

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

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

PAOLA CUARTAS O.<sup>1</sup>, LAURA VILLAMIZAR R.<sup>2</sup>, CARLOS ESPINEL C.<sup>3</sup> y ALBA MARINA COTES P.<sup>4</sup>

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

**Palabras clave:** Baculovirus. Control biológico. Infección viral.

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

**Key words:** Baculovirus. Biological control. Viral infection.

### Introducción

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

En diferentes partes del mundo se han encontrado larvas de *P. operculella* muertas a causa de una enfermedad natural producida por un virus del tipo granulosis (VG) que pertenece a la familia Baculoviridae (CIP 1996 citado en Zeddám *et al.* 1999). A partir de larvas de *P. operculella* infectadas con un granulovirus encontradas en Perú, el Centro Internacional

de la Papa (CIP), desarrolló un bioplaguicida en polvo para la protección de semilla de papa en almacenamiento, el cual ha sido usado en diferentes países para el control de esta plaga (CIP 1996 citado en Zeddám *et al.* 1999). Para *T. solanivora*, hasta el año 2004 sólo se había reportado un aislamiento de virus de la granulosis encontrado infectando naturalmente larvas en condiciones de campo en Mérida, Venezuela (Niño de Gualdrón 1996 citado por Niño y Notz 2000). El Laboratorio de Control Biológico de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-Corpoica, durante los años 2004 y 2005 realizó la búsqueda de aislamientos nativos de virus de la granulosis afectando de forma natural larvas de *T. solanivora*. A partir de este trabajo se aislaron, identificaron y caracterizaron cinco muestras de los departamentos de Cundinamarca, Nariño y Norte de Santander (Villamizar *et al.* 2006). Estos aislamientos nativos, se identificaron como virus de la granulosis mediante técnicas de microscopía, moleculares e inmunológicas, y se encontraron diferencias mo-

<sup>1</sup> Investigador profesional asistente. Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Laboratorio de Genética Molecular Animal. Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. [pcuartas@corpoica.org.co](mailto:pcuartas@corpoica.org.co). Autor para correspondencia.

<sup>2</sup> Investigador Ph. D. Asociado. Sc. D. en Ciencias Farmacéuticas. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. [lvillamizar@corpoica.org.co](mailto:lvillamizar@corpoica.org.co).

<sup>3</sup> Investigador Master Asistente. Master en Entomología. Biólogo. Laboratorio de Control Biológico. Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. [cespinelc@corpoica.org.co](mailto:cespinelc@corpoica.org.co).

<sup>4</sup> Directora Centro de Biotecnología y Bioindustrias. Ph. D. en Fitopatología. Control Biológico, Corpoica-Tibaitatá. AA. 240142 Las Palmas Parque Central Bavaria, Bogotá. [amcotes@corpoica.org.co](mailto:amcotes@corpoica.org.co).

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

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

### Materiales y Métodos

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

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

**Determinación del rendimiento de producción de partículas virales.** Se realizó una propagación viral de cada aislamiento para las dos especies de polilla de la papa (*T. solanivora* y *P. operculella*) como se describió previamente y se evaluó la producción de partículas virales expresada como cuerpos de inclusión por miligramo de tejido larval (CI/mg) siguiendo la metodología descrita por Gómez (2005). Las in-

fecciones para cada cepa se realizaron al mismo tiempo, con la misma población larval. Se seleccionaron 15 larvas que presentaron síntomas típicos de infección por granulovirus para cada aislamiento en cada especie de polilla, se maceraron y filtraron individualmente. La suspensión se dispuso en microplacas de 96 pozos y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de Elisa (Asys Hitech. Expert 96). Los resultados se extrapolaron en la curva de calibración estandarizada por Gómez (2005). El diseño experimental fue completamente al azar con 15 repeticiones por tratamiento y dos repeticiones en el tiempo. Los resultados de concentración se transformaron calculando el logaritmo decimal para cumplir con los principios de homogeneidad de varianza y normalidad de datos, y de esta forma utilizar un análisis paramétrico. El análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) para determinar el aislamiento más productivo en cada especie de polilla se realizaron con el programa SAS 9.1; y mediante el programa Statistix 8.1.1.0 se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de diferencias mínimas significativas (DMS) ( $\alpha = 0.05$ ), para determinar diferencias en la productividad de partículas virales de cada aislamiento en las dos especies.

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

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

El montaje de los ensayos se realizó de la misma forma para todos los aislamientos de granulovirus en las dos especies de polilla. Huevos de las polillas depositados en papel absorbente (400-500 huevos/papel) se inocularon con 3mL de una suspensión viral a una concentración ajustada a  $5 \times 10^6$  CI/mL para cada aislamiento. En el interior de un recipiente plástico de 16 onzas se ubicó un tubérculo de papa con 15 larvas neonatas obtenidas a partir de las posturas inoculadas. Se realizó un muestreo destructivo cada cuatro días para *T. solanivora* y cada dos días para *P. operculella*, tomando al azar tres unidades experimentales (tubérculos) durante 32 días. La variable evaluada fue el ACC como se describió anteriormente, se determinó la distribución de frecuencias para cada aislamiento viral y se comparó con la de las larvas sanas. El ensayo contó con una repetición en el tiempo.

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

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

Para cada tratamiento, se pesaron tres tubérculos de papa y se ubicaron en una bolsa plástica que contenía el producto formulado según la dosis comercial (5g bioplaguicida/Kg papa. Producto a base de baculovirus registro ICA # 5416). Las bolsas se cerraron y se agitaron hasta que los tubérculos quedaron cubiertos con el producto. Para los tratamientos con los virus sin formular, los tubérculos se inocularon con una brocha de  $\frac{1}{2}$  pulgada aplicando 2 mL de la suspensión viral en la superficie. El tratamiento control consistió en tres tubérculos sin aplicación viral, sobre los que se colocaron 15 larvas recién emergidas y se incubaron a 23°C durante 20 días, momento en el cual se realizó un muestreo destructivo de los tubérculos en busca de las larvas. Se contó el número de larvas muertas, larvas vivas sin signos de infección, larvas vivas con signos de infección y el número de pupas obtenidas. Los resultados de mortalidad en cada tratamiento, se corrigieron determinando el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider-Orelli (Zar 1999): Eficacia =  $(b - K/100 - K) \times 100$ . En donde b es el porcentaje de mortalidad en el tratamiento y K es el porcentaje de mortalidad del testigo. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. El porcentaje de eficacia de los productos, se analizó con el programa Statistix 8.1.1.0 mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de diferencias mínimas significativas (DMS) ( $\alpha = 0.05$ ).

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

## Resultados y Discusión

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

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

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

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

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

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

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

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

nómeno se recomienda mantener un abundante inóculo viral original criopreservado y adecuadamente alicuotado, de manera que después de algunos pases en el insecto se recurra a la cepa original conservada, no adaptada al hospedero y realizar el proceso de infección en una etapa temprana para obtener una rápida replicación del virus y aumentar su virulencia.

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

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

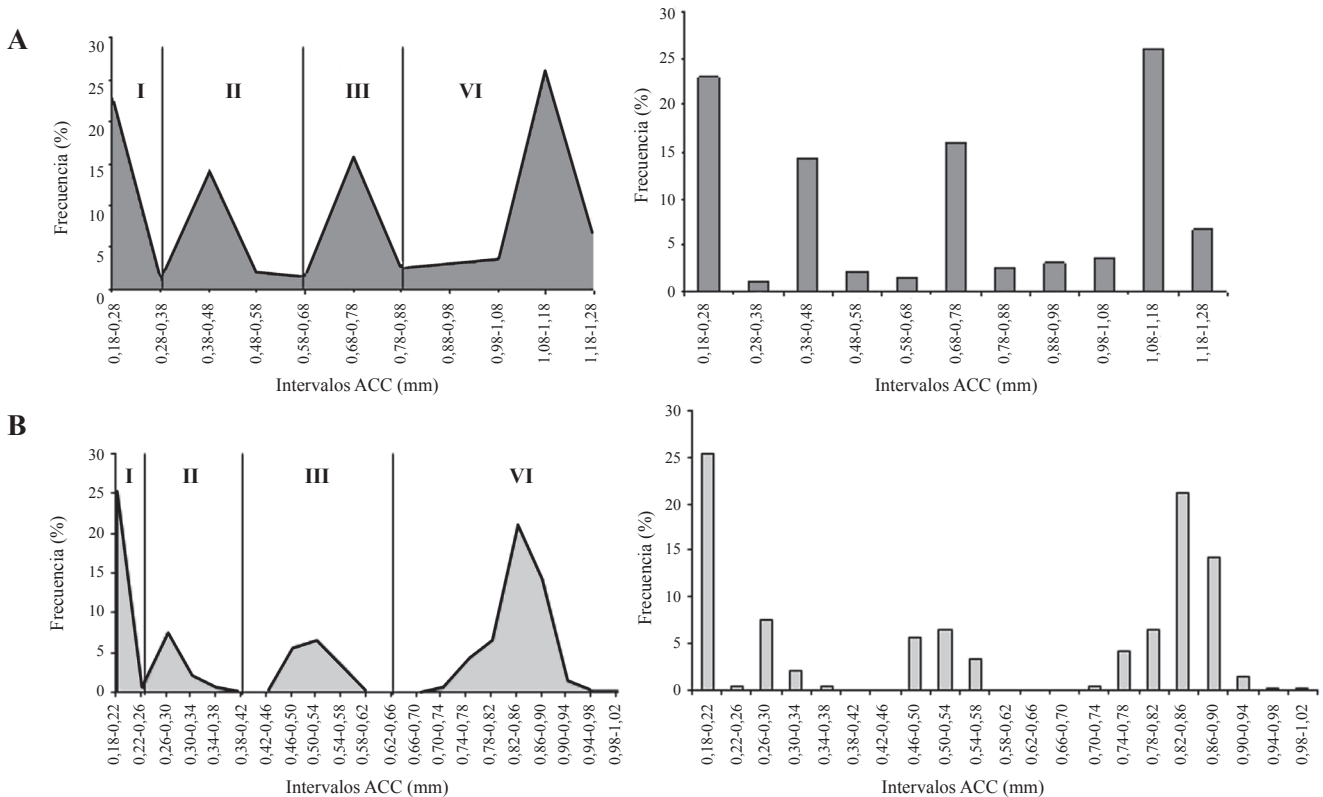


Figura 1. Distribución de frecuencias del ancho de la cápsula cefálica. A. Larvas sanas de *T. solanivora*. B. Larvas sanas de *P. operculella*.



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

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

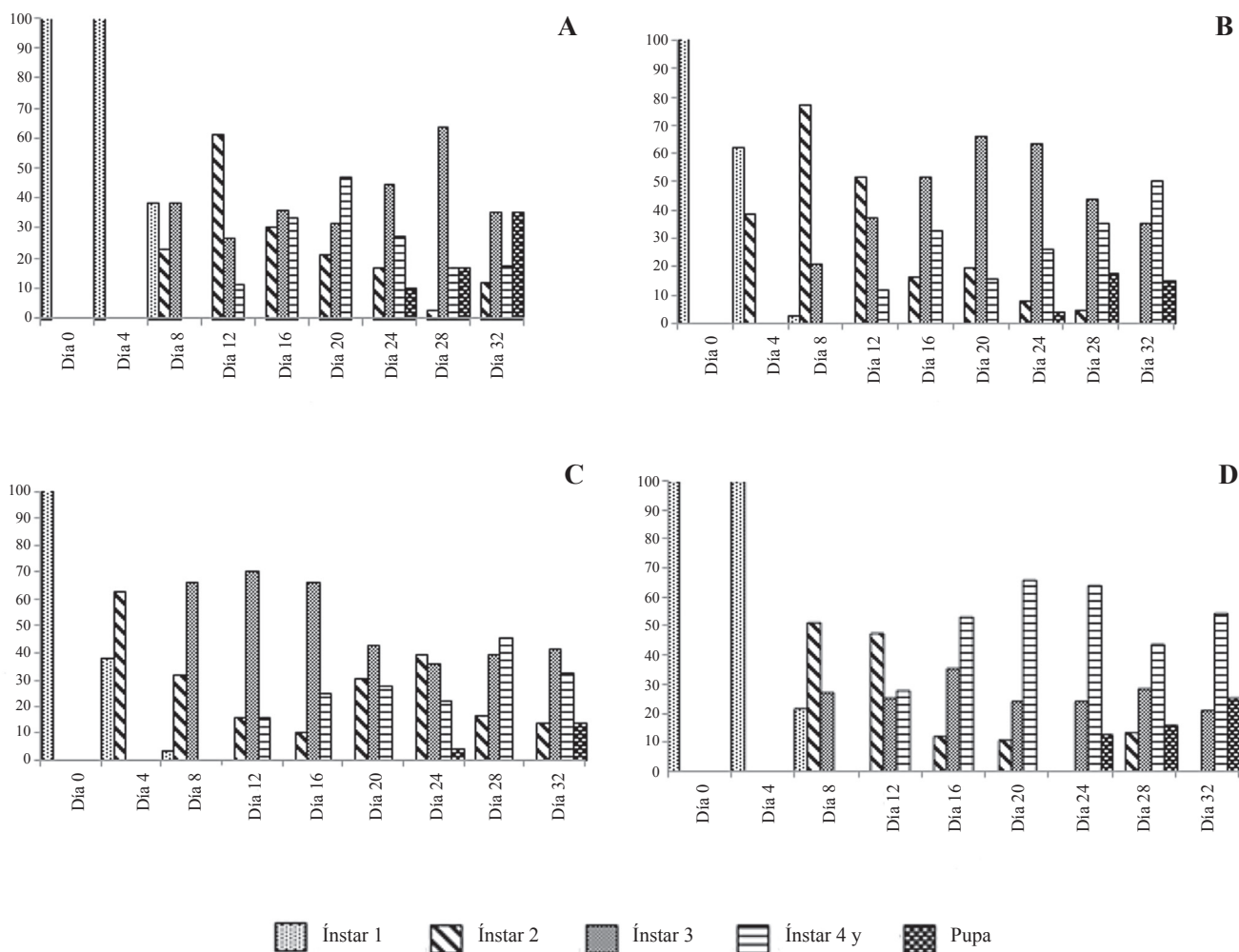
El retraso en el desarrollo de las larvas infectadas con los diferentes aislamientos pudo deberse al efecto negativo que tiene el virus en los hábitos alimenticios y en la expresión hormonal de las larvas durante el cambio sucesivo de instares (Buran y Park 1992; Nakai *et al.* 2004; Subramanian *et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

Por otro lado, en los primeros días de desarrollo no se evidenciaron signos de infección en las larvas de *T. solanivora* y *P. operculella*, observándose larvas de coloración parda translúcida. Luego de algunos días aparecieron aglomeraciones de estructuras blanquecinas observadas a través del

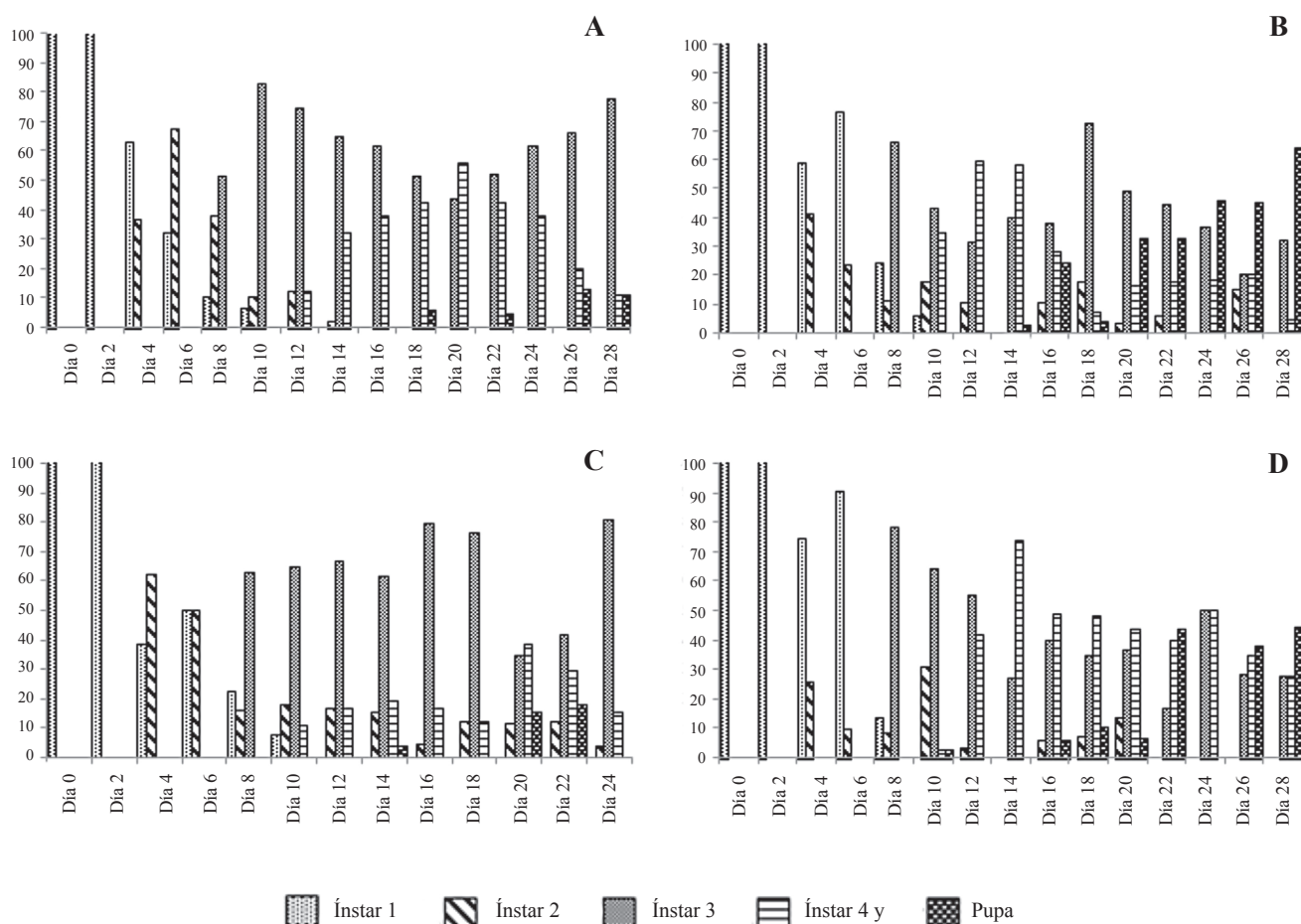
abdomen de las larvas, principalmente en la parte posterior. Estas aparecieron por todo el cuerpo a medida que transcurrió la infección, hasta que las larvas adquirieron un color blanco lechoso en todo su cuerpo. Estos signos también han sido reportados por Alcázar *et al.* (1992), Niño y Notz (2000) y Villamizar *et al.* (2006).

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

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



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



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

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

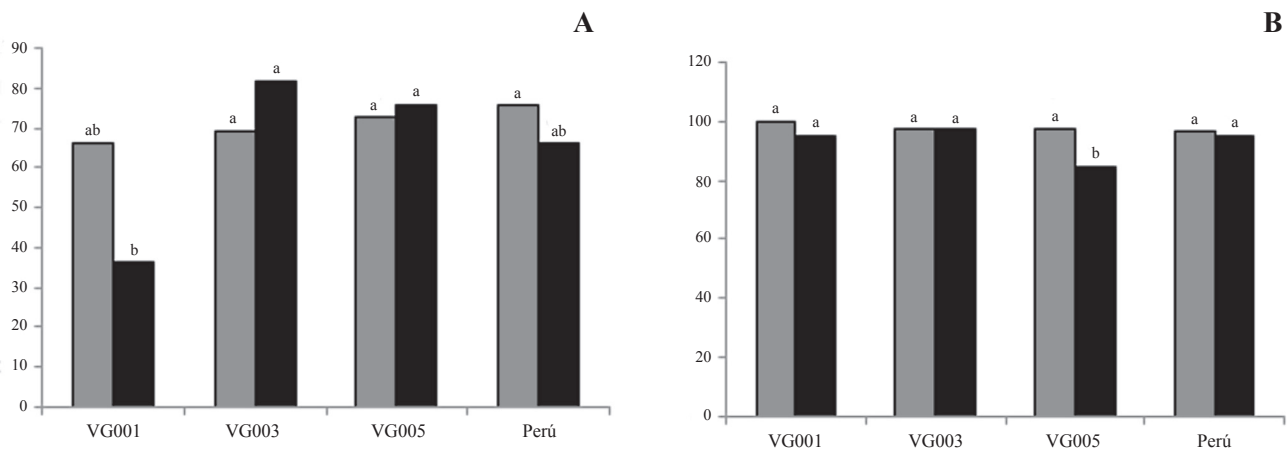
En términos generales no hay diferencias estadísticas entre la actividad biocontroladora de cada aislamiento formulado y sin formular, resultados que sugieren que el proceso de formulación no afectó la eficacia de los granulovirus. Resultados similares fueron reportados por Niño y Notz

(2000), quienes no encontraron diferencias en la mortalidad de las larvas de *T. solanivora* ocasionada por un granulovirus aplicado como suspensión acuosa de partículas virales y el mismo granulovirus formulado. Cossentine y Jensen (2004) tampoco encontraron un incremento significativo de la eficacia de un granulovirus de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) al incorporar algunos aceites en su formulación.

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

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

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



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

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

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

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

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

### Literatura citada

- ALCÁZAR, J.; CERVANTES, M.; RAMAN, K. 1992. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *P. operculella*. Revista Peruana de Entomología 35: 107-111.
- BURAND, J.; PARK, E. 1992. Effect of nuclear polyhedrosis virus infection on the development and pupation of gypsy moth larvae. Journal of Invertebrate Pathology 60: 171-175.
- CABALLERO, P.; LÓPEZ-FERBER, M.; WILLIAMS, T. 2001. Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Editorial M. V. Phytoma. España. 518 p.
- COOPER, V.; REISKIND, M.; MILLER, J.; SHELTON, K.; WALTHER, B.; ELKINTON, J.; EWALD, P. 2002. Timing of transmission and the evolution of virulence of an insect virus. Proceeding of Biological Sciences 269 (1496): 1161-1165.
- COSENTINE, J.; JENSEN, L. 2004. Persistence of a commercial codling moth granulovirus product on apple fruit and foliage. Journal of Entomological Society of British Columbia 101: 87-92.
- DEAN, B.; NISHRY, J. 1965. Scoring and profitability models for evaluating and selecting engineering products. Operations Research 13 (4): 550-569.
- GAMBOA, M.; NOTZ, A. 1990. Biología de *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa (*Solanum tuberosum*). Instituto de Zoología Agrícola, Facultad de Agronomía, UCV. Apartado 4579 Maracay 2101<sup>a</sup>. Venezuela: 1-9.
- GÓMEZ, J. 2005. Búsqueda y selección de aislamientos nativos de granulovirus para el control de *Tecia solanivora* (Povolny) (Le-

- pidoptera: Gelechiidae) en cultivos de Papa en Cundinamarca. Trabajo de grado. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 139 p.
- HERNIOU, E.; OLSZEWSKI, J.; CORY, J.; O'REILLY, D.; CORY, S. 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect hosts. *Journal of Virology* 78 (7): 3244-3251.
- LÉRY, X.; VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; ZEDDAM, J-L.; COTES, A.; LÓPEZ-FERBER, M. 2008. Analysis of several Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora*: Detection of a new variable region in the PhopGV genome. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin* 31: 83.
- LÓPEZ-ÁVILA, A. 1996. Capítulo III. Plagas y enfermedades. Insectos plagas del cultivo de la papa en Colombia y su manejo, pp. 146-154. En: *Papas Colombianas con el mejor entorno ambiental*. Editora Comunicaciones y Asociados Ltda. Bogotá. Colombia. 268 p.
- LLANDERAL, C. 1993. Definición de instares larvales de *Phthorimaea operculella* por medición de la cápsula cefálica. *Agrociencia. Serie Protección Vegetal* 4 (2): 179-186.
- MOSCARDI, F. 1999. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annual Review of Entomology* 44: 257-289.
- NAKAI, M.; SHIOTSUKI, T.; KUNIMI, Y. 2004. An entomopoxvirus and a granulovirus use different mechanisms to prevent pupation of *Adoxophyes honmai*. *Virus Research* 101: 185-191.
- NIÑO, L. 2004. Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa: 1-18.
- NIÑO, L.; NOTZ, A. 2000. Desarrollo y sintomatología de las larvas de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny, 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) infectadas por un virus Granulosis nativo. *Boletín Entomológico Venezolano* 15 (1): 29-38.
- PARNELL, M.; GRZYWACZ, D.; JONES, K.; BROWN, M.; ODUOR, G.; ONG'ARO, J. 2002. The strain variation and virulence of Granulovirus of diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus, Lep., Yponomeutidae) isolated in Kenya. *Journal of Invertebrate Pathology* 79: 192-196.
- SPORLEDER, M.; KROSCHER, J.; HUBER, J.; LAGNAOUI, A. 2005. An improved method to determine the biological activity (LC<sub>50</sub>) of the Granulovirus PoGV in its host *Phthorimaea operculella*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 116: 191-197.
- SUBRAMANIAN, S.; RABINDRA, R.; PALANISWAMY, S.; SATHIAH, N.; RAJASEKARAN, B. 2005. Impact of granulovirus infection on susceptibility of *Spodoptera litura* to insecticides. *Biological Control* 33: 165-172.
- TAHA, A.; NOUR, E.; CRORZIER, L.; FERBER, M.; CRORZIER, G. 2000. Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. *Virus Genes* 21 (3): 147-155.
- VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; GRIJALBA, E.; TORRES, L.; COTES, A.; LÓPEZ-ÁVILA, A.; BARRERA, G.; ZEDDAM, J.; HERRERA, L.; GÓMEZ, J. 2006. Reconocimiento, selección y evaluación de aislamientos nativos de virus de la Granulosis para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. *Boletín Técnico, Corpoica*. Editorial Produmedios. Bogotá. Colombia. 24 p.
- VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; GRIJALBA, E.; GÓMEZ, J.; COTES, A.; TORRES, L.; BARRERA, G.; LÉRY, X.; ZEDDAM, J. L. 2008. Isolation, identification and biocontrol activity of Colombian isolates of granulovirus from *Tecia solanivora* larvae. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes. IOBC/wprs Bulletin* 31: 85-88.
- ZAR, J. 1999. *Biostatistical analysis*. Cuarta edición. Prentice Hall. New Jersey. 663 p.
- ZEDDAM, J.; POLLET, A.; MANGOENDIHARJO, S.; RAMADHAN, H.; LÓPEZ, F. 1999. Occurrence and virulence of a Granulosis virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) populations in Indonesia. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 48-54.

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