BIOPLAGUICIDA A BASE DE VIRUS

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención pertenece al sector agropecuario, particularmente biopesticidas para el control biológico de plagas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los baculovirus del latín (baculum = bastón) son virus que infectan específicamente a insectos, principalmente miembros del orden *Lepidoptera*, *Hymenoptera* y *Diptera* (Wang & Jehle, 2009; Duffy et al., 2006; Herniou et al., 2003; Boucias et al., 1998). Se encuentran en el ambiente como cuerpos de oclusión (OBs, del inglés Occlusion bodies) (Slack & Arif, 2007), que son estructuras proteicas que protegen los viriones y les posibilitan una mayor persistencia en el ambiente.

La familia *Baculoviridae* se caracteriza por poseer su material genómico compuesto por ADN doble cadena, circular y con un tamaño que varía entre 80 y 180 kilopares de bases (kpb). La familia consta de cuatro géneros asignados de acuerdo a características estructurales, moleculares y biológicas: los *alphabaculovirus* correspondientes a nucleopoliedrovirus (NPVs) aislados de lepidópteros, los *betabaculovirus* o granulovirus (GVs) aislados de lepidópteros, los *deltabaculovirus* o NVPs aislados de dípteros y los *gammabaculovirus* o NPVs aislados de himenópteros (ICTV, 2012; Jehle et al., 2006; Miele et al., 2011).

Estos géneros se diferencian por características estructurales como la morfología de sus cuerpos de oclusión y también por algunos aspectos biológicos (Herniou et al., 2004; Jehle et al., 2006). A lo largo del ciclo de infección, se ha observado que se generan dos fenotipos virales: los viriones brotantes (BVs, del inglés budded virions) y los viriones derivados de oclusión (ODVs, del inglés ocludded derived virions) (Theilmann et al.,

2005). Ambos fenotipos son similares en la estructura de la nucleocápside e idénticos en la información genética que poseen, pero difieren en la fuente y en la composición de sus envolturas (Funk et al., 1997; Braunagel & Summers, 1994). Los BVs son los responsables de llevar a cabo la infección sistémica en el hospedador, mientras que los ODVs son los responsables de la distribución de los virus entre hospedadores.

Los baculovirus se encuentran en el ambiente como cuerpos de oclusión (OBs), dichos cuerpos los mantienen viables en el ambiente por periodos prolongados. Mientras que los OBs de los GVs contienen normalmente un (1) sólo virión, los OBs de los NPVs pueden contener múltiples viriones y, además, dichos viriones pueden contener a su vez múltiples nucleocápsides. (FIG 1). Existen diversos estudios acerca del uso de los Baculovirus como factores de regulación de algunas poblaciones de insectos, especialmente aquellas que afectan la producción agrícola. Esta tecnología ofrece grandes ventajas sobre los pesticidas químicos, entre ellas la disminución de residuos tóxicos en los alimentos producidos y en suelo, así como menores riesgos para la salud.

En el documento WO2014/182228 se describe un método para aumentar la eficacia insecticida de un microorganismo patógeno (nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda* (SfNPV) mediante su asociación con un organismo mutualistico (levadura de especies del grupo Metschnikowia, tales como *Ascomycota* y *Sacharomycetes*; de especies de Candida; especies de *Cryptococcus* y especies de *Pseudozyma*) que co-existe en estrecha asociación con la larva y que estimula la ingesta del patógeno por parte de dicha larva. Sin embargo, el inconveniente que presenta dicho método es que durante el período de almacenamiento, el organismo mutualista puede continuar su actividad metabólica y generar metabolitos que alteren la actividad viral y por ende la calidad del producto.

El documento WO2011/117411 titulado "*Entomopathogenic Viral Preparation*", revela una composición que contiene al menos un granulovirus del tipo *Cydia pomonella* (caracterizado por un patrón de restricción determinado), empleada para el control del

gusano de la manzana *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) y de la polilla del melocotonero oriental *C. molesta*. La composición allí divulgada no tiene ninguna aplicabilidad para el control de plagas migratorias de zonas tropicales y subtropicales de América, tales como el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda.*

Además de las formulaciones y combinaciones de agentes mencionados anteriormente, algunas investigaciones se han centrado en el estudio de la diversidad genética de los agentes de control contra plagas particulares con miras a la selección de aislamientos altamente patogénicos. La patente WO2014/161974 se dirige a nuevos genotipos de nucleopoliedrovirus de *Chrysodeixis chalcites* (Chch SNPV), al procedimiento para su producción y su uso como agente de control biológico. La solicitud de patente ES2301352, revela seis nuevos genotipos del nucleopoliedrovirus múltiple de *S. exigua* denominados AlPstM0935, AlPstM1400, AlPstM1033, AlPstM1449, AlPstM0923, y AlPstM0657 y su uso, preferentemente como mezcla de dos o más genotipos, dentro de composiciones insecticidas contra *S. exigua.*

En las últimas décadas se han empleado diversas estrategias de modificación genética de los Baculovirus para incrementar su virulencia, patogenicidad y/o actividad insecticida, entre las cuales se pueden mencionar:

a) inserción del gen codificante de la toxina del escorpión *Buthus eupus*;
b) inserción del gen de la esterasa de la hormona juvenil de *Heliothis virescens*;
c) inserción del gen de la toxina TxP-1;
d) inserción del gen de la toxina AaIT de escorpión *Androctonus australis* en el AcNPV (nucleo poliedrovirus de Autographa californica);
e) inserción del gen de la toxina cry de *Bacillus thuringiensis*;
f) inserción del gen de la hormona diurética; g) introducción de la neurotoxina neuroselectiva de escorpión LqhIT2;

g) inserción de secuencias que expresan sustancias inhibidoras del apetito en *Helicoverpa zea* y plagas relacionadas (ver patentes brasilera PI0901235-4 y patente US6096304); y

h) modificación del gen de quitinasa, para hacer la lisis de la larva menos agresiva y aumentar el rendimiento e recuperación de viriones para producción masiva.

Si bien las estrategias de modificación genética han demostrado mejorar las características de los baculovirus modificados, la política ambiental de varios países europeos y latinoamericanos, entre ellos Colombia, no permite el uso de organismos genéticamente modificados, razón por la cual estos microorganismos no pueden ser fácilmente transferidos a escala industrial o a campos de cultivo.

Por tal motivo, ha sido necesario desarrollar diversos tipos de formulaciones de bioplaguicidas basadas en organismos no modificados, que sean altamente específicos contra las plagas a tratar y que superen los inconvenientes asociados a la baja eficacia y la alta sensibilidad a la radiación UV. Asi, Corpoica en el trabajo titulado "*Deletion Genotypes Reduce Occlusion Body Potency but Increase Occlusion Body Production in a Colombian Spodoptera frugiperda Nucleopolyhedrovirus Population"* describe la purificación de genotipos a partir de un aislamiento nativo de un nucleopoliedrovirus múltiple de *S. frugiperda* SfMNPV. En este trabajo se reporta la obtención de 83 clones, de los cuales 10 correspondieron a genotipos diferentes y se sometieron a caracterización molecular y biológica. Los resultados mostraron que un genotipo fue más patogénico.

El estudio anterior también evidenció que la mezcla de este genotipo más patogénico (denominado A) con otros tres genotipos seleccionados (denominados C, D y E), presentaba una potencia menor o igual a la del virus de campo. La conclusión de dicha investigación fue que la mezcla co-ocluida de diversos genotipos a nivel natural es un mecanismo de regulación de la patogenicidad para garantizar la permanencia del patógeno en la naturaleza y puede resultar en una actividad insecticida menor que la del virus original de campo (Barrera et al., 2013).

Adicionalmente, en otro trabajo de Corpoica titulado *"Eudragit S100® microparticles containing Spodoptera frugiperda nucleopolyhedrovirus: Physicochemical characterization, photostability and in vitro virus release"*, se reporta un método para microencapsular cuerpos de oclusión del aislamiento NPV001 del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda*, utilizando un polímero del ácido metacrílico Eudragit S100®, mediante el método de emulsión y evaporación de solvente. Las microcápsulas obtenidas presentaron una pérdida de eficacia a partir de las 2 horas de irradiación con luz ultravioleta (Villamizar et al., 2010), posiblemente debido a la no inclusión de otros auxiliares de formulación, y a que el ingrediente activo corresponde a un virus completo de origen silvestre.

En un trabajo posterior titulado *"Microencapsulation of a Colombian Spodoptera frugiperda Nucleopolyhedrovirus with Eudragit S100® by spray drying"*, de Corpoica, se reporta una formulación similar a la anterior con mejoras en el proceso de microencapsulación cambiando el método de evaporación de solvente por un proceso de atomización en lecho fluido (Camacho *et al.,* 2015). En este trabajo, el tamaño de las microcáspulas se disminuyó a 20 µm y se aumentó la fotoestabilidad por exposición UV.

La interacción de los diferentes genotipos que conforman un aislamiento de nucleopoliedrovirus puede tener efectos negativos, neutros o positivos. Por ejemplo, genotipos puros del nucleopoliedrovirus de S. exigua (SeMNPV) demostraron poseer mayor actividad insecticida que el virus completo de origen silvestre (Muñoz et al*.,* 1998). Sin embargo, en un aislamiento de Nicaragua del nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* se observó mayor patogenicidad del virus completo silvestre que en los genotipos puros (Simón et al., 2004; 2005). Además, la mezcla de algunos genotipos re-estableció la patogenicidad de los genotipos puros, pero nunca se alcanzó una mejor patogenicidad que la presentada por el aislamiento silvestre.

Los inventores diseñaron mezclas de dos o más genotipos puros clonados del aislamiento del nucleopoliedrovirus (NPV015 a NPV019) de *Spodoptera frugiperda* que resultaron más patogénicas que el genotipo silvestre.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a composiciones bioplaguicidas que comprenden mezclas sintéticas de dos o más genotipos de alta patogenicidad del NPV de *S. frugiperda* con una actividad insecticida superior con respecto a la del virus nativo del campo y opcionalmente, potenciadores biológicos para incrementar su patogenicidad. Las composiciones presentan alta efectividad frente a *Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), son fotorresistentes y estables a temperatura ambiente.

La invención también proporciona una formulación novedosa para el recubrimiento del ingrediente activo, que comprende diferentes auxiliares de formulación (v.g. filtros UV) para facilitar su aplicación, protegerlo de la luz y extender su tiempo de vida útil sin necesidad de refrigeración.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG 1: Esquema de la estructura de los baculovirus. Se representa la estructura de las dos morfologías de los baculovirus: Nucleopoliedrovirus (ODVM y ODVS) y granulovirus (GV). Los ODVM (viriones múltiples) y ODV (virión simple o single nucleopoliedrovirus SNPV), están inmersos en un cuerpo de oclusión (CI u OB) formado por una matriz proteica denominada poliedrina en los NPV y granulina en los GV.

ODVS: varios ODV, V: virión, NC: nucleocápside.

FIG 2: Esquema del proceso de obtención de genotipos del Nucleopoliedrovirus de *Spodoptera frugiperda.*

A. Obtención de un aislamiento nativo del SfMNPV
B. Obtención de variantes genotípicas individuales
C. Preparación de mezclas sintéticas del virus.

FIG 3: Fotografía del Gel de agarosa con patrones de restricción (REN) generados con la enzima *Pst*I del aislamiento de Granulovirus de *Spodoptera frugiperda* VG008 y de los genotipos el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV015-NPV019.

FIG 4: Diagrama de los fragmentos generados con la enzima *Pst*I del aislamiento de Granulovirus de *Spodoptera frugiperda* VG008 y de los genotipos el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV015-NPV019.

FIG 5: Gráfica del efecto de la formulación sobre la estabilidad a 28°C de la actividad insecticida del virus nativo NPV003 y la mezcla de genotipos y granulovirus.

NPV003-nf: Virus nativo NPV003 sin formular; NPV003-f: Virus nativo NPV003 formulado; Mezcla-f: mezcla de genotipos de NPV003 y granulovirus formulada.

FIG 6: Gráfica del contenido de micoorganismos contaminantes del virus nativo NPV003 formulado y sin formular y de la mezcla de genotipos y granulovirus formulada y almacenado durante tres meses a 28ºC.

NPV003-nf: Virus nativo NPV003 sin formular; NPV003-f: Virus nativo NPV003 formulado; Mezcla-f: mezcla de genotipos de NPV003 y granulovirus formulada.

FIG 7: Gráfica de Eficacia vs tiempo de irradiación del estudio de fotoestabilidad del virus nativo NPV003 formulado y sin formular y de la mezcla de genotipos y granulovirus formulada.

NPV003-nf: Virus nativo NPV003 sin formular; NPV003-f: Virus nativo NPV003 formulado; Mezcla-f: mezcla de genotipos de NPV003 y granulovirus formulada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención comprende una mezcla sintética de dos o más genotipos puros clonados del aislamiento del nucleopoliedrovirus (NPV015 a NPV019) de *Spodoptera frugiperda* (NPV-003= SfCOL) co-ocluidos en un solo cuerpo de oclusión, o la mezcla de cuerpos de oclusión de genotipos individuales y, opcionalmente, un potenciador biológico o químico (v.g. aislamientos de granulovirus, nucleopoliedrovirus de insectos o proteínas derivadas de los mismos). La invención también contempla composiciones que comprenden dichas mezclas sintéticas junto con uno o más excipientes, adyuvantes y/o vehículos química y ambientalmente aceptables para este tipo de productos.

Los genotipos puros se pueden obtener de acuerdo al proceso descrito en la FIG 2. A partir de una suspensión viral purificada de NPV003, se infectan larvas de *Spodoptera frugiperda* por ingesta oral y se extrae hemolinfa de las larvas infectadas justo en el momento del ciclo en el cual se encuentran los viriones brotados (con única nucleocápside y genoma único). Luego, mediante diversas diluciones se infectan células de insecto de la línea Sf9 (línea celular de *S. frugiperda*).

Para la obtención de las mezclas con genotipos co-ocluidos en un solo cuerpo de oclusión, los viriones derivados de los cuerpos de oclusión se pueden liberar mediante tratamiento con soluciones de pH alcalino para luego ser inyectados simultáneamente en las larvas. En el proceso de infección ocurre la co-oclusión de los genotipos seleccionados.

Para la obtención de la mezcla de cuerpos de oclusión de genotipos individuales, se seleccionan células individuales que contienen un solo genotipo en su interior y estos se multiplican mediante inyección en larvas, de las cuales se purifican las variantes genotípicas individuales después de la muerte de los individuos. A partir de los genotipos individuales se pueden realizar mezclas de los genotipos previamente seleccionados por su actividad insecticida.

En una modalidad de la invención, todos los genotipos del nucleopoliedrovirus NPV003 y el aislamiento del granulovirus de *S. frugiperda* VG008 se pueden someter a digestión con la enzima *Pst*I y las bandas generadas se pueden observar en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (FIG 3). Los fragmentos de restricción generados después de la digestión del ADN genómico con la enzima *Pst*I se asignan de manera alfabética, empezando con la letra A para el fragmento más grande y de manera consecutiva hasta el fragmento más pequeño generado (FIG 4).

Los genotipos de nucleopoliedrovirus y granulovirus se caracterizan por un patrón de bandas específico, generado al cortar el genoma con la enzima *Pst*I, con fragmentos de diferentes pesos. La Tabla 1 indica el tamaño estimado de los fragmentos de restricción generados con la enzima *Pst*I del aislamiento de granulovirus de *S. frugiperda* VG008 y de los genotipos el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* NPV015 a NPV019.

Tabla 1.

Fragmento	NPV015	NPV016	NPV017	NPV018	NPV019	VG008
A	28084	28084	28084	28084	28084	14750
B	24926	24926	24926	24926	24926	14749
C	12465	12465	12465	12465	12465	14749
C'				9200		
D	8864	8864	8864	8864	8864	11761
E	8481	8481	8481	8481	8481	8921
E'		7800				
F	7079	7079	7079		7079	8784
G	6932	6932	6932	6932	6932	8397
H	6124	6124	6124	6124	6124	8030
I	5182	5182	5182	5182	5182	6969
J	4899	4899	4899	4899	4899	6660
K	4887			4887	4887	6430
L	4769	4769	4769	4769	4769	5474

L'			4200			
M	3575					5258
N	2953					4552
N'			2700			
O	2112	2112	2112	2112	2112	3485
P	1339	1339	1339	1339	1339	2212
Q	1228	1228	1228	1228	1228	1705
R						1447
S						1039
T						974
U						636
V						521
W						400
X						300
Total	**133899**	**130284**	**129384**	**129492**	**127371**	**138203**

Las bandas que caracterizan cada genotipo son:

- **NPV015:** A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q
- **NPV016:** A, B, C, D, E, E´, F, G, H, I, J, L, O, P, Q
- **NPV017:** A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, L, L´, N´, O, P, Q
- **NPV018:** A, B, C, C´, D, E, G, H, I, J, K, L, O, P, Q
- **NPV019:** A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, O, P, Q
- **VG008:** A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, W, X

Las secuencias de los fragmentos amplificados son:

>Sf23

GCTTGTGCGTTGTCGTTGATCGTACAGAGATAATAACTAAAATACACCCCATCA
CTAAGAAAAAAATTAAAATTGACGTATCTAATAAATACATTAATAGGATGAAG
AAGACGCTGATAAAGTGGGGCTATCCTGTGAAATTTGCAAAATTTGACGAGTTT
AAAGGATACAAGTACGACATTGACACGGACGACTGGGACCGAGTCGACTACA
A

>Sf24
TCGTCGGCATCATACTGCTCTCGGTGGACAAGTTTGTGTCCATACCCATCATAC
AGCTGTACCAGATCGCGTACCAGCAACTGCAGATATCGCCGTTTTACGTGACGC
TGACGCTCATGCTGCTCACCACCGTTGGTGGACTGTCGACGAAAACCATGCGA
ACGTG

El aislamiento VG008, por su parte, amplifica una región específica de 203 pb con los cebadores SFGV 24.1-5' CCGATAAGGTTATATCTGA 3' y SFGV24.2 5' TCAATAACTTCTTCGTGCA 3'. La secuencia del fragmento amplificado es la siguiente:

>SFGV24
AGATATCACCTTTGAAGACATTGATTCGATCTACGACGCAGAAACGCAACTCG
ACAAAGCTTACGATAACGTTAAATGGGAGGACAAATACAAGGAATTGCTAGAC
CAATACAATAAAGATAAAGAAAAATGGGAGAAAAAATACACAGAGCTTATGA
ATCAAAATACAGTCGACGAGGACAAATGGACAACAGAAAAGAAGA

Los genotipos del nucleopoliedrovirus (NPV015, NPV016, NPV017, NPV018, NPV019) también se caracterizan por la amplificación de dos fragmentos específicos de 214 y 166 pares de bases con los cebadores Sf23.1 (5'-GCTTGTGCGTTGTCGTTGAT-3') y Sf23.2 (5'-TTGTAGTCGACTCGGTCCCA-3'), y con los cebadores Sf24.1 (5'-TCGTCGGCATCATACTGCTC-3') y Sf24.2 (5'-CACGTTCGCATGGTTTTCGT-3') respectivamente. Esta región presente y específica para todos estos genotipos, no se encontró en otros aislamientos de campo.

Los genotipos del nucleopoliedrovirus (NPV015, NPV016, NPV017, NPV018, NPV019) se encuentran depositados en el banco de germoplasma de microorganismos con interés en control biológico de la Nación, administrado por Corpoica y ubicado en el Centro de Investigaciones Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca, Colombia).

En una modalidad de la invención, la mezcla sintética comprende al menos el genoma de un virión que presenta el patrón de bandas generado con la enzima *Pst*I y listado en la Tabla 1.

En una modalidad aún más preferida, las mezclas sintéticas de genotipos son:

1. Mezcla sintética No. 1: NPV015+NPV016+NPV017;
2. Mezcla sintética No. 2: NPV015+NPV018+NPV019;
3. Mezcla sintética No. 3: NPV015+NPV016+NPV017+VG008;
4. Mezcla sintética No. 4: NPV015+NPV018+NPV019+VG008;
5. Mezcla sintética No. 5: NPV015+NPV018+NPV017+ proteína de VG008;
6. Mezcla sintética No. 6: NPV015+NPV018+NPV019+ proteína de VG008.

Las mezclas sintéticas 1 a 4 son obtenidas de acuerdo con el procedimiento ilustrado en la FIG. 2. Para el caso particular de las mezclas sintéticas 5 y 6, una vez se obtienen las mezclas de los genotipos virales, se adicionan proteínas de VG008 como potenciador. Las proteínas de VG008 pueden corresponder al extracto proteico total o parcial obtenido a partir de los cuerpos de oclusión, a las proteínas purificadas a partir de éstos, o producidas sintéticamente. Las principales proteínas corresponden a las del tipo enhancinas y quitinasas.

Las mezclas sintéticas pueden ser incluidas en composiciones biopesticidas. Las composiciones incluyen, además de las mezclas sintéticas de NPV, diferentes vehículos, coadyuvantes, protectores ultravioleta, diluentes, polímeros de recubrimiento, tensioactivos y reguladores de pH con funciones para darle forma y características propias a la presentación final (v.g. formar emulsiones,), mejorar la estabilidad y aumentar la vida útil durante el almacenamiento. La concentración total de las mezclas sintéticas en las composiciones de la invención está preferiblemente entre 0,1% y 99,9 % (p/p).

Para efectos de la presente invención, vehículo se puede definir como una sustancia o mezcla de sustancias (v.g. disolventes, soluciones, emulsiones y suspensiones) capaces de contener las mezclas sintética sin que se afecte su capacidad para realizar la función deseada.

Los protectores ultravioleta se seleccionan del grupo que comprende: *pigmentos* tales como óxidos de hierro, dióxido de titanio, dióxido de zinc; *colorantes* tales como licopeno, betaína, bixina, curcumina, clorofila, tartrazina, azafrán, ácido carmínico, otros colorantes alimenticios y abrillantadores ópticos tales como los derivados del estilbeno.

Los diluentes se seleccionan del grupo que comprende: *arcillas* tales como caolín, bentonitas y sepiolitas, almidones, derivados de la celulosa *y estearatos* tales como estearato de magnesio. Los polímeros de recubrimiento se seleccionan del grupo que comprende por: *polímeros naturales* tales como lignina, celulosa, almidón, carragenina, alginato, goma arábiga, goma Guar, goma Xantan, dextranos, *polímeros sintéticos* tales como derivados acrílicos (Polimetacrilatos) y *poliésteres*.

Los reguladores de pH se seleccionan del grupo que comprende: tampones tales como tampón fosfato, citrato, carbonato, borato, ftalato y sus mezclas. Los tensioactivos se seleccionan del grupo que consiste de: *tensioactivos aniónicos* tales como ésteres de ácido carboxílico y derivados de ácidos carboxílicos polietoxilados; *tensioactivos catiónicos* tales como cloruro de benzalconio y cloruro de cetilpiridinio; *tensioactivos no iónicos* tales como polisorbatos (Tween 20-80), ésteres de sorbitán (Span 20-80) y octilfenoletoxilado (Tritón); y *tensioactivos anfotéricos* tales como betaínas y sultaínas.

Las composiciones de la invención pueden ser sólidas en forma de polvos, granulados, tabletas o pellets, o pueden ser líquidas en forma de suspensión, concentrado emulsionable o emulsión y pueden ser de aplicación foliar, aplicación al suelo, por espolvoreo, por irrigación y/o por aspersión y puede ser mezclada con compost, fertilizantes, otros bioinsumos, extractos vegetales y agroquímicos. Adicionalmente, las

composiciones pueden contener opcionalmente agentes potenciadores biológicos o químicos de la actividad insecticida.

La concentración de los cuerpos de oclusión del ingrediente activo en las composiciones está entre $1x10^4$ y $1x10^{11}$ cuerpos de oclusión/mL con cualquiera de las mezclas sintéticas virales anteriormente descritas. Las composiciones incluyen diferentes coadyuvantes con funciones específicas para mejorar la estabilidad en almacenamiento y la fotoestabilidad de las partículas virales frente a la radiación solar.

En una modalidad preferida adicional, las composiciones de la invención se formulan como polvo mojable, la cual incluye un polímero bioadhesivo que reduce los efectos de la radiación solar y mejora la adherencia del virus al tejido vegetal y las mucosas intestinales del insecto. Los componentes específicos de ésta composición permiten estabilizar los cuerpos de oclusión del virus durante el almacenamiento aumentando así la vida útil del bioproducto.

Algunas de las modalidades preferidas de las composiciones de la presente invención se describen en las Tablas 2 a 7.

Tabla 2. Composición de polvo mojable base

COMPONENTE	**(%p/p) en base seca**
Suspensión viral con concentración entre 10^4 y 10^{11} cuerpos de oclusión/mL *	0,50 - 8,50
Caolín	70,00 - 95,00
Óxido de hierro rojo	0,10 - 10,00
Licopeno E160d	0,10 - 15,0
Copolímero del ácido metacrílico (Eudragit S100®)	1,00 - 10,00
Fosfato diácido de potasio	0,01 - 1,00
Fosfato dibásico de sodio	0,10 - 1,00

*Corresponde a cualquiera de las mezclas sintéticas virales descritas.

Tabla 3. Composición de polvo mojable No SfNPV003-1

COMPONENTE	(%p/p) en base seca
Suspensión viral con concentración entre 10^4 y 10^{11} cuerpos de oclusión/mL *	1,35
Caolín	77,95
Óxido de hierro rojo	1,36
Licopeno E160d	13,61
Copolímero del ácido metacrílico (Eudragit S100®)	5,48
Fosfato diácido de potasio	0,04
Fosfato dibásico de sodio	0,21

*Corresponde a cualquiera de las mezclas sintéticas virales descritas.

Tabla 4. Composición de polvo mojable No SfNPV003-2

COMPONENTE	(%p/p) en base seca
Suspensión viral con concentración entre 10^4 y 10^{11} cuerpos de oclusión/mL*	2,50
Caolín	77,80
Óxido de hierro rojo	1,36
Licopeno E160d	13,61
Copolímero del ácido metacrílico (Eudragit S100®)	4,48
Fosfato diácido de potasio	0,04
Fosfato dibásico de sodio	0,21

*Corresponde a cualquiera de las mezclas sintéticas virales descritas.

Tabla 5. Composición de polvo mojable No SfNPV003-3

COMPONENTE	(%p/p) en base seca
Suspensión viral con concentración entre 10^4 y 10^{11} cuerpos de oclusión/mL *	2,50
Caolín	77,80
Óxido de hierro rojo	2,36
Licopeno E160d	13,61
Copolímero del ácido metacrílico (Eudragit S100)	3,48
Fosfato diácido de potasio	0,04
Fosfato dibásico de sodio	0,21

*Corresponde a cualquiera de las mezclas sintéticas virales descritas.

Tabla 6. Composición base de concentrado líquido emulsionable.

COMPONENTE	(%p/p) en base seca
Suspensión viral con concentración entre 10^4 y 10^{11} cuerpos de oclusión/mL *	0,66 al 6,60
Copolímero del ácido metacrílico (Eudragit S100)	0,00 al 5,00
Caolín	2,0 al 30,00
Licopeno E160d	0,05 al 5,00
Ácido Bórico	0,05 al 5,00
Aceite vegetal	10,00 al 70,00
Ácido oléico	3,00 al 10,00
Tween 80	1,00 al 10,00
Span 60	1,00 al 10,00

*Corresponde a cualquiera de las mezclas sintéticas virales descritas.

Tabla 7. Composición del concentrado emulsionable No SfNPV003-4

COMPONENTE	(%p/p) en base seca
Suspensión viral con concentración entre 10^8 y 10^{11} cuerpos de oclusión/mL	3,40
Copolímero del ácido metacrílico (Eudragit S100)	0,15
Caolín	10,60
Licopeno E160d	2,84
Ácido Bórico	0,50
Aceite vegetal	66,49
Ácido oleico	8,01
Tween 80	4,24
Span 60	3,77

*Corresponde a cualquiera de las mezclas sintéticas virales descritas.

Las composiciones biopesticidas de la invención son eficaces para el control biológico de insectos de los órdenes *Himenóptera, Díptera y Lepidóptera*, preferentemente contra *Spodoptera frugiperda* en todos sus cultivos hospederos, particularmente maíz, arroz, algodón, caña de azúcar y pastos. Adicionalmente, las composiciones de la presente no requieren de alta tecnología para su obtención y son viables para su empleo en la industria agrícola.

Los siguientes Ejemplos ilustran la presente invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención de Genotipos

A partir de larvas de un cultivo de pastura en el Departamento de Córdoba (Colombia) se aisló un nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (NPV003) y un granulovirus de *S. frugiperda* (VG008) (Gómez et al., 2010). Del nucleopoliedrovirus NPV003 se obtuvieron poliedros purificados que contenían diversos genotipos de manera natural.

El proceso de obtención de genotipos puros se describe en la FIG. 2, donde se muestra cómo, a partir de la suspensión viral purificada de NPV003 se infectaron larvas de *S. frugiperda* por ingesta oral y se extrajo hemolinfa de las larvas infectadas en el momento del ciclo en el cual se encontraban los viriones brotados (con única nucleocápside y genoma único).

Mediante diversas diluciones se infectaron células de insecto de la línea Sf9 (línea celular de *S. frugiperda*). Después se seleccionaron células individuales, las cuales contenían un solo genotipo en su interior y estos se multiplicaron mediante inyección en larvas, de las cuales se purificaron las variantes genotípicas individuales después de la muerte de los individuos. A partir de los genotipos individuales se realizaron mezclas de los genotipos previamente seleccionados por su actividad insecticida.

Inicialmente se liberaron los viriones derivados de los cuerpos de oclusión mediante tratamiento con soluciones de pH alcalino y se inyectaron en larvas. En el proceso de infección ocurrió la co-oclusión de los genotipos seleccionados. Paralelamente, se obtuvieron las mezclas de los genotipos realizando mezclas de los cuerpos de oclusión que contienen las variantes seleccionadas de manera individual.

Ejemplo 2. Actividad insecticida de las mezclas virales

La actividad insecticida fue evaluada mediante bioensayo siguiendo la metodología de la gota descrita por Hughes y Wood (1981) y utilizando la Concentración Letal 50 (CL_{50}) determinada previamente para el virus nativo NPV003, correspondiente a 1 x 10^5 CI/mL. Los tratamientos correspondieron al virus nativo NPV003, la mezcla sintética No. 1, la mezcla sintética No. 2 y un testigo absoluto. Se utilizaron tres repeticiones por tratamiento, cada una con 15 larvas neonatas, en un diseño completamente al azar y la mortalidad se evaluó a los 7 días después de la inoculación. Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA y una prueba de diferencia mínima significativa DMS (95%).

Como resultados del ensayo, el testigo absoluto presentó una mortalidad del 6,66%, mientras que los tratamientos evaluados mostraron porcentajes de mortalidad significativamente superiores ($p>0,05$). Con el virus nativo NPV003 se alcanzó la mortalidad esperada para la concentración utilizada, con un valor del 53,33%, en tanto que con las mezclas ensayadas (mezclas sintéticas 1 y 2), se evidenció un aumento significativo ($p=0,0168$) de la actividad insecticida, con valores del 80% y 70% para las mezclas 1 y 2 respectivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla 8, los cuales confirmaron el efecto potenciador de las mezclas sintéticas con potencial para ser utilizadas como ingrediente activo de las composiciones bioinsecticidas.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de larvas neonatas de *S. frugiperda* tratadas con el virus nativo NPV003 y dos mezclas sintéticas ajustadas a 1 x 10^5 CI/mL

Repetición	NPV003	Mezcla 1	Mezcla 2	Testigo
1	53,00	67,00	73,00	6,66
2	46,00	87,00	73,00	6,66
3	60,00	87,00	66,00	6,66
Promedio	**53,00**	**80,33**	**70,66**	**6,66**

Ejemplo 3. Estabilidad de las composiciones en condiciones de almacenamiento

Para una composición formulada según la Tabla 4 (No SfNPV003-1 a base de la mezcla viral mezcla No 1), se empacaron muestras de 0,5 g en bolsas metalizadas de 2 cm de ancho x 4 cm de largo y se sellaron al vacío. Como tratamientos control se utilizaron el aislamiento nativo NPV003 formulado (fórmula No SfNPV003-1 (NPV003-f)) y sin formular (NPV003-nf).

Nueve muestras de cada tratamiento se almacenaron en una incubadora a 28±2°C. La actividad insecticida fue evaluada mediante bioensayo antes y después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento, siguiendo la metodología de la gota descrita por Hughes y Wood (1981) y utilizando la CL_{90} determinada previamente para cada inóculo viral.

Para medir el contenido de contaminantes, se adicionaron 9 mL de Tween 80® al 0,1% a una de las muestras y se realizaron diluciones decimales hasta $1x10^{-5}$. De las tres últimas diluciones se sembraron 100 µL en cajas de Petri:

i) para la evaluación de mohos en medio agar-papa-dextrosa suplementado con Tritón al 0,1% (agar PDA + Tritón),
ii) para la cuantificación de levaduras en medio agar extracto de levadura y malta (agar YM), y
iii) para el recuento de bacterias contaminantes en medio agar nutritivo.

Cada dilución se sembró por triplicado. El resultado se expresó como recuento de unidades formadoras de colonia de contaminantes por gramo de producto (UFC/g). El diseño experimental fue completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo y todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Como se observa en la FIG. 5, el virus nativo NPV003 presentó una pérdida del 33% de su actividad insecticida cuando fue almacenado como suspensión viral sin formular durante tres meses a 28ºC. Por el contrario, el virus nativo NPV003 y la mezcla viral (mezcla 1), los dos formulados como un polvo mojable, sólo evidenciaron una pérdida de actividad del 11% cuando fueron sometidos a las mismas condiciones que el virus NPV003 sin formular, lo que demuestra el efecto estabilizador que brinda la formulación durante el período de almacenamiento.

Para las condiciones del estudio, la formulación redujo en un 66% la inactivación viral después de tres meses de almacenamiento a la temperatura de 28°C efecto que podría magnificarse a temperaturas más bajas o bajo condiciones de refrigeración.

La cinética de la pérdida de eficacia versus tiempo de almacenamiento para la mezcla formulada se ajustó a una cinética de orden 1 con un coeficiente correlación del 0,98. Con la ecuación obtenida para este modelo matemático se estimó la vida útil del producto, considerando como la eficacia mínima aceptable un 70%. Con base en esta información, el producto sería estable por 8 meses almacenado a 28ºC, es decir sin requerir cadena de frío para su transporte y almacenamiento, lo que reduce los costos de distribución y provee una ventana de tiempo suficiente para la comercialización del bioinsumo.

En cuanto al contenido de contaminantes, y como se evidencia en la FIG. 6, el contenido de microorganismos aumenta directamente proporcional al tiempo de almacenamiento en el tratamiento correspondiente a la suspensión del virus nativo NPV003 sin formular, con un incremento superior a una unidad logarítmica. Por el contrario, en los dos tratamientos formulados probados (el virus nativo NPV003 y la mezcla viral en forma de polvo mojable), se presentó una reducción significativa de los contaminantes la cual fue inversamente proporcional al tiempo de almacenamiento.

Este comportamiento posiblemente se debe al efecto del proceso de formulación, que implica la remoción de agua del producto hasta una humedad final inferior al 5% en el producto. El proceso de secado causa la muerte de los microorganismos, reduciendo la carga de contaminantes en dos unidades logarítmicas y posteriormente la baja humedad que reduce el metabolismo microbiano evita la proliferación de contaminantes como bacterias y hongos que aún permanezcan viables en la formulación.

La disminución de contaminantes en el formulado, puede estar asociada con la mayor estabilidad de la actividad insecticida, considerando que los microorganismos pueden afectar negativamente la integridad de las partículas virales durante el almacenamiento.

Ejemplo 4. Ensayo de Fotoestabilidad frente a la radiación UV *tipo B*

Los tratamientos evaluados para este ensayo fueron el virus nativo NPV003 sin formular (suspensión acuosa), el virus nativo NPV003 formulado como polvo mojable según la formula No SfNPV003-1 de la Tabla 4 y la mezcla viral formulada (Mezcla No 1), también formulada como SfNPV003-1. Se prepararon suspensiones y se ajustaron a una concentración de $2x10^7$ CI/mL.

Se dispusieron 200 µL de cada suspensión en 5 pozos de una fila de una microplaca de 96 pozos de fondo plano. La microplaca se irradió con una lámpara monocromática (longitud de onda 302 nm) durante 2, 4 y 6 horas, a una distancia de 10 cm de la fuente de luz. Antes de iniciar la exposición a la luz se cubrió la primera columna de pozos de la microplaca con papel aluminio (un pozo de cada concentración), consistiendo este tratamiento en el virus no expuesto a la radiación, tiempo 0 horas.

Cada 2 horas y hasta completar 6 horas, se cubrió la columna de pozos siguiente, representando cada columna de la microplaca un tiempo diferente de exposición a la radiación ultravioleta tipo B. Posteriormente, se adicionaron a cada pozo 200 µL de una solución de sacarosa al 4% que contenía un colorante azul de alimentos al 1% y se llevó a

cabo un bioensayo para determinar la actividad insecticida siguiendo la metodología de la gota descrita por Hughes y Wood (1981).

Para determinar la eficacia se utilizó la fórmula de Schneider – Orelli (Zar 1999) y con los valores de eficacia se calculó el porcentaje de actividad original remanente utilizando la siguiente ecuación (Shapiro, 1989):

$$\% \text{ Actividad Original} = (B / A) \times 100$$

en donde:

A: Eficacia del virus no expuesto

B: Eficacia del virus expuesto a la radiación UV

La normalidad de los datos fue estimada mediante una prueba de Shapiro-Wilk (95%) y la homogeneidad de varianzas utilizando la prueba de Barlett (95%). Posteriormente, las diferencias entre tratamientos fueron evidenciadas mediante una prueba DMS (95%).

En la FIG. 7 se presentan los resultados de ensayo, en la cual se puede observar que el virus NPV003 sin formular, presentó una pérdida progresiva y significativa de la actividad a medida que aumentó el tiempo de irradiación, con una inactivación del 49% después de 6 horas de exposición a la lámpara UVB.

El virus nativo NPV003 formulado como polvo mojable según la formula No SfNPV003-1 mostró una inactivación del 11,6%, en tanto que la mezcla viral, formulada también según la formula No SfNPV003-1, una inactivación del 5,8%, lo que confirma el efecto fotoprotector de la formulación, la cual permitiría prolongar la persistencia de las partículas virales en el ambiente.

Cabe destacar que la eficacia final después de 6 horas de irradiación, fue significativamente mayor para el producto formulado a base de la mezcla viral con respecto al formulado a base del virus nativo NPV003, lo que sugiere también que posiblemente la mezcla viral contribuye a la mayor fotoestabilidad del producto formulado.

REFERENCIAS

1. Boucias, D.G., Pendland, J.C. 1998. Baculoviruses, in: Kluwer (Ed.), Principles of insect pathology. Academic Publishers, Norwell, pp. 111-146.

2. Braunagel, S.C., Summers, M.D. 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.

3. Duffy, S.P., Young, A.M., Morin, B., Lucarotti, C.J., Koop, B.F., & Levin, D.B. 2006. Sequence analysis and organization of the *Neodiprion abietis* nucleopolyhedrovirus genome. Journal of Virology 80: 6952-63.

4. Funk, C. J., Braunagel, S. C., Rohrmann, G. F. 1997. Regulation of Baculovirus Late and Very Late Gene Expression. New York: Plenum

5. Gómez, J., Guevara, J., Cuartas, P., Espinel, C., Villamizar, L. 2013. Microencapsulated *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: insecticidal activity and effect on arthropod populations in maize. Biocontrol Science and Technology 23: 829-846.

6. Gómez, J.; Guevara, J.; Barrera, G.; Cotes, A.; Villamizar, L. 2010. Aislamiento, identificación y caracterización de nucleopoliedrovirus nativos de *Spodoptera frugiperda* en Colombia. Revista Facultad Agronomía. Medellín 63: 5511-5520.

7. Herniou, E.A., Olszewski, J.A., Cory, J.S., O'Reilly, D.R. 2003. The genome sequence and evolution of baculoviruses. Annual Review of Entomology 48: 211-234.

8. Herniou, E.A, Olszewski, J.A., O'reilly, D.R., Cory, J.S. 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. Journal of Virology 78: 3244-3251.

9. Hughes, P.R., Wood, H.A. 1981. A synchronous peroral technique for the bioassay of insect viruses. Journal of Invertebrate Pathology 37: 154-159.

10. ICTV, 2012. International Committee on Taxonomy of viruses.

11. Inceoglu, A.B., Kamita, S.G., Hammock, B.D. 2006. Genetically modified baculoviruses: a historical overview and future outlook. Advances in virus research 68: 323-360.

12. Jehle, J.A., Lange, M., Wang, H.L., Hu, Z.H., Wang, Y.J., Hauschild, W. 2006. Molecular identification and phylogenetic analysis of baculoviruses from Lepidoptera. Virology 346: 180-193.

13. Jenkins, N. & Grzywacz, D. 2003. Towards the standardization of quality control of fungal and viral biocontrol agents. In Qual Control Prod Biol Control agents theory Test Proced, pp. 247–263. Edited by J. C. van Lenteren. Wallinford, UK: CAB International.

14. Lahlalia R, Serrhinib M, Jijakl M. 2006. Studying and modelling the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of P. expansum. International Journal of Food Microbiology. 103:315-322.

15. Lasa, R., Pagola, I., Ibanez, I., Belda, J.E., Williams, T., Caballero, P. 2007. Efficacy of *Spodoptera exigua* multiple nucleopolyhedrovirus as a biological insecticide for beet armyworm control in greenhouses of southern Spain. Biocontrol Science and Technology 17: 221-232.

16. Miele, S.A.B., Garavaglia, M.J., Belaich, M.N.,. 2011. Baculovirus: molecular insights on their diversity and conservation. Int. Journal of Evolutionary Biology 211: 37-42.

17. Muñoz, D., Castillejo, J.I., Caballero, P. 1998. Naturally occurring deletion mutants are parasitic genotypes in a wild-type nucleopolyhedrovirus population of *Spodoptera exigua*. Applied and Environmental Microbiology 64: 4372-4377.

18. Muñoz, D., Murillo, R., Krell, P.J., Vlak, J.M., Caballero, P. 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. Virus Research 59: 61-74.

19. Murillo, R., Muñoz, D., Williams T., Caballero, P. 2006. Genetic and phenotypic variability in *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus isolates from greenhouse soils in southern Spain. Biological Control 38: 157-175.

20. Ravensberg, W. 2011. A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control arthropods. Vol. 10.

21. Santos A., García M., Cotes A.M., Villamizar L. 2012. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. Revista Iberoamericana de Micología 29:150-156.

22. Schneider-Orelli, O., 1947. Entomologisches Praktikum-Einfürung in die land- un forstwirtschafliche Insektenkunde. Sauerländer & Co, Aarau, Germany.

23. Shapiro, M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera:Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. Journal of Economical Entomology. 82: 548-550.

24. Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2004. Genetic structure of a *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus population: High prevalence of deletion genotypes. Applied and Environmental Microbiology 70: 5579-5588.

25. Simón, O., Williams, T., López-Ferber, M., Caballero, P., 2005. Functional importance of deletion mutant genotypes in an insect nucleopolyhedrovirus population. Applied and Environmental Microbiology 71, 4254-4262.

26. Slack, J., Arif, B.M., 2007. The baculoviruses occlusion-derived virus: Virion structure and function. Advances in virus research 69: 99-165.

27. Theilmann, D.A., Blissard, G.W., Bonning, B., Jehle, J., O'Reilly, D.R., Rohrmann, G.F., Theim, S., Vlak, J., 2005. Family baculoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Virus Taxonomy. Elsevier Press, San Diego, pp. 177-185.

28. Villamizar, L., Barrera, G., Cotes, A. M. & Martínez, F. 2010. Eudragit S100 microparticles containing *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus: physicochemical characterization, photostability and *in vitro* virus release29. Journal of Microencapsulation 27: 314-24

29. Villamizar, L., Zeddam, J., Espinel, C., Cotes, A. M. 2005. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV. Revista Colombiana de Entomología 31: 127-132.

30. Wang, Y.; Jehle, J. A. 2009. Nudiviruses and other large, stranded circular DNA viruses of invertebrates: New insights on an old topic. Journal of Invertebrate Pathology 101: 187-193.Zar, J. 1999

31. Biostatistical Analysis. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey.