

## 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)

J. L. ZEDDAM, R. M. VASQUEZ SOBERON, Z. VARGAS RAMOS, A. LAGNAOUI

Las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* se distribuyen ampliamente en América Latina. Forman parte del grupo de insectos más perjudiciales para el cultivo y almacenamiento de papa en países en desarrollo. Recién, *T. solanivora* entró a Canarias y amenaza nuevas zonas paperas. Un mismo virus de granulosis (denominado *Phthorimaea operculella* granulovirus o PhopGV) es un agente eficaz para controlar ambas especies, por lo que es considerado como el componente principal de los programas de manejo integrado desarrollados para controlar estas plagas. El presente trabajo trata de la cuantificación de la producción del virus en larvas de las dos especies, así como de la dosificación de la formulación viral que constituye el bio-plaguicida. Primeramente, se estableció que una solución viral con una absorbencia de 1 DO<sub>450</sub> contenía  $679,9 \pm 53,9 \times 10^6$  CI (cuerpos de inclusión)/ml y que un CI pesaba aprox.  $65 \times 10^{-3}$  pg. Luego, se determinó que la producción de CI por unidad de peso es casi el doble en *P. operculella* ( $2,35 \pm 1,26 \times 10^9$  CI/mg) que en *T. solanivora* pero que la diferencia de tamaño entre especies hace que la cantidad de CI recuperada por larva no sea estadísticamente diferente entre ambas polillas. Finalmente, se estimaron que las tasas de aplicación del PhopGV utilizado en los programas de bio-control llegan a  $1,5 \times 10^{11}$  CI/tonelada de tubérculos en almacén tradicional y  $3 \times 10^{12}$  CI/ha en el campo.

J. L. ZEDDAM: IRD, Whympers 442 y Coruña, Apartado 17.12.857, Quito (Ecuador).  
J. L. ZEDDAM, R. MARIELA V.SOBERON, Z. VARGAS RAMOS, A. LAGNAOUI : CIP, Apartado 1558, Lima 100 (Perú).

**Palabras-clave:** Granulovirus, *Baculoviridae*, polillas de la papa, *Phthorimaea operculella*, *Tecia solanivora*, dosificación de virus, control biológico.

### INTRODUCCIÓN

Se conocen cuatro especies principales de polillas de la papa en América Latina: *Phthorimaea operculella* (Zeller), *Tecia solanivora* (Povolny), *Symmetrichema tangolias* (Gyen) y *Tuta absoluta* (Meyrick) (antes *Scrobipalpus absoluta*). Estas especies de lepidópteros, que pertenecen a la familia *Gelechiidae*, constantemente extienden su área de distribución, constituyendo importantes plagas de papa en nuevas regiones (RAMAN, 1988). Así, *T. solanivora* recién se

estableció en las Canarias (1998) donde la papa es uno de los pilares de la agricultura de subsistencia. Las pérdidas superen el 50% de la producción de papa en determinadas zonas (D. Ríos, com. pers.). Los daños y perjuicios producidos por las larvas de polillas son muy altos, sobre todo en países en desarrollo, y el empleo masivo del control químico no representa una alternativa sostenible. Por estas razones, el Centro Internacional de la Papa (CIP) está desarrollando programas de manejo integrado de plagas (MIP) para controlar dichas especies (CIP, 1995). Un

virus de granulosis (*Phthorimaea operculella* granulovirus o PhopGV), es uno de los mayores componentes del MIP. Este virus pertenece al género *Granulovirus* de la familia *Baculoviridae* (ICTV, 2000) y puede infectar tanto a *P. operculella* (o PTM: Potato Tuber Moth) como a *T. solanivora* (ZEDDAM *et al.*, 1994). Recientemente, se publicaron datos sobre la multiplicación de este virus en cultivos de tejidos (LERY *et al.*; 1997) y se reportaron secuencias virales parciales (TAHA *et al.*, 2000) y completas (LÓPEZ-FERBER, com. pers.). Los trabajos presentados aquí se llevaron a cabo con el objetivo de obtener información necesaria para mejorar la cuantificación del virus que es usado en la formulación del bio-plaguicida, así como, para determinar la cantidad de patógeno producido in vivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- Multiplicación y purificación del virus de granulosis.

Tanto para *P. operculella* como para *T. solanivora* se hicieron infecciones en el primer estadio larval, contaminando la superficie del tubérculo de papa con un homogeneizado de larvas infectadas con PhopGV (ALCAZAR *et al.*, 1992a). Después de aproximadamente dos semanas el virus mató a las larvas, las cuales exhibían los síntomas típicos de la enfermedad por granulosis. Se colectó y pesó individualmente para luego almacenarlas en microtubos a -20°C.

Los cuerpos de inclusión (CI) del virus fueron purificados a partir de larvas de PTM infectadas con el PhopGV a través de centrifugaciones empleando gradientes de sacarosa, como lo menciona MATTHIESSEN *et al.* (1978). Estos autores determinaron que a 450 nm los CI de PhopGV puro y en suspensión en agua obedecen a la Ley de Beer, es decir, que existe una relación lineal entre las absorbencias (expresadas como el número de densidades ópticas o  $DO_{450}$ ) y las concentraciones de los CI. Es así, que empleando esta propiedad se estandarizaron todas las suspensiones de PhopGV usadas en las pruebas posteriores. Las absorbencias de los CI en suspen-

siones acuosas fueron tomadas a 450 nm de longitud de onda empleando un espectrofotómetro Bio-Rad (modelo 2550).

### 2- Conteos y estimación del contenido de proteínas de los CI.

Se contaron los CI contenidos en dos diluciones diferentes de una misma suspensión pura de PhopGV. Los conteos de los CI se realizaron a una amplificación de 600x, empleando un hematocitómetro (tipo Neubauer) y un microscopio de luz Olympus (modelo BH-2) equipado con un campo oscuro. Cada valor obtenido correspondió al promedio de 10 conteos realizados sobre 5 cuadrados secundarios del hematocitómetro.

Se realizaron cuantificaciones del contenido proteico de los CI purificados, empleándose para ello suspensiones virales de concentraciones conocidas (expresadas en unidades de absorbencia a 450 nm). Se utilizó el kit de dosaje de proteínas comercializado por Bio-Rad, el cual se basa en el método de BRADFORD (1976). Se empleó la albúmina del suero bovino (BSA) como proteína de referencia, siguiéndose el procedimiento normal sugerido por el fabricante. Los valores de absorbencia, obtenidos después de la reacción colorimétrica usada para el dosaje de proteínas, fueron leídos a 595 nm con el mismo espectrofotómetro Bio-Rad.

Una serie de pruebas de calibración (datos no presentados) permitieron determinar las diluciones óptimas para los CI, las cuales deben encontrarse en la zona logarítmica de la regresión establecida en el ensayo con la BSA (entre 0,2 y 0,9 mg/ml). Así se determinó que para dosificar la cantidad de virus, las diluciones debían encontrarse entre el rango de  $7,5 \times 10^{-2}$  a  $2,5 \times 10^{-1}$   $DO_{450}$ . Los valores de las  $DO_{595}$  obtenidos para las diferentes concentraciones de virus (expresadas como  $DO_{450}$ ) fueron usados para determinar gráficamente la cantidad de proteínas virales contenidas en cada muestra. También, esta cantidad se calculó basándose en la ecuación de regresión establecida a partir de los valores obtenidos en el caso de la proteína estándar (BSA).

### 3- Determinación de la producción viral en larvas de diferentes especies de polillas de la papa

Se pesó larvas de *P. operculella* muertas por la infección con el GV (bajo condiciones controladas al nivel de laboratorio). Se determinó el número de CI presentes en cada una. Se procedió de igual manera con 15 larvas de *T. solanivora* muertas por el mismo virus. Por cada larva de ambas especies se determinó la cantidad de CI producida por miligramo de peso larval. Se comparó estadísticamente los rendimientos promedios obtenidos en cada especie por medio de una prueba de homogeneidad de varianza.

Las larvas usadas para los análisis se coleccionaron muertas y exhibían los síntomas clásicos de la infección por GV, sobre todo el tegumento de color blanco, pero estos síntomas no siempre excluyen la posible presencia de otros patógenos, por lo que se analizó individualmente cada larva por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). No se detectaron bandas de proteínas correspondientes a otros virus diferentes del PhopGV, con lo que se asume que la muerte fue únicamente debido a la enfermedad causada por el PhopGV.

### 4- Estimación de las cantidades de CI usadas en los programas de bio-control de las polillas de la papa

Para determinar la cantidad de CI obtenida bajo condiciones de producción masal del virus, se recolectó material biológico en la unidad piloto del CIP-Lima. Se tomaron muestras de los homogeneizados de larvas de *P. operculella* empleados para formular el bio-plaguicida (el cual es distribuido a los agricultores). Se realizó el conteo de los CI presentes en cada uno de 6 lotes diferentes. Cada lote contenía 600 larvas infectadas por el virus.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1- Estimación del contenido proteico de los CI de PhopGV.

Pruebas preliminares (datos no presentados) demostraron que realizando la dosifica-

ción de las proteínas virales empleando CI sin disolver, se obtuvo claramente menos del valor real (aproximadamente 50% por debajo de los valores obtenidos después de la disolución de los CI), probablemente debido a la accesibilidad restringida del reactivo (azul de Coomassie) a los amino ácidos localizados dentro de la estructura para-cristalina formada por la condensación de la granulina; siendo necesaria la disolución de los CI antes de aplicar la prueba. Esta fue obtenida incubando la suspensión de los CI del PhopGV durante 30 minutos a 37 °C en presencia de un igual volumen de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M, pH 10).

Pruebas complementarias demostraron también que omitiendo la neutralización del pH alcalino producido por la adición de la solución de carbonato de sodio, conllevó a obtener absorbencias un poco más bajas cuando se realizó la dosificación de las proteínas. Esta observación está en concordancia con BRADFORD (1976), quien informó que aparece una coloración débil en presencia de buffers altamente alcalinos. Por lo que después de completar la disolución, el pH de las muestras de PhopGV se bajó hasta la neutralidad agregándoles ácido clorhídrico concentrado (HCl). Además, se contó con un control (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>+ HCl) que sólo dio un valor de absorbencia muy reducido a 595 nm (más bajo que 0,058 unidades), el cual fue sustraído de las lecturas de las muestras.

Las absorbencias obtenidas con el kit para el dosaje de diferentes cantidades de la proteína referencia (BSA) así como de los CI de PhopGV se presentan en la tabla 1.

Estos datos permitieron establecer la ecuación de regresión que relaciona la absorbencia medida a 595 nm con la cantidad de BSA presente expresada en microgramos ( $DO = 0,1786 + 0,3043 \ln BSA$ ). Se aplicó esta ecuación a los valores de la DO<sub>595</sub> obtenidos por el virus para determinar matemáticamente la cantidad de proteínas virales presente en cada muestra (Tabla 2, primera columna). Paralelamente, estos valores de las DO<sub>595</sub> correspondiendo a las diferentes concentraciones de virus fueron reportados

Tabla 1. Absorbencias obtenidas con el kit de dosaje proteico para diferentes cantidades de la proteína (BSA) de referencia y del virus (PhopGV).

Cantidad de BSA (en $\mu\text{g}$ de proteína)	Absorbencias (en $\text{DO}_{595}$ )	Cantidad de PhopGV (en $\text{DO}_{450}$ )	Absorbencias (en $\text{DO}_{595}$ )
0	0,001	$7,75 \times 10^{-2}$	0,114
2	0,094	$12,40 \times 10^{-2}$	0,262
5	0,244	$18,75 \times 10^{-2}$	0,426
10	0,452	$24,80 \times 10^{-2}$	0,561
20	0,809	-	-

sobre la curva real  $\text{DO} = f(\text{BSA})$  para la determinación gráfica directa de estas mismas cantidades de proteínas vírales (Tabla 2, segunda columna; gráfico no presentado). De hecho, era necesario comparar los dos métodos entre si ya que con este protocolo de dosificación de proteínas, BRADFORD (1976) mencionó que existía una leve distorsión de la linealidad en el patrón de respuesta. Sin embargo, se observó que los valores obtenidos eran muy similares en ambos casos lo que valida los resultados generados.

Estos resultados nos permitieron estimar que a 1  $\text{DO}_{450}$  de PhopGV le corresponde aproximadamente de  $38,18 \pm 5,59 \mu\text{g}$  (valor promedio basado en los cálculos obtenidos usando la ecuación de regresión) a  $44,37 \pm 8,23 \mu\text{g}$  de proteínas vírales (valor promedio basado en la determinación gráfica), que puede considerarse como la cantidad de virus total, asumiendo que las proteínas representan más del 97% del peso del CI (ZEDDAM *et al.*, en preparación).

Nuestros valores son aproximadamente 4 veces más bajos que los estimados por

MATTHIESSEN *et al.* (1978). Según los datos de estos autores, a 0,45  $\text{DO}_{450}$  le correspondería 0,08 mg de virus/ml, es decir que 1  $\text{DO}_{450}$  sería equivalente a aproximadamente 177  $\mu\text{g}$  de PhopGV. Se puede explicar esta diferencia quizás por el hecho de que usaron un método indirecto para determinar las concentraciones de los CI. De hecho las estimaciones las obtuvieron al mezclar una suspensión calibrada de partículas de látex con la suspensión del virus, para luego determinar la proporción de los dos componentes después de rociar la mezcla en un grid de microscopía electrónica. Entre posibles factores que podrían interferir, estaría la capacidad desigual de las partículas de látex y los CI de poder fijarse a los grids, lo que podría explicar la diferencia que existe con el valor que obtuvimos al aplicar un método más directo.

## 2- Determinación del número de CI contenidos en una suspensión viral del PhopGV a 1 $\text{DO}_{450}$ de concentración.

Se determinó que el número de CI presentes en 1 ml de una suspensión viral con

Tabla 2. Estimaciones gráfica y matemática, a partir de diferentes concentraciones de suspensión viral, de las cantidades de proteínas contenidas en 1  $\text{DO}_{450}$ .

Cantidad de PhopGV (en $\text{DO}_{450}$ )	Cantidad de proteínas vírales (en $\mu\text{g}/\text{DO}_{450}$ )	
	Estimación matemática	Estimación gráfica
$7,75 \times 10^{-2}$	33,7	30,97
$12,40 \times 10^{-2}$	34,3	44,35
$18,75 \times 10^{-2}$	38,9	50,13
$24,80 \times 10^{-2}$	45,8	52,02

Tabla 3. Estimación del número de CI presentes en 1 DO<sub>450</sub> de suspensión viral.

Cantidad de PhopGV (en DO <sub>450</sub> )	Conteo del número de CI/ml (x 10 <sup>6</sup> )	Estimación del número de CI/DO <sub>450</sub> (x 10 <sup>6</sup> )
2,5 x 10 <sup>-2</sup>	18,0 ± 0,9	733,8 ± 34,1
10 <sup>-2</sup>	6,3 ± 0,4	626,0 ± 38,8

una absorbencia de 1 DO<sub>450</sub> es de aproximadamente 679,9 ± 53,9 x 10<sup>6</sup> (Tabla 3).

### 3- Estimación del peso de un CI del PhopGV

MATTHIESSEN *et al* (1978) estimaron que en 35 g del PhopGV puro y liofilizado había aproximadamente 1,35 x 10<sup>15</sup> partículas, lo que daba un peso promedio aproximado de 26 x 10<sup>3</sup> picogramos (pg) por CI. Con nuestros datos (44,4 µg de virus/DO<sub>450</sub> y 679,9 x 10<sup>6</sup> CI/DO<sub>450</sub>) hallamos 65 x 10<sup>-3</sup> pg/CI, que es poco menos del doble que el calculado por los autores mencionados.

### 4- Estimación de la producción de virus en larvas de polillas de la papa.

Los resultados de los conteos de los CI presentes en larvas de *P. operculella* y *T.*

*solanivora* muertas por la infección viral al nivel del laboratorio se presentan en la tabla 4.

Basado en bio-ensayos, KROSCHER (1995) determinó un contenido de 10<sup>10</sup> CI/larva. Previamente, por observaciones al microscopio electrónico, MATTHIESSEN *et al.*, (1978) asumieron que un equivalente larval correspondía de 4 a 5 x 10<sup>9</sup> CI, mientras que DUNN (1971) estimó que la cantidad total de virus que infecta a las larvas de PTM en su último estadio era aproximadamente 10<sup>11</sup> CI. La diferencia entre los valores dados por los primeros dos autores y la última estimación es significativa, aunque la cantidad de 10<sup>11</sup> partículas de virus por larva es poco frecuente. De hecho, basándonos en los datos de DUNN (1971), aproximadamente 2,6 mg (14,7 DO<sub>450</sub>) de virus puro se hallaría en el último

Tabla 4. Relación entre el peso de la larva y el número de CI presentes en larvas de *Phthorimaea operculella* (*P. op.*) y *Tecia solanivora* (*T. sol.*).

Larva nº	Peso de la larva (en mg)		CI/larva (x 10 <sup>9</sup> )		CI/mg de peso corporal (x 10 <sup>8</sup> )	
	<i>P. op.</i>	<i>T. sol.</i>	<i>P. op.</i>	<i>T. sol.</i>	<i>P. op.</i>	<i>T. sol.</i>
1	10,0	45,39	0,70 ± 0,02	7,22 ± 0,25	0,70 ± 0,02	1,50 ± 0,03
2	4,2	42,78	0,41 ± 0,14	4,98 ± 0,11	0,98 ± 0,03	1,16 ± 0,02
3	12,8	26,49	3,46 ± 0,19	6,50 ± 0,32	2,70 ± 0,01	2,46 ± 0,12
4	15,4	33,60	1,84 ± 0,18	6,64 ± 0,41	1,19 ± 0,01	1,96 ± 0,01
5	10,2	31,95	3,94 ± 0,15	7,16 ± 0,29	3,86 ± 0,15	2,24 ± 0,09
6	8,6	15,30	2,12 ± 0,08	2,73 ± 0,20	2,46 ± 0,09	1,79 ± 0,13
7	10,6	30,92	3,97 ± 0,19	5,08 ± 0,27	3,75 ± 0,18	1,64 ± 0,09
8	9,3	24,91	2,29 ± 0,17	3,45 ± 0,20	2,46 ± 0,12	1,38 ± 0,08
9	12,9	37,10	4,59 ± 0,34	2,20 ± 0,12	3,56 ± 0,03	0,59 ± 0,03
10	7,0	37,27	2,16 ± 0,17	1,72 ± 0,18	3,08 ± 0,02	0,46 ± 0,05
11	10,2	18,53	3,94 ± 0,15	2,45 ± 0,05	3,86 ± 0,15	1,32 ± 0,03
12	11,2	30,92	4,17 ± 0,14	4,75 ± 0,26	3,72 ± 0,12	1,54 ± 0,08
13	4,2	31,69	1,94 ± 0,12	1,25 ± 0,13	1,37 ± 0,08	0,39 ± 0,04
14	18,7	8,80	4,98 ± 0,23	0,11 ± 0,01	2,66 ± 0,12	0,12 ± 0,01
15	20,4	7,25	2,06 ± 0,11	0,20 ± 0,02	1,01 ± 0,05	0,28 ± 0,02

estadio larval, él que generalmente no excede de 10 a 15 mg de peso corporal. Esta cantidad de virus es equivalente al 20% del peso fresco total de la larva, lo que es un poco elevado considerando el contenido en agua del insecto. Al contrario, los datos que se obtuvieron durante nuestro estudio, aunque no son idénticos, son coherentes con los reportados por MATTHIESSEN *et al.* (1978).

Finalmente, la aplicación de una prueba de homogeneidad de varianzas ( $p=0,05$ ) a los valores obtenidos durante nuestro estudio demostró que la producción del virus es proporcionalmente más importante en larvas de *P. operculella* que en *T. solanivora*, siendo la producción de CI por mg de peso corporal de  $2,35 \pm 1,26 \times 10^9$  CI/mg por la primera especie y  $1,27 \pm 0,74 \times 10^9$  CI/mg para la otra.

Al contrario, la misma prueba estadística aplicada a los 13 individuos más grandes de cada grupo, no permitió establecer que para los últimos estadios larvales, el número de CI obtenido en *T. solanivora* fuera más importante que el obtenido en *P. operculella* ( $3,76 \pm 2,47 \times 10^9$  y  $2,84 \pm 1,41 \times 10^9$  CI/larva, respectivamente), aunque esta primera especie sea más grande que la última. Sin embargo, para confirmar definitivamente este resultado, sería necesario repetir sobre una muestra numéricamente más importante.

### 5- Estimación de las cantidades de CI del PhopGV empleadas en la formulación del bio-plaguicida.

Basándose en la tecnología desarrollada por el CIP, dos formulaciones diferentes del bio-plaguicida se pueden producir teniendo como base al PhopGV, cada una usada bajo condiciones específicas. Una de ellas es la preparación de suspensiones acuosas del PhopGV para aplicaciones en campo, empleándose 20 larvas infectadas con el virus para un litro de agua destilada conteniendo un agente dispersante al 0,2% (Triton, Pegasol). Para aplicar una hectárea se requiere aproximadamente de 2000 larvas (ALCAZAR & RAMAN, 1992b).

La otra es la formulación en polvo seco producida para aplicaciones en almacén,

empleándose un material inerte (talco) mezclado con 20 larvas homogeneizadas por kilogramo, añadiendo también el dispersante al 0,2% de concentración final. Se usan aproximadamente 5 kg de esta formulación para proteger 1 tonelada de tubérculos (ALCAZAR & RAMAN, 1992b). Ambas formulaciones dieron resultados satisfactorios a nivel de agricultor, mientras que KROSHEL (1995) usando sólo 100 larvas/ha en campo no obtuvo resultados satisfactorios.

### a- Cálculos teóricos de las cantidades de virus aplicadas en los programas de bio-control basándose en el contenido en CI de las larvas infectadas a nivel de un laboratorio

Basándonos en nuestros datos, la cantidad de CI que se aplicó debe corresponder a aproximadamente  $3,48 \times 10^{12}$  CI/tonelada de tubérculos (considerando un peso promedio de 14,8 mg por cada larva infectada con PhopGV usada en la preparación del bio-plaguicida) para la formulación en polvo seco. Para la formulación acuosa, le corresponde aproximadamente  $6,96 \times 10^{13}$  CI/ha. Esta cantidad de patógeno está en concordancia con informes previos dados por diferentes autores quienes realizaron aplicaciones de otros virus de granulosis para controlar lepidópteros plaga. Por ejemplo, TATCHELL & PAYNE (1984) hallaron que cantidades entre  $10^{12}$  y  $10^{14}$  CI/ha eran necesarias para controlar *Pieris rapae* en campos de col en Gran Bretaña. En otros casos, se obtuvieron buenos resultados con dosis muy inferiores. Así, GLEN y PAYNE (1984) encontraron que, para obtener un 90% de reducción del daño producido por *Cydia pomonella* en huertos de manzanos en el Reino Unido, eran necesarios de  $1,8 \times 10^{10}$  a  $1,3 \times 10^{11}$  CI/ha.

### b- Determinación de la cantidad real de virus aplicada basándose en el contenido en CI de las larvas infectadas a nivel de una unidad de producción masal

El promedio del peso fresco unitario de

Tabla 5. Estimación de las cantidades de CI empleadas en la formulación del bio-plaguicida viral y aplicadas sobre tubérculos de papa.

Lote n°	CI/lote (x 10 <sup>11</sup> )	Promedio de CI/larva (x 10 <sup>9</sup> )	Promedio de CI/mg de larva (x 10 <sup>8</sup> )	Promedio de CI/kg de bio-plaguicida (x 10 <sup>9</sup> )	Promedio de CI aplicados/kg de tubérculos (x 10 <sup>8</sup> )
1	7,72 ± 0,47	1,29 ± 0,07	0,87 ± 0,05	25,8 ± 1,4	1,29 ± 0,07
2	9,24 ± 0,55	1,54 ± 0,09	1,04 ± 0,06	30,8 ± 1,8	1,54 ± 0,09
3	9,51 ± 0,58	1,58 ± 0,10	1,07 ± 0,06	31,6 ± 2,0	1,58 ± 0,10
4	9,23 ± 0,61	1,53 ± 0,10	1,04 ± 0,07	30,6 ± 2,0	1,53 ± 0,10
5	8,74 ± 0,38	1,46 ± 0,06	0,98 ± 0,04	29,2 ± 1,2	1,46 ± 0,06
6	8,19 ± 0,50	1,36 ± 0,08	0,92 ± 0,05	27,2 ± 1,6	1,36 ± 0,08

las larvas que fueron colectadas al nivel de la unidad de producción masal era aproximadamente de 14,8 mg (valor determinado a partir del peso de 100 individuos). Los conteos realizados sobre los 6 lotes de 600 larvas cada uno permitieron establecer que las cantidades de CI presentes en los diferentes lotes fueron del mismo orden: las variaciones entre los lotes los más y los menos concentrados no superaban aproximadamente el 20% (Tabla 5).

Un punto esencial a mencionar es que la producción estimada de CI por larva se encontró muy debajo (casi 20 veces menos) del rango previamente determinado al analizar individualmente las larvas muertas por PhopGV. La primera hipótesis que explicaría esta baja producción ( $0,99 \pm 0,06 \times 10^8$  CI/mg de larva) puede ser que al reducir los costos de labor se conduce a recolectar toda larva que presente síntomas de la enfermedad viral, este muerta o sólo enferma; es lógico suponer que para un mismo tamaño, las larvas enfermas contienen probablemente menos virus que las muertas. La segunda hipótesis sería una inadecuada homogeneización de las larvas, debido a que la trituración de éstas se realiza con mortero manual, el cual es menos eficiente que un homogeneizador de tejidos. Con el mortero probablemente se dejen agregados CI sin salir de los tejidos larvales o sin dispersar.

En base a los resultados presentados, se determinó que es baja la cantidad de material activo (virus) en la formulación cuando se expresa como peso: en promedio 45,2 mg de virus/kg. Con este nuevo valor, basado a lo

que sale de la unidad de producción, serían aproximadamente  $1,5 \times 10^{11}$  CI/tonelada de tubérculos y  $3 \times 10^{12}$  CI/ha las cantidades de virus realmente aplicadas, en almacén y campo respectivamente.

## CONCLUSIONES

Fue previamente demostrado que el PhopGV aislado primeramente de *P. operculella* (STEINHAUS *et al.*, 1967), se halla infectando naturalmente larvas de *T. solanivora* (ZEDDAM *et al.*, 1994). Es así que este virus puede controlar ambas especies de plagas lo que incrementa su mercado potencial. Varios países en desarrollo (entre ellos Perú, Bolivia, Colombia, Tunisia, Venezuela, Yemen) llevan a cabo programas de MIP usando el PhopGV (CIP, 1995; BEN SALAH, H. & AALBU, R., 1992; KROSHEL, 1990; KROSHEL, 1995; ZEDDAM *et al.*, 1999). Por ello, las necesidades son grandes para establecer una satisfactoria estandarización de las formulaciones del virus, así como para definir con precisión las dosis eficaces para ser aplicadas en el control de plagas. Estos puntos son cruciales y a veces difíciles de lograr en zonas poco favorecidas, donde el equipo básico y el personal calificado es escaso o no existe.

Idealmente, la determinación precisa de la cantidad de virus presente en los lotes de larvas infectadas debería llevarse contando los CI mediante el uso de un microscopio óptico adecuado. Sin embargo, todas las unidades de producción no cuentan con este equipo. En este caso, los resultados obtenidos en el

estudio demuestran que para tener una estimación más precisa de la cantidad de virus contenida en un lote de larvas infectadas es mejor basarse en el peso corporal total que el equivalente larval. Por lo tanto, la comparación de las cantidades de CI recuperadas al nivel de una unidad de producción piloto clásica son muy por debajo de lo que se puede lograr obtener cuando se realiza la infección y la preparación de las larvas bajo condiciones más controladas (laboratorio). Investigaciones complementarias deberían establecer cuales son los factores claves a tomar en cuenta para mejorar la productividad (expresada como el número de CI finalmente recu-

perados/ g de larva) de este tipo de unidad y de ahí, bajar significativamente el costo del bio-plaguicida.

Por otro lado, se estableció que el PhopGV se puede producir en un nivel parecido sobre larvas de *P. operculella* y de *T. solanivora*, debido a que existe una compensación entre la productividad más grande de la primera especie y el tamaño más importante de la segunda. Así que, en los países donde ambas especies están presentes, la elección del hospedero necesario a la multiplicación viral podría esencialmente depender de las facilidades de manejo de las crías.

#### ABSTRACT

ZEDDAM J. L., R. M. VASQUEZ SOBERON, Z. VARGAS RAMOS, A. LAGNAOUI. 2003. Use of a granulovirus for the microbial control of the potato tuber moths *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bol. San. Veg. Plagas*, 29:659-667.

The potato tuber moths *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* are present in large areas of Latin America. They are part of the most devastating group of potato pests in developing countries, and their damages occur both in the field and under storage conditions. Recently, *T. solanivora* was introduced to Canaries and is now threatening new potato-growing regions. A granulovirus named PhopGV (Familia: *Baculoviridae*) represents an efficient microbial agent for controlling both insect species, and is thus regarded as the main component of integrated management programs (IPM) developed to fight these pests. The work reports on the dosage of virus produced in larvae of both species and on the doses used for the viral biopesticide. Firstly, it was established that a viral solution exhibiting an absorbance of 1 OD<sub>450</sub> contained 679, 9 ± 53,9 x 10<sup>6</sup> IB (inclusion bodies)/ml and that the mean IB weight was about 65 x 10<sup>-3</sup> pg. Also, it was found that the IB production per mg was almost the double in *P. operculella* (2,35 ± 1,26 x 10<sup>9</sup> IB/mg) than in *T. solanivora* larvae but the difference in size between the two species made the final number of IB obtained per larva was not statistically different in both cases. Finally, it was estimated that the application rates of PhopGV when used in bio-control programs were reaching 1, 5 x 10<sup>11</sup> IB/ton of tubers for traditional storage and 3 x 10<sup>12</sup> IB/ha in potato fields.

**Keywords:** Granulovirus, *Baculoviridae*, potato tuber moth, *Phthorimaea operculella*, *Tecia solanivora*, virus dosage, biological control

#### REFERENCIAS

- ALCAZAR, J.; CERVANTES, M. y RAMAN, K V. 1992a. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. *Rev. per. Ent.*, 35: 107-111.
- ALCAZAR, J. y RAMAN K V. 1992b. Control de *Phthorimaea operculella* en almacenes rústicos, empleando virus granulosis en polvo. *Rev. per. Ent.*, 35: 117-120.
- BEN SALAH, H. y AALBU, R. 1992. Field use of granulosis virus to reduce initial storage infestation of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) in North Africa. *Agric. Ecosyst. and Environ.*, 38: 119-126.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- CIP. 1995. The International Potato Center. Program report:1993-1995. Lima, Peru. 192 p.



- DAS, G P., MAGALOLONA, E D, RAMAN, K. V. y ADALLA, C. B. 1992. Effects of different components of IPM in the management of the potato tuber moth in storage. *Agric. Ecosyst. and Environ.*, 41: 321-325.
- DUNN, A. 1971. Investigations into a granulosis virus of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*) (Zeller), with emphasis on its potential as a virological insecticide. Honours thesis, University of Western Australia.
- GLEN, D. M. y PAYNE, C. C. 1984. Production and field evaluation of codling moth granulosis virus for control of *Cydia pomonella* in the United Kingdom. *Ann. appl. Biol.*, 104: 87-98.
- ICTV, 2000. Family *Baculoviridae*. In: van Regenmortel, M. H.V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, R. B. Wickner (Eds), *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* pp.445-455, Academic Press, San Diego, USA
- KROSHEL, J. 1995. Integrated pest management in potato production in the Republic of Yemen, with special reference to the integrated biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller). *Tropical Agriculture*, 8, Margraf Verlag, Weikersheim, 232 p.
- LERY, X., GIANNOTTI, J., TAHA, A., RAVALLEC, M., ABOL-ELA, S. 1997. Multiplication of a granulosis virus isolated from the potato tuber moth in a new established cell line of *Phthorimaea operculella*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 33: 640-646.
- MATTHIESSEN, J. N, CHRISTIAN, R., GRACE, T. D. C. y FILSHIE, B. K. 1978. Large-scale field propagation and the purification of the granulosis virus of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bull. ent. Res.*, 68: 385-391.
- RAMAN, K V. 1988. Lutte intégrée contre les insectes nuisibles de la pomme de terre dans les pays en voie de développement. *CIP Circular*, 16 (1): 1-9.
- STEINHAUS, E. A. y MARSH, G. A. 1967. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 436-438.
- TAHA, A., NOUR-EL-DIN, A., CROIZIER, L., FERBER, M. L. y CROIZIER, G. 2000. Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. *Virus Genes*, 21 (3): 147-155.
- TATCHELL, G. M. y PAYNE, C. C. 1984. Field evaluation of a granulosis virus for control of *Pieris rapae* (Lep.: Pieridae) in the United Kingdom. *Entomophaga*, 29 (2): 133-144.
- ZEDDAM, J-L, LERY, X., GIANNOTTI, J., NINO, L., ANGELES, I. y ALCAZAR, J. 1994. Susceptibility of different potato moth species to a same granulosis virus. Proceedings of the XXVIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Montpellier, France, 28 August-2 September, pp. 239-240.
- ZEDDAM, J-L.; POLLET, A.; MANGOENDIHARJO, S.; HARIS RAMADHAN, T. y LOPEZ-FERBER, M. 1999. Occurrence and virulence of a granulosis virus in *Phthorimaea operculella* (Lep.: Gelechiidae) populations in Indonesia. *J. Invertebr. Pathol.*, 74: 48-54.

(Recepción: 31 enero 2003)

(Aceptación: 5 agosto 2003)