (OB/mg larve) des populations expérimentales pour le P0 en fonction de l'hôte. (F= 0,72; P= 0,6101 ; ddl= 38) (Figure 61 A). En P2, la productivité des populations artificielles est globalement plus importante sur *P. operculella* que sur *T. solanivora,* mais la différence n'est significative que pour la population 10 : 90 (F= 5,70; P= 0,0010 ; ddl= 32) (Figure 61 B). Cette tendance se confirme en P3. Toutes les populations expérimentales sont plus productives sur *P. operculella* (F= 25,22; P= 0,0000 ; ddl= 18) (Figure 61 C).

Il n'y a pas non plus de relation évidente entre la productivité (OB/mg larve) et l'efficacité. L'hypothèse d'une plus grande production d'OB par les populations virales les mieux adaptées ne se confirme pour aucun des deux hôtes (Tableau 11).

La productivité par larve est plus importante pour *T. solanivora*, ($21,79\times10^8$ OB/larve) que pour *P. operculella* ($14,2\times10^8$ OB/larve), du fait de la plus grande taille de la première. Cependant, ce fait n'explique pas les différences observées. Le poids moyen des larves de *P. operculella* infectées correspond à 0,41 fois celui des larves de *T. solanivora*. Par contre, le rapport des productions est de 0,65. (Production par larve de *P. operculella*/Production par larve de *T. solanivora*).

Finalement, on peut étudier le facteur multiplicatif ou rendement, c'est-à-dire, le nombre d'OB récoltés par OB inoculé. Le Tableau 11 donne ce ratio pour les CL_{50} et pour les CL_{90}. Le rendement, en se basant su la CL_{50}, est toujours supérieur sur *P. operculella*, mais en se basant sur la CL_{90}, c'est sur *T. solanivora* que l'on obtient les chiffres les plus élevés. Ceci est du à la plus faible augmentation de la dose nécessaire pour obtenir une mortalité élevée chez *T. solanivora*, en comparaison avec *P. operculella*.

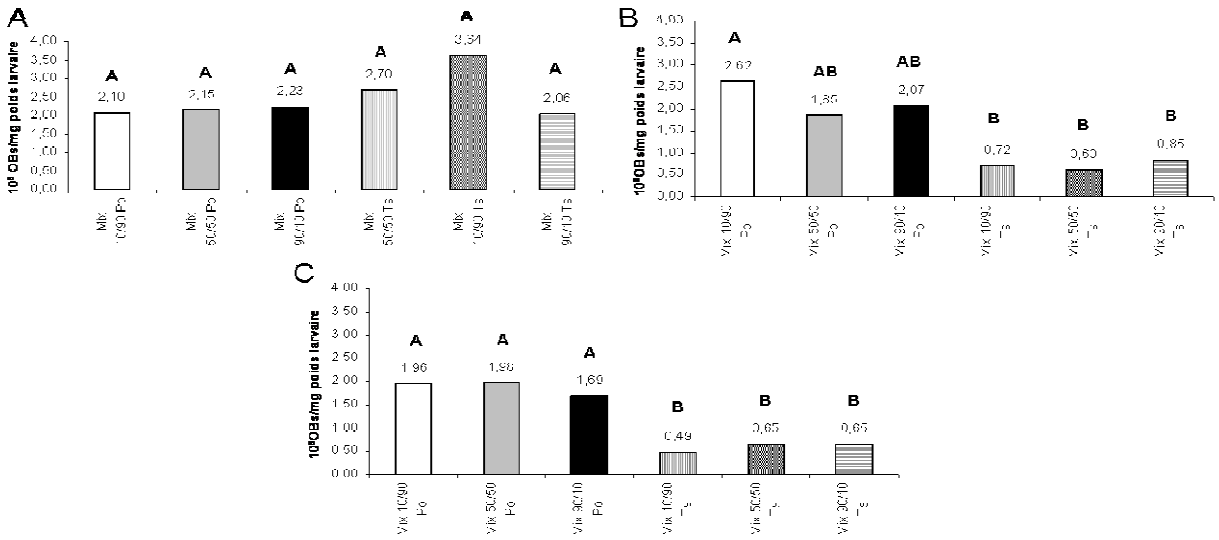

Figure 61. Comparaison de la productivité virale (OB/mg de poids larvaire) des populations expérimentales obtenues par mélange des isolats Pérou et VG003 au cours des passages sur les deux hôtes. A) Passage 0 ; B) Passage 2 ; C) Passage 3. Mix : Mélange. Po : *P. operculella* ; Ts : *T. solanivora*.
Les colonnes partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes (Tukey, α=0,05).

5.3. Discussion

La productivité virale observée sur les deux hôtes a été conforme aux valeurs obtenues par d'autres équipes. Zeddam *et al.,* (2003) ont trouvé que la productivité d'un PhopGV Péruvien sur *T. solanivora* était de 1,3x10^8 OB/mg de poids larvaire en moyenne. Gómez *et al.* (2009), à partir des essais faits avec les isolats de PhopGV du centre de la Colombie (VG002, VG003 et VG004) et Péruvien (mentionnés dans le Chapitre 3) sur *T. solanivora*, ont présenté une productivité entre 4,1 et 4,7 x10^7 OB/mg de poids larvaire, valeurs comparables à celles obtenues dans ce travail sur le même hôte, mais à partir d'isolats mélangés artificiellement. Nous avons obtenu, avec les isolats VG003 et Pérou sur *T. solanivora,* une productivité supérieure, au-dessus de 10^8 OB/mg de poids larvaire. Des différences dans la méthode de purification des OB entre leur travail et le notre peuvent expliquer ces différences. La productivité d'autres GVs a été supérieure sur leurs hôtes respectifs.

Tableau 11. Parallèle entre les valeurs de la productivité virale et l'efficacité (CL_{50} et CL_{90}) des populations expérimentales et des isolats Pérou et VG003 sur les deux hôtes. CL=Concentration létale. OB=Corps d'inclusion.

Hôte	Population	P	CL_{50} (OB/mm^2)	CL_{90} (OB/mm^2)	Productivité (10^8 OB/mg larve)	Poids larve (mg)	Prod (10^8 OB/ larve)	Rendement (Prod/CL_{50})	Rendement (Prod/CL_{90})
P operculella	10:90	P0	2,36	3837,7	2,1	6,9	14,49	6,14	0,003
	10:90	P1	0,57	764,2	1,61	8	12,88	22,6	0,01
	10:90	P2	7,15	8770,1	2,62	5,8	15,2	2,13	0,001
	10:90	P5	0,16	738,6	1,61	8,5	13,69	85,53	0,02
	10:50	P0	1,23	164,5	2,15	8,4	18,06	14,68	0,1
	10:50	P1	0,53	275,3	1,87	7,8	14,59	27,52	0,05
	10:50	P2	0,91	999	1,85	4,5	8,33	9,15	0,008
	10:50	P5	1,48	1447,2	1,94	7,4	14,36	9,7	0,009
	90:10	P0	0,28	182,7	2,23	6,1	13,6	48,58	0,07
	90:10	P1	0,3	164,2	1,46	8,9	12,99	43,31	0,08
	90:10	P2	0,1	362,5	2,07	8,4	17,39	173,88	0,04
	90:10	P5	0,43	12714	1,48	8,2	12,14	28,22	0,001
	Pérou		6,62	258,7	1,89	8,7	16,44	2,48	0,06
	VG003		26,19	2558,3	2,02	7,4	14,95	0,57	0,005
T. solanivora	10:90	P0	5	600,7	3,64	10,1	36,76	7,35	0,06
	10:90	P2	5,82	118	0,72	20,5	14,76	2,54	0,12
	10:90	P5	2,19	93,7	0,48	23,7	11,38	5,19	0,12
	10:50	P0	2,66	136,3	2,7	9,9	26,73	10,05	0,2
	10:50	P2	3,66	159,9	0,6	17,7	10,62	2,9	0,06
	10:50	P5	4,72	216	0,64	25,7	16,45	3,48	0,07
	90:10	P0	1,25	155	2,06	17	35,02	28,02	0,22
	90:10	P2	3,65	60,1	0,85	26	22,1	6,05	0,36
	90:10	P5	6,17	257,8	0,65	23	14,95	2,42	0,06
	Pérou		30,1	13806,3	1,61	17,5	28,18	0,94	0,002
	VG003		6,93	423,6	2,15	10,6	22,79	3,29	0,05

Par exemple, Grzywacz *et al.* (2001), ont estimé la productivité des isolats Kenyans du *Plutella xylostella granulovirus* (PlxyGV) à $8x10^9$ OB/mg de poids larvaire, et, avec ce taux de production, ils ont calculé que pour les tests en champ, une concentration de $3x10^{13}$ OB/Ha offrait une protection similaire à celle des inseticides chimiques, ce qui correspond à environ 750 larves infectées/Ha. En ce qui concerne CpGV, les préconisations d'utilisation sont de 10^{13} OB/Ha, ce qui correspond à la quantité de virus contenu dans 1000 larves (d'après le dossier technique de la Carpovirusine ® produite par NPP (France)). Pour le PhopGV, Alcazar et Raman (1992) indiquent un traitement avec 20 larves/kg de produit formulé, et 5 kg/tonne de pommes de terres, ce qui, d'après les calculs de Zeddam *et al*. (2003) fait environ $1,5\times10^{11}$ OB/tonne traitée pour la protection face à *P. operculella* en stockage, et 3×10^{12} OB/Ha en champ. Ces derniers auteurs indiquent une production de $2,84\times10^9$ et $3,76\times10^9$ OB/larve sur *P. operculella* et *T. solanivora*, respectivement. Comme les isolats étudiés dans ce travail offrent des efficacités contre *T. solanivora* du même ordre que celles obtenues précédemment contre *P. operculella*, on peut s'attendre à des préconisations similaires. *T. solanivora*

attaque aussi les tubercules en plein champ. Il sera nécessaire de faire des essais pour déterminer quelle dose est suffisante pour une protection appropriée.

Dans notre travail, la productivité sur *P. operculella,* l'hôte primitif de PhopGV, est supérieure à celle sur *T. solanivora.* Cuartas *et al*., (2009), lorsqu'ils ont évalué les isolats de PhopGV VG001, VG003 et VG005 issus de *T. solanivora* sur les deux hôtes, ont également trouvé une productivité supérieure sur *P. operculella*.

De plus, la productivité des populations de laboratoire composées par mélange d'isolats est significativement supérieure à celle des isolats génétiquement homogènes. Ces différences pourraient être dues à des interactions entre les génotypes du mélange. Entre deux cycles d'infection de larves, le nombre de réplications du génome viral est très important : à partir d'un à 10 OB, une larve génère 10^8-10^{10} OB. Ceci implique la possibilité de génération d'un grand nombre de variants génétiques par mutation, auxquels s'ajoutent ceux originés par recombinaison, comme discuté dans le chapitre d'introduction. Cette capacité à générer de la variabilité génétique est un atout pour arriver à coloniser (accomplir le cycle viral) un nouvel hôte (Dennehy *et al*., 2006). Cependant, cette possibilité s'accompagne souvent de capacités de réplication et d'infection sur le nouvel hôte inférieures à ce qu'elles étaient sur l`hôte initial. Si l'équilibre entre le niveau de production d'OB par larve et la probabilité de rencontre d'un nombre d'OB suffisant pour démarrer l'infection n'est pas atteint, la colonisation de cette nouvelle espèce hôte ne se généralisera pas. Dans les populations étudiées, on constate que l'infection de *T. solanivora* par l'isolat Pérou demande une concentration virale importante (30,1 OB/mm2). Dans l'environnement extérieur, une telle concentration est difficilement atteignable. Par contre, dans des conditions de stockage, ou l'environnement est clos, cette concentration pourrait être atteinte. Les différences dans les résultats publiés sur le contrôle de *T. solanivora* par certains isolats de PhopGV, pourraient s'expliquer par ce fait. Une fois la rencontre entre le virus et son hôte réussie, et le processus de réplication dans cet hôte initié, la pression de sélection exercée dans cette nouvelle espèce hôte favorise l'adaptation et la spécialisation progressive en occasionnant des variations sur le processus d'infection de l'hôte

(Herniou *et al.,* 2004). Les populations de PhopGV adaptées à *T. solanivora* se différencient de celles non adaptées non seulement dans la pathogenicité (LC_{50} de 6,23 OB/mm^2 pour VG003), mais aussi dans le déroulement de l'infection. Ainsi, les larves de *T. solanivora* infectées par l'isolat Pérou meurent très tard, ce qui leur permet d'atteindre des poids considérables, tandis que VG003 produit une mortalité avec des symptômes plus « classiques ».

Notre modèle ne nous permet pas d'étudier plus finement la virulence, c'est-à-dire, la sévérité de l'infection, mesurée usuellement chez les baculovirus par le temps létal. En général on observe une corrélation négative entre productivité et virulence (plus le virus tue vite, moins la larve grandit, et moins elle a la possibilité de produire des OB (Cory *et al*., 2004 ; Simon *et al*., 2008). C'est le cas décrit par Cherry *et al.,* (2002), sur un isolat très virulent du *Plutella xylostella granulovirus* (PlxyGV) sur cet insecte. Ils ont constaté une productivité très basse. Erlandson *et al*., 2007, ont trouvé que la virulence du *Trichoplusia ni* SNPV (TnSNPV) était inférieure à celle d'*Autographa californica* MNPV (AcMNPV), mais affichait une productivité 5 fois supérieure (2,55x 10^9 contre 5,31x10^8 OB/larve). La productivité peut être affectée par différentes causes : la diminution pourrait être simplement le résultat d'une mort précoce de la larve, d'un changement dans sa croissance, ou encore, d'une modification sur la réplication virale (Cory *et al*., 2004).. Sans pouvoir faire une analyse détaillée dans notre cas, la corrélation entre poids final des larves et production n'est pas évidente.

5.4. Conclusion

Avec les donnés issues de ce travail il n'a pas été possible d'établir une relation claire entre pathogénicité et productivité. L'infection d'un nouvel hôte ne s'accompagne pas d'une diminution de la descendance produite (nb d'OB par larve), ni du taux d'exploitation de l'hôte (nb d'OB par masse de larve). Cependant, il apparait clair que le rendement (rapport OB produits à OB inoculés) varie. Le rendement en OB par masse de larves est en général supérieur dans les conditions testées pour les productions sur *P. operculella*. On a pu déterminer que la taille plus petite des larves de *P. operculella* par rapport à celles de *T. solanivora* n'est pas un facteur déterminant sur la

productivité virale.

Par ailleurs, la productivité des populations expérimentales composées de mélange de génotypes n'est pas plus basse que celle des isolats génétiquement homogènes.

La meilleure productivité trouvée sur larves de *P. operculella* et la distribution mondiale de cet insecte, permettent d'envisager cet hôte comme véhicule potentiel de production de PhopGV qui pourrait être utilisé contre les deux hôtes étudiés.

Cependant, si le développement d'un biopesticide efficace sur ce complexe de ravageurs est envisagé, des facteurs autres que la capacité réplicative des virus dans ces hôtes doivent être pris en compte. Ces facteurs sont par exemple l'adaptation des hôtes à des conditions d'élevage et le coût et l'efficacité de ces élevages. Dans ce dernier aspect, il est opportun de dire que le système de production de ces insectes a des points critiques à résoudre, notamment l'absence d'un milieu artificiel. Les élevages, et par conséquent la production du virus, se font directement sur les tubercules, ce qui implique l'extraction manuelle de larves infectées à la fin de la production.

Chapitre 6. Conclusion Générale

Les espèces invasives constituent une menace importante, non seulement pour les écosystèmes naturels (communautés d'espèces natives) mais aussi pour les écosystèmes exploités, notamment dans l'agriculture.

L'arrivée de ces espèces induit des changements dans les populations autochtones au niveau du comportement et de la biologie des populations, jusqu'à des changements au niveau génétique et/ou évolutif. Ces modifications touchent les espèces qui se trouvent en concurrence directe (interactions primaires) avec l'espèce envahissante (mêmes niches, exploitation des mêmes ressources, …), mais aussi d'autres espèces « secondaires » liées à l'espèce native, comme ses ennemis naturels, et dans notre cas d'étude, les virus pathogènes.

La teigne du Guatemala *T. solanivora* est un bon exemple d'espèce invasive qui occupe une niche naturellement colonisée par une autre teigne (*P. operculella*). Ce complexe d'espèces inféodées à la même culture est intéressant pour étudier l'évolution du granulovirus de *P. operculella* PhopGV en présence d'un hôte alternatif.

Cette thèse s'inscrit dans un double objectif, la recherche d'un moyen de contrôle biologique de la teigne du Guatemala, et l'étude de l'évolution des populations virales sous contrainte évolutive dans un scénario naturel.

Nos résultats doivent donc être examinés sous ce double prisme. Ils ont permis une première avancée dans l'étude de l'évolution virale, en mettant en évidence une variabilité génotypique et phénotypique interne aux populations, et en offrant une alternative pour le contrôle des deux espèces.

A partir des travaux initiaux réalisés par CORPOICA et l'IRD, cinq isolats de PhopGV ont été trouvés sur *T. solanivora* dans différentes régions de Colombie. Les résultats obtenus durant cette thèse ont confirmé la variabilité génotypique présente dans les populations des baculovirus. De plus certains des isolats sont constitués d'au moins 2

génotypes différents dont la proportion peut varier d'un isolat à l'autre en fonction de la zone géographique d'isolement. Ces génotypes semblent représentatifs des 2 hôtes présents dans un même écosystème. Certaines hypothèses ont été émises quant au déroulement de l'interaction du virus avec les deux hôtes, mais des expériences complémentaires sont nécessaires pour envisager les mécanismes génétiques et moléculaires qui sont mis en jeu durant le phénomène d'alternance des hôtes.

La capacité de réplication de PhopGV sur *T. solanivora*, voire le contrôle de cet insecte par le virus ont été sujets à controverse. L'identification d'isolats viraux aux efficacités variables sur les deux hôtes confirme le potentiel génétique attribué aux agents de contrôle biologique. Nous avons pu montrer l'adaptation d'un isolat (VG003) à ce nouvel hôte, et la flexibilité de la pathogénicité des autres isolats (VG001 et VG005) pour contrôler les deux hôtes. Nous avons pu établir que les isolats colombiens isolés sur *T. solanivora* présentent une insertion de 86 pb sur le gène *egt.* Nous n'avons pas pu conclure à une relation directe entre cette insertion et la possibilité d'infecter l'hôte alternatif. Il en a été de même sur l'autre région variable détectée, au niveau des *orf90-orf91.* D'autres gènes viraux sont certainement impliqués. Par contre, les différences allèliques au niveau de ces autres loci viraux n'ont pas pu être détectées par les moyens que nous avons mis en œuvre. Seul un séquençage complet du génome de chaque génotype permettrait d'obtenir ces informations.

A la vue des résultats prometteurs obtenus sur les isolats sauvages colombiens constitués de multiples génotypes, à la fois sur *P. operculella* et *T. solanivora,* il est apparu nécessaire de comparer l'évolution de ces isolats avec des échantillons constitués de mélanges artificiels sur les deux hôtes. L'hétérogénéité génotypique des populations, qu'elle soit naturelle (présente dans des isolats) ou artificielle (populations de laboratoire construites par mélange d'isolats génétiquement homogènes), a une influence sur l'efficacité du virus. Les populations expérimentales constituées à partir des isolats Pérou et VG003 dans trois proportions différentes présentent une efficacité supérieure sur les deux hôtes par rapport aux isolats appliqués individuellement. L'activité biologique des isolats sur les deux hôtes ne parait pas affectée au cours des

cycles de réplication. La plasticité génotypique présente dans ces isolats de PhopGV est un trait à mettre à profit pour le développement de biopesticides. Curieusement, le passage d'un hôte à l'autre d'un mélange de génotypes ne diminue pas l'efficacité biologique vis à vis de l'un ou l'autre des hôtes, au moins pendant la durée que nous avons pu tester, et pour les paramètres considérés. Dans le long terme, les virus mieux adaptés à un hôte ne conservent pas la même activité sur l'autre, ce qui laisse à penser que cette capacité d'alternance d'hôtes a un coût biologique.

Compte tenu des aspects liés aux caractéristiques propres de ces isolats, pouvant être considérées comme des ingrédients actifs contre les deux insectes ravageurs, il reste à résoudre certains points critiques à l'échelle de la production. La mise au point d'un milieu artificiel est un de ces points. Comme nous l'avons mentionné, la disponibilité d'un milieu artificiel nous permettrait de déterminer d'autres paramètres de l'efficacité biologique, comme la virulence des isolats en calculant le temps létal et nous pourrions établir la relation avec la productivité virale. Pour ce qui concerne la production industrielle, cela permettrait d'aboutir à un système de production moins exigeant en main d'œuvre et en temps de manipulation.

A travers la compréhension des phénomènes d'évolution et d'adaptation, nous pouvons proposer de nouvelles solutions cohérentes et spécifiquement adaptées pour lutter contre ces ravageurs grâce à l'emploi d'un ou plusieurs mélanges d'isolats. L'expérience et les résultats acquis lors de cette thèse, nous permettent d'aborder plus sereinement l'avenir et notamment l'annonce de nouveaux flux d'invasions dus au réchauffement climatique. De nouveaux ravageurs de la famille des Gelechiidae, comme la teigne de la tomate *T. absoluta* déjà présente dans les pays méditerranéens ainsi que *S. tangolias* pourraient être les futures cibles de ces nouveaux bioinsecticides.

7. Références Bibliographiques

(NC_004062). Online:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=16527&window=7350&begin=108497

AGRONEWS. 2010. Biopesticides market to reach 1 billion on 2010. On line: http://news,agropages.com/Feature/FeatureDetail---178.htm

ARAQUE, C., GARCÍA, J. 1999. Manual integrado de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny). CRECED Provincia de Pamplona, Santander. Colombia, 44 p.

ARENDS, H., WINSTANLEY, D., JEHLE, J. 2005. Virulence and competitiveness of *Cydia pomonella granulovirus* mutants: parameters that do no match. J. Gen. Virol. 86: 2731-2738.

AREVALO, A., CASTRO, R. 2003. Evaluación post-registro de los insecticidas con licencia de uso para controlar la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA, CNP. Bogotá, Colombia: 86-89.

ASSER-KAISER, S., FRITSCH, E., UNDORF-SPAHN, K., KIENZLE, J., EBERLE, K.; GUND, N.A., REINEKE, A., ZEBITZ, C.P., HECKEL, D.G., HUBER, J., JEHLE, J.A. 2007. Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. Science 318: 1916-1917.

BALMER, O., CURTIS-STEARNS, S., SCHÖTZAU, A., BRUN, R. 2009. Intraspecific competition between co-infecting parasite strains enhances host survival in African trypanosomes. Ecology 90 (12):3367-3378.

BARRETO, N., ESPITIA, E., GALINDO, R., GORDO, E., CELY, L., MARTÍNEZ, L., LOZANO, F., LÓPEZ-ÁVILA, A. 2003a. Estudios de fluctuación de poblaciones de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en tres intervalos de altitud en Cundinamarca y Boyacá. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia, 24-25 abril 2003. P 153-157.

BARRETO, N., ESPITIA, E., GALINDO, R., SÁNCHEZ, M., SUARÉZ, A., LÓPEZ-ÁVILA, A. 2003b. Determinación de parámetros reproductivos y hábitos de *Tecdia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera : Gelechiidae) en condiciones de laboratorio y campo. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia, 24-25 abril 2003. P 31-36.

BERLING, M., BLACHERE-LOPEZ, C., SOUBABERE, O., LÈRY, X., BONHOMME, A., SAUPHANOR, B., LOPEZ-FERBER, M. 2009. *Cydia pomonella granulovirus* genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. Appl. Envir. Micro. 75(4):925-930.

BONNING, B.C. HAMMOCK, B.D. 1996. Development of recombinant baculoviruses for insect control. Ann. Rev. Entomol. 41: 191-210.

BOSA, C.F., WITZGALL, P., COTES, A.M., FUKUMOTO, T., BARRETO, N. 2005. Evaluación de la técnica de la interrupción de la cópula de *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). Rev. Colomb. Entomol. 31 (2): 145-150.

BRAUNAGEL, S., SUMMERS, M. 1994. *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, PDV and ECV viral envelopes and nucleocapsids: structural proteins, antigens, lipid and fatty acid profiles. Virology: 202:315-328.

BULL, J.C., GODFRAY, H.C.J., O'REILLY, D.R. 2001. Persistence of an occlusion-negative recombinant nucleopolyhedrovirus in *Trichoplusia ni* indicates high multiplicity of cellular infection. Appl. Environ. Microbiol. 67 (11): 5204- 5209.

BULL, J.C., GODFRAY, H.C.J., O'REILLY, D.R. 2003. A few-polyhedra mutant and wild-type nucleopolyhedrovirus remain as a stable polymorphism during serial coinfection in *Trichoplusia ni*. Appl. Environ. Microbiol. 69 (4): 2052- 2057.

BURDEN, J., HAILS, R., WINDASS, J., SUNER, M.M., CORY, J. 2000. Infectivity, speed of kill, and productivity of a baculovirus expressing the Itch Mite Toxin Txp-1 in second and fourth instar larvae of *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 75 (3): 226-236.

CABALLERO, P., WILLIAMS, T., LÓPEZ-FERBER, M. 2001. Estructura y clasificación de los baculovirus. P.15 - 46. *En*: P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, España.

CARNERO, A., PADILLA, A., PERERA, S., HERNÁNDEZ, E., TRUJILLO, E. 2008. Pest status of *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae), Guatemalan Potato moth, in the Canary Islands. In: Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes, IOBC/WPRS Bulletin 31:336-339.

CARRERA, M.V., ZEDDAM, J.L., POLLET, A., LÉRY, X., LÓPEZ-FERBER, M. 2008. Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. In: Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 31: 40-43.

CHAPARRO, M., ESPINEL, C., COTES, A., VILLAMIZAR, L. 2010. Fotoestabilidad y actividad insecticida de dos formulaciones de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*. Rev. Colomb. Entomol. 36 (1): 25-30.

CHARLTON, C.A., VOLKMAN, L.E. 1993. Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB sf 21 celles induced actin cable formation. Virology. 197:245-254.

CHERRY, A., WILLIAMS, T. 2001. Control de insectos plaga mediante los baculovirus. P. 389-450. *En*: P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, España.

CHERRY, A., OSAE, M., DJEGUI, D. 2002. Relative potency, yield and transmission of a Kenyan isolate of *Plutella xylostella* granulovirus in a population of diamondback moth from Benin, West Africa. *En:* International Symposium Improving Biocontrol of *Plutella xylostella*. Cirad, Montpellier, France. On line: http://dbm2002.cirad.fr/en/papers/cherry.html

CIP. 1992. Control biológico de la polilla de la papa con *Baculovirus Phthorimaea*. Boletín de Capacitación CIP-2, Lima. 43. p.

CLAUS, J.D., SCIOCCO DE CAP, A. 2001. Producción masiva de baculovirus. P.257-314. *En*: P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, España.

CLAVIJO, G., WILLIAMS, T., SIMON, O., MUÑOZ, D., CERUTTI, M., LOPEZ-FERBER, M., CABALLERO, P. 2009. Mixtures of complete and *pif1*and *pif2* – deficient genotypes are required for increased potency of an insect nucleopolyhedrovirus. J. Virol. V.83 (10): 5127-5136.

CLAVIJO, G., WILLIAMS, T., MUNOZ, D., CABALLERO, P., LOPEZ-FERBER, M. 2010. Mixed genotype transmission bodies and virions contribute to the maintenance of diversity in an insect virus .Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 277: 943- 951.

CONDREAY, J.P., KOST, T.A. 2007. Baculovirus expression vectors for insect and mammal cells. Curr Drug Targets 8: 1126-1131.

COOPER, D., CORY, J. S., MYERS, J. H. 2003. Hierarchical spatial structure of genetically variable nucleopolyheroviruses infecting cyclic populations of western tent caterpillars. Mol. Ecol. 12: 881- 890.

CORY, J., CLARKE, E., BROWN, M., HAILS, R., O'REILLY, D. 2004. Microparasite manipulation of an insect: the influence of the *egt* gene on the interaction between a baculovirus and its lepidopteran host. Funct Ecol. 18: 443-450.

CORY, J., GREEN, B., PAUL, R., HUNTER-FUJITA, F. 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. J. Invertebr. Pathol. 89: 101-111.

CORREDOR, D., FLÓREZ, E. 2003. Estudios básicos de biología y comportamiento de la polilla guatemalteca de la papa en un área piloto en el municipio de Villapinzón. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia, 24-25 abril 2003. P 39-45.

CRESPO, L., GRZYWACS, D., FIGUEROA, I., BONEA, O. 2005. Una formulación líquida del baculovirus y otros productos naturales para el control de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias* (Lep: Gelechiidae) en Bolivia. En: Memorias del III Taller internacional sobre la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Cartagena de Indias, Colombia. Centro Internacional de la Papa (CIP). pp. 49-58.

CROIZIER, G., CROIZIER, L., BIACHE, G., CHAUFAUX, J. 1985. Evolution de la composition génétique et du pouvoir infectieux du baculovirus du *Mamestra brassicae* L. au cours de 25 multiplications successives sur les larves de la noctuelle du chou. Entomophaga 30 : 365-374.

CROIZIER, G. RIBEIRO, C. H. T. 1992. Recombination as a possible major cause of genetic heterogeneity in *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus wild populations. Virus Research 26: 183-196.

CROIZIER, L., TAHA, A., CROIZIER, G., LOPEZ-FERBER, M. 2004. Genebank (NC_004062). Online: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=16527&window=7350&begin=108497

CROOK, N. E., SPENCER, R. A., PAYNE, C.C. 1985. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. J. Gen. Virol. 66: 2423-2430.

CROOK, N. E. 1986. Restriction enzyme analysis of granulosis viruses isolated from *Artogeia rapae* and *Pieris brassica.* J. Gen. Virol. 67: 781 – 787.

CUARTAS, P., VILLAMIZAR, L., ESPINEL, C., COTES, A.M. 2009. Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera:Gelechiidae). Rev. Colomb. Entomol. 35 (2):122-129.

DAS, G. P., RAMAN K. V. 1994. Alternate hosts of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) Crop Prot. 13: 83-86.

DAVIS, M., THOMPSON, K. 2000. Eight ways to be a colonizer; two ways to be an Invader: a proponed nomenclature scheme for invasion ecology. Bull. Ecol. Soc. Am. 81:226-230.

DENNEHY, J., FRIEDENBERG, N., HOLT, R., TURNER, P. 2006. Viral ecology and the maintenance of novel host use. Am. Nat. 167 (3):429-439.

DOMINGO, E., BARANOWSKI, E., RUIZ-JAROBO, C.M., MARTIN-HERNANDEZ, A.M., SAIZ, J.C., ESCARMIS, C. 1998. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. Emerg. Infect. Dis. 4: 521–527.

DURANTEL, D., LÓPEZ-FERBER, M., CROIZIER, G. 1998. Régulation des gènes chez les baculovirus. Virologie. 2 :285-295.

EBERLE, K., SAYED, S., REZAPANAH, M., SHOJAI-ESTABRAGH, S. AND JEHLE, J. 2009. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. 2009. J. Gen. Virol. 90:662-671.

EBLING, P. M., KAUPP, W. J. 1995. Differentiation and comparative activity of six isolates of nuclear polyhedrosis virus from the forest tent caterpillar, *Malocosoma distria,* Hubner. J. Invertebr. Pathol. 66:198-200.

ENGELHARD, E., KAM-MORGAN, L., WASHBURN, J., VOLKMAN, L. 1994. The insect tracheal system: a conduit for the systemic spread of *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. Virology. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 91:3224-3227.

ERLANDSON, M., NEWHOUSE, S., MOORE, K., JANMAAT, A., MYERS, J., THEILMANN, D. 2007. Characterization of baculovirus isolates from *Trichoplusia ni* populations from vegetable greenhouses. Biol. Contr. 41: 256-263.

ERLANDSON, M. 2009. Genetic variation in field populations of Baculovirus: Mechanisms for generating variation and its potential role in baculovirus epizootiology. Virologica Sinica. 24 (5): 458-469.

ESCRIBANO, A., T. WILLIAMS, D. GOULSON, R. D. CAVE, J. W. CHAPMAN, AND P. CABALLERO. 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of four isolates from the Americas. J. Econ. Entomol. 92:1079–1085.

ESPINEL, C., COTES, A. M., VILLAMIZAR, L. 2009. Efecto de la infección con granulovirus en el desarrollo de *Tecia solanivora* (Lepidoptera:Gelechiidae). Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 62 (1):4797-4805.

ESPINEL, C., LÉRY, X., VILLAMIZAR, L., ZEDDAM, J.L., COTES, A.M., LÓPEZ-FERBER, M. 2009. A *Phthorimaea operculella* granulovirus (PhopGV) containing several genotypes is highly efficient on *Tecia solanivora.* Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/ wprs Bulletin. 45: 83-86.

ESTRADA, A., SIERRA, G. 1997. Vademécum del cultivo de la papa. Fedepapa. Federación Colombiana de Productores de Papa. Primera edición. Edición Grafemas Ltda. Bogota, Colombia.172. p.

FALCON, L., HESS, R. 1985. Electron microscope observations of multiple occluded virions in the granulosis virus of the codling moth, *Cydia pomonella.* J. Invertebr. Pathol. 45:245-252.

FEDERICI, B. 1997. Baculovirus patogénesis. p. 33-59. *En:* L.K. Miller (ed.). The Baculoviruses. Plenum Press, N.Y.

FIGUEIREDO, E., MUÑOZ, D., ESCRIBANO, A., MEXIA, A., VLAK, J.M. CABALLERO, P. 1999. Biochemical identification and comparative insecticidal activity of nucleopolyhedrovirus isolates pathogenic for *Heliothis armigera* (Lep. Noctuidae) larvae. J. Appl. Ent. 123: 165-169.

FINNEY, D. J. 1971. Probit analysis. Cambridge University Press. 333 p.

FRANK, S.A. 1996. Models of parasite virulence. Q. Rev. Biol. 71: 37-78

FRANK, S.A. 2003. Viral genetics: Deadly partnerships. Nature Vol 425: 251-252.

GALINDO, J., ESPAÑOL, A. 2003. Una metodología para la evaluación de tratamientos de manejo de polilla guatemalteca mediante el seguimiento de poblaciones y el muestreo de la cosecha. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia: 14-19.

GEHREN, U. 1982. Bekämpfung der none durch impfung mit dem Hofmannschen Bacillus. Z. Forst. Jagdwesen 24: 499.

GERMAIN, J.F., LACORDAIRE, A., COCQUEMPOT, C., RAMEL, J.M., OUDARD, E. 2009. Un nouveau ravageur de la tomate en France : *Tuta absoluta.* PHM-Revue Horticole. Nº 512 : 37-41.

GÓMEZ, Y., LÉRY, X., MUÑOZ, D., LÓPEZ-FERBER, M., CABALLERO, P. 2008. Molecular and biological characterization of a novel granulovirus isolate from *Phthorimaea operculella* found in Costa Rica. IOBC/WPRS Bulletin 31: 89.

GÓMEZ, J., VILLAMIZAR, L., ESPINEL, C., COTES, A.M. 2009. Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera:Gelechiidae). Corpoica Cien. Tecnol. Agropecu. 10(2): 152-158.

GOTO, C., MINOBE, Y., IISUKA, T. 1992. Restriction analysis and mapping of the genomes of granulosis viruses isolated from *Xestia c-nigrum* and five other noctuid species. J. Gen. Virol. 73: 1491-1497.

GRAHAM, R.I., TYNE, W.I., POSSE, R.D. 2004. Genetically variable nucleopolyhedrovirus isolated from spatially separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera : Geometridae) in Orkney. J. Invertebr. Pathol. 87:29-38.

GRZYWACZ, D., PARNELL, M., KIBATA, G., ODUOR, G., OGUTU, W., MIANO, D., WINSTANLEY, D. 2001. The development of endemic baculoviruses of *Plutella xylostella* (diamondback moth DBM) for control of DMB in East Africa. *En*: Proceedings of the 4Th International workshop : The management of diamondback moth and other crucifer pests. Nov. 2001. Melbourne, Australie. Pp. 271-280.

GUILLON, M. 2005. Current world situation on acceptance and marketing of biological control agents (BCAS). International Biocontrol Manufaturers' Association. On line: http://www.ibma.ch/IBMA_Public_Positions/index.html.

GUTIÉRREZ, S., LÓPEZ-FERBER, M. 2004. Les stratégies des baculovirus pour franchir l'intestin des insectes. Virologie. 8 :311-321.

HAMBLIN, M., VAN BEEK, N.A.M., HUGHES, P.R., WOOD, H.A. 1990. Co-occlusion and persistence of a baculovirus mutant lacking the polyhedron gene. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3057-3062.

HARVEY, J.P., VOLKMAN, L.F. 1983. Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus. Virology. 124: 21-34.

HERNIOU, E., OLSZEWSKI, J., CORY, J., O'REILLY, D. 2003. The genome sequence and evolution of Baculoviruses. Annu. Rev. Entomol. 48: 211- 234.

HERNIOU, E.; OLSZEWSKI, J.; CORY, J.; O´REILLY, D.; CORY, S. 2004. Ancient coevolution of Baculoviruses and their insect hosts. J. Virol. 78 (7): 3244-3251.

HODGSON, D.J., VANBERGEN, A.J., WATT, A.D., HAILS, R.S., CORY, J.S. 2001. Phenotypic variation between naturally co-existing genotypes of a Lepidopteran baculovirus. Evol. Ecol. Res. 3: 687-701.

HODGSON, D.J., HITCHMAN, R.B., VANBERGEN, A.J., HAILS, R.S., POSSEE, R.D., CORY, J.S. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. J. Evol. Biol. 17: 1018-1025.

HORTON, H.M., BURAND, J.P. 1993. Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion. J. Virol. 67:1860-1868.

IBARRA, J. DEL RINCÓN, M.C. 2001. Capacidad insecticida de los baculovirus. p. 203 – 226. *In*: P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, España.

JEHLE, J. A., NICKEL, A., VLAK, J.M., BACKHAUS, H. 1998. Horizontal escape of the novel Tc1 like lepidopteran transposon TCp3.2 into *Cydia pomonella* granulovirus. J. Mol. Evol. 46: 215-224.

JEHLE, J., BLISSARD, W., BONNING, B., CORY, J., HERNIOU, E., ROHRMANN, G., THEILMANN, D., THIEM, S., VLAK, J. 2006. On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. Arch. Virol. 151:1257-1266.

KAMITA, S.G., MAEDA, S., HAMMOCK, B. 2003. High-frequency homologous recombination between baculoviruses invoves DNA replication. J. Virol. 77: 13053-13061.

KIKHNO, I., GUTIERREZ, S., CROIZIER, L., CROIZIER, G., LOPEZ-FERBER, M. 2002. Characterisation of *pif* gene required for *per os* infectivity of *Spodoptera littoralis* nucleopolyherovirus. J. Gen. Virol. 83: 3013-3022.

KOLODNY-HIRSCH, D., Van BEEK, N. 1997. Selection of a morphological variant of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with increased virulence following serial passage in *Plutella xylostella.* J. Invertebr. Path.69:205-211.

KOST, T.A., CONDREAY, J.P., JARVIS, D.L. 2005. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nat Biotechnol. 23: 567-575

KROSCHEL, J., FRITSCH, E., HUBER, J. 1996a. Biological control of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller in the Republic of Yemen using granulosis virus: Biochemical characterization, pathogenicity and stability of the virus. Biocontrol Sci.Technol. 6:207-216.

KROSCHEL, J., KAACK, J., FRITSCH, E., HUBER, J. 1996b. Biological control of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* Zeller in the Republic of Yemen using granulosis virus: Propagation and effectiveness of the virus in field trials. Biocontrol Sci.Technol. 6:217-226.

KUZIO, J., JAQUES, R., FAULKNER, P. 1989. Identification of P74, a gene essential for virulence of baculovirus occlusion bodies. Virology 173: 759-763.

LACEY, L.A., VAIL, P.V., HOFFMANN, D.F. 2002. Comparative activity of baculoviruses against the codling moth *Cydia pomonella* and three other tortricid pests of tree fruit. J. Invertebr. Path. 80: 64-68.

LEE, C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive especies. Trends in Ecology & Evolution. 17(18):386-391.

LÉRY, X.; ABOL-ELA, S., GIANNOTTI, J. 1998. Genetic heterogeneity of *Phthorimaea operculella* granulovirus: Restriction analysis of wild-type isolates and clones obtained *in vitro.* Acta Virol. 42: 13-21.

LÉRY, X.; ZEDDAM, J. L.; LÓPEZ-FERBER, M. 2005. Genetic heterogeneity of various PhopGV isolates found on *Phthorimaea operculella, Tecia solanivora* and *Symmetrischema tangolias.* En: 10th European Meeting. Invertebrate Pathogens in biological control: Present and future, Bary, Italy.

LI, Q., LI, L., MOORE, K., DONLY, C., THEILMANN D.A., ERLANDSON, M. 2003. Characerization of *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus enhancing and its functional analysis via expression in an *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus recombinant. J. Gen. Virol. 84: 123-132.

LÓPEZ-ÁVILA, A. 1996. 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. Bogota-Colombia: 146-154.

LÓPEZ-ÁVILA, A., ESPITIA, E. 2000. Plagas y benéficos en el cultivo de la papa en Colombia. Boletín Técnico Divulgativo. CORPOICA – PRONATTA. Bogotá, Colombia. 35 p.

LÓPEZ-FERBER, M., DEVAUCHELLE, G. 2005. Les enjeux écologiques des biopesticides à base de baculovirus. En : Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. Ed. Tec & Doc. Lavoisier. France. Pp:589-606.

LÓPEZ-FERBER, M., SIMÓN, O., WILLIAMS, T., CABALLERO, P. 2003. Deffective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 270: 2249- 2255.

MATTHIESSEN, J. N., CHRISTIAN, R. L., GRACE, T. D., FILSHIE, B. K. 1978. Large-scale field propagation and purification of the granulosis virus of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bull. Entomol. Res. 68:385-391

Mc. SPADDEN, B. 2008. Biological control: Current and future market demands. On line:http://www.oardc.ohiostate.edu/mcspaddengardenerlab/Presentations/BMG_CSREESpres.pdf.

MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 44:257-289.

MOURA, G., BATISTA, S., RAMPELOTTI-FERREIRA, F., RAGASSI, M., GARCIA, C., DELALIBERA, I. 2010. Potential of a granulovirus isolate to control *Phthorimaea operculella* Lepidóptera: Gelechiidae). Biocontrol. DOI 10.1007/s10526-010-9277-y IOBC. On line.

MUÑOZ, D., CABALLERO, P. 2001. Diversidad natural de los baculovirus p. 99-102. *In*: P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, España.

MUÑOZ, D., CABALLERO, P. 2000. Persistence and effects of parasitic genotypes in a mixed population of the *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus. Biol. Contr. 19, 259-264.

MUÑOZ, D., CASTILLEJO, J., CABALLERO, P. 1998. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. Appl. Environ. Microbiol. 64 (11): 4372-4377.

NIÑO, L. 2004. Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa: 1-18.

NIÑO, L., ACEVEDO, E., BECERRA, F. 2005. Evaluación de un virus de la granulosis nativo e insecticidas químicos para el control en campo de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidoptera:Gelechiidae) en el estado Mérida, Venezuela. En: Memorias del III Taller internacional sobre la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Cartagena de Indias, Colombia. Centro Internacional de la Papa (CIP). pp. 59-66.

NIÑO, L., NOTZ, A. 2000. Patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Mérida, Venezuela. Bol. Entomol.Ven.15(1):39-48.

O'REILLY, D.R. 1995. Baculovirus-encoded ecdysteroid UDP-glucosyl transferases. Insect Biochem Mol Biol ;, 25 : 541-550.

O'REILLY, D.R., MILLER, L.K. 1989. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. Science 245: 1110-1112.

O'REILLY, D.R., MILLER, L.K. 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the egt gene. Biotechnology 9: 1086-1089

OEPP/EPPO 2005. Data sheets on quarantine pests. OEPP/EPPO Bulletin 35 : 399-401

OEPP/EPPO 2005. *Tuta absoluta*. Bulletin OEPP/EPPO 35:434-435.

ORTEGA, E., FERNÁNDEZ, S. 2000. Manejo integrado de la polilla minadora de la papa *Phthorimaea operculella*. Fonaiap, Prociandino, Pracipa. Ed. Juan F. Bolaños. IICA. Quito. 40 p.

PARNELL, M., GRZYWACZ, D., JONES, K., BROWN, M., ODUOR, G., ONG'ARO, J. 2002. The strain variation and virulence of granulovirus of diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus, Lep., Yponomeutidae) isolated in Kenya. J. Invertebr. Pathol. 79: 192-196.

PENG, K., Van OERS, M., HU, Z., Van LENT, J. W. M., VLAK, J. 2010. Baculovirus *per os* infectivity factors form a complex on the surface of occlusion-derived virus. J. Virol. 84 (18): 9497-9504.

PÉREZ, L., PUERTA, A., BUSTILLO, A., MADRIGAL, A. 1988. Evaluación del *Baculovirus phthorimaea* VG en larvas de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller). Rev. Colomb. Entomol.14(2): 33 –40.

PINEDO, F., MOSCARDI, F., LUQUE, T., OLSZEWSKI, J., RIBEIRO, B. 2009. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltranferase (*egt*) gene of *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. Biol. Contr. 27: 336 – 344.

POLLET, A., BARRAGÁN, A., ZEDDAM J. L., LÉRY, X. 2003. *Tecia solanivora* a serious biological invasion of potatoes cultures in South America. International Pest Control. 45: 139-144.

POSSEE, R. D., RORHMANN, G. F. 1997. Baculovirus genome organization and evolution. *En*: The baculoviruses (L.K. Miller, Ed.), Plenum Press, New York.US. pp.109-140

POVOLNY, D. 1973. *Scrobipalpopsis solanivora* sp.n. A new pest of potato (*Solanum tuberosum*) from Central America. Acta Universitatis Agriculturae, Facultas Agronomica 21: 143–146.

PUILLANDRE, N., DUPAS, S., DANGLES, O., ZEDDAM J.L., CAPDEVIELLE-DULAC, C., BARBIN, K., TORRES-LEGUIZAMON, M., SILVAIN, J.-F. 2007. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. Biol. Invasions 10 (3): 319-333.

REBAUDO, F., DANGLES, O., ZEDDAM, J.L., LERY, X., LOPEZ-FERBER, M. 2006. Étude de l'efficacité biologique d'un granulovirus pour le contrôle de la teigne guatémaltèque de la pomme de terre *Tecia solanivora* Povolny (1973). AFPP Conférence Internationale sur les maladies des plantes. Tours, France.

REZAPANAH, M., SHOJAI-ESTABRAGH, S., HUBER, J., JEHLE, J. 2008. Molecular and biological characterization of new isolates of *Cydia pomonella* granulovirus from Iran. J. Pest. Sci. 81:187-191.

RIBEIRO, H., PAVAN, O., MUOTRI, A. 1997. Comparative susceptibility of two different hosts to genotypic variants of the *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus. Entomol. Exp. Appl. 83: 233-237.

ROHRMANN, G. 2008. Baculovirus as insecticides: Three examples. *En* : Baculovirus Molecular Biology. NCBI. National Center for Biotechnology Information. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=bacvir&part=ch09.

ROHRMANN, G. 2008b. Structural proteins of baculovirus occlusion bodies and virions. *En* : Baculovirus Molecular Biology. NCBI. National Center for Biotechnology Information.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi?book=bacvir&part=ch02&blobn

ame=&blobtype=pdf

RUBIO, S. A., VARGAS, B., LÓPEZ-AVILA, A. 2004. Evaluación de la eficiencia de *Trichogramma lopezandinensis* (Hymenoptera:Trichogrammatidae) para el control de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Rev. Colomb. Entomol. 30(1):107-112.

SAENZ, A. 2003. Efficacy of invasion of *Tecia solanivora* and *Clavipalpus ursinus* by the nematode *Steinernema feltiae.* Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica) 67: 35-43.

SAKAI, A., ALLENDORF, F., HOLT, J., LODGE, D., MOLOFSKY, J., WITH, K., BAUGHMAN, S., CABIN, R., COHEN, J., ELLSTRAND, N., McCAULEY, D., O'NEIL, P., PARKER, I., THOMPSON, J., WELLER, S. 2001. The population biology of invasive species. Annu. Rev. Ecol. Syst. 32:305-332.

SCIOCCO DE CAP, A. 2001. Biología y patogénesis de los baculovirus. p 47- 62. *En*: P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, España.

SEPPÄLÄ, O., KARVONEN, A., TELLERVO-VALTONEN, E., JOKELA, J. 2009. Interactions among co-infecting parasite species: a mechanism maintaining genetic variation in parasites? Proc. R. Soc. B. 276:691-697.

SETIAWATI, W., SOERIAATMADJA, R.E., RUBIATI, T., CHUJOY, E. 2000. The use of *Phthorimaea operculella* granulosis virus to control potato tubermoth (PTM) in tuber storage. Journal Hortikultura (Indonesia). 10(1): 40 - 45.

SHAPIRO, D. I., FUXA, J. R., BRAYMER, H. D., PASHLEY, D. P. 1991. DNA restriction polymorphism in wild isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Path. 58: 96-105.

SHAPIRO, M., SHEPARD, B.M. 2006. The gypsy moth (Lepidoptera:Lymantriidae) nucleopolyhedrovirus as a synergist for baculoviruses against beet army worm, fall armyworm, and corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). J. Agric. Urban Entomol. 23 (4): 243-251.

SHAPIRO-ILAN, D., FUXA, J., LACEY, L., ONSTAD, D., KAYA, H. 2005. Definiton of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. J. Invertebr. Pathol. 88: 1 -7.

SIMON, O., WILLIAMS, T., LÓPEZ-FERBER, M., CABALLERO, P. 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: high prevalence of deletion genotypes. Appl. Environ. Microbiol. 70: 5579–5588.

SIMON, O., WILLIAMS, T., CABALLERO, P., LÓPEZ-FERBER, M. 2006. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 273:783-790.

SIMON, O., WILLIAMS, T., LÓPEZ-FERBER, M., CABALLERO, P. 2005. Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. Appl. Environ. Microbiol. 71: 4254, 4262.

SIMON, O., WILLIAMS, T., LOPEZ-FERBER, M., TAULEMESSE, J.M., CABALLERO, P. 2008. Population genetic structure determines speed of kill and occlusion body production in *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. Biol. Contr. 44: 321-330.

SLACK, J., ARIF, B.M. 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. Adv. Virus Res. 69: 99-165.

SOSA-GÓMEZ, D., MOSCARDI, F. 2001. Resistencia de lepidópteros a los nucleopoliedroviurs: el caso de *Anticarsia gemmatalis* – AgMNPV. p 451-478. *En*: P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, España.

SOTELO, G. 1997. La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) y su control con Baculovirus. II Curso - Taller : Manejo Integrado de Plagas de la papa. CRECED, Valles de Ubaté y Chiquinquirá. Colombia: 32-34.

SPORLEDER, M., ZEGARRA, O., KROSCHEL, J., HUBER, J., LAGNAOUI, A. 2005. Assessment of the inactivation time of *Phthorimaea operculella* (*Po*GV) at different intensities of natural irradiation. CIP Program Report. 1999-2000. 123-128 p.

STEINHAUS, E., MARSH, G. 1967. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. J. Invertebr. Path. 9: 436-438.

TAKATSUKA, J., OKUNO, S., NAKAI, M., KUNIMI, Y. 2003. Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Biol. Control 26: 32-39.

VAN OERS, M., VLAK, J. 2007. Baculovirus genomics. Current Drug Targets. 8:1051-1068.

VARGAS-OSUNA, E., ALDEBIS, H., CABALLERO, P., LIPA, J., SANTIAGO-ALVAREZ, C. 1994. A newly described baculovirus (subgroup B) from *Ocnogyna baetica* (Rambur) Lepidoptera: Actiidae) in sourthen Spain. J. Invertebr. Pathol. 63: 31-36.

VICKERS, J. M., CORY, J. S., ENTWISTLE, P. F. 1991. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosis virus from the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella)* (Lepidoptera: Gelechiidae). J. Invert. Pathol. 57: 334-342.

VIDA, M. C. 1527. De Bombyce. Roma. 238 pp. Original à la biblioteque nationale de France. Paris. Livre II, page 137 versets 10-112.

VILLAMIZAR, L., ZEDDAM, J.L., ESPINEL, C., COTES, A.M. 2005. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base de granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV. Rev. Colomb. Entomol. 31(2):127-132.

VILLAMIZAR, L., ESPINEL, C., GRIJALBA, E., GOMEZ, J., COTES, A. M., TORRES, L., BARRERA, G., LÉRY, X., ZEDDAM, J.L. 2008. Isolation, identification and biocontrol activity of colombian isolates of granulovirus from *Tecia solanivora.* IOBC/WPRS Bulletin. 31:85-88.

WANG, P., GRANADOS, R. 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potencial PM tanget sites for insect control. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47:110-118.

WASHBURN, J., TRUDEAU, D., WONG, J., VOLKMAN, L. 2003. Early pathogenesis of *Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus* and *Helicoverpa zea single nucleopolyhedrovirus* in *Heliothis virescens*: a comparison of the "M" and "S" strategies for astablishing fatal infection. J. Gen. Virol. 84: 343-351.

XUEJUAN, F., MAGGIORANI, A., GUDIÑO, S. 2000. Uso de nematodos entomopatógenos como una alternativa en el control de la polilla *Tecia solanivora,* importante plaga de la papa (*Solanum tuberosum*) en Mérida, Venezuela. Rev. Forest. Venez. 44 (1): 115-118.

ZEDDAM J. L., POLLET, A., MANGOENDIHARJO, S., HARIS RAMADHAN, T., LÓPEZ-FERBER, M. 1999. Occurrence and virulence of a granulovirus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. J. Invertebr. Path. 74: 48-54.

ZEDDAM J.L., VASQUEZ SOBERÓN, R.M., VARGAS RAMOS, Z., LAGNAOUI, A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Bol. San. Veg. Plagas 29: 657-665.

ZEDDAM, J.L., CARRERA, M., BARRAGÁN, A., POLLET, A., LÓPEZ-FERBER, M., LÉRY, X. 2005. Los virus entomopatógenos para el control de las polillas de la papa: Nuevas perspectivas en el manejo de *Tecia solanivora* (Lepidoptera:Gelechiidae). En: Memorias del III Taller internacional sobre la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Cartagena de Indias, Colombia. Centro Internacional de la Papa (CIP). pp. 67-78.

ZELLER, P.C. 1873. Beitrage Zur Kenntniss der nordamericanishchen Nachtfolter, besonders der Microlepidopteran. *Verhandlungen der Zoologish-botanishchen Geselischaft in Wein* 23: 262–263

8. Annexes

Annexe 1.

Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Revista Colombiana de Entomología 35 : 122-129 (2009)

Revista Colombiana de Entomología 35 (2): 122-129 (2009)

Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Infection of native granulovirus on *Tecia solanivora* and *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae)

PAOLA CUARTAS O.[1], LAURA VILLAMIZAR R.[2], CARLOS ESPINEL C.[3] y ALBA MARINA COTES P.[4]

Resumen: Durante 2004 y 2005 se aislaron, identificaron y caracterizaron cepas nativas de granulovirus obtenidos a partir de larvas de *Tecia solanivora* encontradas en los departamentos de Cundinamarca, Nariño y Norte de Santander. Se estudiaron los efectos de estos agentes infecciosos sobre el desarrollo de las polillas de la papa *T. solanivora* y *Phthorimaea operculella*, evaluando como variables el ancho de la cápsula cefálica, los signos de infección viral y la mortalidad. Asimismo se determinó el efecto de la formulación sobre la eficacia de los diferentes aislamientos preparados en forma de polvo para protección de semilla de papa. Adicionalmente, se estudió la productividad viral de cada aislamiento por espectrofotometría. Los mayores rendimientos de producción viral se obtuvieron en larvas de *P. operculella*, los cuales fueron significativamente superiores a los obtenidos en larvas de *T. solanivora* para todos los aislamientos nativos. La infección por granulovirus en larvas de *T. solanivora* y *P. operculella* ocasionó una mayor duración de los ínstares larvales y traslapamiento de los mismos. El proceso de formulación no afectó significativamente la eficacia de los granulovirus. Mediante una técnica de ponderación de indicadores se seleccionó el aislamiento proveniente de Norte de Santander como el más promisorio por presentar alta eficacia y productividad.

Palabras clave: Baculovirus. Control biológico. Infección viral.

Abstract: During 2004 and 2005, native strains of granulovirus obtained from *Tecia solanivora* larvae found in Cundinamarca, Nariño and Norte de Santander were isolated, identified and characterized. The effects of these infectious agents were studied on development of the potato moths *T. solanivora* and *Phthorimaea operculella*, evaluating variables such as width of the cephalic capsule, signs of viral infection and mortality. The effect of formulation was also determined on the efficiency of the different isolates formulated as a powder for potato seed protection. Additionally, the viral productivity of each isolate was studied using spectrophotometry. The highest viral production yields were obtained in *P. operculella* larvae, which were significantly higher than those obtained in *T. solanivora* larvae for all native isolates. The granulovirus infection in *T. solanivora* and *P. operculella* larvae caused a greater duration and overlap of the larval instars. The process of formulation did not significantly affect the efficacy of the granulovirus. Through a technique of weighted indicators, the isolate from Norte de Santander was selected as most promising due to its high efficiency and productivity.

Key words: Baculovirus. Biological control. Viral infection.

Introducción

El manejo tanto en cosecha como en poscosecha de las dos principales polillas de la papa *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) y *Phthorimaea operculella* (Zeller, 1873) (Lepidoptera: Gelechiidae), limitan la producción por los altos costos y contaminación ambiental que se genera con el uso de agroquímicos. Este problema ha llevado a la búsqueda de métodos de control menos riesgosos, más amigables con el ambiente y más sostenibles, como es el uso de productos biológicos a base de virus de la granulosis que afectan de forma natural las larvas de estas dos especies de insectos (López-Ávila 1996).

En diferentes partes del mundo se han encontrado larvas de *P. operculella* muertas a causa de una enfermedad natural producida por un virus del tipo granulosis (VG) que pertenece a la familia Baculoviridae (CIP 1996 citado en Zeddam *et al.* 1999). A partir de larvas de *P. operculella* infectadas con un granulovirus encontradas en Perú, el Centro Internacional de la Papa (CIP), desarrolló un bioplaguicida en polvo para la protección de semilla de papa en almacenamiento, el cual ha sido usado en diferentes países para el control de esta plaga (CIP 1996 citado en Zeddam *et al.* 1999). Para *T. solanivora*, hasta el año 2004 sólo se había reportado un aislamiento de virus de la granulosis encontrado infectando naturalmente larvas en condiciones de campo en Mérida, Venezuela (Niño de Gualdrón 1996 citado por Niño y Notz 2000). El Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, durante los años 2004 y 2005 realizó la búsqueda de aislamientos nativos de virus de la granulosis afectando de forma natural larvas de *T. solanivora*. A partir de este trabajo se aislaron, identificaron y caracterizaron cinco muestras de los departamentos de Cundinamarca, Nariño y Norte de Santander (Villamizar *et al.* 2006). Estos aislamientos nativos, se identificaron como virus de la granulosis mediante técnicas de microscopía, moleculares e inmunológicas, y se encontraron diferencias mo-

[1] Investigador profesional asistente. Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Laboratorio de Genética Molecular Animal. Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. *pcuartas@corpoica.org.co*. Autor para correspondencia.
[2] Investigador Ph. D. Asociado. Sc. D. en Ciencias Farmacéuticas. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. *lvillamizar@corpoica.org.co*.
[3] Investigador Master Asistente. Master en Entomología. Biólogo. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. *cespinelc@corpoica.org.co*.
[4] Directora Centro de Biotecnología y Bioindustrias. Ph. D. en Fitopatología. Control Biológico, Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. *amcotes@corpoica.org.co*.

leculares entre estos virus y el virus aislado de *P. operculella* proveniente del Perú correspondientes a deleciones en parte del gen 90-91 (Léry *et al.* 2008).

Con miras a desarrollar un nuevo bioplaguicida a base de uno de los aislamientos nativos para el control de las polillas de la papa bajo condiciones de almacenamiento y campo, surge la necesidad de seleccionar el aislamiento más virulento y el más promisorio desde el punto de vista tecnológico, donde las características más importantes a tener en cuenta son la obtención de altos rendimientos en la producción de partículas virales y en segundo lugar, que el aislamiento soporte el proceso de formulación sin perder patogenicidad. Por tal razón los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la sintomatología de la infección causada por los aislamientos nativos de granulovirus en las polillas de la papa *T. solanivora* y *P. operculella*, determinar el efecto de la formulación sobre la actividad biocontroladora de los granulovirus nativos para las dos especies de polillas de la papa, comparar el rendimiento de producción de partículas virales de los aislamientos nativos de granulovirus en las polillas de la papa y seleccionar el aislamiento que presente las mejores características biológicas y tecnológicas.

Materiales y Métodos

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, (Mosquera-Cundinamarca). Se utilizaron los aislamientos nativos de granulovirus VG001, VG003 y VG005 obtenidos a partir de larvas de *T. solanivora* recolectadas de papas almacenadas, que presentaban infestación natural, en municipios productores de los departamentos de Nariño, Cundinamarca y Norte de Santander, respectivamente (Villamizar *et al.* 2008); y una cepa de granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú y multiplicada por más de 20 generaciones en *T. solanivora*, utilizada como cepa de referencia. Todos los aislamientos se encuentran crioconservados a -70ºC en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Corpoica.

Propagación y purificación viral. Para cada uno de los aislamientos se tomaron posturas de *T. solanivora* provenientes de una cría ubicada en el Laboratorio de Entomología de Corpoica, luego se inocularon con una suspensión viral que se preparó a partir de una larva de *T. solanivora* infectada con el aislamiento y macerada en 1 mL de suero fisiológico, a esta suspensión no se le determinó la concentración. Después de la infección los huevos se incubaron a 23ºC. Tras la emergencia de las larvas, éstas se ubicaron sobre tubérculos de papa variedad parda pastusa y se incubaron a 23ºC durante 20 días; al final de este tiempo se realizó un análisis destructivo de cada uno de los tubérculos y se recuperaron todas las larvas. Con las larvas se llevó a cabo la purificación viral de forma independiente para cada aislamiento siguiendo la metodología estandarizada por Gómez (2005).

Determinación del rendimiento de producción de partículas virales. Se realizó una propagación viral de cada aislamiento para las dos especies de polilla de la papa (*T. solanivora* y *P. operculella*) como se describió previamente y se evaluó la producción de partículas virales expresada como cuerpos de inclusión por miligramo de tejido larval (CI/mg) siguiendo la metodología descrita por Gómez (2005). Las infecciones para cada cepa se realizaron al mismo tiempo, con la misma población larval. Se seleccionaron 15 larvas que presentaron síntomas típicos de infección por granulovirus para cada aislamiento en cada especie de polilla, se macararon y filtraron individualmente. La suspensión se dispuso en microplacas de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de Elisa (Asys Hitech. Expert 96). Los resultados se extrapolaron en la curva de calibración estandarizada por Gómez (2005). El diseño experimental fue completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento y dos repeticiones en el tiempo. Los resultados de concentración se transformaron calculando el logaritmo decimal para cumplir con los principios de homogeneidad de varianza y normalidad de datos, y de esta forma utilizar un análisis paramétrico. El análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey (α = 0.05) para determinar el aislamiento más productivo en cada especie de polilla se realizaron con el programa SAS 9.1; y mediante el programa Statistix 8.1.1.0 se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de diferencias mínimas significativas (DMS) (α = 0.05), para determinar diferencias en la productividad de partículas virales de cada aislamiento en las dos especies.

Desarrollo de las larvas sanas de *T. solanivora* y *P. operculella*. Inicialmente se estableció el desarrollo de las larvas sanas de *T. solanivora* y *P. operculella* basados en la ley de Dyar. La variable evaluada fue el ancho de la cápsula cefálica (ACC), empezando por el tiempo cero y cada dos días para *P. operculella* y cada cuatro días para *T. solanivora* durante 32 días. Cada unidad experimental correspondió a una cubeta plástica de 16 onzas con tapa, en la cual se ubicó un tubérculo de papa criolla con 10 larvas neonatas de *P. operculella*, o un tubérculo de papa pastusa con 15 larvas neonatas de *T. solanivora*, según las preferencias alimenticias previamente establecidas para cada especie de insecto en condiciones de cría. Las unidades experimentales se incubaron a 23ºC y a una humedad relativa (HR) del 65%.

En cada tiempo de medición y para cada polilla se realizaron muestreos destructivos de los tubérculos en busca de las larvas, se midió el ACC de cada una de las larvas con un micrómetro adaptado en el ocular de un microscopio óptico con un aumento de 4 X. Posteriormente se estableció el rango del ACC y se realizó una distribución de frecuencias con el fin de determinar los diferentes ínstares larvales y compararlos con el de las larvas sanas.

El montaje de los ensayos se realizó de la misma forma para todos los aislamientos de granulovirus en las dos especies de polilla. Huevos de las polillas depositados en papel absorbente (400-500 huevos/papel) se inocularon con 3mL de una suspensión viral a una concentración ajustada a $5x10^6$ CI/mL para cada aislamiento. En el interior de un recipiente plástico de 16 onzas se ubicó un tubérculo de papa con 15 larvas neonatas obtenidas a partir de las posturas inoculadas. Se realizó un muestreo destructivo cada cuatro días para *T. solanivora* y cada dos días para *P. operculella*, tomando al azar tres unidades experimentales (tubérculos) durante 32 días. La variable evaluada fue el ACC como se describió anteriormente, se determinó la distribución de frecuencias para cada aislamiento viral y se comparó con la de las larvas sanas. El ensayo contó con una repetición en el tiempo.

Eficacia de los aislamientos de Granulovirus. Todos los aislamientos de granulovirus se formularon siguiendo la

metodología utilizada por Corpoica para la producción del bioplaguicida registrado comercialmente utilizando la cepa del Perú. La concentración final del producto para todos los aislamientos virales fue de 1 x 10^6 CI/g. Los aislamientos sin formular consistieron en suspensiones virales ajustadas a la concentración de 1x10^6 CI/mL.

Para cada tratamiento, se pesaron tres tubérculos de papa y se ubicaron en una bolsa plástica que contenía el producto formulado según la dosis comercial (5g bioplaguicida/Kg papa. Producto a base de baculovirus registro ICA # 5416). Las bolsas se cerraron y se agitaron hasta que los tubérculos quedaron cubiertos con el producto. Para los tratamientos con los virus sin formular, los tubérculos se inocularon con una brocha de ½ pulgada aplicando 2 mL de la suspensión viral en la superficie. El tratamiento control consistió en tres tubérculos sin aplicación viral, sobre los que se colocaron 15 larvas recién emergidas y se incubaron a 23ºC durante 20 días, momento en el cual se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos en busca de las larvas. Se contó el número de larvas muertas, larvas vivas sin signos de infección, larvas vivas con signos de infección y el número de pupas obtenidas. Los resultados de mortalidad en cada tratamiento, se corrigieron determinando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Zar 1999): Eficacia = (b – K/100 – K) x 100. En donde b es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento y K es el porcentaje de mortalidad del testigo. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. El porcentaje de eficacia de los productos, se analizó con el programa Statistix 8.1.1.0 mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de diferencias mínimas significativas (DMS) ($\alpha = 0.05$).

Selección del aislamiento de granulovirus. Con el fin de seleccionar el mejor aislamiento de granulovirus, se analizaron los valores de eficacia y productividad por medio de la técnica de ponderación de indicadores de Dean y Nishry (1965). Para esto se definió la importancia de dichas variables según el impacto de cada una en el proceso de producción de un controlador biológico. Se determinó el coeficiente de importancia (CIV) de cada variable, según la importancia relativa de cada una y con esto se calculó el coeficiente de selección de cada aislamiento viral (CSAV) para determinar la importancia de cada una de las variables en las cepas evaluadas. El CSAV se multiplicó por el CIV y se obtuvo el índice de selección final (ISF) con el que se construyó una matriz de decisión.

Resultados y Discusión

Propagación y purificación viral. En la propagación viral de todos los aislamientos se observaron síntomas típicos de infección por granulovirus en la mayoría de las larvas. Después de las centrifugaciones diferenciales y de correr todas las muestras en el colchón de glicerol, se evidenció la formación de una banda blanca entre las concentraciones de 60% y 80%, correspondientes a los cuerpos de inclusión purificados de cada aislamiento de granulovirus como se ha reportado por otros autores como Taha *et al.* (2000) y Sporleder *et al.* (2005), quienes confirmaron por microscopía electrónica que esta banda corresponde a partículas virales. Este método de purificación viral, permitió obtener de forma fácil y rápida las partículas virales.

Rendimiento de producción. Las 15 larvas mostraron claros signos de la infección por granulovirus, correspondiente a una coloración blanca y un retraso notorio en el crecimiento. Los datos de absorbancia a 450nm en todos los casos fueron mayores a 0,04nm. Los rendimientos de producción de partículas virales para cada uno de los aislamientos estuvieron en un rango de 10^9 a 10^{10} cuerpos de inclusión por miligramo de tejido larval, tanto para *P. operculella* como para *T. solanivora*. Para *P. operculella* se encontró que la producción de cuerpos de inclusión por miligramo de tejido larval fue significativamente mayor ($P < 0,0004$) con el aislamiento VG005, en comparación con los demás aislamientos; mientras que los aislamientos VG001, Perú y VG003 no presentaron diferencias significativas entre sí (Tabla 1).

Teniendo en cuenta que el granulovirus VG005 se aisló a partir de larvas de *T. solanivora*, las diferencias de productividad viral encontradas podrían sugerir que este aislamiento está menos adaptado a *P. operculella* y que por lo tanto, necesita producir una mayor progenie viral para garantizar su mantenimiento y supervivencia en este hospedero (Moscardi 1999). En *T. solanivora* la producción de cuerpos de inclusión por miligramo de tejido larval fue mayor en el aislamiento de Perú, aunque no fue significativamente diferente a los obtenidos con los aislamientos VG005 y VG001, pero que sí fue estadísticamente superior ($P < 0,0004$) al rendimiento obtenido con el aislamiento VG003 (Tabla 1).

El granulovirus proveniente de Perú fue aislado a partir de larvas de *P. operculella*, sin embargo, produjo el mayor rendimiento en larvas de *T. solanivora* en comparación con

Tabla 1. Productividad y eficacia de los diferentes aislamientos de granulovirus en *T. solanivora* y *P. operculella*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba DMS ($\alpha = 0.05$).

Polilla	Aislamiento	Criterios de selección	
		Eficacia (%)	Productividad (CI/mg)
T. solanivora	Perú	66,66	1,19x10^{10} bc
	VG001	36,37	9,67x10^{9} cd
	VG003	81,78	7,46x10^{9} d
	VG005	75,74	1,04x10^{10} bcd
P. operculella	Perú	94,74	1,36x10^{10} bc
	VG001	94,74	1,38x10^{10} b
	VG003	97,37	1,33x10^{10} b
	VG005	84,21	2,94x10^{10} a

los aislamientos virales cuyo hospedero original fue *T. solanivora*. Este resultado podría estar relacionado con diversos mecanismos de adaptación que los virus utilizan para mantenerse y reproducirse dentro de un nuevo hospedero (Parnell *et al.* 2002; Herniou *et al.* 2004). Sin embargo, para *T. solanivora* no se encontraron diferencias significativas con los aislamientos VG001 y VG005 aisladas de esta especie, lo que sugiere un avanzado proceso de adaptación del virus del Perú al hospedero secundario, debido posiblemente a la constante propagación que se ha realizado de éste en larvas de *T. solanivora* (más de 20 pases) (Moscardi 1999).

Se obtuvo una producción de CI por miligramo de tejido significativamente mayor (P = 0.0004) en larvas de *P. operculella* que en larvas de *T. solanivora* para los aislamientos VG003, VG001 y VG005 (Tabla 1). Para el caso del aislamiento del Perú, la producción de partículas virales no presentó diferencias significativas entre las dos especies de polillas. Para seleccionar el aislamiento más productivo de granulovirus tanto en larvas de *P. operculella* como de *T. solanivora*, es importante tener en cuenta la capacidad replicativa de los virus en estos hospederos, su historia evolutiva, su adaptación y la facilidad, costos y eficiencia de las crías de los insectos. Se podría sugerir la utilización de larvas de *P. operculella* para la producción masiva de los granulovirus, pues se obtuvieron los mayores rendimientos de partículas virales; sin embargo, estos rendimientos podrían disminuir tras pases consecutivos de los virus en este hospedero debido a los procesos de adaptación mencionados anteriormente; también se debe tener en cuenta el momento de infección, ya que existe un proceso de adaptación del virus que puede llevar a la disminución de la virulencia dependiendo si la transición del virus entre hospederos se hace temprana o tardíamente (Cooper *et al.* 2002). Teniendo en cuenta este fenómeno se recomienda mantener un abundante inóculo viral original crioconservado y adecuadamente alicuotado, de manera que después de algunos pases en el insecto se recurra a la cepa original conservada, no adaptada al hospedero y realizar el proceso de infección en una etapa temprana para obtener una rápida replicación del virus y aumentar su virulencia.

Desarrollo de los signos de infección. El crecimiento de las larvas de *T. solanivora* y *P. operculella* cumplió con la ley de Dyar, debido a que el crecimiento de las partes esclerotizadas como la cápsula cefálica de ínstares sucesivos siguió una progresión geométrica regular (Dyar 1935 citado por Gamboa y Notz 1990). Con el análisis de distribución de frecuencias del ancho de la cápsula cefálica (intervalo de 0,1 para *T. solanivora* y 0,04 para *P. operculella*), se establecieron cuatro grupos sin solapamiento los que sugieren la formación de cuatro ínstares larvales tanto para *T. solanivora* como para *P. operculella* (Fig. 1).

Los cuatro ínstares larvales de *T. solanivora* y su duración fueron registrados también por y Niño y Notz (2000) y Villamizar *et al.* (2006). Para el caso de *P. operculella* este mismo comportamiento fue reportado por Llanderal (1993) y Gamboa y Notz (1990). Para *T. solanivora* el AAC va de 0,18 a 0,38 mm para el primer ínstar, de 0,39 a 0,68 mm para el segundo ínstar, de 0,69 a 0,88 mm para el tercer ínstar y de 0,89 a 1,28 mm para el cuarto instar (Fig. 1A). Para *P. operculella* el ACC va de 0,18 a 0,26 mm para el primer ínstar, de 0,27 a 0,42 mm para el segundo ínstar, de 0,43 a 0,66 mm para el tercer ínstar y de 0,67 a 1,02 mm para el cuarto ínstar (Fig. 1B). Estas escalas han sido reportadas por otros autores con algunas diferencias que se pueden presentar por los diferentes intervalos de medición utilizados influenciados por cambios ambientales, condiciones nutricionales variables

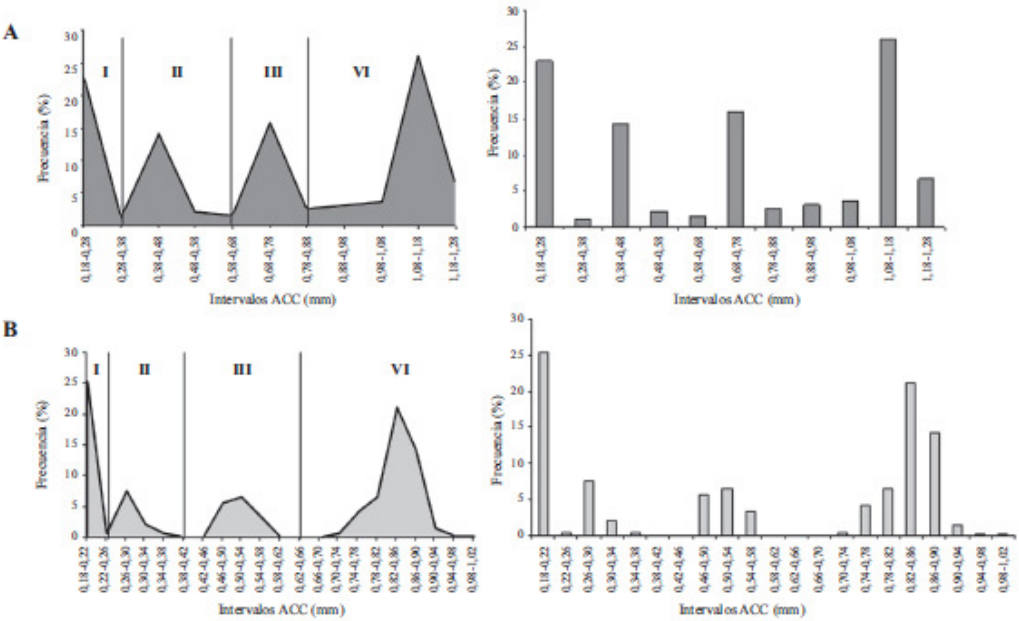

Figura 1. Distribución de frecuencias del ancho de la cápsula cefálica. **A.** Larvas sanas de *T. solanivora*. **B.** Larvas sanas de *P. operculella*.

debido a diferencias en el sustrato alimenticio, cambio en la proporción de sexos y variaciones en el estado fisiológico de las larvas (Llanderal 1993).

En cuanto al comportamiento de los estados de desarrollo larval de *T. solanivora* y *P. operculella* infectadas con los diferentes aislamientos de granulovirus se observó en todos los casos una mayor duración de los diferentes ínstares, lo que generó un traslape de los mismos (Figs. 2 y 3). Este efecto fue reportado por Reed (1971 citado por Alcázar *et al.* 1992), Alcázar *et al*. (1992), Niño y Notz (2000) y Villamizar *et al.* (2006).

El retraso en el desarrollo de las larvas infectadas con los diferentes aislamientos pudo deberse al efecto negativo que tiene el virus en los hábitos alimenticios y en la expresión hormonal de las larvas durante el cambio sucesivo de ínstares (Burand y Park 1992; Nakai *et al.* 2004; Subramanian *et al.* 2005). Según Moscardi (1999), una característica de la infección ocasionada por baculovirus es el retraso del desarrollo y la reducción de la capacidad alimenticia de las larvas.

Por otro lado, en los primeros días de desarrollo no se evidenciaron signos de infección en las larvas de *T. solanivora* y *P. operculella*, observándose larvas de coloración parda translucida. Luego de algunos días aparecieron aglomeraciones de estructuras blanquecinas observadas a través del abdomen de las larvas, principalmente en la parte posterior. Estas aparecieron por todo el cuerpo a medida que transcurrió la infección, hasta que las larvas adquirieron un color blanco lechoso en todo su cuerpo. Estos signos también han sido reportados por Alcázar *et al.* (1992), Niño y Notz (2000) y Villamizar *et al.* (2006).

Para los últimos días de medición (días 28 y 32) se encontró que las larvas infectadas con el granulovirus VG005 y Perú adquirieron una tonalidad rosada en la parte dorsal del cuerpo, pero sin perder el color blanco-lechoso adquirido por la infección de granulovirus. Según Niño (2004) y Villamizar *et al.* (2006), esta pigmentación rosada que aparece en la parte dorsal de las larvas en los últimos días de desarrollo, denotaría el inicio del cambio del estado de larva al estado de pupa, el cual se presentaría normalmente para larvas sanas. La ausencia de la coloración rosada en algunas larvas, puede deberse al efecto de la infección viral (Alcázar *et al.* 1992; Caballero *et al.* 2001).

Eficacia de los aislamientos de Granulovirus. Para *T. solanivora* se encontró que los tratamientos que produjeron un mayor porcentaje de eficacia fueron los aislamientos VG003 formulado (81,8%) y sin formular (69,6%), VG005 formulado (75,7%) y sin formular (72,7%), y el aislamiento del Perú

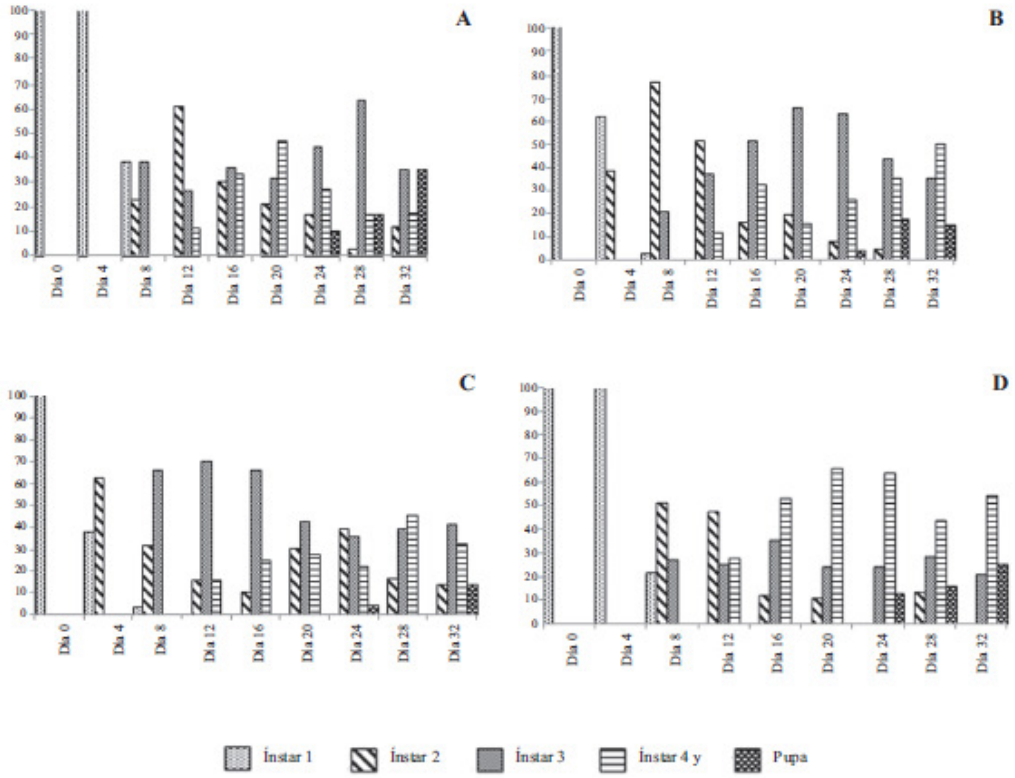

Figura 2. Comportamiento de los ínstares larvales (% frecuencia) de *T. solanivora* infectada con granulovirus. **A.** Aislamiento VG001. **B.** Aislamiento VG003. **C.** Aislamiento VG005. **D.** Aislamiento de Perú.

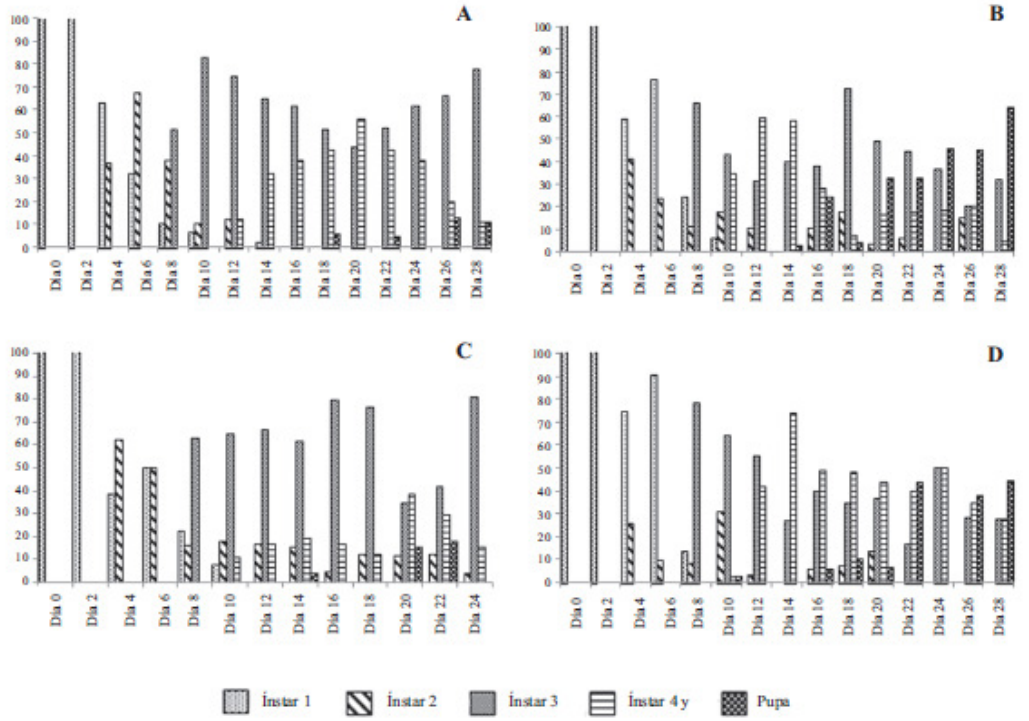

Figura 3. Comportamiento de los ínstares larvales (% frecuencia) de *P. operculella* infectada con granulovirus. **A.** Aislamiento VG001. **B.** Aislamiento VG003. **C.** Aislamiento VG005. **D.** Aislamiento de Perú.

sin formular (75,7%), los cuales no fueron significativamente diferentes (DMS $\alpha = 0.05$); pero sí presentaron un porcentaje de eficacia estadísticamente superior ($P = 0.1658$) con respecto al aislamiento VG001 formulado (36,37%) (Fig. 4A). En *P. operculella* se encontró que los tratamientos que produjeron un mayor porcentaje de eficacia fueron los aislamientos VG001 formulado (94,7%) y sin formular (100%), VG003 formulado y sin formular (97,3%), Perú formulado (94,7%) y sin formular (96,7%) y VG005 sin formular (97,4%); los cuales no presentaron diferencias estadísticas entre sí, pero si presentaron diferencias ($P = 0.1120$) con respecto al aislamiento VG005 formulado (84,2%) (Fig. 4B).

En términos generales no hay diferencias estadísticas entre la actividad biocontroladora de cada aislamiento formulado y sin formular, resultados que sugieren que el proceso de formulación no afectó la eficacia de los granulovirus. Resultados similares fueron reportados por Niño y Notz (2000), quienes no encontraron diferencias en la mortalidad de las larvas de *T. solanivora* ocasionada por un granulovirus aplicado como suspensión acuosa de partículas virales y el mismo granulovirus formulado. Cossentine y Jensen (2004) tampoco encontraron un incremento significativo de la eficacia de un granulovirus de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) al incorporar algunos aceites en su formulación.

Selección del aislamiento. Con miras a seleccionar el aislamiento más promisorio para el desarrollo de un bioplaguicida para el control de *T. solanivora* y *P. operculella*, se seleccionaron las variables de eficacia y productividad, las cuales fueron analizadas mediante la técnica de ponderación de indicadores de Dean y Nishry (1965). El coeficiente de importancia para cada factor fue mayor para la variable de eficacia con un valor de 0.5875 en comparación al obtenido

Tabla 2. Coeficientes de selección de los aislamientos de granulovirus (CSAV).

Criterios de selección	*T. solanivora*				*P. operculella*			
	Perú	VG001	VG003	VG005	Perú	VG001	VG003	VG005
Eficacia	0.105	0.057	0.129	0.120	0.150	0.150	0.154	0.133
Productividad	0.108	0.088	0.068	0.095	0.124	0.126	0.121	0.268

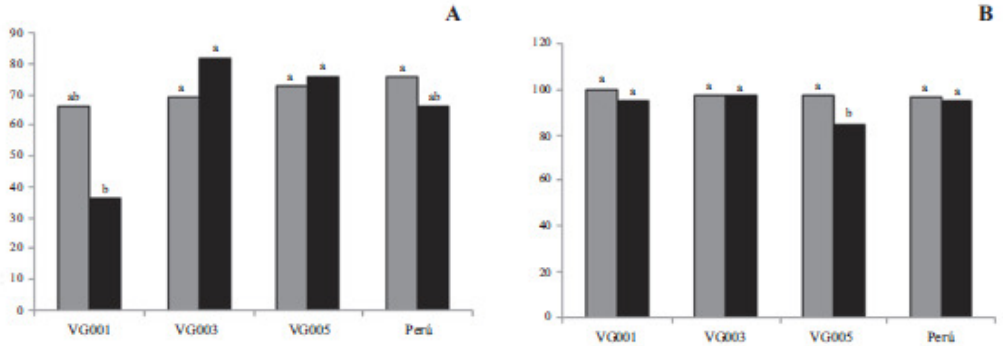

Figura 4. Eficacia de aislamientos de granulovirus formulados y sin formular en larvas de las polillas de la papa. **A.** Larvas de *T. solanivora*. **B.** Larvas de *P. operculella*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba DMS ($\alpha = 0.05$) (Producto sin formular barras en gris y producto formulado barras en negro).

para productividad con un valor de 0.4125. Posteriormente se llevó a cabo la ponderación de los factores de selección para cada uno de los aislamientos virales, con base en los datos de los ensayos de productividad viral y eficacia (Tabla 1). Los valores correspondientes a los coeficientes de selección de cada aislamiento viral se muestran en la Tabla 2.

A partir de la matriz de decisión se obtuvieron los mayores índices de selección final tanto para *T. solanivora* como para *P. operculella* con el aislamiento nativo VG005 proveniente de Norte de Santander con valores de 0.111 y 0.189 respectivamente (Tabla 3). Teniendo en cuenta este resultado se recomienda el uso de este aislamiento para la producción de bioplaguicidas para el control de las dos polillas de la papa tanto en campo, como en almacenamiento.

Tabla 3. Matriz de decisión para la selección del mejor aislamiento viral para el desarrollo de un bioplaguicida para el control de *T. solanivora* y *P. operculella*.

Criterios de selección Polilla	Aislamiento	Eficacia	Productividad	Índice de selección final (ISF = CIV x CSAV)
T. solanivora	Perú	0,062	0,045	0,107
	VG001	0,033	0,036	0,069
	VG003	0,076	0,028	0,104
	VG005	0,071	0,040	0,111
P. operculella	Perú	0,088	0,051	0,139
	VG001	0,088	0,052	0,140
	VG003	0,091	0,050	0,141
	VG005	0,078	0,111	0,189
Total				1,00

Literatura citada

ALCÁZAR, J.; CERVANTES, M.; RAMAN, K. 1992. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *P. operculella*. Revista Peruana de Entomología 35: 107-111.

BURAND, J.; PARK, E. 1992. Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and pupation of gypsy moth larvae. Journal of Invertebrate Pathology 60: 171-175.

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. 518 p.

COOPER, V.; REISKIND, M.; MILLER, J.; SHELTON, K.; WALTHER, B.; ELKINTON, J.; EWALD, P. 2002. Timing of transmission and the evolution of virulence of an insect virus. Proceeding of Biological Sciences 269 (1496): 1161-1165.

COSSENTINE, J.; JENSEN, L. 2004. Persistence of a commercial codling moth granulovirus product on apple fruit and foliage. Journal of Entomological Society of British Columbia 101: 87-92.

DEAN, B; NISHRY, J. 1965. Scoring and profitability models for evaluating and selecting engineering products. Operations Research 13 (4): 550-569.

GAMBOA, M.; NOTZ, A. 1990. Biología de *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa (*Solanum tuberosum*). Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV. Apartado 4579 Maracay 2101ª. Venezuela: 1-9.

GÓMEZ, J. 2005. Búsqueda y selección de aislamientos nativos de granulovirus para el control de *Tecia solanivora* (Povolny) (Le-

pidoptera: Gelechiidae) en cultivos de Papa en Cundinamarca. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 139 p.

HERNIOU, E.; OLSZEWSKI, J.; CORY, J.; O'REILLY, D.; CORY, S. 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. Journal of Virology 78 (7): 3244-3251.

LÉRY, X.; VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; ZEDDAM, J-L.; COTES, A.; LÓPEZ-FERBER, M. 2008. Analysis of several Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora*: Detection of a new variable region in the PhopGV genome. Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 31: 83.

LÓPEZ-ÁVILA, A. 1996. Capítulo III. Plagas y enfermedades. Insectos plagas del cultivo de la papa en Colombia y su manejo, pp. 146-154. En: Papas Colombianas con el mejor entorno ambiental. Editora Comunicaciones y Asociados Ltda. Bogotá. Colombia. 268 p.

LLANDERAL, C. 1993. Definición de ínstares larvales de *Phthorimaea operculella* por medición de la cápsula cefálica. Agrociencia. Serie Protección Vegetal 4 (2): 179-186.

MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. Annual Review of Entomology 44: 257-289.

NAKAI, M.; SHIOTSUKI, T.; KUNIMI, Y. 2004. An entomopoxvirus and a granulovirus use different mechanisms to prevent pupation of *Adoxophyes honmai*. Virus Research 101: 185-191.

NIÑO, L. 2004. Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa: 1-18.

NIÑO, L.; NOTZ, A. 2000. Desarrollo y sintomatología de las larvas de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) infectadas por un virus Granulosis nativo. Boletín Entomológico Venezolano 15 (1): 29-38.

PARNELL, M.; GRZYWACZ, D.; JONES, K.; BROWN, M.; ODUOR, G.; ONG'ARO, J. 2002. The strain variation and virulence of Granulovirus of diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus, Lep., Yponomeutidae) isolated in Kenya. Journal of Invertebrate Pathology 79: 192-196.

SPORLEDER, M.; KROSCHEL, J.; HUBER, J.; LAGNAOUI, A. 2005. An improved method to determine the biological activity (LC_{50}) of the Granulovirus *Po*GV in its host *Phthorimaea operculella*. Entomologia Experimentalis et Applicata 116: 191-197.

SUBRAMANIAN, S.; RABINDRA, R.; PALANISWAMY, S.; SATHIAH, N.; RAJASEKARAN, B. 2005. Impact of granulovirus infection on susceptibility of *Spodoptera litura* to insecticides. Biological Control 33: 165-172.

TAHA, A.; NOUR, E.; CRORZIER, L.; FERBER, M.; CRORZIER, G. 2000. Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. Virus Genes 21 (3): 147-155.

VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; GRIJALBA, E.; TORRES, L.; COTES, A.; LOPÉZ-ÁVILA, A.; BARRERA, G.; ZEDDAM, J.; HERRERA, L.; GÓMEZ, J. 2006. Reconocimiento, selección y evaluación de aislamientos nativos de virus de la Granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Boletín Técnico, Corpoica. Editorial Produmedios. Bogotá. Colombia. 24 p.

VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; GRIJALBA, E.; GÓMEZ, J.; COTES, A.; TORRES, L.; BARRERA, G.; LÉRY, X.; ZEDDAM, J. L. 2008. Isolation, identification and biocontrol activity of Colombian isolates of granulovirus from *Tecia solanivora* larvae. Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 31: 85-88.

ZAR, J. 1999. Biostatistical analysis. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. 663 p.

ZEDDAM, J.; POLLET, A.; MANGOENDIHARJO, S.; RAMADHAN, H.; LÓPEZ, F. 1999. Ocurrence and virulence of a Granulosis virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. Journal of Invertebrate Pathology 74: 48-54.

Recibido: 15-feb-08 • Aceptado: 26-jul-09

Annexe 2.

Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae).

Corpoica Ciencia y Tecnología agropecuaria
10 : 152-158 (2009)

Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. (2009) 10(2), 152-158

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Comparison of the efficacy and yield of three native granulovirus over *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) larvae

ABSTRACT

Tecia solanivora is one of the most limiting potato pests and the use of granulovirus constitutes a promissory alternative for its control. A biopesticide based on a granulovirus isolate from Peru is manufactured in Colombia, for controlling the pest under storage conditions. In a previous work, three native granulovirus from *T. solanivora* larvae from the localities of Chocontá, Mosquera and Carmen de Carupa of the Cundinamarca department were isolated. These native strains could be better adapted to both the host and the environmental conditions of the country. In the present work the three native isolates of granulovirus were evaluated formulated and unformulated under laboratory conditions by using a bioassay and were compared with the Peruvian strain. The formulated native viruses presented the highest efficacy with results between 88% and 100%, while the Peruvian isolate obtained 88%. These results were significantly different from the obtained with the unformulated virus isolates, for which the efficacy ranged between 36% and 86% for native isolates and was 59% for the Peruvian strain. The concentration of occlusion bodies (OB) produced per milligram of larva tissue was measured and no significant differences between the isolates were observed. The average yield was 4.4 x 10^7 OB/mg larvae. Results allowed to select the native isolate from Mosquera (Cundinamarca) for a future biopesticide development for presenting the highest virulence levels.

Keywords: Tortricidae, moth, potato, biopesticide, baculovirus.

Radicado: 20 de abril de 2009
Aprobado: 23 de junio de 2009

[1] Microbióloga Industrial. Investigadora profesional asistente. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. jagomez@corpoica.org.co
[2] Química farmacéutica Ph.D. Investigador Ph.D. asistente. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. lvillamizar@corpoica.org.co
[3] Biólogo M.Sc. Investigador máster asistente. Laboratorio de Control Biológico. Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. cespinel@corpoica.org.co
[4] Bióloga Ph.D. Directora Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) Corpoica C.I. Tibaitatá. acotes@corpoica.org.co

Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae)

Juliana Gómez[1], Laura Villamizar[2], Carlos Espinel[3], Alba Marina Cotes P.[4]

RESUMEN

Tecia solanivora es una de las plagas más limitantes del cultivo de la papa, para cuyo control el uso de granulovirus constituye una alternativa promisoria. Para el control de la plaga en condiciones de almacenamiento, en Colombia se produce un bioplaguicida en polvo a base de un granulovirus aislado en Perú a partir de larvas de *Phthorimaea operculella*. En un trabajo previo se aislaron tres granulovirus nativos provenientes de larvas de *T. solanivora* de los municipios de Chocontá, Mosquera y Carmen de Carupa en el departamento de Cundinamarca, los cuales podrían estar mejor adaptados al insecto y a las condiciones ambientales del país. En el presente trabajo, los tres aislamientos de granulovirus se evaluaron mediante un bioensayo en laboratorio utilizándolos formulados y sin formular y teniendo como patrón de comparación la cepa peruana. Los virus nativos formulados presentaron eficacias entre 88% y 100%, mientras que para el aislamiento peruano se obtuvo 88%. Estos resultados fueron significativamente diferentes de los obtenidos con los aislamientos sin formular, para los cuales la eficacia estuvo entre 36% y 86% para los aislamientos nativos y, 59% para el aislamiento peruano. También se comparó la cantidad de cuerpos de inclusión (CI) producidos por miligramo de larva con cada uno de los aislamientos, entre los que no se encontraron diferencias significativas. El rendimiento promedio fue de 4,4 x 10^7 CI/mg de larva. Los resultados permitieron seleccionar el aislamiento nativo proveniente de Mosquera (Cundinamarca) para el futuro desarrollo de un bioplaguicida por presentar los mayores niveles de virulencia.

Palabras clave: Tortricidae, polilla, papa, bioplaguicida, baculovirus.

INTRODUCCIÓN

Los granulovirus (GV), pertenecientes al género baculovirus, han sido estudiados por ser eficientes patógenos de artrópodos, especialmente de insectos y por presentar cuerpos de inclusión (CI) proteicos que los hacen resistentes a las condiciones ambientales (Caballero *et al.*, 2001). El virus actúa como un insecticida estomacal, cuando las larvas ingieren las partículas virales. Las larvas infectadas por granulovirus presentan síntomas característicos como la presencia de una coloración blan-

© 2009 Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

ca del tegumento (figura 1) y pérdida del apetito hasta el cese de la alimentación. La muerte se produce por desintegración de los tejidos y órganos; en este caso el tegumento se vuelve muy frágil y se rompe con facilidad liberando el contenido líquido con millones de cuerpos de inclusión (CI) (Niño y Notz, 2000a).

Figura 1. Larvas de *Tecia solanivora*

En varios países del mundo se ha descrito la presencia de un virus de la granulosis (PhopGV) infectando larvas de la polilla de la papa *P. operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), especie estrechamente relacionada con *T. solanivora* (Vickers *et al.*, 1991; Zeddam *et al.*, 1999). En este sentido, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en el Perú desarrolló un bioplaguicida a base de un aislamiento viral que se aplica a la semilla de papa en condiciones de almacenamiento para el control de *P. operculella*. La aplicación de este producto ocasiona hasta 98% de mortalidad de las larvas de la polilla (CIP 1992). Por otra parte, en Venezuela en 1992, se hallaron en el estado de Mérida larvas de *T. solanivora* afectadas por un granulovirus, el cual se aisló y está siendo estudiado con miras al desarrollo de una alternativa de control de la plaga (Niño y Notz, 2000b). En Colombia, en el año 2000 Corpoica se enfrentó al reto de producir un bioplaguicida a base de uno de estos granulovirus para responder a la emergencia sanitaria causada por la polilla guatemalteca *T. solanivora*. Inicialmente se obtuvo la cepa de PhopGV proveniente del Perú, se adaptó la tecnología de formulación desarrollada por el CIP y se realizó un ajuste tecnológico del producto, el cual se encuentra registrado ante el Instituto Colombiano Agropecuario ICA (Villamizar *et al.*, 2005a).

Aunque el PhopGV puede infectar larvas de otras polillas como *T. solanivora*, la búsqueda y aislamiento de cepas nativas de granulovirus a partir de larvas de *T. solanivora* se planteó como objetivo de una investigación anterior, gracias a la cual actualmente se cuenta con tres aislamientos nativos provenientes de los municipios de Chocontá, Mosquera y Carmen de Carupa ubicados en el departamento de Cundinamarca (Villamizar *et al.*, 2005b). Dichos aislamientos probablemente se encuentran mejor adaptados a su insecto hospedero *T. solanivora* y a las condiciones ambientales de Colombia, lo cual podría resultar en un control más eficiente de la plaga.

Considerando estas ventajas y con miras a continuar con el desarrollo de un bioplaguicida a base de granulovirus para el control de *T. solanivora* para ser aplicado en condiciones de campo, el objetivo del presente estudio fue comparar los tres aislamientos nativos de granulovirus obtenidos en el departamento de Cundinamarca, teniendo en cuenta parámetros como eficacia y productividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cría del insecto

Las larvas empleadas en los bioensayos se obtuvieron de la cría de *Tecia solanivora* del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica. Esta fue mantenida sobre dieta natural (tubérculos de papa variedad pastusa) en un cuarto de bioensayos a una temperatura de 22 ± 2 °C y humedad relativa de 75 ± 5%.

Aislamientos de granulovirus

Los tres granulovirus evaluados fueron aislados a partir de larvas de *T. solanivora* en el departamento de Cundinamarca (Colombia) durante el 2004 y fueron conservados en solución salina estéril a -70 °C en el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de Corpoica (Villamizar *et al.*, 2005b). Los aislamientos virales fueron codificados como VG002 (aislado en el municipio de Chocontá), VG003 (aislado en el municipio de Mosquera) y VG004 (aislado en el municipio de Carmen de Carupa). Como cepa de referencia se evaluó un aislamiento de granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú donado por el CIP, codificado como VG001, el cual fue mantenido bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Producción y purificación viral

La producción del virus empleado en los bioensayos se realizó mediante la inoculación tanto de posturas de *T. solanivora* como de tubérculos de papa pastusa, con suspensiones de cada uno de los aislamientos en estudio.

Al cabo de 20 días, se colectaron las larvas infectadas y se maceraron en SDS al 0,1%. La suspensión obtenida se filtró en tres capas de velo suizo estéril y se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se 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 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 se lavó dos veces en buffer Tris-HCl. La concentración de la suspensión de cuerpos de inclusión purificados 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 y colaboradores (1978).

Determinación de la eficacia de tres aislamientos nativos de granulovirus

Se comparó la eficacia de los tres aislamientos nativos y la cepa peruana formulados de la misma forma que el producto semicomercial elaborado en Corpoica y sin formular. El bioensayo se desarrolló siguiendo el Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica-Corpoica, para la evaluación de la eficacia del bioplaguicida a base del granulovirus de *P. operculella* para el control de la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora*. Este método se encuentra validado y registrado por el Instituto Colombiano Agropecuario como un control de calidad de dicho bioplaguicida (Biotécnica, 2004).

De cada aislamiento se prepararon suspensiones virales ajustadas cada una a una concentración de 1 x 10^8 CI/mL en un volumen de 50 mL. Estas suspensiones se entregaron a la planta de producción de baculovirus de Corpoica para su formulación en forma de polvo para espolvoreo, el cual presentó una concentración final de 10^5 CI/g. Como una forma de determinar si el proceso de formulación tuvo algún efecto sobre los aislamientos, estos se evaluaron sin formular utilizando la suspensión viral ajustada a 10^5 CI/mL, concentración equivalente a la obtenida en el producto formulado (10^5 CI/g).

Los tratamientos de virus formulado se inocularon de la siguiente manera: se tomaron tres tubérculos de papa variedad pastusa y se colocaron en una bolsa de polietileno de alta densidad que contenía el producto, utilizando la dosis recomendada (5 g de producto por kg de papa). La bolsa se agitó vigorosamente hasta obtener un cubrimiento total de los tubérculos (figura 2b). Los tratamientos de virus sin formular se inocularon sumergiendo los tubérculos durante tres minutos en la suspensión viral y dejándolos secar durante 1 hora en cabina de flujo laminar.

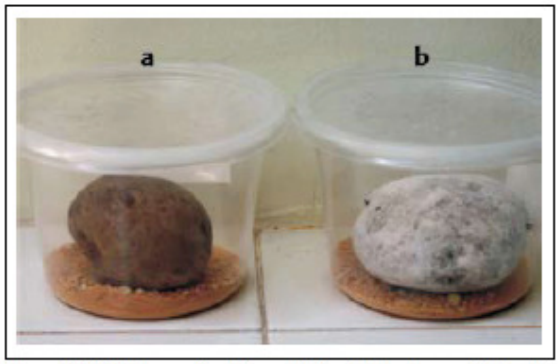

Figura 2. Unidad experimental con tubérculo tratado con aislamientos virales sin formular (a) y formulados (b)

Posteriormente, cada tubérculo se colocó en un recipiente plástico de 16 onzas que contenía arena estéril en el fondo (unidad experimental) (figura 2) y sobre cada tubérculo se colocaron cuidadosamente 15 larvas neonatas de *T. solanivora*. Se contó con un testigo positivo, tanto para los aislamientos formulados como sin formular, en el cual los tubérculos se trataron con el producto o la suspensión viral del aislamiento peruano VG001; adicionalmente se contó con un testigo absoluto que consistió en tubérculos sin ningún tratamiento. Los recipientes se mantuvieron en un cuarto de bioensayos a 22 ± 2 °C y una humedad relativa de 70%. El diseño experimental fue completamente al azar con tres unidades experimentales por tratamiento.

Pasados 25 días se realizó un análisis destructivo de todos los tubérculos, determinando el número de larvas muertas o desaparecidas, larvas sanas, larvas vivas con síntomas y pupas; los individuos se clasificaron dentro de dos grupos: muertos (larvas vivas con síntomas de infección, larvas muertas y larvas desaparecidas) y vivos (pupas y larvas sanas). La eficacia se calculó mediante la fórmula de Schneider – Orelly (Zar, 1999):

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

Donde b es la mortalidad (%) en el tratamiento y k es la mortalidad (%) del testigo absoluto.

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (Anova) y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) mediante el programa estadístico Statistix versión 1.0.

Estimación de la producción de cuerpos de inclusión

Como otro parámetro de selección de los aislamientos de granulovirus se tomó en cuenta la productividad, es decir, la cantidad promedio de cuerpos de inclusión producidos

por miligramo de peso larval. Para cada aislamiento seleccionado se tomaron 10 larvas de *T. solanivora* infectadas y con cada una se preparó una suspensión viral de la siguiente manera: para cada suspensión se tomó una larva infectada de peso conocido, la cual se maceró y se llevó a un volumen de 10 mL con suero fisiológico estéril. Cada suspensión se pasó por papel filtro con el fin de retirar los tejidos de la larva. A partir del filtrado obtenido se hicieron diluciones y se leyó la absorbancia de la dilución adecuada en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm y se calculó la concentración de la suspensión madre (CI/mL). A partir de ésta se calculó la cantidad de cuerpos de inclusión producidos por miligramo de larva utilizando el peso de éstas y la dilución empleada. El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y se aplicó un Anova (95%) mediante el programa Statistix versión 1.0, con el fin de detectar diferencias entre los rendimientos de los aislamientos virales. Como un parámetro de comparación, este mismo procedimiento se llevó a cabo también para la cepa de granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la eficacia de tres aislamientos nativos de granulovirus

La eficacia promedio determinada con el bioensayo en el cual se evaluó la actividad de los diferentes aislamientos de granulovirus formulados y sin formular fue de 86,2%, 63,6%, 36,4% y 59,1% para los aislamientos VC003 (Mosquera), VC002 (Chocontá), VC004 (Carmen de Carupa) y la cepa de referencia del Perú, respectivamente, cuando se utilizaron sin formular y de 98,2%, 88,7%, 100% y 88,7% para los aislamientos VC003, VC002, VC004 y la cepa de referencia del Perú, respectivamente, cuando se sometieron al proceso de formulación estandarizado en la planta de producción semicomercial de baculovirus de Corpoica (figura 3).

La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) detectó diferencias significativas entre los tratamientos formulados y sin formular para los aislamientos virales VC002, VC004 y la cepa de referencia del Perú, siendo significativamente mayor la eficacia obtenida cuando los virus se sometieron al proceso de formulación (figura 3). Este resultado sugiere que posiblemente los auxiliares de formulación empleados para elaborar el producto tuvieron un efecto sobre las larvas de *T. solanivora*, ya sea causando su muerte o aumentando la susceptibilidad al virus. Dicho efecto podría deberse a la presentación del producto en forma de polvo que además tiene un tamaño de partícula muy pequeño (100 µm) (Villamizar *et al.*, 2005a), lo cual pudo producir el taponamiento de

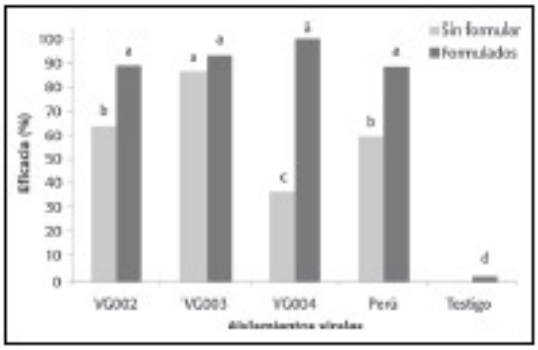

Figura 3. Eficacia de los aislamientos de granulovirus formulados y sin formular, sobre larvas de *Tecia solanivora*. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias según prueba de Tukey 95%

los espiráculos de las larvas impidiendo su respiración y en consecuencia causando la muerte. Este taponamiento también podría haber generado una disminución de la tasa respiratoria de los insectos, debilitándolos y por ende haciéndolos más susceptibles a la infección (McVean *et al.*, 2002).

Resultados similares fueron reportados por Mascarin y Alves (2007), quienes determinaron la eficacia en condiciones de laboratorio de un aislamiento de granulovirus sobre larvas de *P. operculella* formulado como un polvo seco, evaluando también la acción del talco empleado para la formulación. En dicho estudio se observó que el diluente en polvo del producto sin virus causó 60% de mortalidad de las larvas y cuando se mezcló con el virus a una concentración de 5 x 10^8 CI/g, se obtuvo 100% de mortalidad, lo cual indica un posible efecto sinérgico entre el talco y el virus.

Araque y García (1999) reportaron también que las larvas de primer instar de *T. solanivora* son susceptibles al contacto con polvos finos, los cuales causan deshidratación del insecto. Este efecto pudo haberse presentado también con los aislamientos formulados evaluados en el presente estudio, debido a que la formulación presenta muy baja humedad (< 5%) y contiene silicatos que se caracterizan por su capacidad para absorber agua (APHA 2005). En consecuencia, los formulados posiblemente generaron un estrés evaporativo en las larvas, fenómeno que ha sido reportado como fundamental en la respiración de los insectos y por lo tanto en la sobrevivencia de los mismos (Meyer, 2002).

El análisis estadístico también detectó diferencias significativas entre la eficacia de los aislamientos sin formular. Los aislamientos VC002, VC003 y VC004 fueron estadísticamente diferentes entre sí y los aislamientos VC003 y

VC004 presentaron diferencias con respecto a la cepa de referencia del Perú, siendo significativamente mayor la eficacia del aislamiento VC003 (figura 3). Estos resultados indican que posiblemente este virus presenta mayor virulencia sobre larvas de *T. solanivora* que los demás aislamientos nativos y la cepa del Perú, lo cual puede deberse a una mejor adaptación tanto al hospedero como a las condiciones ambientales de la región.

La adaptación de los baculovirus a su hospedero ha sido reportada por Hodgson y colaboradores (2002) en su estudio sobre la selección diferencial de genotipos de virus de la poliedrosis de la polilla de los pinos *Panolis flammea* (Denis & Schiffermüller) (Lepidoptera: Noctuidae). Estos autores mencionan que diferentes aislamientos de baculovirus pertenecientes a la misma especie pueden infectar a un mismo insecto hospedero; sin embargo, sólo aquellos que se encuentren mejor adaptados a las condiciones brindadas por el insecto hospedero se mantendrán en éste. Dentro de los factores que afectan la adaptación de los baculovirus se encuentran la especificidad de la respuesta inmune del hospedero, las interacciones entre diferentes genotipos presentes en el hospedero y las interacciones entre los aspectos ecológicos del patógeno y del ambiente. Dichos factores influencian positiva o negativamente el rendimiento, la tasa de mortalidad y la virulencia de los diferentes aislamientos (Hodgson *et al.*, 2002, Dennehy *et al.*, 2006).

Por otra parte, las diferencias en la virulencia de los tres aislamientos nativos podrían estar asociadas a variabilidad genotípica. Dicha variabilidad se encuentra registrada por Léry y colaboradores (2008), quienes determinaron mediante un análisis con endonucleasas de restricción las diferencias genotípicas de cinco aislamientos del granulovirus de *P. operculella* obtenidos a partir de larvas de *T. solanivora* en Colombia, incluyendo los tres aislamientos evaluados en el presente estudio (VC002, VC003 y VC004). Estos autores encontraron que los tres aislamientos provenientes de la región de Cundinamarca presentan un perfil de restricción diferente comparado con aislamientos del Perú, Ecuador y Túnez, debido a la presencia de una región variable en el gen 90-91, que posiblemente es una modificación específica y única de los aislamientos colombianos.

Generalmente, el hallazgo de diferentes aislamientos de baculovirus en distintas regiones geográficas a partir de un mismo insecto hospedero ha resultado en cepas de virus que tienen el mismo origen, pero que debido a su adaptación a las diferentes condiciones, tanto del insecto como del ecosistema, han sufrido pequeñas variaciones genotípicas que pueden resultar en grandes diferencias en cuanto a su virulencia respecto a la cepa original (Rezapanah *et al.*, 2008). Las variaciones genéticas en poblaciones de baculovirus han sido detectadas a varias escalas ecológicas entre regiones geográficas; también se han encontrado diferencias en la patogenicidad entre los aislamientos de diferentes regiones y entre genotipos derivados del mismo aislamiento (Hodgson *et al.*, 2001).

Uno de los casos más estudiados mundialmente ha sido el del granulovirus de la polilla de la papa *P. operculella*, el cual ha sido ampliamente investigado en cuanto a diferencias genéticas entre los diferentes aislamientos de diversos orígenes geográficos. Vickers y colaboradores (1991) compararon 14 aislamientos del PhopGV de ocho regiones del mundo usando endonucleasas de restricción y utilizando bioensayos para comparar la actividad biocontroladora. Se encontraron tres genotipos distintos y diferencias significativas en la actividad biológica de los aislamientos, aunque no se pudo comprobar que dichas diferencias se derivaran de las variaciones genotípicas. Léry y colaboradores (1998) en su estudio sobre la heterogeneidad genética de diferentes aislamientos de PhopGV describen que la mayoría de granulovirus aislados en condiciones de campo consisten en mezclas de variantes genéticamente heterogéneas. En dicho estudio se encontró que existen muchas variantes del virus nativo original aislado en Túnez, las cuales se demostraron por la presencia de diferentes fragmentos en los perfiles obtenidos usando endonucleasas de restricción. Estos autores atribuyeron las variaciones a una adaptación del aislamiento original a las condiciones proporcionadas o a una recombinación entre el aislamiento original y otras cepas de granulovirus endógenas del hospedero, situación descrita también por Singaravelu y Ramakrishman (1998), quienes atribuyeron las variaciones genotípicas de un solo aislamiento de baculovirus al proceso de recombinación entre un pequeño número de variantes del virus que coinfectan la larva hospedero en condiciones de campo.

La variabilidad genética entre aislamientos también ha sido determinada en granulovirus de otras especies de insectos. Rezapanah y colaboradores (2008) registraron que diferentes aislamientos del granulovirus de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) de diferentes regiones de Irán presentan pequeñas variaciones genéticas entre ellos, las cuales resultan en diferencias en la actividad biológica (concentración letal media). Subramanian y colaboradores (2008) también compararon diferentes granulovirus aislados de la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) y el análisis por endonucleasas de restricción reveló que los aislamientos estaban muy cercanamente relacionados pero no eran idénticos.

Estimación de la producción de cuerpos de inclusión

Se determinó la cantidad promedio de cuerpos de inclusión producidos por miligramo de tejido larval para los tres aislamientos nativos y la cepa del Perú. El análisis de varianza (95%) no detectó diferencias significativas entre los aislamientos. Este resultado indica que la productividad, es decir, la cantidad de cuerpos de inclusión por miligramo de tejido de las larvas o por larva producidos y liberados por el insecto hospedero (Hodgson *et al.*, 2002) fue igual para todos los aislamientos en larvas de *T. solanivora* con un promedio de 4,4 x 10^7 CI/mg de peso larval y 1,0 x 10^8 CI/larva (tabla 1).

Tabla 1. Producción de cuerpos de inclusión de los aislamientos de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*

Aislamientos	Productividad (CI/mg)	Promedio CI/larva
VG002	4,7 x 10^7	1,1 x 10^8
VG003	4,5 x 10^7	1,0 x 10^8
VG004	4,3 x 10^7	1,1 x 10^8
Perú	4,1 x 10^7	9,0 x 10^8

La productividad es un parámetro muy importante en la investigación de baculovirus y ha sido ampliamente estudiada por varios autores con el fin de determinar características esenciales de los aislamientos virales para ser utilizados en formulaciones de insecticidas biológicos (Vázquez *et al.*, 2002; Arends *et al.*, 2005). En el caso específico del granulovirus de *P. operculella* se han realizado algunas investigaciones como la de Matthiessen y colaboradores (1978), quienes mediante observaciones al microscopio electrónico registraron que un equivalente larval (una larva de *P. operculella*) correspondía a 4,0 x 10^8 CI. En un estudio, Zeddam y colaboradores (2003) determinaron la producción de granulovirus en larvas de las polillas *P. operculella* y *T. solanivora* muertas por la infección viral en laboratorio; encontraron que la producción fue de 2,4 x 10^8 CI/larva y de 1,3 x 10^8 CI/mg para *T. solanivora*. Estos resultados coinciden con los obtenidos en la presente investigación en cuanto a la producción de cuerpos de inclusión por larva, la cual presentó un valor promedio de 10^8. Esto podría indicar que para los granulovirus aislados a partir de larvas de las polillas de la papa, el mayor rendimiento encontrado corresponde a este valor, concordando con lo reportado por Hodgson y colaboradores (2001), quienes concluyeron que para la mayoría de larvas de lepidópteros infectadas por virus de la familia Baculoviridae, el rendimiento promedio obtenido es de 10^8 CI en larvas de último instar.

La productividad de un virus en el tejido de su hospedero se ve afectada por muchos otros factores como el tiempo letal y la virulencia (Kamiya *et al.*, 2004). Cherry y colaboradores (2002) evaluaron entre otros factores, la producción de partículas virales de un granulovirus sobre larvas de la polilla dorso de diamante *P. xylostella*. En este estudio encontraron que a pesar de la alta patogenicidad de este aislamiento sobre las larvas de la polilla reflejada en la dosis letal media, se obtuvieron menores rendimientos debido a la reducción de los tiempos de mortalidad. Al igual que el tiempo letal, la dosis proporcionada a las larvas, el aumento de su peso y el tamaño inicial son factores que pueden afectar la productividad viral, obteniéndose menores rendimientos cuando el insecto se infecta con altas concentraciones. Este hecho se debe a que la muerte ocurre más rápidamente y de esta forma el virus dispondrá de menos tiempo para replicar sus estructuras (CI) en el hospedero (Boucias *et al.*, 1980; Shao-Hua *et al.*, 1998; Hodgson *et al.*, 2001).

CONCLUSIONES

Los aislamientos de granulovirus nativos presentaron una alta eficacia sobre larvas *T. solanivora* en condiciones de laboratorio y la formulación potenció la actividad insecticida, lo cual indica que el bioplaguicida a base de dichos virus constituye una alternativa promisoria para el control de la plaga. El aislamiento VG003 proveniente del municipio de Mosquera (Cundinamarca) fue seleccionado para continuar con el desarrollo de la formulación por presentar la mayor eficacia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento a Colciencias por el apoyo financiero de este trabajo.

REFERENCIAS

American Pharmaceutical Association (APHA). 2005. Handbook of pharmaceutical excipients. 5ª. ed. London, UK, 918 p.

Araque C, García J. 1999. Manual integrado de la polilla guatemalteca de la papa Tecia solanivora (povolny). Corpoica, Fonatta, Bogotá, 44 p.

Arends H, Winstanley D, Johannes J. 2005. Virulence and Competitiveness of *Cydia pomonella* Granulovirus Mutants: Parameters that do not match. Journal of General Virology 86: 2731-2738.

Biotécnica. 2004. Manual de procedimientos operativos estándar del laboratorio de control de calidad de biopaguicidas (Análisis físico-químico de baculovirus). Corpoica, Laboratorio de Control Biológico, Mosquera Colombia.

Bourias D, Johnson D, Allen G. 1980. Effects of Host Age, Virus Dosage and Temperature on the Infectivity of a Nucleopolyhedrosis Virus against Velvet Bean Caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Larvae. Environmental Entomology 9(1):59-61.

Caballero P, López-Ferber M, Williams T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra, Editorial Phytoma, España, 517 p.

Centro Internacional de la Papa (CIP). 1992. Control Biológico de la polilla de la papa con Baculovirus *Pithorimaea*. Boletín de Capacitación CIP-2. Lima, Perú, 19 p.

Cherry A, Ouse M, Djegui D. 2002. Relative Potency, Yield and Transmission of a Kenyan Isolate of *Plutella xylostella* Granulovirus in a Population of Diamondback Moth from Benin, West Africa. En: Memorias del primer simposio internacional de mejoramiento del control biológico de *Plutella xylostella*. Cirad (Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) Montpellier, Francia. En: http://dbm2002.cirad.fr/papers/cherry.doc (Consulta: marzo de 2009).

Dennehy J, Friedenberg N, Holt R, Turner P. 2006. Viral Ecology and the Maintenance of Novel Host Use. The American Naturalist 167(3): 429-439.

Hodgson D, Vanbergen A, Watt A, Hails R, Cory J. 2001. Phenotypic Variations Between Naturally Co-Existing Genotypes of a Lepidopteran Baculovirus. Evolutionary Ecology Research 3:687-701.

Hodgson D, Vanbergen A, Watt A, Hartley S, Hails R, Cory J. 2002. Differential Selection of Baculovirus Genotypes Mediated by Different Species of Host Food Plant. Ecology Letters 5:512-518.

Kamiya K, Zhu J, Murai M, Lavina-Caolili B, Ikeda M, Kobayashi M, Kawanura S. 2004. Cloning and Comparative Characterization of three Distinct Nucleopolyhedroviruses Isolated from The Common Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. Biological Control 31:38-48.

Léry X, Abol-Ela S, Giannotti J. 1998. Genetic Heterogeneity of *Pithorimaea operculella* Granulovirus: Restriction Analysis of Wild-Type Isolates and Clones Obtained in vitro. Acta Virologica 42:13-21.

Léry X, Villamizar L, Espinel C, Cotes A, Zeddam J, López-Ferber M. 2008. Analysis of Several Colombian *Pithorimaea operculella* Granulovirus Isolated from *Tecia solanivora*: Detection of a New Variable Region in the PhopGV Genome. Insect pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 31:83.

Matthiessen J, Christian R, Grace T, Hilsbie K. 1978. Large-Scale Field Propagation and the Purification of the Granulosis Virus of the Potato Moth, *Pithorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bulletin of Entomological Research 68:385-391.

Mcwan R, Sait S, Thompson D, Begon M. 2002. Dietary Stress Reduces the Susceptibility of *Plodia interpunctella* to Infection by a Granulovirus. Biological Control 25(1):81-84.

Meyer J. 2002. Insect Physiology. Respiratory System. Department of Entomology NC State University. En: http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/tutorials/respire.html (Consulta: mayo de 2009).

Mascarin G, Alves S. 2007. Baculovirus: mayor inimigo da traça-da-batata. Revista Associação Brasileira da Batata, ABBA. Batata Show 18:(7). En: http://www.abbbatatabrasileira.com.br/revista18_010.htm. (Consulta: agosto de 2009).

Nieto L, Notz A. 2000a. Desarrollo y sintomatología de larvas de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) infectadas por un virus granulosis nativo. Boletín Entomológico de Venezuela 15(1):29-38.

Nieto L, Notz A. 2000b. Patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado de Mérida, Venezuela. Boletín Entomológico de Venezuela 15(1):39-48.

Rezapanah M, Shojai-Estabragh S, Huber J, Jehle J. 2008. Molecular and Biological Characterization of New Isolates of *Cydia pomonella* Granulovirus from Iran. Journal of Pest Science 81:187-191.

Shao-Hua C, Hong-Liang S, Zuo-Hu L. 1998. Effect of Temperature Oscillation on Insect Cell Growth and Baculovirus Replication. Applied and Environmental Microbiology 64(6):2237-2239.

Singaravelu B, Ramakrishnan N. 1998. Characterization of a Granulosis Virus from the Castor Semilooper, *Achaea janata* L. Journal of Invertebrate Pathology 71:227-235.

Subramanian S, Rabindra R, Sithanantham S. 2008. Genetical and Biological Variations among *Plutella xylostella* Granulovirus Isolates. Phytoparasitica 36(3):230-238.

Vásquez J, Zeddam J, Tristerra A. 2002. Control Biológico del cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfNPV en Iquitos, Perú. Folia Amazónica 13(1-2):25-39.

Vickers J, Cory J, Entwistle, P. 1991. DNA Characterization of eight Geographic Isolates of Granulosis Virus from the Potato Tuber Moth (*Pithorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). Journal of Invertebrate Pathology 57:334-342.

Villamizar L, Zeddam J, Espinel C, Cotes A. 2005a. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un biopaguicida a base del granulovirus de *Pithorimaea operculella* PhopGV. Revista Colombiana de Entomología 31(2):127-132.

Villamizar L, Cotes A, Grijalba E, Torres L, Espinel C, Gómez J. 2005b. Reconocimiento de aislamientos nativos del virus de la granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. En: Resúmenes XXXII Congreso Sociedad Colombiana de Entomología: 84.

Zar J. 1999. Biostatistical analysis. 4a. ed. Prentice Hall. New Jersey, pp. 663.

Zeddam J, Pollet A, Mangoendihardjo H, Ramadhan T, López-Ferber M. 1999. Occurrence and Virulence of a Granulosis Virus in *Pithorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) Populations in Indonesia. Journal of Invertebrate Pathology 74:48-54.

Zeddam J, Vásquez R, Vargas Z, Lagraoui A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Pithorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Boletín de Sanidad Vegetal: Plagas 29:657-665.

Annexe 3.

A *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV) containing several genotypes is highly efficient on *Tecia solanivora*.

Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 45 : 83-86 (2010)

Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes
IOBC/wprs Bulletin Vol. 45, 2009
pp. 83-86

A *Phthorimaea operculella* granulovirus (PhopGV) containing several genotypes is highly efficient on *Tecia solanivora*

Carlos Espinel-Correal[1], Xavier Léry[2], Laura Villamizar[3], Jean-Louis Zeddam[4], Miguel López-Ferber[1], Alba Marina Cotes[3]

[1]École des Mines d'Alès, 30319 Alès, France; [2]IRD, (UR072) Centre de Recherche, 30380 Saint Christol-les-Alès and Université Paris Sud 11, 91405 Orsay, France; [3]CBB, CORPOICA Km 14 via Mosquera, Cundinamarca, Colombia; [4]IRD (UR072), Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

Abstract: The granulovirus of *Phthorimaea operculella* (PhopGV) is becoming an alternative for biological control of potato moth pests. A PhopGV isolate from *P. operculella* in Peru, multiplied for several years on the alternative host *Tecia solanivora* in Colombia (named #Col6) appears to successfully control this pest, in spite of previous studies showing the inefficacy of PhopGVs on other hosts including *T. solanivora*. In this work, we studied the possible reasons for the high performance of this PhopGV. Restriction profiles and PCR analyses were performed on #Col6 and a reference PhopGV isolate (#1346). Submolar bands were found in #Col6 particularly with *Sma* I and *Nru* I endonucleases. PCR amplification of the 90-91 gene of #Col6 gave two bands, one of 767 bp and another of 619 bp, corresponding to a deleted gene found previously in viral isolates from *T. solanivora*. This indicates that #Col6 is a mixture of several genotypes, one of them probably coming from a local latent GV infection in the *T. solanivora* laboratory colony used for virus multiplication. The LC_{50} was assessed on *T. solanivora* with #Col6, #1346, the original Peruvian isolate and a PhopGV isolated from *T. solanivora* in Colombia (#VG003). #Col6 exhibited the highest virulence, probably because of the presence of several genotypes coming from *P. operculella* and *T. solanivora*.

Key words: PhopGV, Biological control, *Tecia solanivora*, *Phthorimaea operculella*

Introduction

The Guatemalan potato moth *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera:Gelechiidae) is the most important potato pest in Colombia. For the control of *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae), the International Potato Center (IPC), recommends the use of a granulovirus (PhopGV) isolated from *P. operculella* in Peru. As no granulovirus was previously isolated on *T. solanivora*, the IPC suggested the use of PhopGV to control this pest. However, previous studies have shown the inefficacy of granulovirus isolates from *P. operculella* on alternative hosts, especially *T. solanivora* (Pollet *et al.*, 2003; Rebaudo *et al.*, 2006). The virus was able to replicate, but its efficacy was very low on the alternative hosts.

In 2002, the Colombian Corporation for Agricultural Research (CORPOICA) started manufacturing a PhopGV isolate provided by IPC on a laboratory colony of *T. solanivora*. The original isolate was thus multiplied for several years on this alternative host. The product successfully controls *T. solanivora* larvae under storage of potato seeds (Villamizar *et al.*, 2008a). This virus isolate was called #Col6. This work tried to elucidate the reason for the high performance of #Col6 on *T. solanivora* and to analyze the differences between the original isolate provided by IPC and #Col6.

Material and methods

Characterization of the viral isolates

Four different PhopGV isolates were used. PhopGV from *P. operculella* (gift from IPC) originated from La Molina (Peru), named "#Peru original" and "#Col6" provided by CORPOICA, which is the result of the multiplication of "#Peru original" on *T. solanivora* for ten passages. These isolates were compared to PhopGV isolate #1346 (gift from Dr. R. EL Bedewy, IPC, Egypt), characterized by Léry *et al.* (1998) and completely sequenced (Genebank accession: NC004062) and isolate "#VG003", isolated from *T. solanivora* in Funza (Colombia), by CORPOICA (Villamizar *et al.*, 2008b).

After occlusion bodies (OBs) purification and DNA viral extraction (Taha *et al.*, 2000), DNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm. The restriction profiles with 10 endonucleases (*Bam* HI, *Hind* III, *Sma* I, *Mlu* I, *Hpa* I, *Dra* III, *Nde* I, *Bst* EII, *Nru* I and *Nsi* I) that shown differences on PhopGV isolates were used (Léry *et al.*, 2008). Amplification by PCR of the five variable regions of the PhopGV (Léry *et al.*, 2008) using specific set of primers was performed.

Biological test

Bioassays to determine the mean lethal concentration (LC_{50}) were carried out with neonate larvae (L1) of *T. solanivora* using purified OBs. The OBs concentration was evaluated using the formula: $6.8 \times 10^8 \times OD_{450} \times$ dilution = Number of OBs/ml (OD_{450}=optical density at 450 nm) (Zeddam *et al.*, 2003). Dilutions of purified virus stock in distilled water were used (1.5×10^5 to 5×10^9 OBs in 2 ml of water). The final concentrations on the potato surface were 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 50, 500 and 5,000 OBs/mm^2. They were applied homogeneously using a nebulizer apparatus (Carrera *et al.*, 2008). Two tubers were used for each concentration. Three replicates per dose, each consisting in 15 neonate larvae per tuber, were set up. Infected and dead larvae were collected. LC_{50} was calculated using Polo PC (LeOra Software, 1987).

Results and discussion

Restriction profiles of the viral DNA were different between isolates #1346 and #Col6. With *Sma* I a 5,830 bp submolar band could be detected in #Col6. Using *Nru* I, two submolar bands not present in #1346 could be detected at 12,016 bp and 5,450 bp respectively. One band at 6,100 bp is present as submolar in #Col6, whereas it is normally detected in #1346. Finally, a new band of 5,511 bp was detected in #Col6 (Fig. 1A). These results indicated that #Col6 is a mixture of several genotypes.

Previously results on the genetic characterization of #Peru original and #VG003, indicated that #1346 and #Peru original could be considered identical and correspond to one of the genotypes of #Col6 whereas #VG003 corresponds to one of the other genotypes. To verify the hypothesis of a combination of several genotypes in #Col6, PCR analyses were carried out. Gene 90-91 presents a deletion of the gene at 148 bp that appears to be a specific modification only found in viral strains obtained from *T. solanivora* in Colombia (Léry *et al.*, 2008). PCR amplification indicates that #Col6 has two bands of 767 bp, corresponding to the band of #1346, and 619 bp, corresponding to the deleted gene (Fig. 1B), confirming the presence of at least two different genotypes in a proportion of 60-40% in the genome of #Col6.

The commercial production of PhopGV in Colombia used a viral infection of eggs from a laboratory colony followed by potatoes infestation with infected larvae. The infection of eggs for the next batch was made from these larvae in a successive passage model (unpublished data). Presence in #Col6 of at least one genotype from #Peru original and another probably

from #VG003, coming respectively from *P. operculella* and *T. solanivora*, could be explained. There was a permanent introduction with insect field population made after 8 to 10 generations in the production process. It is possible to imagine that some larvae with a local latent GV infection were added to the rearing. Because of these new data on the genetic characteristic of #Col6 and results of biological assays previously obtained (Villamizar *et al.* 2008a), we compared the biological activities of #Col6 and its two genotypes (#Peru original and #VG003).

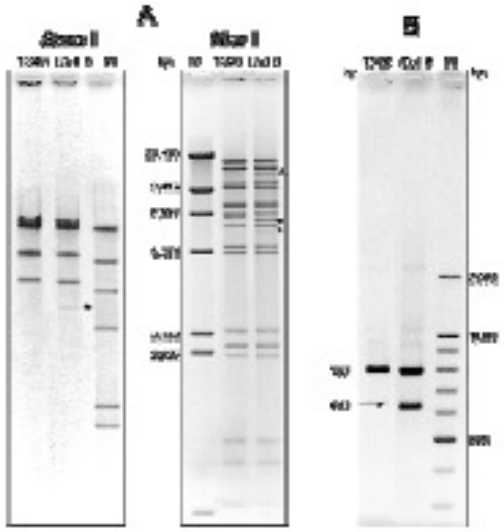

Figure 1. (A) Restriction DNA profiles of PhopGV #1346 and #Col6 isolates obtained with *Sma* I and *Nru* I. Asterisks indicate differences in band patterns. (B) Electrophoresis of PCR fragments amplified from the genomic DNA of #1346 and #Col6 with primers amplifying a region of 90-91 genes.

Biological test

The PhopGV #Col6 isolate exhibited the highest virulence with a LC_{50} of 3.39 OBs/mm^2. In comparison, the LC_{50} of #Peru original and #1346 were respectively 30.11 and 60.67 OBs/mm^2, when the LC_{50} of #VG003 was 6.93 OBs/mm^2 (Table 1). These results reinforce the previously studies (Pollet *et al.*, 2003; Rebaudo *et al.*, 2006) which indicated the lower virulence of the PhopGV isolates from *P. operculella* when tested on *T. solanivora*.

Curiously #Col6, which is a mixture of at least two genotypes (one from *P. operculella* and one from *T. solanivora*), is more efficient that #VG003, adapted to *T. solanivora*. This confirms results obtained by Villamizar *et al.* (2008a), which demonstrate the high virulence of #Col6 against *T. solanivora*. One hypothesis, which was demonstrate on another baculovirus model (NPV), is that a mixture of two different genotypes could be more efficient than the cloned genotypes alone (Simon *et al.*, 2006). This could explain the results obtained with #Col6. To verify this hypothesis, it would be necessary to run test with experimental mixtures of different viral isolates with different genetic and biological properties. The biological activity of such mixtures could be improved, in order to propose a more active and universal biopesticide against *T. solanivora*. The same work must also be performed on *P. operculella*.

Table 1. LC_{50} values of four PhopGV isolates on *T. solanivora* (in OBs/mm^2).

Isolate	LC_{50}	95%	
		Lower limit	Upper limit
#1346	68.67 a*	39.03	99.44
#Peru original	30.11 a	15.333	63.481
#VG003	6.93 b	4.895	9.808
#Col6	3.39 b	1.992	5.497

*LC_{50} followed by the same letter is not significantly different

References

Carrera, M.V.; Zeddam, J.L.; Pollet, A.; Léry, X. & López-Ferber, M. 2008: Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. IOBC/wprs Bulletin 31: 40-43.

Léry, X.; Villamizar, L.; Espinel-Correal, C.; Zeddam, J.L.; Cotes, A.M. & López-Ferber, M. 2008. Analysis of several Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora*: Detection of a new variable region in the PhopGV genome. IOBC/wprs Bulletin 31: 83.

Pollet, A.; Barragán, A.; Zeddam J.L. & Léry, X. 2003. *Tecia solanivora* a serious biological invasion of potatoes cultures in S. America. Intern. Pest Cont. 45: 139-144.

Rebaudo, F.; Dangles, O.; Zeddam, J.L.; Lery, X. & López-Ferber, M. 2006. Étude de l'efficacité biologique d'un granulovirus pour le contrôle de la teigne guatemaltéque de la pomme de terre *Tecia solanivora* Povolny (1973) AFPP Conférence International sur les maladies des plants. Tours, France.

Simon, O.; Williams, T.; Caballero, P. & López-Ferber, M. 2006. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. Proc. R. Soc. B 273:783-790.

Taha, A.; Croizier, L.; López-Ferber, M. & Croizier, G. 2000. Physical map and partial genetic map of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) granulovirus (PhopGV). 19th Ann. Meeting Am. Soc. Virology, July 8-12. Univ. Colorado, Fort Collins, Co. Ma. USA.

Villamizar, L.; Espinel-Correal, C.; Grijalba, E.; Cuartas, P.; López-Ávila, A. & Cotes, A.M. 2008a. Development of a granulovirus based insecticide to control the potato tuber moths *Tecia solanivora* and *Phthorimaea operculella*. In: Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 31: 77-82.

Villamizar, L.; Espinel-Correal, C.; Grijalba, E.; Gómez, J.; Cotes, A.M.; Barrera, G.; Léry, X. & Zeddam, JL. 2008b. Isolation, identification and biocontrol activity of Colombian isolates of granulovirus from *Tecia solanivora* In: Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 31: 85-88.

Zeddam J.L.; Vasquez Soberón, R.M.; Vargas Ramos, Z. & Lagnaoui, A. 2003. Producción viral y tasas de aplicación del granulovirus usado para el control biológico de las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). Bol San. Veg. Plagas 29: 657-665.

Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora.*

Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin 45 : 145-148. (2009)

Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes
IOBC/wprs Bulletin Vol. 45, 2009
pp. 145-148

Biological activity and compatibility with chemical pesticides of a Colombian granulovirus isolated from *Tecia solanivora*

Carlos Espinel[1,3]; Juliana Gómez[1]; Laura Villamizar[1]; Alba Marina Cotes[1]; Xavier Léry[2], Miguel López-Ferber[3]
[1]Laboratorio de Control Biológico, Center of Biotechnology and Bioindustry, Colombian Corporation for Agricultural Research. Mosquera, Colombia; [2]Institut de recherche pour le développement, IRD –Francia, 213 rue La Fayette, 75480, Paris; [3] Ecole de Mines d'Alès, 6, Avenue de Clavières, 30319 Alès cedex (France)

Abstract: The Guatemalan potato moth *Tecia solanivora* is the most limiting potato pests in Venezuela, Colombia and Ecuador. In a previous work, a native granulovirus isolated from *T. solanivora*, appeared to be one promising tool for managing this insect and the other potato moth *Phthorimaea operculella*. The compatibility with chemical pesticides used for potato crops protection was determined. Biological activity was not affected after 24 hour of contact, suggesting that native granulovirus could be used combined with these agrochemicals in an Integrated Potato Crop Management Programme.

Key words: baculovirus, granulovirus, potato, Guatemalan potato moth

Introduction

Potatoes are central to the culture and diet of Andean people and occupy the fourth rank among the world's principle food crops (FAO, 2008). However, Andean potato production is threatened by two moths *Tecia solanivora* and *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), whose larvae destroy potato tubers. Because distribution of both moths often overlap in Colombia, it is necessary to develop tools to manage them simultaneously.

Only a few chemical insecticides are registered for controlling these moths, and their efficacy is not well determined (Notz and Gualdrón 2000). Currently, a registered biopesticide based on a Peruvian granulovirus isolated from *P. operculella* (PhopGV) has been successfully used in Colombia for managing the Guatemalan moth in stored potato. This virus isolate appears to be efficient for controlling *T. solanivora*. However, an isolate isolated from the same insect host could be more virulent to this insect than Peruvian granulovirus isolated from a different potato moth.

In a previous work a native isolate of granulovirus VG003 isolated from *T. solanivora* was selected due to its high biocontrol activity towards *T. solanivora*, and its yield on viral particles. The scope of this study was to investigate its compatibility with chemicals.

Materials and methods

Lethal concentrations over P. operculella and T. solanivora larvae under laboratory conditions

Bioassay was performed by using suspensions of purified virus (Caballero *et al.*, 2001) of native VG003 and foreign Peruvian isolates. Eight different virus dilutions adjusted from 1.5

x 10^8 to 5 x 10^9 occlusion bodies (OBs)/mL by OD 450 nm measurement were evaluated by spraying two ml of each suspension on three potato tubers with the nebulizer described by Carrera *et al.*, (2008). Inoculated tubers were placed individually in plastic flasks and infested with 15 neonatal larvae of *T. solanivora* or *P. operculella*. Treatments were maintained at 25°C ± 2°C for 25 days, when tubers were analyzed for determining the larvae mortality. Experiment was repeated five times and dose response data were analyzed by using Probit analysis (Finney, 1971) to determine the LC_{50} and LC_{90} concentrations.

Compatibility with chemical pesticides

Four insecticides (Carbofuran, Profenofos, Chlorpyrifos and Dimetomorph) and four fungicides (Mancozeb, Metalaxyl, Cypermethrin and Cymoxanil) frequently used for managing potato insect pest and diseases, were reconstituted in water by using two times the field application recommended dosage and 1 ml of each pesticide dilution was mixed with 1 ml of purified virus VG003. Mixtures were maintained at 20°C for 24 hours in a temperature regulated bath and then, OBs were purified by differential centrifugations and using a sucrose gradient (45%, 65% and 80%). Purified virus suspensions were used to prepare new suspensions adjusted to 3 x 10^6 OBs/ml, which were used to perform a bioassay following the previously described methodology. The bioassay included a positive control treatment corresponding to a non-exposed virus and an absolute control in which potato tubers were not inoculated. Mortality percentages were used to determine the efficacy by the Schneider-Orelli equation (Zar, 1999), which was analyzed by ANOVA test (95%).

Results and discussion

Lethal concentrations over P. operculella and T. solanivora larvae under laboratory conditions LC_{50} and LC_{90} of Colombian and Peruvian granulovirus are presented in Table 1. The Colombian isolate VG003 was significantly more virulent for *T. solanivora* than for *P. operculella*, VG003 lethal concentrations were statistically lower over its original host (*T. solanivora*), in comparison with the obtained over the alternative host (*P. operculella*).

In the other hand, the Peruvian isolate PhopGV, was significantly more virulent for its original host *P. operculella* than for *T. solanivora*. For both isolates, the lethal concentrations were lower when bioassay was carried out over the insect from which granulovirus strains were originally isolated, which could be related with a specific adaptation of each viral isolate to different hosts (Léry *et al.*, 1998).

Table 1. Lethal concentrations (OBs/ml) of VG003 and Peruvian PhopGV isolates over *P. operculella* and *T. solanivora* larvae under laboratory conditions

Insect	Viral isolate	LC_{50} (OBs/ml)	Lower limit	Upper limit	LC_{90} (OBs/ml)	Lower limit	Upper limit
Phthorimaea operculella	VG003	1.3 x 10^7 a	9.0 x 10^6	2.0 x 10^7	1.3 x 10^9 a	6.8 x 10^8	3.0 x 10^9
	PhopGV	3.4 x 10^6 b	2.3 x 10^6	4.9 x 10^6	1.3 x 10^8 b	8.0 x 10^7	2.5 x 10^8
Tecia solanivora	VG003	3.6 x 10^6 b	2.5 x 10^6	5.1 x 10^6	2.2 x 10^8 b	1.2 x 10^8	4.6 x 10^8
	PhopGV	1.5 x 10^7 a	9.6 x 10^6	2.6 x 10^7	7.2 x 10^9 a	2.5 x 10^9	2.8 x 10^{10}

The LC_{50} of VG003 isolate obtained in the present work is similar to the one previously obtained by Chaparro *et al.*, (2008) for VG003 isolate over *T. solanivora* larvae, when used a

different potato tubers inoculation method. In the mentioned work, inoculation was made with a brush, which was utilized to apply 2mL of viral suspension on the surface of each potato, obtaining a LC_{50} of 1.6 x 10^6OBs/ml.

Compatibility with chemical pesticides

Virus only treatment at 3 x 10^6 OBs/ml resulted in a 66.8% mortality, while in treatments with both virus and pesticides, mortality ranged from 64.5% to 80.1%. The differences are not statistically significant, suggesting that OBs were not inactivated by the chemical pesticides evaluated. To verify if larvae mortality in the treatments was caused by the virus infection or by a residual content of chemical pesticides in the samples, the percentage of collected larvae with typical granulovirus infection symptoms was calculated. Virus-only treatment presented the highest symptomatic larvae percentage (40%). Mixtures of virus and agrochemicals, gave lower values (between 22.2% and 37.8%). ANOVA tests did not detect statistical differences between treatments. These results could suggest that viral pathogenicity was not affected for evaluated chemical products.

Virus tolerance to pesticides could be attributed to a protective effect of OBs (Figure 1), which protect the virions exposed to adverse environmental conditions. Tamez (2002) demonstrated when this protective action of the granule when testing n-propanol in a nucleopolyhedrovirus spray-dried formulation, which did not affect the insecticidal activity. In other work, Villamizar and Martínez, (2008) evaluated the compatibility of one isolate of Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus with 16 organic solvents, concluding that all solvents evaluated were compatible with the virus, as they did not affect viral activity.

Although in our experimental conditions virus particles per se are unaffected by the chemical compounds tested, baculovirus efficacy, can be altered in many ways by the effects of chemical pesticides on the host insect, that should be carefully analysed.

The Colombian isolate VG003 demonstrated high potential to control both potato moths under an integrated pest management programme due to its biocontrol activity and its compatibility with chemical pesticides used in potato crops.

Acknowledgements

This work was partially funded by the Colombian Agricultural Ministry (MADR).

References

Caballero, P., López-Ferber, M. & Williams, T. 2001: Los Baculovirus y sus Aplicaciones como Bioinsecticidas en el Control Biológico de Plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. España: 517 p.

Carrera, M., Zeddam, J., Pollet, A., Léry, X. & López-Ferber, M. 2008: Evaluation of *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. IOBC Bulletin 31: 40-43.

Chaparro, M., Villamizar, L., Espinel, C. & Cotes, A. 2008: Fotoestabilidad de formulaciones de granulovirus y estudio del efecto potenciador del filtro ultravioleta utilizado. XXXV Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. p. 72.

FAO, 2008: The global potato economy. http://www.potato2008.org/en/potato/IYP-3en.pdf, [Accessed: February 24, 2009].

Finney, D. 1971: Probit Analysis. Cambridge University Press. (3rd edition). London. 151p.

Léry, X., Abol-Ela, S. & Giannotti, J. 1998: Genetic heterogeneity of *Phthorimaea opercu-lella* granulovirus: restriction analysis of wild-type isolates and clones obtained *in vitro*. Acta Virologica 42: 13-21.

Niño, L. & Notz A. 2000: Patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973. (Lepidoptera: Gelechiidae), en el estado Mérida, Venezuela. Boletín Entomología Venezolana 15: 39-48.

Tamez, P., Meguire, M., Behle, R., Shasha, B. & Pingel, R. 2002: Storage stability of *Anagrapha falcifera* nucleopolyhedrovirus in spryed-dried formulation. J. Invertebr. Pathol. 79: 7-16.

Villamizar, L. & Martínez, F. 2008: Determinación de las condiciones de microencapsulación de un baculovirus entomopatógeno mediante coacervación con Eudragit S100®. Vitae Revista de la Facultad de Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia (Medellín-Colombia) 15: 123-131.

Weeden, C., Shelton, A. & Hoffman, M. 2008: Baculoviruses. http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/baculoviruses.html#references. [Accessed: February 24, 2009].

Zar, J. 1999. Biostatistical Analysis. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. p. 523.

Annexe 5.

Genetic and Biological Analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* Granulovirus (PhopGV) Isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Applied and Environmental Microbiology 76 : 7617-7625 (2010)

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Nov. 2010, p. 7617–7625 Vol. 76, No. 22
0099-2240/10/$12.00 doi:10.1128/AEM.00999-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Genetic and Biological Analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* Granulovirus Isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)[▽]

Carlos Espinel-Correal,[1,3] Xavier Léry,[2] Laura Villamizar,[3] Juliana Gómez,[3] Jean Louis Zeddam,[4] Alba Marina Cotes,[3] and Miguel López-Ferber[1]*

EMA, Centre LGEI, 6 Avenue des Clavières, 30100, Alès, France[1]; IRD (UR072), Centre de Recherche, 30380 Saint Christol-les-Alès, and Université Paris Sud 11, 91405 Orsay, France[2]; Centro de Biotecnología y Bioindustria, CORPOICA, Km 14 vía Mosquera, Cundinamarca, Colombia[3]; and IRD (UR072), Université Paris Sud 11, 91405 Orsay, France, and Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador[4]

Received 25 April 2010/Accepted 11 September 2010

Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) is an invasive potato pest of the north of South America that recently colonized zones where *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), a taxonomically related insect, was established. Nowadays, both species can be found in most areas in different proportions. The *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV) was found to efficiently control *P. operculella* and was used as a biopesticide in storage conditions. However, no appropriate biological control methods exist for *T. solanivora*, and the use of granulovirus isolates would provide a solution. The Colombian Corporation for Agricultural Research (CORPOICA) carried out several *T. solanivora* larva samplings in Colombia with the aim of finding potential isolates. Five geographical granulovirus isolates from *T. solanivora* (VG001, VG002, VG003, VG004, and VG005) were found, and molecular analysis by REN profiles shows three different genotypic variants in Colombia. Analysis of their genomes revealed their relatedness to PhopGV. Two isolates exhibited submolar bands in their REN patterns, suggesting a mixture of viral genotypes. These data were confirmed by PCR amplification and sequencing of particular regions of the viral genomes. Their biological activity was assayed on both hosts, *T. solanivora* and *P. operculella*. A significantly higher pathogenicity in both hosts was observed with isolates VG001 and VG005 than with isolate VG003 or a Peruvian isolate (from *P. operculella*) used as a reference in the bioassay. Based on their molecular and biological activity characteristics, VG001 and VG005 isolates should be selected for further analysis in order to establish their potential as biological control agents.

The Guatemalan potato pest *Tecia solanivora* Povolny 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) recently became the major insect pest of potatoes in Central America and the north of South America (18, 34). *T. solanivora* is an aggressive pest that damages up to 100% of stored potato seeds (31). *T. solanivora* also produces important losses in field conditions by entering the potato tubers under the ground, in contrast to another potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) (4). Its point of origin is in Central America. It entered Venezuela in 1983 via infested potato seeds imported from Costa Rica, and in 1985 it was reported for the first time in the northeast of Colombia. Six years later, this insect was present in the center of Colombia, in the main zones of potato production. In 1996, it was found in the southwest of the country (at the border with Ecuador), in another important area of potato production (Fig. 1) (26). During its migration, *T. solanivora* colonized zones where *P. operculella*, the endemic potato tuber moth, was established. To date, both species can be found in most areas in Colombia in different proportions (18).

In 1999, *T. solanivora* was found locally in Canary Islands (Spain) (6). The European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) included it in the A2 action list of pests recommended for regulation as a quarantine pest (11).

In Colombia, only a few chemical insecticides are registered for the control of *T. solanivora*, and their efficacy has not been precisely quantified (22). Furthermore they could have adverse effects on beneficial organisms (1) and the environment, and toxic residues can be found on potatoes (4).

Back in 1967, a granulovirus was found in a *P. operculella* population from Ceylan (29). In the following years, various isolates were described around the world, in all potato production areas where *P. operculella* is found (14, 33). These granulovirus isolates appeared to be genetically related (32) and were thus collectively called the *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV). PhopGV isolates were found to efficiently control and prevent potato tuber moth proliferation in storage conditions, without inducing any harm to other beneficial organisms. Accordingly, the use of PhopGV-based insecticides was promoted by the International Potato Center (Lima, Peru). Local production factories were set up to distribute the virus to potato producers, but the results were not fully reliable, as no quality control was implemented.

The absence of appropriate biological control methods for *T. solanivora* prompted research institutes to test the possibility of controlling this insect using PhopGV. Results were inconsistent between different laboratories (24, 26). The methods used were not standardized, and the virus isolates were not characterized, making it impossible to compare the results.

* Corresponding author. Mailing address: LGEI, Ecole des Mines d'Alès, 30319 Alès, France. Phone: 33466782704. Fax: 33466782701. E-mail: miguel.lopez-ferber@mines-ales.fr.
▽ Published ahead of print on 24 September 2010.

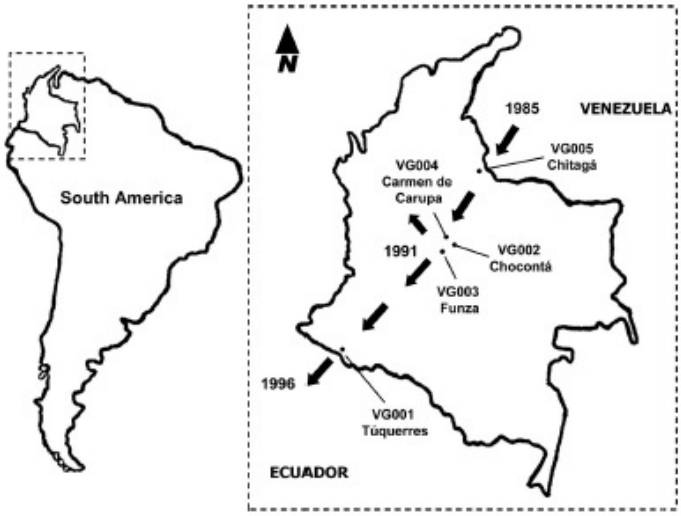

FIG. 1. Five geographic locations where PhopGV isolates were found on *T. solanivora* in Colombia. Arrows show the invasive route of *T. solanivora* in Colombia.

The complete sequence of a Tunisian PhopGV isolate has been determined (GenBank no. NC004062) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html), providing a standard for comparison between isolates. A method for testing the biological activity of the virus against its potential hosts has been developed, providing the appropriate framework to test for the efficacy of granulovirus isolates in the control of *T. solanivora* (7).

The Colombian Corporation for Agricultural Research (CORPOICA) conducted extensive samplings in Colombia aiming to find virus isolates infecting local populations of *T. solanivora*. In this work, we report the biological and molecular characterization of several granulovirus isolates collected on *T. solanivora*. A promising isolate has been chosen to develop a biological pesticide.

MATERIALS AND METHODS

Collection of insects. *T. solanivora* larvae were collected throughout the major Colombian potato-growing departments, in the northeast (Norte de Santander), northwest (Antioquia), center (Cundinamarca and Boyacá), and southwest (Nariño), both in field and in storage conditions. Healthy larvae and/or larvae with signs of granulovirus disease were individually collected and homogenized in microcentrifuge tubes with 1 ml saline solution (0.9% [wt/vol] NaCl). The suspension was divided into five subsamples of 200 μl each, which were stored at −70°C. A preliminary check for granulovirus was carried out using dark-field microscopy as described by Evans and Shapiro (12). Putative GV-containing samples were used to inoculate healthy *T. solanivora* neonates from a laboratory colony maintained at the Laboratory of Entomology in CORPOICA (Mosquera, Colombia). One subsample of each larval suspension was diluted in 1 ml saline solution and dropped over a paper towel (10 cm^2) with *T. solanivora* eggs (approximately 150 eggs). The paper was divided into fragments of 1 cm^2 that were placed over clean potato tubers (*Solanum tuberosum* var. parda pastusa) in plastic cages. Larvae were collected 25 days later and checked for virus infection.

Virus purification and DNA characterization. Virus purification was performed by a modified sucrose gradient method (20). GV-infected larvae were homogenized in H_2O containing 0.1% SDS. This suspension was centrifuged for 5 min at 750 × *g*. The supernatant was centrifuged for 20 min at 20,000 × *g*. The pellet was resuspended in 1 ml H_2O and was then layered onto a 30 to 70% linear sucrose gradient and centrifuged for 20 min at 22,500 × *g*. The white band of viral occlusion bodies (OBs) was collected, diluted with 3 vol of H_2O, and centrifuged for 20 min at 20,000 × *g*. The pellet containing the OBs was resuspended in 2 ml H_2O and stored at −20°C. The OB concentration was estimated by the optical density at 450 nm as previously described (34). For the DNA extraction, 25 μl of 2 M Na_2CO_3 was added to a volume of 325 μl of OB suspension containing 10^{10} OBs. After a 5-min incubation, the viral DNA released was extracted twice with an equal volume of phenol and once with chloroform iso-amylic alcohol (24:1). DNA was precipitated at room temperature by adding 3.3 volumes of 100% ethanol in the presence of sodium acetate (0.3 M final concentration) followed by centrifugation at 12,000 × *g* for 10 min. The pellet was washed with 70% ethanol and centrifuged at 12,000 × *g* for 10 min. The pellet containing DNA was dissolved in Tris-EDTA (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) at 56°C for 2 h. The DNA concentration was determined by measuring the A_{260}. Restriction profiles with 11 endonucleases (BamHI, BstEII, BstAPI, DraIII, HindIII, HpaI, MluI, NdeI, NruI, NsiI, and SmaI) were performed as specified by the manufacturer (Promega). The DNA restriction fragments were separated by electrophoresis in 1% agarose gel in TAE (0.04 M Tris, 0.1% acetic acid 0.001 M EDTA, pH 8.0) buffer at 80 V for approximately 4 h, using lambda DNA/HindIII as a molecular size marker. Fragments were visualized and photographed under UV light after ethidium bromide staining. As a control, the sequenced PhopGV isolate 1346 (17) was used (GenBank accession no. NC004062).

Previous works (16) showed that two regions of the PhopGV genome exhibited significant sequence variation between isolates. These regions are located within viral open reading frame (ORF) 129 and overlapping ORFs 90 and 91. They were PCR amplified under the following cycling conditions: 95°C for 5 min, 20 cycles of 95°C for 1 min, 57°C for 1 min, and 72°C for 1 min, and 73°C for 5 min. The primer pair PhopGV90-1 (5′-GATTTACCGGCGGGCACCAATCTCGAAG-3′) and PhopGV90-2 (5′-ACAGACGTAAATGCCAACGATCGTGCAG-3′) (nucleotides [nt] 78036 to 78063 and 78822 to 78795, respectively, on the complementary strand, on NC_004062) and the primer pair PhopGV129-1 (5′-GCGATGATGAGAATGGGAATGTGAAGAC-3′) and PhopGV129-2 (5′-TGCCTGCTGTGCTCGACAACAATAGACC-3′) (nt 116465 to 116492 and 117401 to 117374, respectively, on the complementary strand, on NC_004062) were used to amplify these two regions. PCR products were sequenced on an ABI 377 automated sequencer.

Biological tests. Bioassays to determine the mean 50% lethal concentration (LC_{50}) of purified OBs from one isolate from each region (VG001, VG003, and VG005) were carried out using neonate larvae (L1) of *T. solanivora* and *P.*

operculella. A PhopGV from *P. operculella* (gift from the International Potato Center) that originated in La Molina (Peru), named Peru 6, was also included in the tests because it is currently used as the active component of a biopesticide used for *T. solanivora* control in stored potatoes. Previous results on the genetic characterization of isolate Peru 6 indicated that it could be considered identical to isolate 1346 (data not shown). Dilutions of purified OBs in distilled water were applied homogeneously (1.5×10^5 to 5×10^9 OBs in 2 ml of water) by a pulverization method with a nebulization chamber as previously described (7). The final OB concentrations laid on the potato surface were 0.15, 0.5, 1.5, 5, 15, 50, 500, and 5,000 OBs/mm^2. Two potato tubers were used for each concentration. Three to five replicates per dose, each consisting of 15 neonate larvae per tuber, were set up. Infected and dead larvae were collected, and statistic analyses were performed using Polo PC (LeOra Software, 1987) and Statplus 4.9 (Analystsoft, 2007).

Nucleotide sequence accession numbers. Sequence data obtained from this work were deposited in GenBank with the following accession numbers: PhopGV_egt_type_2 HQ166267, PhopGV_egt_type_3 HQ166268, PhopGV_egt_type_4 HQ166269, PhopGV_egt_type_5 HQ166270, and PhopGV_region_90_91_type_2 HQ166271.

RESULTS

Collection of insects. In total, 19 locations were surveyed in the potato production areas of Colombia, and 377 larvae were collected during the 3-month campaign. The maximum number of larvae collected in a given location was six. After a selection process by microscopy and amplification, the presence of GV was confirmed in only five samples, each coming from a different location. These isolates were named VG001, from Túquerres (southwest, frontier with Ecuador), VG002, VG003, and VG004, from Chocontá, Funza, and Carmen de Carupa, respectively (center of Colombia), and VG005, from Chitagá (northeast, frontier with Venezuela) (Fig. 1).

DNA characterization. The DNA restriction endonuclease (REN) profiles were closely related to the reference PhopGV profiles (isolate 1346) with the enzymes used, indicating that the isolated viruses can be considered PhopGV.

The three isolates coming from the center of Colombia (VG002, VG003, and VG004) and isolate VG001 (from southwest of Colombia) appeared to be similar with all enzymes tested except SmaI. All isolates were compared to the reference PhopGV 1346 (Tables 1 and 2 and Fig. 2). Polymorphisms among the isolates were observed with the enzymes tested, when isolates from the center of Colombia were compared with VG005, from the northeast, and PhopGV 1346.

After SmaI digestion, the D fragment is not present in isolates VG005 and 1346. In contrast, a C′ fragment was detected in the same isolates and in VG001 as a submolar band, and it was absent in the isolates from the center of Colombia (Fig. 2).

The isolate VG005 (northeast of Colombia) was different from reference 1346 for four enzymes, NruI, BstApI, BamHI, and NdeI. Only one difference was found in the NsiI restriction profiles of isolates from the southwest and center of Colombia compared to those of VG005 and 1346. The NruI restriction profiles were homogeneous between all Colombian isolates but differed from that of 1346 (Table 1). With HpaI, differences could be observed in the F and M fragments in VG001 and isolates from the center of Colombia. BstApI revealed the presence of new fragments in Colombian isolates, and a deletion was found in VG001 and isolates from the center of Colombia. With MluI two differences were found in VG001, VG002, VG003, and VG004 compared to 1346 (Table 1).

Differences were found between VG001, VG002, VG003, and VG004 compared to 1346 in three fragments, with two insertions and one deletion when enzyme BstEII was used. The same isolates presented differences with the enzyme DraIII, with a small deletion. With BamHI, a new fragment in Colombian isolates could be detected that was completely absent in 1346. Differences in the lengths of two fragments were presented in VG001 and isolates from the center of Colombia. The restriction fragment in band I is absent in isolates VG001 and VG005 (Table 2).

Several differences were found after NdeI digestion. In VG001 and isolates from the center of Colombia (VG002, VG003, and VG004), differences in several fragments, including deletion and insertions, were found. A new (J′) fragment was detected in all Colombian isolates and was absent in 1346. With HindIII in VG001 and isolates from the center of Colombia, differences were apparent in small deletions (Table 2).

The consistent presence of submolar bands pointed out that these isolates might be in fact mixtures of genotypes. This hypothesis was confirmed by PCR amplification and sequencing of part of genes 90, 91, and 129. In the case of the reference virus 1346, only the 787-bp band was visible. For VG002, VG003, and VG004, only the 619-bp band was visible, whereas in VG001 and VG005, two bands of 787 and 619 bp, in proportions of 10 to 90% and 90 to 10%, respectively, were generated by PCR using the primer pair PhopGV90-1 and PhopGV90-2 (Fig. 3A). Sequencing showed that the difference between the 619- and 787-bp bands was essentially due to a large deletion in the ORF 90 to 91 region (Fig. 4).

More complex patterns were obtained after PCR using primer pair PhopGV129-1 and PhopGV129-2 (Fig. 3B). Three fragments were generated in the PhopGV 1346 isolate. The published sequence corresponds to the biggest fragment of 937 (*egt* region type 1 in Fig. 5), which does not appear to be the most frequent in our gels. The 723-bp fragment (called *egt* region type 2 in Fig. 5) corresponds to a 214-bp deletion in type 1. Last, the 569-bp fragment that is barely found in the gels corresponds to an additional 154-bp deletion (called *egt* region type 4 in Fig. 5). All Colombian isolates exhibited a major 1,023-bp amplification fragment (*egt* region type 3) resulting from an 86-bp insertion in the type 1 sequence. In addition, minor fragments were generated, with lengths of 869 bp resulting from the 86-bp insertion and from a 214-bp deletion from the reference sequence (*egt* region type 5 in Fig. 5). Only VG005 presents the *egt* type 2 gene, like PhopGV 1346. The *egt* type 4 variant is shared by VG001 and VG005.

The insertion and deletions are located inside the coding sequences for EGT, resulting in a coding capacity being between 286 to 450 amino acids.

Biological tests. Under our experimental conditions, the Colombian PhopGV isolates presented a 50% lethal concentration (LC_{50}) between 1.16 and 6.93 OBs/mm^2 on *T. solanivora* and between 0.8 and 26.2 OBs/mm^2 on *P. operculella* and a 90% lethal concentration (LC_{90}) between 282.1 and 423.6 OBs/mm^2 on *T. solanivora* and between 110.6 and 2,558.4 OBs/mm^2 on *P. operculella*. The Peru 6 isolate, used as a control, presented LC_{50}s against *T. solanivora* and *P. operculella* of 30.1 OBs/mm^2 and 6.6 OBs/mm^2, respectively, and LC_{90}s of 13,806.3 OBs/mm^2 and 258.7 OBs/mm^2, respectively (Table 3).

Among the Colombian isolates tested on *T. solanivora*,

TABLE 1. Comparison of NsiI, NruI, HpaI, BstApI, and MluI restriction fragments of DNAs of Colombian isolates and isolate 1346[a]

Fragment	Estimated fragment size (bp)														
	NsiI			NruI			HpaI			BstApI			MluI		
	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005
A	23,160	=	=	18,349	=	=	25,448	=	=	22,736	=	=	20,354	=	=
B	19,681	=	=	14,772	=	=	13,198	=	=	18,509	=	=	18,078	=	=
C	16,857	=	=	14,325	=	=	13,025	=	=	14,368	=	=	10,707	=	=
D	9,925	=	=	10,034	12,016	12,016	11,563	=	=	13,266	11,466	=	10,542	=	=
E	6,498	=	=	9,333	=	=	8,285	=	=	10,606	=	=	9,762	=	=
F	6,420	=	=	7,210	=	=	7,597	7,800	=	10,152	=	=	6,309	=	=
G	4,830	=	=	6,996	=	=	6,623	=	=	9,308	=	=	5,749	=	=
H	4,751	=	=	6,399	6,300	6,300	4,333	=	=	9,297	=	=	4,676	=	=
I	4,439	=	=	6,104	6,250	6,250	4,077	=	=	2,978	=	=	4,670	=	=
J	4,434	=	=	5,511	5,450	5,450	4,061	=	=	2,774	=	=	4,381	=	=
J'										–	2,550	2,550			
K	3,020	=	=	4,541	=	=	4,008	=	=	2,434	–	–	4,191	=	=
K'										–	1,800	*1,800*			
L	2,771	2,925	=	4,294	=	=	3,584	=	=	955	=	=	3,620	3,410	=
M	2,094	=	=	2,350	=	=	3,566	3,350	=	874	=	=	2,953	=	=
N	2,084	=	=	2,129	=	=	3,284	=	=	579	=	=	2,929	=	=
O	1,886	=	=	2,109	=	=	2,283	=	=	265	=	=	2,848	=	=
P	1,536	=	=	1,982	–	–	1,294	=	=	107	=	=	2,513	=	=
Q	1,504	=	=	1,067	=	=	1,003	=	=	9	=	=	1,365	=	=
R	1,488	=	=	895	=	=	456	=	=				1,174	=	=
S	1,343	=	=	627	=	=	351	=	=				722	=	=
T	456	=	=	180	=	=							620	=	=
U													579	=	=
V													475	650	=
n	20	20	20	20	19	19	19	19	19	17	18	18	22	22	22

[a] *n*, number of fragments. –, fragment not present. =, fragment size similar to that of reference isolate 1346. Italics indicate faint band. A prime indicates a new fragment not present in reference isolate 1346.

TABLE 2. Comparison of BstEII, DraIII, BamHI, NdeI, and HindIII restriction fragments of DNAs of Colombian isolates and isolate 1346[a]

Fragment	Estimated fragment size (bp)														
	BstEII			DraIII			BamHI			NdeI			HindIII		
	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005	Isolate 1346	VG001, VG002, VG003, and VG004	VG005
A	23,243	=	=	19,485	=	=	29,906	=	=	23,302	=	=	22,634	=	=
B	17,886	=	=	16,565	=	=	17,766	=	=	18,456	–	=	14,177	=	=
C	16,610	=	=	14,344	=	=	11,561	=	=	18,165	=	=	10,705	=	=
D	12,351	=	=	12,533	=	=	10,577	=	=	9,829	9,600	=	8,969	=	=
E	12,281	=	=	12,448	=	=	10,129	=	=	9,010	=	=	7,248	=	=
E'										–	8,950	–			
F	7,668	=	=	11,449	=	=	8,725	=	=	8,131	=	=	7,126	7,060	=
G	6,590	=	=	11,356	=	=	7,792	=	=	6,746	=	=	6,275	=	=
H	6,218	6,400	=	8,409	=	=	7,789	=	=	6,463	6,700	=	5,736	=	=
H'							–	6,400	6,400						
I	4,614	4,450	=	4,168	4,075	=	6,114	–	=	5,994	=	=	4,627	=	=
I'										–	5,390	–			
J	4,267	4,325	=	3,385	3,433	=	2,901	2,830	=	5,376	=	=	4,020	=	=
J'										–	4,120	4120			
K	3,470	=	=	2,494	=	=	2,806	2,750	=	3,348	=	=	3,644	3,580	=
L	1,984	=	=	2,096	=	=	943	=	=	1,929	=	=	3,474	=	=
M	1,869	=	=				870	=	=	1,342	=	=	3,298	=	=
N	166	=	=				712	=	=	1,126	=	=	3,216	=	=
O							626	=	=				2,476	=	=
P													2,072	=	=
Q													2,036	=	=
R													1,449	=	=
S													1,441	=	=
T													1,266	=	=
U													881	=	=
V													812	=	=
W													791	=	=
X													384	=	=
Y													324	=	=
Z													89	=	=
AA													47	=	=
n	14	14	14	12	12	12	15	15	16	14	16	15	27	27	27

[a] *n*, number of fragments. –, fragment not present. =, fragment size similar to that of reference isolate 1346. Italics indicate faint band. A prime indicates a new fragment not present in the reference isolate.

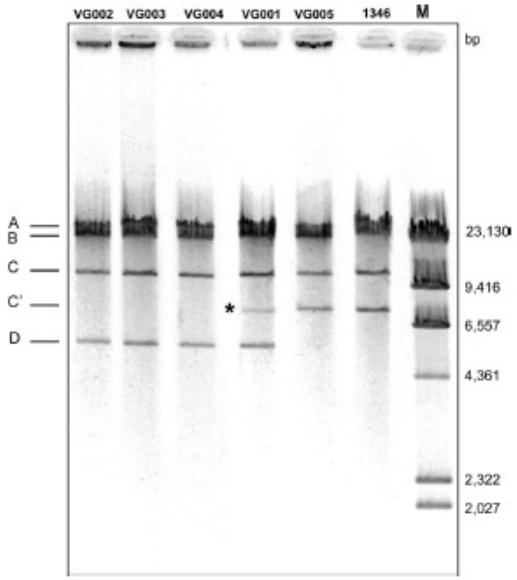

FIG. 2. SmaI restriction endonuclease digest profiles of DNA of PhopGV Colombian isolates and PhopGV isolate 1346. Asterisk indicates submolar band. M, marker. C', new fragment not present in reference isolate 1346.

VG003 was significantly different from VG001 and VG005 ($\chi^2 = 16.73$; df = 4; $P = 0.002$); according to the analysis of potency, VG001 and VG005 were 4-fold and 3.2-fold, respectively, more virulent than the isolate from the center of Colombia (VG003). Moreover, all of the Colombian isolates (VG003, VG005, and VG001) were significantly different from isolate Peru 6 ($\chi^2 = 61.7$; df = 6; $P < 0.001$), with potencies of 4-fold, 16.2-fold, and 19-fold, respectively, more virulent than the Peruvian isolate. Among the Colombian isolates tested on *P. operculella*, significant differences were found ($\chi^2 = 103$; df = 4; $P < 0.001$); VG001 and VG005 were 5.8-fold and 27.7-fold more virulent than VG003. On this host, the Peruvian isolate (Peru 6) was 4.5-fold more virulent than the isolate from the center of Colombia (VG003). The isolates from the southwest (VG001) and northeast (VG005) were even significantly different from Peru 6 ($\chi^2 = 40.5$; df = 4; $P < 0.001$), with potencies of 1.3-fold and 6.2-fold, respectively, more virulent than the isolate native of *P. operculella*.

DISCUSSION

The low level of *T. solanivora* infestation in Colombia during the sampling campaign (September to November 2004) was probably related to an atypical rainy season. It is well known that an extended rainy season is the most important factor to reduce populations of *T. solanivora* (3). This low insect density probably affected baculovirus prevalence. Baculovirus epizootics are in general density dependent. Most larvae were collected in storage facilities of potato seeds, where insect populations are less dependent on weather (4, 31). Larvae with typical granulovirus infection were found in only 1 (Funza) of the 19 locations. Larvae coming from four other locations without typical disease symptoms provided the other four isolates after laboratory amplification.

In a previous work, after a field survey of the granulovirus of *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Yponomeutidae)

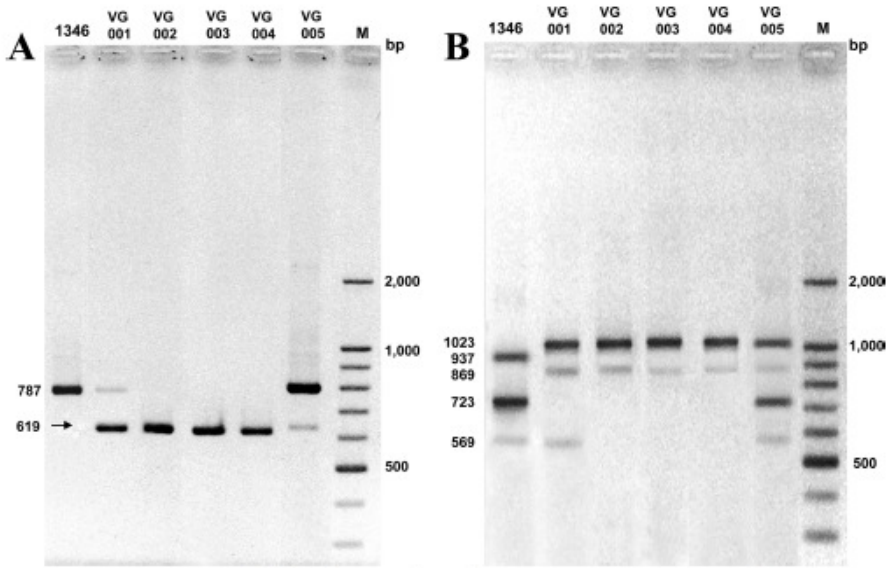

FIG. 3. Semiquantitative PCR of Colombian PhopGV isolates and reference 1346. (A) Genes 90–91. (B) Gene 129. M, marker.

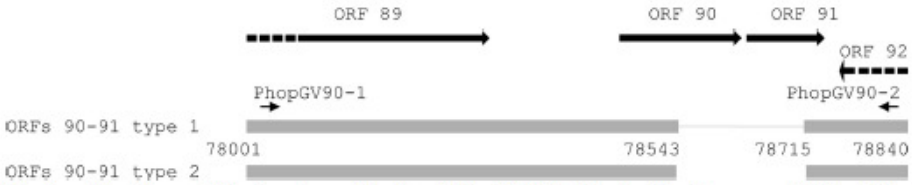

FIG. 4. Overview of the alignment of the two polymorphisms found in the ORF 90 to 91 region. Type 1 corresponds to the published complete sequence (accession number NC004062). Type 2 corresponds to accession number HQ166271. The 840-bp fragment represented in the figure corresponds to the region from nt 78001 to 78840 in NC004062. Primer PhopGV90-1 is located between nt 36 and 63. Primer PhopGV90-2 is located between nt 822 and 795 (complementary strand).

in Kenya, authors (23) found 95 of 127 (74.8%) larvae with confirmed infection symptoms by microscopy and REN profiles, coming from 14.8% of locations surveyed (4 of 27 locations). In this study, only 2% of samples obtained in the field were confirmed as having granulovirus infection in 26.3% of locations surveyed. The within-population prevalence of baculovirus in our survey appears to be lower than that in their study, but the between-population prevalence remains at the same levels, suggesting that even under conditions not favorable to epidemic outbreaks, the virus remains active in the insect populations.

REN profiles confirmed that the viruses isolated from *T. solanivora* larvae are related to PhopGV. This was definitively confirmed by sequencing of PCR-amplified regions located in ORFs 90 to 91 and 129. In addition, this analysis allowed the identification of three different genotypic variants. The first is present in the three isolates from the center of the country; the second one is present in the isolate from the southwest (VG001), showing slight differences from the previous one; and the third, present in the isolate from the northeast (VG005), has differences found with all enzymes. While REN profiles revealed the differences existing between viral isolates at the whole-genome level, sequencing of two variable regions established that these isolates were mixtures of viral genotypes. The particular REN pattern observed for each Colombian PhopGV isolate corresponds to the predominant viral genotype. In some cases, the presence of less-abundant genotypes was suspected because of the existence of submolar bands appearing after enzyme digestions but confirmed only after sequencing of PCR products.

Genotypic variation in baculovirus populations has been thoroughly observed in nucleopolyhedroviruses (alphabaculoviruses) by several authors, both within and between populations of the same host from different geographical scales (12, 21, 30). Even a single larval host can contain a large number of nucleo polyhedro virus (NPV) variants infecting *Panolis flammea* (Denis & Schiffermüller, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) (9). Granuloviruses (betabaculoviruses) are far less variable; however, various genotypes have been found each time that the analysis was carried out (10, 15). This different level of genetic variability may be related to the structure of the OBs, containing many virions for NPVs that can be genetically different (8) or only one virion for GVs (5).

P. operculella was the major potato moth established in Western South America (including Colombia) (24) before the invasion of *T. solanivora* in 1985. The PhopGV isolates found in the region were thus adapted to *P. operculella*. The displacement of this original host after *T. solanivora* invasion followed a temporal pattern from Venezuela to Colombia. *T. solanivora* invasion is probably the result of a single introduction event (25). Under these conditions, probably no adapted virus was carried along with it. PhopGV populations adapted to *P. operculella* were subjected to a selective pressure for replication in this alternative host. However, as both species coexist in some areas, selection of virus populations or genotypic variants able to replicate in both hosts could occur.

The main zone of potato production in Colombia is the

FIG. 5. Overview of the alignment of the *egt* variants found in PhopGV. Variants 1 to 5 correspond to accession numbers NC004062, HQ166267, HQ166268, HQ166269, and HQ166270, respectively. The 1,900-bp fragment represented in type 1 includes the region from nt 116301 to nt 118200 in the complete sequence NC004062. Primer 129-1 is located between nt 165 and 192. Primer 129-2 is located between nt 1101 and 1074 (complementary strand).

TABLE 3. Virulence in both hosts, measured by LC_{50} and LC_{90} of the PhopGVs isolated from *T. solanivora* in Colombia and Peru 6 isolated from *P. operculella*

Strain	No. of OBs/mm² (95% CI)		Slope ± SE	χ^2	df	*P*
	LC_{50}	LC_{90}				
VG001 on *T. solanivora*	1.16 (0.34–2.78)	379.30 (141.36–1,675.25)	0.51 ± 0.06	0.14	3	0.968
VG001 on *P. opercuella*	4 (2.60–6.07)	1,265.6 (450.77–5,649.6)	0.55 ± 0.04	0.39	5	0.078
VG003 on *T. solanivora*	6.93 (4.22–11.37)	423.64 (191.53–1,275.453)	0.71 ± 0.07	1.53	6	0.957
VG003 on *P. operculella*	26.19 (17.2–39.3)	2,558.35 (1,317.82–5,944.00)	0.68 ± 0.04	1.69	5	0.890
VG005 on *T. solanivora*	1.85 (0.71–0.82)	282.07 (116.49–1,024.99)	0.58 ± 0.07	0.41	3	0.936
VG005 on *P. operculella*	0.76 (0.41–1.25)	110.59 (50.41–336.40)	0.62 ± 0.05	0.27	4	0.069
Peru 6 on *T. solanivora*	30.1 (15.33–63.48)	13,806.38 (3,468.89–111,218.40)	0.48 ± 0.05	3.73	6	0.712
Peru 6 on *P. operculella*	6.62 (4.5–9.48)	258.74 (155.06–491.42)	0.75 ± 0.10	3.73	3	0.803

central part of the country, with important commercial exchanges with all other production zones via potato seeds. The virus isolates found in this region (isolates VG002, VG003, and VG004) were all similar to each other (data not shown) but differed in their restriction pattern from the reference *P. operculella* isolate PhopGV 1346. VG003 was included for further analysis.

The two other isolates (VG001 and VG005) present submolar fragments in their restriction pattern, suggesting that they are in fact mixtures of genotypes. Two different profiles can be observed, the first similar to the profile of PhopGV 1346 and the second similar to the profiles found in Central Colombia (isolates VG002, VG003, and VG004).

It is noteworthy that each Colombian isolate derives from a single larva sample, and the fact that in all samples a mixture of genotypes is present may suggest that there may be coevolutionary interactions among different PhopGVs in their hosts, as described for some NPVs (19).

The only relationship found between the genome relatedness (analyzed by restriction endonuclease profiles and by the sequence of PCR fragments) of the various isolates and their pathogenicity for each insect host species is the 86-bp insertion in the *egt* gene in all Colombian isolates. We cannot, however, conclude that there is a direct link between this insertion and the ability to infect this alternative host, as the number of variants analyzed is relatively low. Differences in pathogenicity were found between VG003 and VG005, and these isolates differ for 10 enzymes among those tested. But differences in pathogenicity were also found between VG001 and VG003 although they presented similar REN profiles. Clearly, as differences in biological activity can have multiple origins and might be due to point mutations, the adaptation to a given host cannot be inferred from the virus DNA restriction profile. In the same way, sequencing the variable regions confirmed that VG001 and VG003 are similar apart from the absence of *egt* type 4 in the latter.

The increased pathogenicity that PhopGV isolated from *T. solanivora* presented on this host in comparison with Peru 6, isolated from *P. operculella*, supports the results of previous studies (26) which indicated that a PhopGV isolated from *P. operculella* and not having previous contact with *T. solanivora* has a lower activity on this alternative host. This phenomenon is also observed with NPV. For example, *Anticarsia gemmantalis* multiple nuclear polyhedrosis virus (AgMNPV), in addition to infecting *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), is able to infect several other species of Lepidoptera, such as *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae), but in this alternative host, it has a significantly lower pathogenicity (27).

The pathogenicity of VG003 is complementary to that of Peru 6 in both hosts (around 7 for the original host and 27 for the heterologous host), suggesting that VG003 is in fact well adapted to *T. solanivora*.

VG001 and VG005, the most pathogenic virus isolates, appear to be genotypic mixtures. They have been isolated in areas where both host species are present. A higher pathogenicity of mixtures of genotypes was observed for the *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus, where a mixture of two genotypes could be more efficient than the cloned genotypes alone (19, 28).

From a biological control perspective, the LC_{90} should be considered because an isolate that obtains the higher mortality (90%) with a lower concentration can be selected, producing an economic advantage in the production process of a biological pesticide (13). Isolates VG001 and VG005 provide the best control potential for both host species and could be considered good active ingredients for a biopesticide.

The use of genetically homogeneous isolates or clones can lead to resistance development more easily than the use of genetically diverse genotypic mixtures, be they natural isolates or laboratory mixed genotypes. The genetically homogeneous Mexican isolate of the *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) was used in orchards in Europe to control the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). Recently, field resistance was described in various places, leading to a search for other isolates able to control this resistance (2). Pathogenicity and genetic variability appear to be two important factors in selecting an isolate as an active ingredient, but other characteristics, such as OB yield, host range, and UV tolerance, also should be studied in order to achieve a biopesticide that is safe and reliable with proved efficacy.

VG003, probably the virus isolate best adapted to *T. solanivora*, is not the most pathogenic to this host. It is likely that increasing pathogenicity implies a reduction in other fitness parameters that still need to be evaluated, and the trade-offs between all these parameters do not lead to maximum pathogenicity. Genotypic mixtures, needing to replicate in both hosts, have an additional selective constraint. Experiments are being carried out to determine if in laboratory conditions this behavior can be reproduced.

REFERENCES

1. **Arévalo, A., and R. Castro.** 2003. Evaluación post-registro de los insecticidas con licencia de uso para controlar la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia, p. 86–89. *In* Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora.* CEVIPAPA, CNP, Bogotá, Colombia.
2. **Asser-Kaiser, S., E. Fritsch, K. Undorf-Spahn, J. Kienzle, K. E. Eberle, N. A. Gund, A. Reineke, C. P. Zebitz, D. G. Heckel, J. Huber, and J. A. Jehle.** 2007. Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant, sex-linked inheritance. Science **317:**1916–1918.
3. **Barreto, N., E. Espitia, R. Galindo, E. Gordo, L. Cely, L. Martínez, F. Lozano, and A. López-Ávila.** 2003. Estudios de fluctuación de poblaciones de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en tres intervalos de altitud en Cundinamarca y Boyacá, p. 153–157. *In* Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora.* CEVIPAPA, CNP, Bogotá, Colombia.
4. **Benavides, M.** 2000. Protección sanitaria del cultivo de la papa para programas de manejo integrado de plagas. Papas Colombianas **2:**62–64.
5. **Caballero, P., T. Williams, and M. López-Ferber.** 2001. Estructura y clasificación de los baculovirus, p. 15–46. *In* P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, Spain.
6. **Carnero, A., A. Padilla, S. Perera, E. Hernández, and E. Trujillo.** 2008. Pest status of *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae), Guatemalan potato moth, in the Canary Islands. IOBC/WPRS Bull. **31:**336–339.
7. **Carrera, M. V., J. L. Zeddam, A. Pollet, X. Léry, and M. López-Ferber.** 2008. Evaluation of the *per os* insecticidal activity of baculoviruses by a nebulization method. IOBC/WPRS Bull. **31:**40–43.
8. **Clavijo, G., T. Williams, D. Muñoz, P. Caballero, and M. López-Ferber.** 2010. Mixed genotype transmission bodies and virions contribute to the maintenance of diversity in an insect virus. Proc. Biol. Sci. **277:**943–951.
9. **Cory, J., B. Green, R. Paul, and F. Hunter-Fujita.** 2005. Genotypic and phenotypic diversity of a baculovirus population within an individual insect host. J. Invertebr. Pathol. **89:**101–111.
10. **Eberle, K., S. Sayed, M. Rezapanah, S. Shojai-Estabragh, and J. A. Jehle.** 2009. Diversity and evolution of the *Cydia pomonella* granulovirus. J. Gen. Virol. **90:**662–671.
11. **EPPO/OEPP.** 2006. Data sheets on quarantine pests: *Tecia solanivora*. Bull. OEPP **36:**175–178.
12. **Evans, H., and M. Shapiro.** 1997. Viruses, p. 89–132. *In* L. A. Lacey (ed.), Manual of techniques in insect pathology. Academic Press, San Diego, CA.
13. **Ibarra, J., and M. C. Del Rincón.** 2001. Capacidad insecticida de los baculovirus, p. 203–226. *In* P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, Spain.
14. **Kroschel, J., H. Kaack, E. Fritsch, and J. Huber.** 1996. Biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller) in the Republic of Yemen using granulosis virus: propagation and effectiveness of the virus in field trials. Biocontrol Sci. Technol. **6:**217–226.
15. **Léry, X., S. Abol-Ela, and J. Giannotti.** 1998. Genetic heterogeneity of *Phthorimaea operculella* granulovirus: restriction analysis of wild-type isolates and clones obtained *in vitro*. Acta Virol. **42:**13–21.
16. **Léry, X., J. L. Zeddam, and M. López-Ferber.** 2005. Genetic heterogeneity of various PhopGV isolates found on *Phthorimaea operculella*, *Tecia solanivora* and *Symmetrischema tangolias*. *In* 10th European Meeting. Invertebrate pathogens in biological control: present and future. Bary, Italy.
17. **Léry, X., L. Villamizar, C. Espinel-Correal, J. L. Zeddam, A. M. Cotes, and M. López-Ferber.** 2008. Analysis of several Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora*: detection of a new variable region in the PhopGV genome. IOBC/WPRS Bull. **31:**83.
18. **López-Ávila, A., and E. Espitia-Malagón.** 2000. Plagas y benéficos en el cultivo de la papa en Colombia. Boletín técnico divulgativo. Editorial Produmedios, Bogota, Colombia.
19. **López-Ferber, M., O. Simón, T. Williams, and P. Caballero.** 2003. Deffective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **270:**2249–2255.
20. **Matthiessen, J. N., R. L. Christian, T. D. Grace, and B. K. Filshie.** 1978. Large-scale field propagation and purification of the granulosis virus of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Bull. Entomol. Res. **68:**385–391.
21. **Muñoz, D., and P. Caballero.** 2001. Diversidad natural de los baculovirus, p. 99–102. *In* P. Caballero, M. López-Ferber, and T. Williams (ed.), Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Phytoma, Valencia, Spain.
22. **Niño, L.** 2004. Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. Rev. Latinoam. Papa **4:**1–18.
23. **Parnell, M., D. Grzywacz, K. Jones, M. Brown, G. Oduor, and J. Ong'aro.** 2002. The strain variation and virulence of granulovirus of diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus, Lep., Yponomeutidae) isolated in Kenya. J. Invertebr. Pathol. **79:**192–196.
24. **Pollet, A., A. Barragán, J. L. Zeddam, and X. Léry.** 2003. *Tecia solanivora*, a serious biological invasion of potatoes cultures in South America. Intern. Pest Control **45:**139–144.
25. **Puillandre, N., S. Dupas, O. Dangles, J. L. Zeddam, C. Capdevielle-Dulac, K. Barbin, M. Torres-Leguizamon, and J. F. Silvain.** 2007. Genetic bottleneck in invasive species: the potato tuber moth adds to the list. Biol. Invasions. **10(3):**319–333.
26. **Rebaudo, F., O. Dangles, J. L. Zeddam, X. Lery, and M. López-Ferber.** 2006. Étude de l'efficacité biologique d'un granulovirus pour le contrôle de la teigne guatémaltèque de la pomme de terre *Tecia solanivora* Povolny (1973). *In* AFPP conférence internationale sur les maladies des plantes. Tours, France.
27. **Ribeiro, H., O. Pavan, and A. Muotri.** 1997. Comparative susceptibility of two different hosts to genotypic variants of the *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus. Entomol. Exp. Appl. **83:**233–237.
28. **Simon, O., T. Williams, P. Caballero, and M. López-Ferber.** 2006. Dynamics of deletion genotypes in an experimental insect virus population. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. **273:**783–790.
29. **Steinhaus, E. A., and G. A. Marsh.** 1967. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. J. Invertebr. Pathol. **9:**436–438.
30. **Takatsuka, J., S. Okuno, M. Nakai, and Y. Kunimi.** 2003. Genetic and biological comparisons of ten geographic isolates of a nucleopolyhedrovirus that infects *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). Biol. Control **26:**32–39.
31. **Vargas, B., S. Rubio, and A. López-Ávila.** 2004. Estudios de hábitos y comportamiento de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa almacenada. Rev. Colomb. Entomol. **30:**211–217.
32. **Vickers, J. M., J. S. Cory, and P. F. Entwistle.** 1991. DNA characterization of eight geographic isolates of granulosis viruses from the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (*Lepidoptera,Gelechiidae*). J. Invertebr. Pathol. **57:**334–342.
33. **Zeddam, J. L., A. Pollet, S. Mangoendiharjo, T. Haris Ramadhan, and M. López-Ferber.** 1999. Occurrence and virulence of a granulovirus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. J. Invertebr. Pathol. **74:**48–54.
34. **Zeddam, J. L., R. M. Vasquez Soberón, Z. Vargas Ramos, and A. Lagnaoui.** 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). Bol. Sanid. Veg. Plagas **29:**657–665.

École Nationale Supérieure des Mines
de Saint-Étienne

N° d'ordre : **2010 EMSE 0594.**

Christian name, NAME Carlos ESPINEL-CORREAL

DISSERTATION TITLE : Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs Phthorimaea operculella et Tecia solanivora (Lepidoptera : Gelechiidae)

Speciality : Sciences et Ingénierie de l'Environnement

Keywords :
Biological invasions, Potato tuber moths, Biological control agents, Pest control, Virus evolution…

Abstract :
Biological invasions constitute an important economical burden when they affect key resources for human alimentation, health or agronomic productions. Potato pests are important as this tuber is a key food source in Andean countries. The recent dispersion of the Guatemalan potato tuber moth, *T. solanivora* in South America can be traced back to the introduction in Venezuela, with progressive dispersion towards the South. Recent invasions provide, in addition, a unique model to analyse the process of adaptation of the whole receiving ecosystem to the new comers. This introduction of *T. solanivora* and its coexistence with the endemic potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* offer us the possibility of studying the adaptation to *T. solanivora* of virus populations infeodated to the later.
A survey has been carried out in the potato-producing regions of Colombia. From the *T. solanivora* larvae collected, granulovirus infections were detected in five different locations. All virus isolates are related to the previously described *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV). Differences in the pathogenicity against the two hosts were observed. Variability was detected in some isolates at two genetic markers. Genetically diverse populations appear to be more pathogenic for both hosts than genetically homogeneous populations. They provide a possible solution for the biological control of these insect pests. Artificial populations were constructed to mimic the mixed natural populations. They behave similarly from a biological point of view, but the evolution of the markers frequencies is not related to the biological efficacy, suggesting that undetected differences in the genomes could be responsible of this host adaptation.
The productivity of the infections in both hosts has been studied as it constitutes a key point for the development of a biocontrol agent. The productivity in *P. operculella* (1.36 to 2.69 × 10^8 OBs/ mg) and *T. solanivora* (0.48 to 3.64 × 10^8 OBs/mg) are not very different. Genotypically mixed populations cannot be differentiated from homogeneous populations by their total production in one or the other host, however, the yields (virus output/doses to infect) show clear differences, mixed populations (natural or artificial) perform better in both hosts. No reduction in the pathogenicity for one host was observed after few cycles of replication of the virus population in the second host. Virus populations originally adapted to *P. operculella* had evolved to infect *T. solanivora*. In regions where both host are present, the populations developed a strategy to be efficient on both hosts.

École Nationale Supérieure des Mines
de Saint-Étienne

N° d'ordre : **2010 EMSE 0594.**

Prénom NOM Carlos ESPINEL-CORREAL

TITRE DE LA THÈSE : Analyse de l'évolution des populations du granulovirus PhopGV en contact avec des hôtes alternatifs Phthorimaea operculella et Tecia solanivora (Lepidoptera : Gelechiidae)

Spécialité: Sciences et Ingénierie de l'Environnement

Mots clefs : Invasions biologiques, teignes de la pomme de terre, agents de contrôle biologiques, contrôle des ravageurs, évolution virale

Résumé :

Les invasions biologiques sont un fardeau économique important si elles affectent des ressources critiques pour l'alimentation, la sante humaine ou les productions agricoles. Les ravageurs de la pomme de terre sont un challenge économique important tant ce tubercule est un aliment clé dans les pays andins. Il est possible de suivre la dispersion récente de la teigne du Guatemala, *T. solanivora* en Amérique du Sud depuis son introduction au Vénézuela à sa propagation progressive vers le sud. Par ailleurs, les invasions récentes fournissent un modèle unique pour analyser les processus d'adaptation de tout l'écosystème receveur au nouveau venu. Cette introduction de *T. solanivora* et sa coexistence avec la teigne endémique *Phthorimaea operculella,* nous offre la possibilité d'étudier l'adaptation de populations virales inféodées à *P. operculella* au nouvel hôte *T. solanivora.*

Une étude de terrain a été engagée dans les régions productrices de pomme de terre en Colombie. A partir des larves de *T. solanivora* collectées sur 5 sites distincts, des infections à granulovirus ont été détectées. Tous les isolats viraux sont apparentés au *Phthorimaea operculella granulovirus* (PhopGV) précédemment décrit. Des différences de pathogénicité envers les deux hôtes ont été observées. Une variabilité a été détectée pour certains isolats au niveau de deux marqueurs génétiques. Les populations présentant une diversité génétique s'avèrent plus pathogènes sur les deux hôtes que des populations génétiquement homogènes. Elles offrent une opportunité pour le contrôle biologique de ces ravageurs. Des populations artificielles ont été construites pour mimer des populations naturelles mélangées. Elles se comportent de la même manière d'un point de vue biologique, mais l'évolution de la fréquence des marqueurs n'est pas liée à l'efficacité biologique, ce qui suggère que des différences non détectées dans le génome pourraient être responsables de l'adaptation de l'hôte. La productivité des infections dans les deux hôtes a été étudiée car elle est la clé de voute du développement d'un agent de contrôle biologique. Les productivités sur *P. operculella* (1,36 à 2,69 × 10^8 OBs/ mg) et *T. solanivora* (0,48 à 3,64 × 10^8 OBs/mg) ne sont pas très différentes. Les populations génétiquement mélangées ne se distinguent pas des populations homogènes par leur production totale dans l'un ou l'autre des deux hôtes, cependant, les rendements (production virale/inoculum) montrent des différences claires, les populations mélangées (naturelles ou artificielles) sont plus performantes sur les deux hôtes. Aucune réduction de la pathogénicité sur l'hôte d'origine n'a été observée après plusieurs cycles de réplication de la population virale sur l'hôte alternatif. Les populations virales originellement adaptées à *P. operculella* ont évolué pour infecter *T. solanivora*. Dans les régions où les deux hôtes sont présents, les populations virales développent une stratégie pour être efficaces sur les deux hôtes.