

ULTRAESTRUCTURA DE *BACULOVIRUS*  
*DIONE* EN LARVAS DE *DIONE JUNO*  
*ANDICOLA* (BATES, 1864) (LEPIDOPTERA) EN  
ECUADOR.

Por Natalia MOLINA MOREIRA\*  
& Roberto JIMENEZ SANTIESTEVA\*.

**RESUMEN**

Este trabajo reporta la presencia de *Baculovirus dione* en larvas de *Dione juno andicola* en Ecuador. También se realiza una estimación del porcentaje de mortalidad que ocasionó el *Baculovirus dione* en la población de *Dione juno* observada en el Jardín Botánico de Guayaquil durante los años 2001 y 2002.

**ABSTRACT**

This paper reports the presence of *Baculovirus dione* in larvae of *Dione juno andicola* in Ecuador. It also makes an estimate of the percentage of mortality resulting by the *Baculovirus dione* on populations of *Dione juno* observed in the Botanical Garden of Guayaquil during the years 2001 and 2002.

\* Cdla Abel Gilbert MZ B52 v1 Durán-Guyas, Ecuador natimolina4@yahoo.es

## INTRODUCCION

En el Jardín Botánico de Guayaquil, se registró en noviembre del año 2000, la mortalidad masiva de larvas de *Dione juno andicola* (Bates, 1864) conocido como gusano de los cuernos defoliador de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener (maracuyá o fruta de la pasión). En los años 2001 y 2002 en los meses de noviembre y diciembre se repitió este evento, el desarrollo del ciclo vital de *Dione juno* fue normal mientras la temperatura se mantuvo entre 25 a 27°C, pero cuando se incrementó la temperatura, se produjo la muerte de toda la población. Para conocer las posibles causas de la mortalidad, se hicieron estudios histopatológicos, observaciones en microscopía electrónica y se realizó una revisión bibliográfica sobre el tema.

Los estudios histopatológicos evidenciaron la presencia de cuerpos de inclusión con la tinción de Steiner y Steiner, a pesar de ello no se pudo definir si estas inclusiones estaban asociadas a bacterias intracelulares virus o a otros patógenos. Debido a las dificultades mencionadas se recurrió a estudios con el microscopio electrónico de transmisión (MET), que permitieron determinar la presencia del *Baculovirus dione*. Este virus fue caracterizado por Ribeiro, Zanotto, De Soza, Mcdowell,S y Kitajimo (1997) en larvas de *Dione juno juno* en Brasil. Los cuerpos de inclusión denominados virus de la poliedrosis nuclear (Nucleopolyhedrovirus NPV) pertenecen a la Familia Baculoviridae. Los viriones presentan cuatro estructuras diferenciadas: capsido, nucleocápside, envoltura tienen doble ebra con polaridad positiva y negativa de ADN.

La familia Baculoviridae está conformada por un grupo de virus muy numeroso, específico para insectos y uno de los más estudiado, la mayoría tiene como hospederos insectos del orden Lepidoptera, los NPV se han aislado de 500 especies de este orden. Muchos de ellos son utilizados como bioinsecticidas en el control de insectos plagas en cultivos de importancia económica (Granados y Federici,1986), aunque debido a las técnicas usadas en laboratorio el costo es más alto que el uso de insecticidas químicos.

A pesar de todos los estudios realizados en este campo, aún se desconoce la forma como se infectan los insectos, algunos autores piensan que la infección se produce por ingestión, mientras otros creen que los insectos pueden portar el virus y replicarse cuando las condiciones son favorables (Adams y Bonami, 1991).

El propósito de este trabajo es: (1) Reportar la presencia de *B. dione* en larvas de *D. juno andicola* en Ecuador (2) Estimar el porcentaje de mortalidad que ocasionó el *B. dione* en la población de *D. juno* observada en el Jardín Botánico de Guayaquil durante los años 2001 y 2002.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En noviembre y diciembre de los años 2001 y 2002 se colectaron en el Jardín Botánico de Guayaquil un total de 15 larvas de *D. juno* en diferentes instars, para observarlas en microscopio de óptico y en microscopio electrónico.

Para estimar la mortalidad se registró el número de huevos puestos por las hembras de *D. juno* dentro del lepidoptario del Jardín Botánico que posee un área de 304m<sup>2</sup>, se observó diariamente el desarrollo de las larvas hasta que empezó la mortalidad.

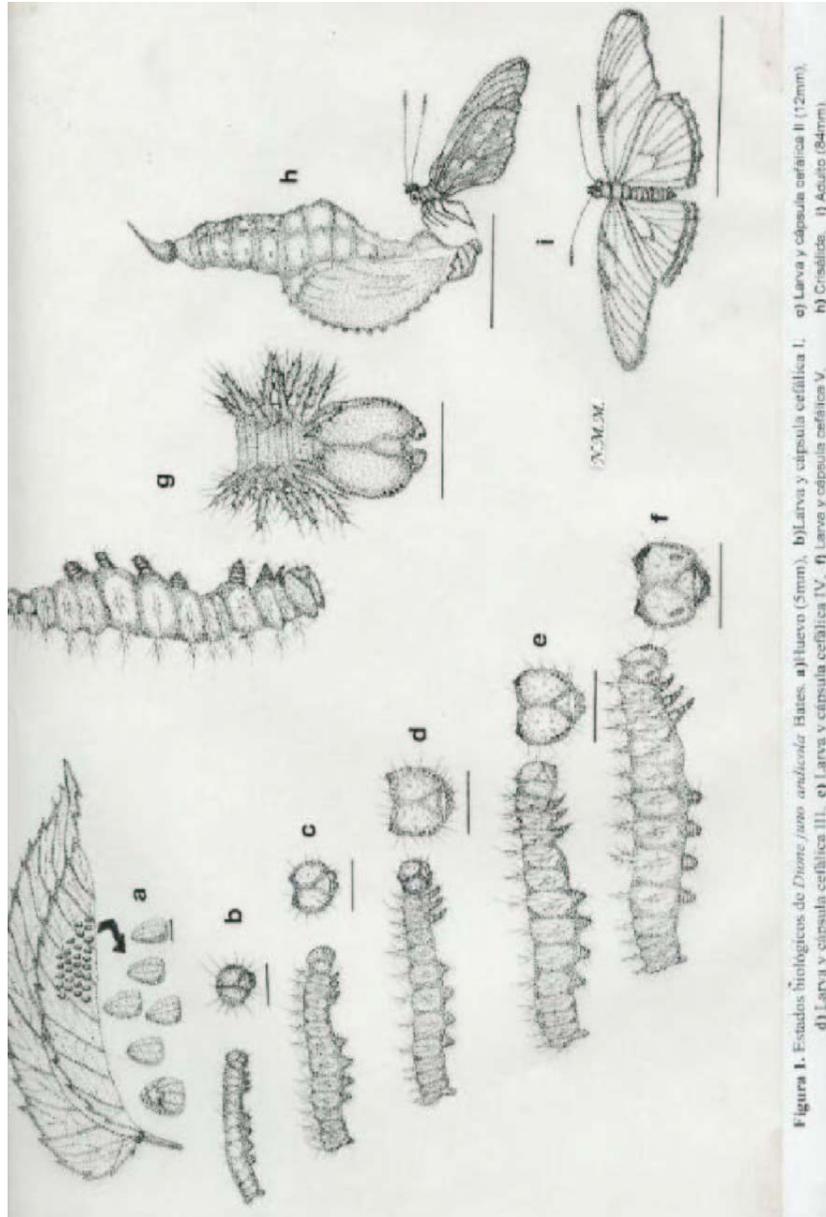


Figura 1. Estudios biológicos de *Diome/jana andicola* Bates. a) Huevo (5mm), b) Larva y capsula cefálica I, c) Larva y capsula cefálica II (12mm), d) Larva y capsula cefálica III, e) Larva y capsula cefálica IV, f) Larva y capsula cefálica V, g) Larva y capsula cefálica VI, h) Crisálida, i) Adulto (84mm)

Para realizar los estudios de histopatología, en microscopio de óptico, se colectaron larvas de diferentes instars que presentaban síntomas de la infección y mortalidad.

Estas larvas fueron fijadas con Davison's AFA, los tejidos de las larvas de *D. juno* se procesaron de acuerdo a la metodología de Bell & Lightner (1998). Las tinciones para histología utilizadas incluyen Mayer Bennet hematoxilina y eosina (H&E), Brown y Brenn (Luna 1968) Steiner y Steiner (Steiner & Steiner 1994), Machiavello (Luna 1968) y Giemsa (Luna 1968).

Para la observación en microscopio electrónico, se seleccionó una larva de *D. juno* en tercer instar que presentaba los síntomas de la infección, puesto que las larvas de cuarto y quinto instar presentaron dificultad para realizar los cortes, por la consistencia más elástica de la cutícula y el tamaño de las setas, características de esta familia de Lepidoptera. Se cortaron fragmentos de 0,1mm.

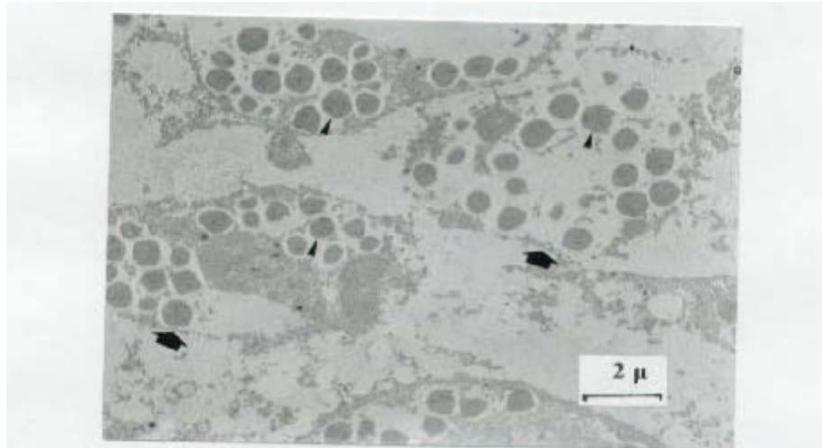
Los tejidos fueron fijados en glutaraldehído al 3% en una solución buffer de pH 7 por 90 minutos, tetra óxido de Osmio(OsO<sub>4</sub>) al 1% por una hora a temperatura ambiente, se procedió a deshidratar las muestras con diferentes porcentajes de alcoholes desde 30 a 100%, se encapsuló en resina Spurr, se realizaron cortes con ultramicrotomo, se hizo la tinción con azul de toluidina para observar al microscopio óptico para escoger el área de estudio, se obtuvieron cortes ultrafinos de 50 µm, se colocaron en mesh previamente recubiertos con oro, la tinción se hizo con citrato de uranilo por 30 minutos y citrato de plomo 20 minutos, se observó al microscopio electrónico de transmisión JEOL/JEM 1010 desde 10K a 25K.

En condiciones de campo para estimar el porcentaje de mortalidad ocasionada por este patógeno, se registró diariamente el número de individuos muertos y parámetros ambientales como humedad y temperatura.

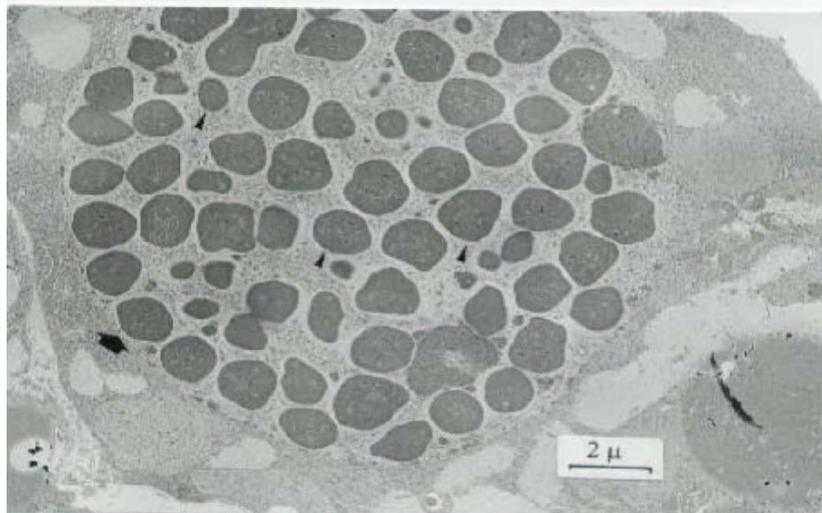
## **RESULTADOS**

### **SIGNOS CLÍNICOS**

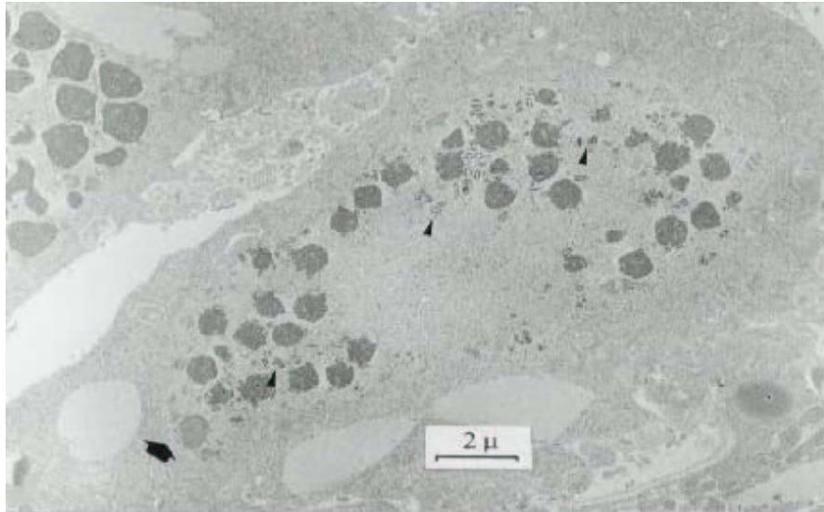
Los síntomas de la infección por NPV en *Dione juno* aparece generalmente a partir del tercer instar larval, el comportamiento y el color de las larvas cambia. Los primeros síntomas son; el aislamiento, la disminución del apetito, el cambio de color. Las larvas que normalmente permanecen agrupadas empiezan a separarse, comen poco y la coloración café oscura con finas líneas longitudinales rojizas, se torna ligeramente más intensa y brillante dándoles una apariencia grasosa, se las ve largas y flácidas al tacto pero poco robustas. A medida que avanza la infección los síntomas son más acentuados y las setas se vuelven frágiles, finalmente se aíslan, dejan de comer, se ven más brillantes y terminan colgadas, algunas como si fuesen a entrar en crisálida, otras se ven sujetas de las pseudopatas, en forma de una V invertida y al mínimo contacto se rompen y dejan caer la hemolinfa, que presenta un aspecto viscoso de color café verdoso, sin olor intenso.



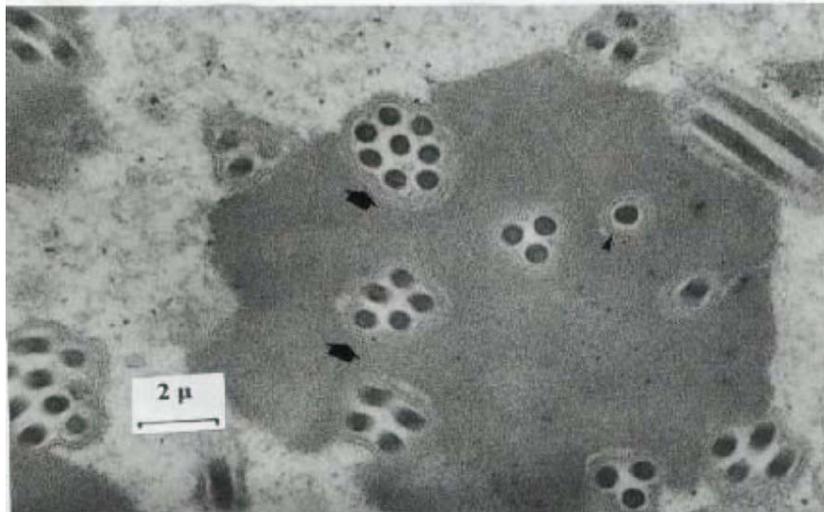
**Fig. 1** Ultraestructura del celoma en la que se observan núcleos hipertrofiados (flecha) con numerosos cuerpos de inclusión (punta de flecha). Barra = 2 $\mu$ .



**Fig. 2** Ultraestructura de un núcleo hipertrofiado con numerosas cuerpos de inclusión (punta de flecha). Se observa la integridad de la membrana nuclear (flecha) y el citoplasma considerablemente reducido con numerosas vacuolas. Barra = 2 $\mu$ .



**Fig. 3** Ultraestructura de un núcleo en estado avanzado de disolución de la membrana nuclear (flecha). Se observa los cuerpos de inclusión con viriones ocluidos y numerosos viriones libres (punta de flecha) Barra =2 $\mu$ .



**Fig. 4** Ultraestructura de un cuerpo de inclusión en el que se observa viriones parcial y totalmente ocluidos (flecha) nótese la naturaleza trilaminar de la envoltura de los viriones (punta de flecha). Se observa agrupación de viriones individuales, en algunos se observa la estructura longitudinal y en otros transversal. Barra =2 $\mu$ .

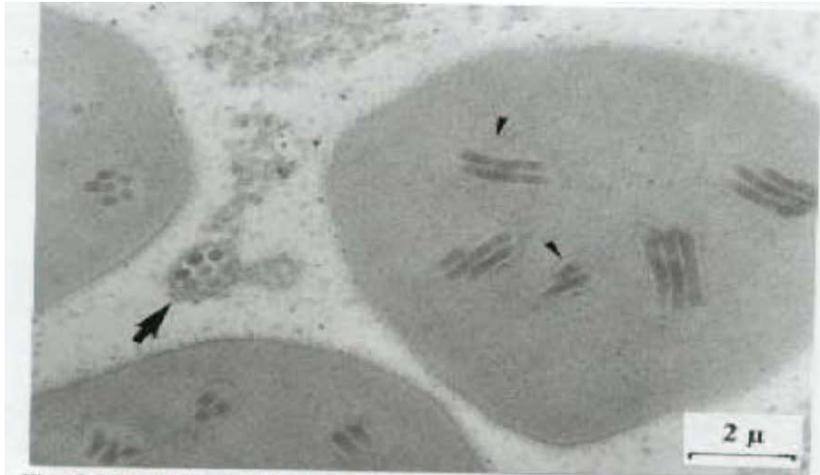


Fig. 5 Ultraestructura de una parte de la sección de un cuerpo de oclusión mostrando el lattice proteínico cristalino, rodeando agrupaciones de viriones. En los viriones se observa la envoltura (flecha) y nucleocápside (punta de flecha) Barra  $-2\mu$ .



Fig. 6 Ultraestructura en la que se observa claramente la forma de báculo en un extremo del virion (flecha) Barra  $-2\mu$ .

## POSIBLE CICLO

Durante dos años consecutivos (2001-2002) de observación no se determinó como se infectan las larvas, la mortalidad se produjo cuando la temperatura promedio mensual osciló entre 28 y 29°C, es importante resaltar dos aspectos; la cantidad de larvas que produjo la escasez de alimento, pudo ocasionarles estrés y hacerlas susceptibles a la invasión del virus y la presencia de un díptero pequeño que succiona la hemolinfa de las larvas, que fue abundante antes de la mortalidad masiva, abre la posibilidad que este sea un vector intermedio.

Para tener alguna pista sobre la forma de la infestación se realizó un sencillo ensayo preliminar: Se colectó una colonia de 20 huevos, se esterilizaron en 10% de formaldehído por una hora, se lavaron con agua destilada por dos horas, a temperatura de 28°C, (Myers, 2000), la colonia se mantuvo unida hasta el tercer instar, se dividió en dos grupos al primero se lo infestó sumergiendo las hojas de maracuyá en 10ml de agua más el contenido hemolinfático de una larva infectada con el patógeno, el segundo grupo se mantuvo en condiciones asépticas, sin embargo ambos grupos murieron durante 5 días, ninguna logró alcanzar el siguiente instar larval.

## HISTOPATOLOGÍA

Se observaron inclusiones o agregaciones atípicas que fueron positivas con la tinción de Steiner y Steiner, en las células del tejido conectivo debajo de la epidermis, las alteraciones citológicas se presentaban muy similares a las observadas en otros artrópodos como camarones afectados por bacterias intracelulares.

Se realizaron ensayos preliminares tratando a las larvas como se trata a los crustáceos afectados por Riketsias, se colectaron dos colonias de 10 y 12 individuos de tercer instar, se los trató con oxitetraciclina en una proporción de 1 a 1 con agua destilada, al quinto día de tratamiento murieron todas las larvas, como bajó la población totalmente, no se pudo realizar otros ensayos. Se esperó el siguiente año para tomar nuevas muestras y realizar estudios en microscopía electrónica para determinar con mayor certeza el patógeno asociado a la mortalidad mortalidad de las larvas.

## ULTRAESTRUCTURA

Las observaciones en microscopio electrónico de transmisión (MET) y la revisión de bibliografía especializada permitió determinar que se trata de un virus de la familia Baculoviridae aislado de *Dione juno juno* y denominado como Baculovirus dione caracterizado por Ribeiro *et al* (1997). La familia Baculoviridae tiene dos género (1) Núcleopolyhedrovirus de tipo Múltiple (MNPV), porque contiene varios haces de viriones baciliformes, estos viriones están envueltos en una proteína cristalina llamada polyhedrin que forma la oclusión viral o cuerpo de oclusión, el viron es baciliforme, mide 2µm. y (2) Granulovirus (Murphy,F.A., Fauquet,C.M., Bishop, D. H. L.,Ghabrial,S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo,M.A., Summers,M.D., 1995).

En la figura 1 Se aprecia la ultra estructura de los numerosos núcleos hipertrofiados con cuerpos de inclusión en la cual se nota fuerte grado de infección con grandes espacios vacuolares en el citoplasma. En la figura 2 la flecha muestra la membrana nuclear integra a pesar que se encuentra el núcleo fuertemente hipertrofiado se observan viriones incluidos en el cuerpo de inclusión, en el citoplasma se ven vacuolas y ribosomas.

En la figura 3 se observa la virtual ruptura de la membrana nuclear con los cuerpos de inclusión liberándose en toda la célula y viriones libres que son los que van a infectar otras células. En la figura 4 se observa los cuerpos de inclusión de los viriones parcial y totalmente ocluidos, se observa las agrupaciones de viriones dentro del lattice, en algunos se observa la estructura longitudinal y transversal. La figura 5 muestra la ultraestructura de una parte de la sección de un cuerpo de inclusión mostrando el lattice proteínico cristalino, rodeando agrupaciones de viriones. En los viriones se observa la envoltura y nucleocápside. La figura 6 muestra la ultraestructura en la que se observa claramente la forma de báculo en un extremo del virión.

#### **ESTIMACIÓN DE LA MORTALIDAD CAUSADA POR EL *BACULOVIRUS DIONE***

En el Jardín Botánico de Guayaquil se registró el nacimiento de 3154 adultos, en el mes de octubre y noviembre de 2000, mientras la temperatura promedio fue 26°C, en diciembre cuando la temperatura alcanzó los 28°C la mortalidad de *D. juno* fue masiva alcanzó el 100%. Este mismo evento se repitió durante los años 2001 y 2002 en el mes de octubre la temperatura promedio fue 27 y 26°C nacieron 957 y 900 adultos respectivamente, pero en noviembre de ambos años el aumento de temperatura a 29 y 28°C nuevamente ocasionó el 100% de mortalidad sobre la población de *Dione juno andicola*.

#### **DISCUSION**

Adams y Bonami (1991), refiere dos tipofomas de NPV una simple conocida como Virus de la poliedrosis nuclear simple (SNPV) cuando contiene una sola nucleocapside y otra múltiple Virus de la poliedrosis nuclear múltiple (MNPV) cuando contiene varias. Los viriones de *D. juno andicola* observado en nuestras muestras es múltiple.

Adams y Bonami (1991), considera que el rango del tamaño de los NPV oscila entre 0.5 a 15 µm, con una predominancia de 0.6 a 2.5 µm en diámetro, los viriones observados en *D. juno andicola* está dentro de este rango frecuente el virión mide aproximadamente 2 µm.

Con referencia a los grados de infección Chacón y Rojas (1994) citados por Aguiar (s/f) estiman que NPV mata el 100% de la población de *Dione juno* en Colombia, no hay información sobre las condiciones ambientales especialmente a que temperatura se ocasionó el 100% de mortalidad en las larvas. Tampoco en el trabajo de Figueiro (1995) en laboratorio con diferentes dosis de gramos de larvas en 500 litros de agua no hay referencias en cuanto a la temperatura.

En las observaciones realizadas en el Lepidoptario del Jardín Botánico de Guayaquil la mortalidad masiva se presentó cuando la temperatura se elevó a 28°C, información que coincide con lo descrito por Adams y Bonami (1991) donde se describe que los NPV se replican muy bien a temperatura de 28°C.

#### **CONCLUSIONES**

Por las consideraciones antes mencionadas se puede concluir que *Baculovirus dione* es altamente patógeno en las poblaciones larvales de *D. juno andicola* afectadas por condiciones de estrés y temperatura promedio de 28°C.

*Baculovirus dione* debido a su especificidad es una alternativa en el control de larvas del género *Dione*, puesto que el uso de insecticidas para disminuir las poblaciones de este insecto afecta a los polinizadores y otros insectos benéficos en el cultivo de *P. edulis*.

## AGRADECIMIENTO

Al Departamento de Microscopía Electrónica del Instituto Nacional de Higiene Leopoldo Izquieta Perez, de manera especial al Dr. Tsuji Amano por su importante contribución a este trabajo y a la Dra Linda Díaz por su dedicación en la preparación de las muestras.

## BIBLIOGRAFIA

- ADAMS J. & BONAMI J.** (Eds.) (1991) Atlas of Invertebrate viruses. pp.89-189.
- AGUIAR E., MENEZES E.B., MENEZES P., CASINO M. & SOARES** (s/f) Passion Fruit. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria. Centro Nacional de pesquisa de agrobiología. Seropedica. Universidad Federal ruraldo Río de Janeiro. Centro I m de pragas.
- FLINK S.J., ENQUIST L.W., KRUG R.M., RUCANIELLA V.R. & SKALSA A.M.** (2000) Principles of virology: molecular biology patogensis and control. American society for microbiology, Washington. 804 pp.
- GRANADOS R. & FEDERICI B.** (Eds.) (1986) The Biology of Baculoviruses. Vol. I. Biological Properties and Molecular Biology. pp. 62-123.
- MURPHY F.A., FAUQUET C.M., BISHOP D.H.L., GHABRIAL S.A., JARVIS A.W., MARTELLI G.P., MAYO M.A. & SUMMERS M.D.** (Eds.) (1995) Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Springer-Verlag, Wien, New York. 104 pp.
- RIBEIRO B.M., ZANOTTO P.M.A, DE SOZA H.L, MCDOWELL S. & KITAJIMO E.W.** (1997) Characterization of a *Baculovirus* infecting the pasión fruit caterpillar *Dione juno juno*. Biocell, 21(1):71-82.