

## CUANTIFICACIÓN DE LA PRODUCCIÓN VIRAL Y TASAS DE APLICACIÓN DE UN VIRUS DE GRANULOSIS USADO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LAS POLILLAS DE LA PAPA, *PHTHORIMAEA OPERCULELLA* Y *TECIA SOLANIVORA* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE).

JEAN-LOUIS ZEDDAM<sup>1,2</sup>, RUTH MARIELA VÁSQUEZ SOBERON<sup>2</sup>, ZENOBIO VARGAS RAMOS<sup>2</sup> Y AZIZ LAGNAOUI<sup>2</sup>

### RESUMEN

Las polillas de la papa *Phthorimaea operculella* y *Tecia solanivora* están entre las plagas más perjudiciales para el cultivo y almacenamiento de papa en países en desarrollo, y se distribuyen ampliamente en América Latina. El virus de granulosis PoGV controla ambas especies en forma eficaz y es considerado el componente principal de los programas de manejo integrado desarrollados contra estas plagas. En este trabajo se cuantificó la producción del virus en larvas de las dos especies y dosificó la formulación viral del bio-plaguicida. Se estableció que una solución viral con una absorbancia de  $1 DO_{450}$  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 y luego que la producción de CI por unidad de peso fue 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 ambas larvas hizo que la cantidad de CI recuperada por larva no fuera diferente estadísticamente. Finalmente, las tasas de aplicación del PoGV utilizado en los programas de bio-control llegaron a  $1,5 \times 10^{11}$  CI/tonelada de tubérculos en almacén tradicional y  $3 \times 10^{12}$  CI/ha en el campo  
Palabras clave: *Baculoviridae*, control biológico, dosificación de virus, granulovirus, *Phthorimaea operculella*, PoGV, polilla de la papa, *Tecia solanivora*.

### ABSTRACT

Potato moths *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora* are among the most damaging pest for this crop and during storage of potato in developing countries, and are widely distributed in Latin America. The PoGV (granulosis virus) controls both species efficiently, and is the main component in integrated management programs developed against these pests. This work reports on virus production on larvae from both species, and determination of dosage of the viral formulation of the biopesticide. It was determined that a viral solution with an absorbance of  $1 DO_{450}$  contained  $679,9 \pm 53,9 \times 10^6$  IB (inclusion bodies)/mL, that an IB weighed approx.  $65 \times 10^{-3}$  pg, and that IB production per weight unit was almost twice in *P. operculella* ( $2,35 \pm 1,26 \times 10^9$  CI/mg) than *T. solanivora*, but because their different size, the amounts of IB recovered per larva were not significantly different between species. Finally, application rates of the PoGV used in the biocontrol programs reached  $1,5 \times 10^{11}$  CBI/ton of tubers stored traditionally, and  $3 \times 10^{12}$  IB/ha in the field.  
Key-words: *Baculoviridae*, biological control, granulovirus, *Phthorimaea operculella*, potato tuber moths, *Tecia solanivora*, virus dosage.

### 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 *Scrobipalpaloides 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). Los daños y perjuicios producidos por las larvas 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 (GV), uno de

<sup>1</sup>IRD, 213 rue La Fayette, 75480 París (Francia).

<sup>2</sup>CIP (International Potato Center), Apartado 1558, Lima 12 (Perú).

(Recibido: 16 de noviembre del 2001. Aceptado: 9 de octubre del 2002).

los mayores componentes del MIP, puede infectar tanto a *P. operculella* (o PTM: potato tuber moth) como a *T. solanivora* (Taha *et al.*; 2000). 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 PoGV (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 les colectó y pesó individualmente para luego almacenarlas en microtubos a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Los cuerpos de inclusión (CI) del virus fueron purificados a partir de larvas de PTM infectadas con el PoGV (Alcazar *et al.* (1978). Estos autores determinaron que a 450 nm los CI de PoGV 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  $\text{DO}_{450}$ ) y las concentraciones de los CI. Es así, que empleando esta propiedad se estandarizaron todas las suspensiones de PoGV usadas en las pruebas posteriores. Las absorbencias de los CI en suspensiones 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 PoGV. Los conteos de los CI se realizaron a una amplificación de 600x, empleando un hematócitosmetro (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 hematócitosmetro.

Se realizaron cuantificaciones del contenido protéico 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  $2,5 \times 10^{-1}$   $\text{DO}_{450}$ . Los valores de las  $\text{DO}_{595}$  obtenidos para las diferentes concentraciones de virus (expresadas como  $\text{DO}_{450}$ ) 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.

Quince larvas de *P. operculella* muertas por la infección con el GV (bajo condiciones controladas a nivel de laboratorio) fueron pesadas y el número de CI presente en cada una fue determinado. 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 producido por mg 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 colectaron 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 PoGV, con lo que se asume que la muerte fue únicamente debido a la enfermedad causada por el PoGV.

#### 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 protéico de los CI de PoGV.

Pruebas preliminares (datos no presentados) demostraron que realizando la dosificación de las proteínas virales empleando CI sin disolver, se obtuvo claramente menos del valor real (aproxima-

damente 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 aminoácidos 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 PoGV 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 PoGV se bajó hasta la neutralidad agregándoles ácido clorhídrico concentrado (HCl). Además, se contó con un control (Na<sup>2</sup>CO<sup>3</sup>+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 PoGV se presentan en la Tabla 1.

Cantidad de BSA (en ug de proteínas)	Absorbencias (en DO <sub>595</sub> )	Cantidad de PoGV (en DO <sub>450</sub> )	Absorbencias (en DO <sub>595</sub> )
0	0,001	7,75 x 10 <sup>-2</sup>	0,114
2	0,094	12,40 x 10 <sup>-2</sup>	0,262
5	0,244	18,75 x 10 <sup>-2</sup>	0,426
10	0,452	24,80 x 10 <sup>-2</sup>	0,561
20	0,809		

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

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 ( $DO=0,1786+0,3043 \text{ LnBSA}$ ). Se aplicó esta ecuación a los valores de la  $DO_{595}$  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  $DO_{595}$  correspondiendo a las diferentes concentraciones de virus fueron reportados sobre la curva real  $DO=f(\text{BSA})$  para la determinación gráfica directa de estas mismas cantidades de proteínas virales (Tabla 2, segunda columna; gráfico no presentado). De hecho, era necesario comparar los dos métodos entre sí, 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.

Cantidad de proteínas virales (en ug/DO450)		
Cantidad POGV (en DO <sub>450</sub> )	Estimación Matemática	Estimación Gráfica
$7,75 \times 10^2$	33,7	30,97
$12,40 \times 10^2$	34,3	44,35
$18,75 \times 10^2$	45,8	52,02

Tabla 2. Estimaciones gráficas y matemáticas, a partir de diferentes concentraciones de suspensión viral, de las cantidades de proteínas contenidas en 1  $DO_{450}$ .

Estos resultados nos permitieron estimar que a 1  $DO_{450}$  de PoGV 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 virales (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 (Zeddarn *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  $DO_{450}$  le correspondería 0,08 mg de virus/ml, es decir que 1  $DO_{450}$  serie equivalente a aproximada-

mente  $177 \mu\text{g}$  de PoGV. 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 PoGV a 1 $DO_{450}$ de concentración.

Se determinó que el número de CI presentes en 1 ml de una suspensión viral con una absorbencia de 1  $DO_{450}$  es de aproximadamente  $679,9 \pm 53,9 \times 10^5$  (Tabla 3).

Concentración del PoGV (en $DO_{450}$ )	Conteo del número ( $\times 10^6$ )	Estimación del número de CI/ $DO_{450}$ ( $\times 10^6$ )
$2,5 \times 10^2$	$18,0 \pm 0,9$	$733,8 \pm 34,1$
$10^2$	$6,3 \pm 0,4$	$626,0 \pm 38,8$

Tabla 3. Estimación del número de CI presentes en 1  $DO_{450}$  de suspensión viral.

## 3. Estimación del peso de un CI del PoGV.

Matthiessen *et al.* (1978) estimaron que en 35 g del PoGV puro y liofilizado había aproximadamente  $1,35 \times 10^{15}$  partículas, lo que daba un peso promedio aproximado de  $26 \times 10^{-3}$  picogramos (pg) por CI. Con nuestros datos ( $44,4 \mu\text{g}$  de virus/ $DO_{450}$  y  $679,9 \times 10^6$  CI/ $DO_{450}$ ) hallamos  $65 \times 10^{-3}$  pg/CI, que es poco menos del doble que el valor 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.

Larva n°	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>Pop.</i>	<i>Tsol.</i>
1	10,0	45,39	0,70 ± 0,02	7,2 ± 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 ± 0,1 2	1,25 ± 0,13	1,37 ± 0,08	0,39 ± 0,04
14	18,7	8,80	4,98 ± 0,3	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

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*)

Basado en bio-ensayos, Kroschel (1995) determinó un contenido de  $10^{10}$  CI/larva. Previamente, por observaciones al microscopio electrónico, Matthiessen *et al.*, (1978) asumieron que un equivalente larval correspondía de 4 a  $5 \times 10^9$  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  $10^{11}$  CI. La diferencia entre los valores dados por los primeros dos autores y la última estimación es significativa, aunque la cantidad de  $10^{11}$  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 estadio larval, el que generalmente no excede de 10 a 15 mg de peso corporal, el 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, 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 PoGV 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 PoGV, cada una usada bajo condiciones específicas. Una de ellas es la preparación de suspensiones acuosas del PoGV 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). 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 laboratorio.

Basándose 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 PoGV usada en la preparación del bio-plaguicida) para la formulación en polvo seco. Para la formulación acuosa, le corresponde aproxi-

madamente  $6,96 \times 10^{13}$  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 y 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 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).

Lote n°	CI/lote (x 10 <sup>11</sup> )	Promedio de CI/larva (x 10 <sup>9</sup> )	Promedio de CI/mg de larva (x10 <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

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

Un punto esencial a mencionar es que la producción estimada de CI por larva se encuentra muy debajo (casi 20 veces menos) del rango previamente determinado al analizar individualmente las larvas muertas por PoGV. 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, esté 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 1,9 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 PoGV aislado primeramente de *P. operculella* (Steinhaus et al., 1967), se halla infectando naturalmente larvas de *T. solanivora* (Zeddám 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 PoGV (CIP, 1995; Ben Salah, H. & Aalbu, R., 1992; Kroshel, 1990; Kroshel, 1995; Zeddám 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 can-

tidad 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 cuáles son los factores claves a tomar en cuenta para mejorar la productividad (expresada como el número de CI finalmente recuperado/ g de larva) de este tipo de unidad y de allá, bajar significativamente el costo del bio-plaguicida.

Por otro lado, se estableció que el PoGV 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.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores reconocen la ayuda técnica de la Sra. Gloria Sotelo y del Sr. Pedro Rodríguez y las útiles discusiones y sugerencias aportadas por el Dr. Fausto Cisneros.

## LITERATURA CITADA

- ALCAZAR, J.; M. CERVANTES Y K. V. RAMAN. 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 K. V. RAMAN. 1992b. Control de *Phthorimaea operculella* en almacenes rústicos, empleando virus granulosis en polvo. Rev. per. Ent. 35: 117-120.
- SALAH, H. & R. AALBU. 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, Perú. 192 p.
- DAS, G.P., E. D. MAGALOLONA, K. V. RAMAN & C. B. ADALLA. 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. & PAYNE, C. C. 1984. Production and field evaluation of cadling moth granulosis virus for control of *Cydia pomonella* in the United Kingdom. *Ann. appl. Biol.* 104: 87-98.
- KROSHEL, J. 1990. Final report on integrated pest management for the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) in Yemen A. R. Ministry of Agriculture and Fisheries, General Department of Plant Protection, Yemen German Plant Protection Project, 30 p.
- 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., J. GIANNOTTI, A. TAHA, M. RAVALLEC & S. ABOL-ELA. 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., R. CHRISTIAN, T. D. GRACE C. & B. FILSHIE 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. & G. A. MARSH. 1967. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. *J. Invertebr. Pathol.*, 9: 436-438.
- TAHA, A., A. NOUR-EL-DIN, L. CROIZIER, M. L. FERBER & G. CROIZIER. 2000. Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. *Virus Genes.*, 21 (3): 147-155.
- TATCHELL, G. M. & C. C. PAYNE. 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., X. LERY, J. GIANNOTTI, L. NINO, I. ANGELES & J. ALCAZAR. 1994. Susceptibility of different potato moth species to a same granulosis virus. Proceeding of the XXVIIth Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Montpellier. France, 28 August-2 September, pp. 239-240.
- ZEDDAM, J. L., A. POLLET, S. Mangoendiharjo, T. Haris Ramadhan & M. López-Ferber. 1999. Occurrence and virulence of a granulosis virus in *Phthorimaea operculella* (Lep.: Gelechiidae) populations in Indonesia. *J. Invertebr. Pathol.* 74: 48-54.