

22443

2005

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

req. 55796
27 JUL. 2009

**BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE
GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora* (Povolny)
(Lepidoptera: Gelechiidae) EN CULTIVOS DE PAPA DE
CUNDINAMARCA**

JULIANA ANDREA GÓMEZ VALDERRAMA

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

Microbióloga Industrial

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D. C.
Agosto de 2005**

BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE
GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora* (Povolny)
(Lepidoptera: Gelechiidae) EN CULTIVOS DE PAPA DE CUNDINAMARCA

JULIANA ANDREA GÓMEZ VALDERRAMA

APROBADO

Laura Fernanda Villamizar Rivero
Q.F. M.Sc.
Director

Carlos Espinel Correal
Biólogo
Co-director

Amanda Varela
Bióloga M.Sc. PhD(c)
Jurado

Erika Grijalba
Q.F.
Jurado

BÚSQUEDA Y SELECCIÓN DE AISLAMIENTOS NATIVOS DE
GRANULOVIRUS PARA EL CONTROL DE *Tecia solanivora* (Povolny)
(Lepidoptera: Gelechiidae) EN CULTIVOS DE PAPA DE CUNDINAMARCA

JULIANA ANDREA GÓMEZ VALDERRAMA

APROBADO

Angela Umaña Muñoz M.Phil
Decana Académica

David Gómez Méndez M.Sc.
Director de carrera

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

A Dios, mi roca, mi luz y mi guía.

A mi mamá por ser el motivo y la razón de mi vida y por
quien estoy donde estoy.

A Fernando por ser mi fuerza y mi complemento.

A mi tía, ese ángel que me cargó con sus manitas
inolvidables y desde el cielo me sostuvo con sus alas.

AGRADECIMIENTOS

A Alba Marina Cotes Ph.D. Directora del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica-Tibaitatá, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo, por su apoyo en todos los aspectos y por inculcar en mí un pensamiento crítico, autónomo y abierto.

A Laura Villamizar Q.F. M.Sc., investigadora del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica-Tibaitatá y directora de este trabajo, por confiar en mí y permitirme trabajar con ella, por sus invaluable enseñanzas, su paciencia y sobre todo por su gran aporte en mi formación profesional y personal.

A Carlos Espinel, B.Sc. investigador del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica-Tibaitatá y codirector de este trabajo, por ser un soporte muy importante para este trabajo, por brindarme sus conocimientos y por apoyarme incondicionalmente.

A Gabriela Perdomo y Juan Alberto Arias, auxiliares del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica-Tibaitatá, por su inmensa ayuda y sobre todo por su paciencia.

Al grupo de profesionales investigadores del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica-Tibaitatá por sus aportes a este trabajo y su apoyo.

Al grupo de estudiantes del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica-Tibaitatá, por cuidarme, escucharme y apoyarme y por dejarme aprender tanto de sus vidas.

A Jesús Gómez por su valiosa ayuda en los viajes y la recolección de muestras.

Al Jean-Louis Zeddám Ph.D., investigador del Instituto Francés de Investigaciones para el Desarrollo (IRD) especialista en Virología de Insectos por sus observaciones, recomendaciones y gran aporte intelectual para el desarrollo de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
1. INTRODUCCIÓN -----	16.
2. MARCO TEÓRICO -----	19.
2.1. LA PAPA -----	19.
2.1.1. Generalidades del cultivo de la papa -----	19.
2.1.2. El cultivo de la papa en Colombia -----	20.
2.2. LA POLILLA DE LA PAPA -----	21.
2.2.1. Clasificación taxonómica -----	21.
2.2.2. Origen y distribución geográfica -----	21.
2.2.3. Biología y comportamiento -----	22.
2.2.3.1. Huevo -----	23.
2.2.3.2. Larva -----	24.
2.2.3.3. Pupa -----	25.
2.2.3.4. Adulto -----	26.
2.2.4. Ciclo Biológico -----	27.
2.2.5. Daño -----	27.
2.2.6. Fluctuación de la población -----	29.
2.2.7. Estrategias de manejo integrado de la polilla -----	30.
2.2.7.1. Control Cultural -----	30.
2.2.7.2. Control Etológico(feromonas) -----	31.
2.2.7.3. Control Químico -----	31.
2.2.7.4. Control biológico -----	32.
2.3. BACULOVIRUS -----	36.
2.3.1. Generalidades -----	36.
2.3.2. Antecedentes -----	37.
2.3.3. Clasificación -----	41.

2.3.4. El virus de la Granulosis -----	42.
2.3.4.1. Morfología -----	44.
2.3.4.2. Modo de acción del virus en larvas de la polilla -----	47.
2.3.4.3. Sintomatología de larvas infectadas -----	49.
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN -----	52.
3.1. FORMULACION DEL PROBLEMA -----	52.
3.2. JUSTIFICACIÓN -----	52.
4. OBJETIVOS -----	54.
5. MATERIALES Y METODOLOGÍA -----	55.
5.1. UBICACIÓN -----	55.
5.2. MATERIAL BIOLÓGICO -----	55.
5.2.1. Material entomológico -----	55.
5.2.2. Material Vegetal -----	55.
5.2.3. Microorganismos -----	55.
5.3. RECOLECCIÓN DE LARVAS EN EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA -----	56.
5.4. PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES VIRALES -----	57.
5.5. DETERMINACIÓN DE LA POSIBLE PRESENCIA DE GRANULOVIRUS -----	57.
5.6. PROPAGACIÓN VIRAL -----	58.
5.7. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN -----	59.
5.8. COLORACIÓN DE LOS GRÁNULOS -----	60.
5.9. ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE GRANULOVIRUS -----	61.
5.10. PURIFICACIÓN DEL VIRUS -----	62.
5.11. ELECTROFORESIS SDS PAGE -----	64.
5.12. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS -----	66.
5.12.1. Preparación de las suspensiones virales -----	66.

5.12.2. Montaje del bioensayo -----	67.
5.12.3. Diseño experimental y análisis estadístico -----	69.
5.13. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO PROMEDIO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN PRODUCIDOS POR MILIGRAMO DE LARVA -----	69.
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	71.
6.1. RECOLECCIÓN DE LARVAS -----	71.
6.2. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GRANULOVIRUS -----	74.
6.3. PROPAGACIÓN VIRAL -----	79.
6.4. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN -----	86.
6.5. COLORACIÓN DE LOS GRÁNULOS -----	88.
6.6. ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE GRANULOVIRUS -----	96.
6.7. PURIFICACIÓN DEL VIRUS -----	99.
6.8. ELECTROFORESIS SDS PAGE -----	101.
6.9. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS -----	104.
6.10. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO PROMEDIO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN PRODUCIDOS POR MILIGRAMO DE LARVA -----	110.
7. CONCLUSIONES -----	116.
8. RECOMENDACIONES -----	117.
9. BIBLIOGRAFÍA -----	118.
ANEXOS -----	128.

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Estados de desarrollo de la polilla guatemalteca de la papa <i>Tecia solanivora</i> . -----	22.
Figura 2. Huevos de <i>Tecia solanivora</i> -----	23.
Figura 3. Larvas de <i>Tecia solanivora</i> -----	25.
Figura 4. Pupa de <i>Tecia solanivora</i> -----	25.
Figura 5. Adulto de <i>Tecia solanivora</i> -----	26.
Figura 6. Daño provocado por larvas de <i>Tecia solanivora</i> -----	28.
Figura 7. Características morfológicas de los granulovirus -----	46.
Figura 8. Esquemmatización del modo de acción de un baculovirus -----	51.
Figura 9. Procedimiento para purificación de granulovirus -----	64.
Figura 10. . Unidad experimental con tubérculo tratado con aislamientos sin formular y formulados -----	69.
Figura 11. Hemolinfa de un insecto infectado con la cepa de granulovirus del Perú observado al microscopio de campo oscuro -----	75.
Figura 12. Muestras con posible infección por granulovirus observadas al microscopio de campo oscuro -----	76.
Figura 13. Determinación de cuerpos de inclusión en las muestras de larvas de <i>T. solanivora</i> colectadas en el departamento de Cundinamarca por la técnica de microscopía de campo oscuro -----	78.
Figura 14. Sintomatología exhibida por larvas de <i>T. solanivora</i> afectadas por los diferentes aislamientos del virus de la granulosis -----	82.
Figura 15. Cepa de granulovirus PhoGV del Perú antes y después del tratamiento con KOH -----	86.
Figura 16. Aislamiento C01-26 antes y después del tratamiento con KOH -----	88.

Figura 17. Coloración con Azocarmine G realizada a la hemolinfa de larvas de <i>T. solanivora</i> (a). Larva sana. (b). Larva infectada con PhoGV del Perú. -----	90.
Figura 18. Coloración con Azocarmine G realizada a la hemolinfa de larvas de <i>T. solanivora</i> (C04-04 y C06-11) -----	91.
Figura 19. Coloración con Azocarmine G de la hemolinfa de una larva infectada con el aislamiento C01-26-----	94.
Figura 20. Curva de calibración para cuantificación de granulovirus ----	97.
Figura 21. Fracciones obtenidas después de someter la suspensión viral a centrifugación en gradiente de sacarosa -----	100.
Figura 22. Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida de los diferentes aislamientos de granulovirus-----	103.
Figura 23. Porcentajes de eficacia de los aislamientos nativos de granulovirus formulados y son formular sobre larvas de <i>T. solanivora</i> -----	105.

LISTA DE TABLAS

	Páginas
Tabla 1. Información nutricional de la papa -----	19.
Tabla 2. Duración del ciclo de vida de <i>Tecia solanivora</i> en diferentes condiciones ambientales -----	27.
Tabla 3. Enemigos naturales de la polilla guatemalteca de la papa en Colombia -----	34.
Tabla 4. Algunos Insecticidas a base de baculovirus registrados -----	38.
Tabla 5. Subgrupos de baculovirus y sus principales características -----	41.
Tabla 6. Características del diseño experimental empleado -----	69.
Tabla 7. Resultados de la recolección de larvas de <i>T. solanivora</i> en el departamento de Cundinamarca y principales condiciones ambientales de los municipios de muestreo -----	72.
Tabla 8. Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión Mediante microscopía de campo oscuro de las muestras recolectadas en Cundinamarca -----	77.
Tabla 9. Reproducción de síntomas virales en larvas de 1° ínstar de <i>T. solanivora</i> -----	80.
Tabla 10. Muestras seleccionadas por presentar resultados positivos en la reproducción de síntomas virales y municipio de procedencia de cada una -----	80.
Tabla 11. Producción de cuerpos de inclusión de los aislamientos nativos de granulovirus sobre larvas de <i>T. solanivora</i> -----	111.

RESUMEN

En el presente trabajo se buscaron cepas nativas de granulovirus en los principales municipios paperos del departamento de Cundinamarca, encontrándose tres cepas provenientes de los municipios de Chocontá, Mosquera y Carmen de Carupa, las cuales fueron identificadas por diferentes métodos. Estos aislamientos se evaluaron bajo condiciones de laboratorio y se compararon con la cepa peruana, utilizándolos tanto sin formular como formulados. Los virus nativos formulados presentaron porcentajes de eficacia entre 88% y 100%, mientras que para el aislamiento peruano se obtuvo el 88%. Estos resultados fueron significativamente diferentes de los obtenidos con los aislamientos sin formular, para los cuales los porcentajes de eficacia estuvieron entre el 36% y el 86%. También se comparó la cantidad de cuerpos de inclusión producidos por miligramo de larva con cada uno de los aislamientos, no presentándose diferencias significativas entre los aislamientos, con lo que se obtuvo un rendimiento promedio de 4.4×10^7 CI/mg de larva. Los resultados obtenidos permitieron concluir que la formulación favoreció la actividad biocontroladora de los virus evaluados. Además se estableció que todos los virus en estudio se multiplican en similar cantidad en el tejido larval, haciéndolos rentables desde el punto de vista de producción masiva del bioplaguicida. El aislamiento nativo proveniente de Mosquera (Cundinamarca) fue seleccionado por ser el más virulento para el futuro desarrollo de un bioplaguicida.

ABSTRACT

On this research looked for native strains of granulovirus in the main potato producer cities in Cundinamarca. Three strains from the cities of Chocontá, Mosquera and Carmen de Carupa, which were obtained from Chocontá, Mosquera y Carmen de Carupa . They were identified by different methods, evaluated under laboratory conditions and compared with the Peruvian strain. Virulence of the strains was then compared by using the viruses with and without formulation. The formulated isolation presented the highest efficacy with results between 885 and 1005, while the Peruvian isolated obtained 88%. These results were significantly different from the isolations without formulation, for which the percentage of efficacy were between 36% and 86%. Occlusion bodies production between strains was compared and the average yield was 4.4×10^7 CI/mg larva, without significant differences between the isolations. The results allow to conclude that formulation favored the activity of biocontrol of the assessed virus. The native isolations from Mosquera and Carmen de Carupa (Cundinamarca) was selected because their high biocontrol activity for continuing with the biopesticide development.

1. INTRODUCCIÓN

La importancia del cultivo de papa en Colombia es indudable por muchas razones, dentro de las que se destacan las 180.000 ha cultivadas, su peso en la canasta familiar y la generación de empleo que representa. Sin embargo, este cultivo es atacado por un gran número de insectos plaga y enfermedades que afectan la producción, dañan la calidad y demeritan el producto.

Dentro de las plagas más importantes se destacan las polillas de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) y *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) por el impacto causado al cultivo. Las larvas de estos insectos causan daños severos a los tubérculos, tanto a nivel de campo como en almacenamiento, pudiendo causar pérdidas hasta del 100% de la cosecha.

La polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) fue descrita por primera vez en Guatemala y ha sido reportada en varios países de Centro y Suramérica. Apareció por primera vez en Colombia en 1987 en el departamento de Norte de Santander. Sin embargo, sólo se le consideró como un grave problema sanitario en 1994, cuando comenzó a golpear severamente los cultivos de la zona papera del departamento de Boyacá. Desde entonces, en épocas especialmente de poca humedad, es considerada la principal plaga del cultivo, condición que afecta la calidad de la producción.

Generalmente, el control de este insecto plaga se ha basado en productos químicos, los cuales han sido ineficientes, además de los problemas de su uso indiscriminado, el cual conlleva riesgo de alta contaminación ambiental. Por esta razón, surge la necesidad de desarrollar alternativas de bajo costo y de bajo impacto ambiental que aseguren el control de la polilla y puedan ser incluidas dentro de un programa de manejo integrado de plagas.

El uso de virus entomopatógenos para el control de varias plagas agrícolas se ha considerado una opción eficaz y sin riesgos para la salud humana ni para el ambiente en general. Los virus de la poliedrosis nuclear (VPN) y de la granulosis (VG), pertenecientes al género Baculovirus, han sido muy estudiados y caracterizados por ser patógenos eficientes de artrópodos, especialmente insectos y por presentar cuerpos de inclusión que los hacen resistentes a las condiciones medio ambientales.

Desde 1964, en varios países del mundo como Australia, Perú, y Bolivia entre otros, se ha reportado la presencia de un virus de la granulosis infectando larvas de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller), especie estrechamente relacionada con *T. solanivora* (Povolny). Estos virus han sido aislados y ampliamente investigados con el fin de ser utilizados para el control de estas plagas, mediante el desarrollo de tecnologías de producción de bioplaguicidas. Por ejemplo, el Centro Internacional de la Papa (CIP) en el Perú desarrolló un bioplaguicida a base de un aislamiento del granulovirus de *P. operculella* que se aplica en condiciones de almacenamiento de semilla de papa para el control de *P. operculella*. La aplicación de este producto produce hasta el 98% de mortalidad de las larvas de la polilla.

Por otra parte, en Venezuela en 1992, se hallaron en el estado de Mérida larvas de *T. solanivora* afectadas por un virus de la granulosis, el cual se aisló y está siendo estudiado con miras al desarrollo de una alternativa de control de la plaga.

En Colombia, en el año 2000 Corpoica se enfrentó al reto de producir un bioplaguicida a base de Baculovirus para responder a la emergencia sanitaria causada por la polilla guatemalteca *T. solanivora*. Inicialmente se obtuvo la cepa del granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú y se adaptó la

tecnología de formulación desarrollada por el CIP; este producto se encuentra en proceso de registro.

Aunque el virus de la granulosis aislado inicialmente de *P. operculella* puede infectar larvas de otras polillas como *T. solanivora*, la búsqueda y aislamiento de cepas nativas de granulovirus a partir de larvas de *T. solanivora* permitiría contar con un virus más adaptado a este hospedero y posiblemente más eficiente para su control. Además, el trabajar con aislamientos nativos permite utilizar organismos adaptados a las condiciones ambientales de nuestro país y aprovechar la biodiversidad que en éste se encuentra.

Considerando las ventajas que presenta el trabajar con organismos aislados del mismo insecto por controlar, la utilización de cepas nativas del ecosistema donde serán aplicados y contar con una colección de organismos biocontroladores identificados, en el presente trabajo se buscaron y seleccionaron aislamientos nativos de granulovirus para el control de *T. solanivora*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. LA PAPA

2.1.1. Generalidades del cultivo de la papa

La papa es una planta dicotiledónea herbácea anual de la familia de las solanáceas. El tubérculo se puede considerar como una parte del tallo adaptado para almacenar reservas y para la reproducción (Contreras 1998).

La papa es cultivada en muchos países del mundo y su importancia económica se incrementa continuamente en proporción al aumento de la población humana (El Correo de la Papa 2002a). Este tubérculo ocupa una posición única entre los cultivos alimenticios básicos del mundo tales como trigo, arroz, maíz, cebada, millo, avena y centeno, porque en una extensión más reducida se produce en mayor cantidad que cualquiera de las gramíneas cultivadas (Luján 1970).

Desde el punto de vista nutricional la papa es una fuente económica de almidón, proteína y también contiene vitaminas y minerales (tabla 1).

Tabla 1. Información nutricional de la papa

Agua	65 – 85%
Hidratos de carbono	15 – 28%
Proteínas	1 – 4%
Grasa	0.05 – 0.09%
Cenizas	0.5 – 1.5%

Fuente: Contreras 1998

2.1.2. El Cultivo de la Papa en Colombia

Dentro de la actividad agropecuaria nacional se destaca el cultivo de papa tanto por los aspectos directamente relacionados con su explotación, como por la variada cantidad de actividades que se generan en torno a este producto. En forma directa se puede considerar como un gran promotor de otros sectores de la economía como el transporte, la industria de alimentos, agroquímicos y empaques entre otras (Moreno *et al.* 1998).

En cuanto al área ocupada, el cultivo de la papa dispone del 11% de la extensión ocupada en cultivos transitorios, ubicándose principalmente en la zona fría andina donde es eje de los principales sistemas de producción (Moreno *et al.* 1998; El Correo de la Papa 2001).

Las zonas productoras de Colombia se encuentran distribuidas en 14 departamentos dentro de los cuales se destacan por su importante contribución en la producción nacional: Cundinamarca, Boyacá, Nariño y Antioquia, cuyos aportes suman alrededor del 89% de la producción nacional anual. Alrededor de 90.000 familias se encuentran vinculadas con la explotación directa de este cultivo, mientras que la demanda por jornales puede ascender a unos 20 millones al año. Los cultivos se encuentran diseminados en climas con temperaturas entre 8°C y 18°C y alturas de 1.000 msnm y 3.500 msnm (Moreno *et al.* 1998).

La papa es un producto de consumo masivo por parte de la población colombiana, especialmente en la dieta de los estratos de menores ingresos. En general se ha estimado que el consumo *per capita* de papa en el país en los últimos años se encuentra alrededor de los 71 Kg/ persona / año (Moreno *et al.* 1998).

2.2. LA POLILLA DE LA PAPA

2.2.1. Clasificación Taxonómica

Según Araque y García (1999) la clasificación taxonómica de la polilla guatemalteca de la papa es la siguiente:

CLASE:	Insecta
ORDEN:	Lepidoptera
SUB-ORDEN:	Dytrisia
SUPERFAMILIA:	Tineoideae
FAMILIA:	Gelechiidae
TRIBU:	Gnorimoschemini
GÉNERO:	<i>Tecia</i>
ESPECIE:	<i>Tecia solanivora</i>

2.2.2. Origen y Distribución Geográfica

La polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*) fue descrita por primera vez en Guatemala en 1973 por Dalibor Povolny (Araque y García 1999) con base en unos especímenes enviados de Guatemala y ha sido reportada en Costa Rica, Guatemala, Panamá, Honduras, Venezuela, Colombia y Ecuador (Sotelo 1997).

En 1983 se dispersó de su centro de origen hasta Suramérica debido a la importación de semilla de papa proveniente de Costa Rica hacia el estado de Táchira (Venezuela). En este país se encuentra en tres de los cuatro estados más importantes en cuanto a producción de papa. En 1985 se constató su presencia en el departamento de Norte de Santander en Colombia y en 1994 se encontraron porcentajes de daño entre 10 y 40% en el Departamento de Cundinamarca. En 1996 se localizó en Ecuador y en 1999 se detectó en la zona noroeste de Tenerife, Islas Canarias en España (Niño 2004).

En nuestro país, *T. solanivora* se ha adaptado a las diferentes condiciones agroecológicas que presentan las regiones productoras de papa, las cuales se encuentran entre los 1.800 a 3.200 msnm, temperaturas entre 6 y 24°C, precipitaciones entre 500 a 2500 mm y humedad relativa entre 60 y 100% (Araque y García 1999).

2.2.3. Biología y Comportamiento

Tecia solanivora presenta un ciclo de vida holometábolo al igual que todas las especies pertenecientes al orden Lepidoptera, es decir, que pasa por los estadios de huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1) (Pedigo 2002).

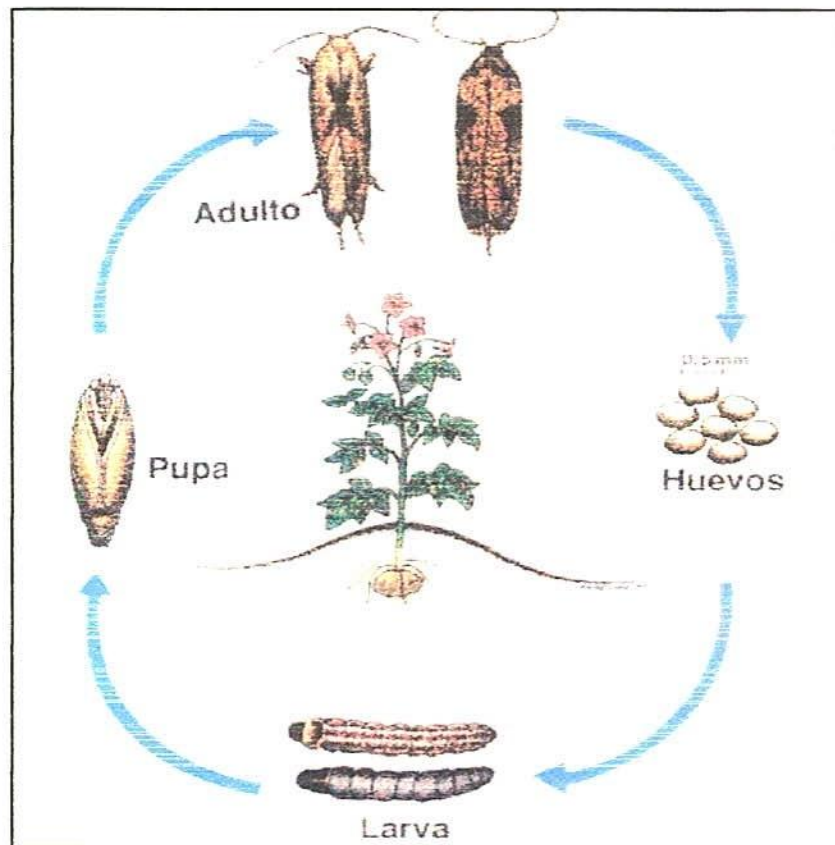


Figura 1. Estados de desarrollo de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Tomado de: Palacios 1997.

2.2.3.1. Huevo

Los huevos de *T. solanivora* son de forma ovalada casi redondeada, miden en promedio 0,53 mm de largo y 0,41 mm de ancho. Recién puestos son de color blanco aperlado, y a medida que avanza la incubación se tornan de color amarillo y luego marrón oscuro al acercarse la eclosión que ocurre de 9 a 15 días después de la postura (Figura 2) (Sotelo 1997, López-Ávila y Espitia 2000).

Los huevos son colocados en masa o en grupos cuando hay presencia de tubérculos. En campo se encuentran en grupos pequeños sobre las hojas bajas de la planta, en el cuello de la raíz, base del tallo y sobre el área de tuberización; en almacenamiento los huevos son colocados sobre los tubérculos cerca de los ojos o en cualquier cavidad o lugar protegido (Araque y García 1999, López-Ávila y Espitia 2000).



Figura 2. Huevos de *Tecia solanivora*.

2.2.3.2. Larva

Del huevo emerge una larva de 1 mm de largo. Las larvas son de tipo erusciforme o forma de gusano con cabeza esclerotizada con tres pares de patas torácicas, cuatro pares de pseudopatas y un par anal (Figura 3). En el interior del tubérculo pasan por cuatro instares larvales (Sotelo 1997).

Las larvas de primer ínstar penetran en el tubérculo a través de un diminuto orificio que abren con sus mandíbulas y comienzan a alimentarse de la pulpa del tubérculo. Miden de 1,2 a 1,4 mm de largo, son de color blanco transparente y con cabeza y escudo protorácico de color marrón oscuro. Este estado es muy susceptible a la luz solar, al agua y polvos finos que se le pueden pegar y envolver su cuerpo ocasionando deshidratación. Las larvas de segundo ínstar son de color blanco crema y hacen minas superficiales en el tubérculo. Las del tercer ínstar son de color amarillo verdoso, con puntos más visibles y se caracterizan por hacer galerías profundas y por ser el estado más voraz. En el cuarto estadio alcanzan en promedio 14 mm de largo- y 2,5 mm de ancho, adquieren una coloración violácea en la parte dorsal y crema con visos verdes en el aspecto ventral (Sotelo 1997, López-Ávila y Espitia 2000, Araque y García 1999).

Después que la larva ha completado su desarrollo deja de alimentarse, sale del tubérculo y se ubica en un sitio aledaño al suelo, empaques, paredes de almacén o eventualmente en la superficie del tubérculo; allí construye un capullo con seda al cual se adhieren partículas del substrato presente (López-Ávila y Espitia 2000).

El estado larval de *T. solanivora* se caracteriza por presentar puntos o manchas de color negro en cada segmento torácico y abdominal, lo que la diferencia de las larvas de *P. operculella*, principalmente en los tres primeros instares (Araque y García 1999).

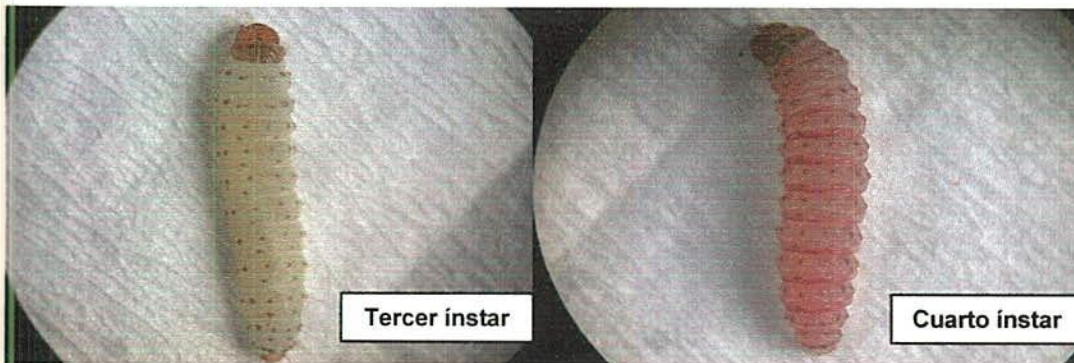


Figura 3. Larvas de *T. solanivora*.

2.2.3.3. Pupa

Se forma dentro del capullo elaborado por la larva. Es de tipo obtecta y exhibe una coloración café rojiza que se va oscureciendo conforme madura (López-Ávila y Espitia 2000).

Miden en promedio, en el caso de la hembra, 8,52 mm de largo por 2,95 mm de ancho. La pupa macho mide 7,83 mm de largo por 2,42 mm de ancho (Figura 4). Empupa en el suelo, en las paredes del sitio de almacenamiento, en empaques o dentro del mismo tubérculo (Sotelo 1997).

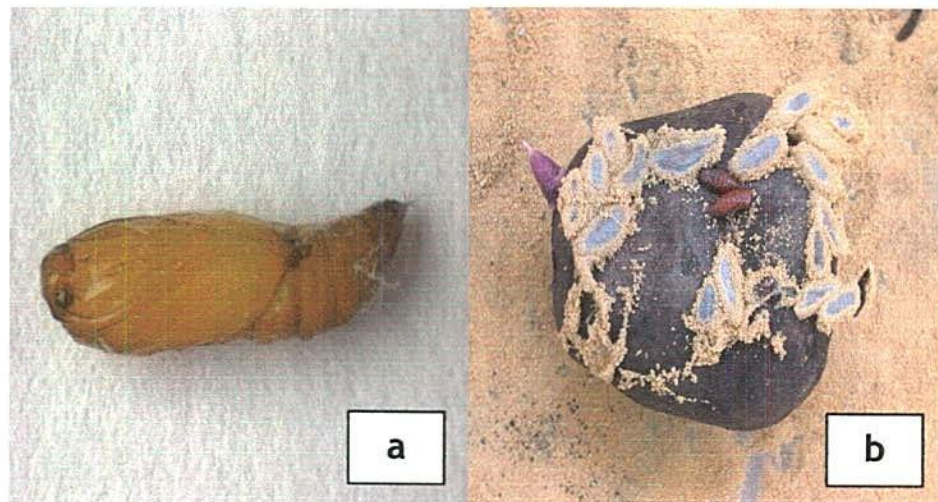


Figura 4. Pupa de *Tecia solanivora*. (a) Apariencia de la pupa vista en estereoscopio. (b) Formación de pupas en la superficie del tubérculo

2.2.3.4. Adulto

Es una polilla de color marrón oscuro en los machos y marrón claro en las hembras. La hembra mide 12 mm de largo por 3,4 mm de ancho mientras el macho mide 9,7 por 2,9 mm. Poseen una cabeza poblada de escamas, palpos labiales largos y recurvados hacia arriba y antenas filiformes. Tienen las alas dispuestas en forma de techo en la posición de reposo, en la cual se observan unas líneas oscuras longitudinales de la base al ápice del ala (Figura 5). El abdomen de la hembra es abultado y en el macho es delgado (López-Ávila y Espitia 2000, Araque y García 1999).

Los adultos son difíciles de visualizar por el mimetismo con el suelo, son muy sensibles a la luz y por eso durante el día permanecen ocultos debajo de los terrones en el suelo, en los arrumes de papa en los almacenes o debajo de objetos. Durante la noche son muy activos, copulan y ovipositan sobre o muy cerca de los tubérculos. La hembra pone entre 180 y 235 huevos durante su vida dependiendo de su alimentación en su estado larval; cerca del 80% de posturas las hace durante sus diez primeros días de vida (Sotelo 1997, Araque y García 1999).



Figura 5. Adulto de *Tecia solanivora*.

2.2.4. Ciclo Biológico

El ciclo de vida está influenciado por la temperatura y la variedad de papa de la cual se alimentan las larvas; a temperaturas más altas el ciclo de vida se acorta. En la tabla 2 se presenta la duración en promedio del ciclo de vida de *T. solanivora*, con base en las condiciones ambientales predominantes en tres zonas paperas del país.

Tabla 2. Duración del ciclo de vida de *Tecia solanivora* en diferentes condiciones ambientales (En días)

	Pamplona (Norte de Santander)	La Selva (Antioquia)	Tunja (Boyacá)
Altura (msnm)	2287	2200	2787
Temperatura (°C)	12-20	16	12-14
Humedad Relativa (%)	78 - 83	78 - 83	44 - 58
Huevo (días)	8-10	10	13-15
Larva (días)	22	20	26
Pupa (días)	15-18	20	23
Adulto (días)	20	20-25	20-25
CICLO TOTAL	65-70	70-75	86-93

Tomado y modificado de: Sotelo 1997.

2.2.5. Daño

Según Torres *et al.* (1997) cuando la larva de *T. solanivora* emerge del huevo se dirige directamente al tubérculo, donde empieza a perforarlo formando galerías a través de este, dejando excrementos, residuos de alimento y exuvias larvales. A medida que crece se hace más voraz, provocando un mayor daño (Figura 6a).

La herida que ocasiona la larva al tubérculo facilita la entrada de microorganismos que pueden causar su pudrición (Figura 6b) (Ben Salah y Aalbu 1992).

El ancho de la galería está en relación con el desarrollo larval; en el primer ínstar el ancho de la galería es de 1,28 mm y en el cuarto ínstar es de 3,84 mm de ancho (Torres *et al*, 1997). Sotelo (1997) menciona que el daño se puede confundir fácilmente con el de *Phthorimaea operculella*, la otra polilla minadora de la papa, con la diferencia de que ésta deja excrementos en los sitios por donde se inicia la perforación del tubérculo.

Los mayores daños ocurren cuando se tiene papa en almacenes rústicos durante varios meses bajo condiciones de temperatura ambiental. En estos casos los daños oscilan entre 30 a 86% pudiendo llegar a 100% en algunos lugares (Alcázar y Raman 1992).

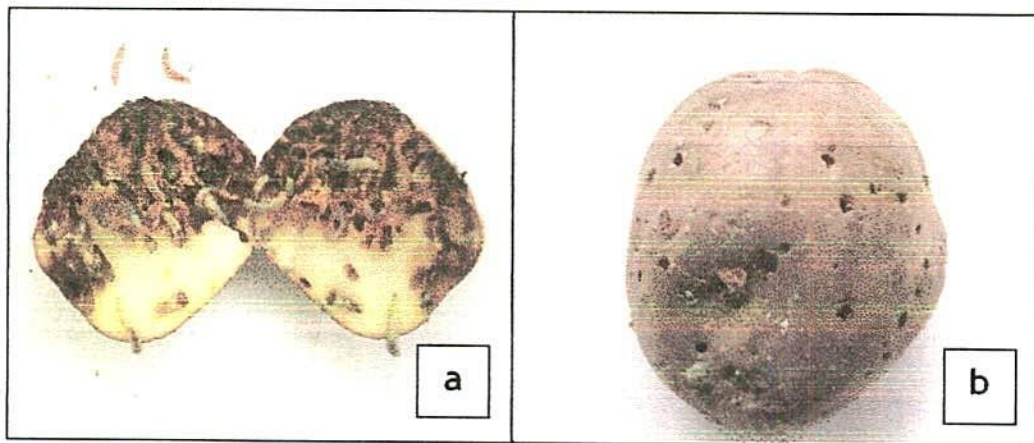


Figura 6. Daño provocado por larvas de *Tecia solanivora*. **(a)** En el interior del tubérculo. **(b)** Apariencia de un tubérculo afectado por la plaga exhibiendo los orificios de salida de las larvas.

2.2.6. Fluctuación de la Población

Las variaciones en la densidad de la población de *T. solanivora* dependen de las condiciones climáticas, siendo la precipitación el factor más influyente, así como la presencia de cultivos de papa y el manejo de los mismos y las fuentes de infestación en el área, principalmente los residuos de cosecha (Niño 2004).

Barreto *et al.* (2003) realizaron estudios sobre la fluctuación de la población de adultos de *T. solanivora* y señalan que existe correlación entre la captura de polillas y las variables climáticas: a menor altitud es mayor la captura, a mayor precipitación es menor la captura y a menor temperatura menor captura. Esto se reitera en estudios realizados por Corredor y Flórez (2003) y Ñuztez *et al.* (1999), quienes observaron una mayor densidad poblacional de la plaga en los períodos más secos, mientras que las bajas densidades de la polilla se asociaron con altas precipitaciones.

En cuanto a la presencia de la plaga relacionada con el estado fenológico del cultivo, se sabe que la infestación de larvas se inicia con la tuberización y se va incrementando a medida que aumenta el peso fresco del tubérculo. En los bordes de las parcelas se observan los peores daños; no obstante, a medida que se desarrolla el cultivo y las poblaciones de polilla se incrementan, el área central de las parcelas también es afectada (Galindo y Español 2003).

La plaga no solamente hace su ataque durante la época de tuberización y maduración del cultivo sino que también afecta la papa que se almacena para semilla o para consumo (Sotelo 1997). La infestación inicial ocurre justo antes y durante la cosecha y es causada por huevos presentes en el suelo o sobre los tubérculos (Ben Salah y Aalbu 1992) y las condiciones en las que se lleva a cabo el almacenamiento de la papa, como oscuridad y poca aireación, son ideales para la reproducción de *T. solanivora*.

2.2.7. Estrategias de Manejo Integrado de la Polilla

Se entiende el manejo integrado de plagas como una tecnología que utiliza medios combinados para reducir el nivel de una plaga determinada a niveles tolerables manteniendo el equilibrio ambiental, todo enmarcado dentro del conocimiento de esta (Pedigo 2002). Se han realizado numerosas investigaciones en las diferentes regiones productoras de papa a nivel mundial, donde las polillas de la papa se han establecido como una de las principales plagas del cultivo. Estas investigaciones, encaminadas a generar estrategias de manejo integrado de la polilla, incluyen prácticas culturales, químicas, etológicas y de control biológico, que buscan reducir los niveles de población de la plaga y con ello las pérdidas económicas (Sáenz 1997).

Para el caso específico de la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora* se tienen en cuenta las prácticas que se mencionan a continuación:

2.2.7.1. Control Cultural

Estas prácticas están dirigidas principalmente a destruir las fuentes de infestación de la plaga, crear condiciones desfavorables para el desarrollo de la plaga e interrumpir la sucesión de generaciones de los insectos. Según Sáenz (1997) y El Correo de la Papa (2002b) dentro de estas prácticas se encuentran:

- Buena preparación del suelo que elimine los estados inmaduros de la polilla y evite terrones o grietas que sirvan de refugio para los adultos.
- Siembra oportuna y profunda tapando bien la semilla.
- Aporque alto para que exista mayor distancia entre la superficie y los tubérculos, evitando su exposición al insecto.
- Mantener el suelo con suficiente humedad, lo cual impide el desarrollo del insecto y evita la formación de grietas en el suelo donde se puede esconder el adulto.
- Cosecha oportuna.

- Selección cuidadosa de tubérculos sanos y dañados al momento de la cosecha y destrucción de tubérculos dañados.
- Limpieza y desinfección del sitio de almacenamiento.
- Rotación de cultivos.

2.2.7.2. Control Etológico (feromonas)

Las feromonas sexuales son sustancias producidas por las hembras para atraer a los machos para copular. El uso de trampas de agua con feromona sexual, consiste en utilizar un pequeño dedal de goma o caucho impregnado con la feromona sexual sintética de *T. solanivora*, la cual atrae a los adultos machos de la polilla y al estar ubicado en un envase con agua y jabón permite capturar y destruir las polillas que caen en este recipiente (Araque 2000, Pedigo 2002).

El manejo de las poblaciones de la plaga con trampas cebadas con feromona sexual, hace que cuando el cultivo entra a las fases fenológicas de producción, engrosamiento y maduración de los tubérculos, las poblaciones fértiles de la plaga sean bajas y por consiguiente el daño; además, estas trampas se usan frecuentemente para monitorear y obtener información acerca de la plaga con el fin de tomar decisiones estratégicas de control como la aplicación de insecticidas (Araque 2000, Pedigo 2002, Niño 2004).

2.2.7.3. Control Químico

Aunque no existen insecticidas químicos específicos para la polilla guatemalteca de la papa, hasta hace muy pocos meses en Colombia se tenían 10 insecticidas con licencia de uso expedida por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) para el control de esta plaga, dentro de los que se encuentran: Curacron 500 EC, Eltra 48 EC, Larvin 375 SC, Lorsban 4 EC, Ofunack 40% EC, Orthene 75% SP, Pirestar 38 EC, Profitox 80 SP, Tess 50 EW y Trapper EC (El Correo de la Papa 2002c). Estos insecticidas fueron

aprobados temporalmente debido a la emergencia sanitaria producida por esta plaga; sin embargo, Arévalo y Castro (2003) durante los años 2000 a 2003 adelantaron pruebas de campo en Boyacá y Cundinamarca para evaluar la eficacia agronómica de estos productos y con base en los bajos niveles de control que presentaron sobre la plaga, el ICA se pronunció oficialmente dejando vigentes solamente los insecticidas Pirestar 38 EC, Orthene 75% SP, Lorsban 4 EC, Trapper EC y Curacron 500 EC.

Por otra parte, en otras regiones del mundo, Ben Salah y Aalbu (1992) han reportado que los insecticidas foliares como deltametrine usados antes de la cosecha no son efectivos en reducir la infestación posiblemente por la destrucción simultánea de los enemigos naturales de la polilla.

Como se puede ver, el control de *T. solanivora* fundamentado en insecticidas químicos ha sido insuficiente para controlar la plaga además de la alta contaminación ambiental que conlleva su uso indiscriminado y el incremento de resistencia por parte de la plaga; por estas razones, se hace necesario el desarrollo de métodos alternativos de control (Arévalo y Castro 2003).

2.2.7.4. Control Biológico

Se entiende el control biológico dentro de un programa de manejo integrado de plagas, como la utilización de parasitoides, depredadores y patógenos con el fin de reducir las poblaciones de una plaga a niveles que no causen pérdidas económicas (Sotelo 1997).

Dentro de este contexto se han realizado varios trabajos de búsqueda, reconocimiento y evaluación de posibles controladores biológicos para *T. solanivora*; sin embargo, a excepción de la utilización del granulovirus entomopatógeno de *P. operculella*, pocos agentes promisorios de control han sido identificados.

A comienzo de la década de los 90's fue encontrada y descrita una nueva especie de avispa denominada *Trichogramma lopezandinensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae), la cual comenzó a ser evaluada por diferentes investigadores con el fin de utilizarla como agente de control biológico de la polilla guatemalteca por ser parasitoide de huevos de diferentes lepidópteros. Los estudios demostraron que esta avispa es capaz de presentar sus estadíos de huevo, larva y pupa dentro de su hospedero (huevos de *T. solanivora*). En campo, liberaciones de 60 hembras del parasitoide cada 8 días presentaron un nivel de control de la plaga del 24%. En almacenamiento de tubérculos, la avispa presentó porcentajes de control de la plaga del 15% al 30% (López-Ávila *et al.* 2003).

En el 2000 se evaluó la actividad patogénica y de control de juveniles infectivos del nemátodo entomoparásito *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) cepa Colombia, sobre estados inmaduros de *T. solanivora* en condiciones de cultivo. El porcentaje de daño de tubérculos por la polilla no superó el 25%; sin embargo, la supervivencia del nemátodo en suelo no supera los 30 días, lo cual no garantiza su establecimiento (Parada y Luque 2003).

En cuanto a microorganismos patógenos, Pérez *et al.* (1997) reportaron la alta susceptibilidad de *T. solanivora* a las toxinas Cry IA producidas la bacteria *Bacillus thuringiensis*. Con base en esta información, Contreras (1998) caracterizó microscópica, bioquímica, molecular y biológicamente 100 aislamientos nativos de *B. thuringiensis* provenientes de siete regiones geográficas de Colombia para el control de la plaga. Se identificó y seleccionó la cepa BtC2950 que presentó una mortalidad del 80% contra larvas de primer ínstar de la polilla al cabo de 120 horas y se determinó la presencia de la proteína Cry1, la cual se sabe que tiene actividad contra lepidópteros. Esto lo confirman los estudios realizados por Martínez *et al.*

(2003) en los que la proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* presentó alta actividad tóxica más alta contra larvas de *T. solanivora*.

Feris y Gutiérrez (1999) evaluaron la actividad biológica de ocho cepas nativas de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisopliae* sobre huevos y larvas de primer ínstar de la polilla en condiciones de laboratorio. Se obtuvieron muy bajos porcentajes de mortalidad (de 5 a 18% para huevos y de 2 a 12% para larvas de primer ínstar) lo que indica la baja especificidad que presentan estos hongos contra la polilla y por ende la ineficiencia de su uso en un programa de manejo integrado de la plaga.

Otros autores han realizado un reconocimiento de los posibles enemigos naturales de *T. solanivora* en las principales zonas productoras de papa de nuestro país, encontrándose varias especies (Tabla 3).

Tabla 3. Enemigos naturales de la polilla guatemalteca de la papa en Colombia.

Nombre científico	Orden: familia	Tipo
<i>Apanteles</i> sp.	Hymenoptera: Braconidae	Parasitoide de larvas
<i>Trichogramma</i> <i>cerca pretiosum</i>	Hymenoptera: Trichogrammatidae	Parasitoide de huevos
<i>Trichogramma</i> <i>lopezandinensis</i>	Hymenoptera: Trichogrammatidae	Parasitoide de huevos
<i>Eriopis connexa</i> <i>connexa</i>	Coleoptera: Coccinelidae	Depredador de huevos
<i>Hypodynerus</i> <i>romandinus</i>	Hymenoptera: Vespidae	Depredador de larvas
<i>Buchannaniella</i>	Hemiptera:	Depredador de

<i>contigua</i>	Anthocoridae	huevos y larvas
<i>Lyctocoris campestris</i>	Hymenoptera: Trichogrammatidae	Depredador de huevos y larvas
<i>Lecanicillium sp.</i>	Moniliales: Moniliacea	Entomopat6geno

Tomado y modificado de: L6pez-6vila y Espitia 2000

En 1992, se hallaron en el estado de M6rida (Venezuela), larvas de *T. solanivora* afectadas por un virus de la granulosis, siendo este el primer enemigo natural de esta plaga observado en condiciones de campo en el pa6s. Ni6o y Notz (2000b) evaluaron cinco concentraciones de este virus encontrando que las concentraciones entre 1 a 50/l ocasionaron una mortalidad que fluctu6 entre el 71% y 100%, sin presentar diferencias significativas en la mortalidad larval obtenida con las diferentes concentraciones. Se encontr6 que en las dosis m6s altas hubo un menor crecimiento y desarrollo de las larvas infectadas, comparadas con las dosis m6s bajas en las cuales un mayor porcentaje de larvas enfermas se desarrollaron hasta el cuarto 6nstar y mantuvieron un consumo similar a las larvas sanas. A la luz de estos resultados seleccionaron la concentraci6n de 50 larvas/l para ser evaluada en los ensayos de formulaci6n del bioplaguicida en polvo formulado con talco (silicato de magnesio) o caol6n (silicato de aluminio) para ser utilizado en almacenamiento. Al ser este aplicado en dosis de 5 g/kg de tub6rculo ocasion6 una mortalidad larval que oscil6 entre el 97% y el 100%.

Actualmente en nuestro pa6s se est6 implementando el uso de un bioplaguicida en polvo para proteger la semilla de papa durante el almacenamiento, denominado "Baculovirus", cuyo principio activo consiste en el virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella*. Este bioplaguicida fue desarrollado por el Centro Internacional de la Papa en el Per6 y su tecnolog6a fue adaptada y modificada por la Corporaci6n Colombiana de

Investigación Agropecuaria Corpoica para su producción semicomercial. Con dicho producto se obtienen niveles de eficacia superiores al 90% según los controles de calidad realizados al producto terminado (Villamizar *et al.* 2005).

2.3. BACULOVIRUS

2.3.1. Generalidades

Los virus de insectos en general han sido estudiados por años debido a un interés intrínseco en el estudio de enfermedades de invertebrados y particularmente, debido a su potencial como agentes ambientalmente benignos en el manejo integrado de plagas, por tener un estrecho rango de hospederos y una elevada patogenicidad y virulencia, que son características ideales para un bioinsecticida. Actualmente se conocen más de 1.100 virus patógenos de invertebrados que afectan a un importante número de especies. La familia Baculoviridae es la más numerosa y ampliamente estudiada de todos los grupos de virus patógenos de insectos, no sólo por su potencial como agentes de control sino también por su papel importante como vectores de expresión de un gran rango de genes biológicamente activos (Evans y Shapiro 1990, Caballero *et al.* 2001).

Dentro de las características básicas de esta familia se puede mencionar que son virus ocluidos, en forma de bastón, con genoma DNA circular de doble cadena de un tamaño que oscila entre los 90 y 180 kpb (Herniou *et al.* 2003). Hasta la fecha, la mayoría de los baculovirus se han aislado principalmente de los órdenes Lepidoptera e Himenoptera y en menor número de Diptera, Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera, Neuroptera y Trichoptera (Luque *et al.* 2001).

La característica más prominente de los baculovirus es la formación de cuerpos de inclusión proteicos que los hace estables durante largos períodos de tiempo, por proteger al virus de la radiación UV y la desecación y además facilita su aplicación mediante pulverizaciones convencionales (Lewis 1989) ya que según Alcázar *et al.* (1992) las formulaciones más aplicables para el uso de virus patógenos de insectos son los polvos mojables y polvos secos.

La familia Baculoviridae puede subdividirse en dos géneros: los virus de la poliedrosis nuclear (VPN) y los virus de la granulosis o granulovirus (VG); ambos géneros se diferencian por la morfología (tamaño, forma y estructura) de sus cuerpos de inclusión y también en aspectos histopatológicos que son de interés taxonómico. Los VPNs forman cuerpos de inclusión grandes en forma de poliedro que contienen múltiples partículas virales, mientras que los VGs forman cuerpos de inclusión pequeños y ovoides llamados gránulos que generalmente contienen un solo virión (Caballero *et al.* 2001, Luque *et al.* 2001).

La mayoría del conocimiento acerca de los baculovirus se relaciona con el género de los virus de la poliedrosis nuclear; el género granulovirus ha sido menos estudiado, debido en parte a que sólo han sido detectados infectando algunos pocos insectos del orden Lepidoptera y a la falta de cultivos celulares apropiados para su estudio (Taha *et al.* 2000).

2.3.2. Antecedentes

El interés en enfermedades de insectos se remonta al siglo XVI cuando se describió formalmente la enfermedad del “marchitamiento de los gusanos”. Más adelante, en 1856 se observaron cuerpos refráctiles en el núcleo de células de insectos infectados con forma de poliedro que fueron relacionados con la enfermedad. Durante la segunda guerra mundial, Burgold descubrió a través de análisis químicos que los poliedros eran cristales compuestos de una matriz de un solo tipo de proteína al que llamó poliedrina. En 1947 se

observaron viriones con forma de vara, los cuales se sabían que eran característicos de la familia Baculoviridae. Luego, en 1970, Max Summer y Gale Smith usaron marcaje radiactivo y patrones de proteínas para demostrar la naturaleza viral del agente infeccioso (Lewis 1989; Christian *et al.* 1993; Herniou *et al.* 2003).

El primer intento exitoso de controlar un insecto plaga con un virus se dio a comienzos del siglo XX; se trató de un virus de la poliedrosis nuclear que fue usado para controlar la “mosca europea” *Gilpinia hercyniae* (Hymenoptera: diprionidae) en Canadá. Más adelante, en 1975, se registró el primer insecticida viral que fue el VPN de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: noctuidae), registrado bajo el nombre de Elcar™. Desde este éxito inicial un gran número de insecticidas virales han sido desarrollados (Christian *et al.* 1993) y registrados (Tabla 4).

Tabla 4. Algunos Insecticidas a base de baculovirus registrados

Organismo	Nombre comercial	Empresa - País	Plaga blanco
Virus de lepidópteros	Spod-X	Thermo Trilogy	Gusano de la Remolacha (<i>Spodoptera exigua</i>)
Virus de la polilla gitana	Gypcheck	U. S. Forest Service	Polilla gitana (<i>Lymantria dispar</i>)
Helicoverpa virus	Elcar	Syngenta	Gusano del maíz (<i>Helicoverpa zea</i>) y del tabaco (<i>Heliothis virescens</i>)
Virus de la polilla bacalao	Granupom	AgrEvo	Polilla de la manzana (<i>Cydia pomonella</i>)
<i>Orgyia pseudotsugata</i>	TM Biocontrol-1	Estados Unidos	<i>Orgyia pseudotsugata</i>

MVPN			
<i>Autographa californica</i> MVPN	SAN 404	Estados Unidos	<i>Autographa californica</i>
<i>Dendrolimus spectabilis</i> VPN	Matsukemin	Japón	<i>Dendrolimus spectabilis</i>
VPN de la polilla Douglas de los pinos	-----	U. S Forest Service	Polilla Douglas de los pinos (<i>Orgia pseudotsugata</i>)
<i>P. operculella</i> Granulovirus	<i>P. operculella</i> Granulovirus	CORPOICA (Proceso de registro)	Polillas de la papa (<i>Phthorimaea operculella</i> y <i>Tecia solanivora</i>)

Tomado y modificado de: EPA 2000 y Christian *et al.* 1993

En el ámbito nacional la investigación enfocada al aislamiento y uso de baculovirus para el control de plagas se remonta a 1989, año en el que se aisló en Colombia el primer baculovirus. Este fue un virus de la poliedrosis nuclear de tipo múltiple encontrado en larvas de *Eprosterna alaeasa* Dyar (Lepidoptera: Limacodidae), defoliador de Palma Africana (Pedraza *et al.* 1989).

También en la década de los 80's se observó una enfermedad atacando las larvas de gusano cachón de la yuca *Erinnys ello* (Lepidoptera: Sphingidae) en los lotes del CIAT, estando la plaga en condiciones naturales. Años más tarde se identificó el causante de la enfermedad como el granulovirus de *E. ello*, que se convirtió en un agente microbiológico potencial para el control de la plaga. Se desarrolló entonces un producto con este principio activo mediante un convenio entre el CIAT y BIOCARIIBE S.A., en colaboración con

el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (MADR). El producto presentó un porcentaje de control del 99.5% de las larvas que estaban entre el primero y el tercer ínstar, a las 96 horas de la aplicación (Arias *et al.* 2001).

A comienzos de los 90's, se reportó la polilla guatemalteca como la principal plaga de los cultivos de papa en zonas como Boyacá, Cundinamarca, Antioquia y Nariño. Por esta razón el Centro Internacional de la Papa (CIP) comenzó en un nuestro país un programa de capacitación en dos unidades piloto: El Santuario-Antioquia y Ventaquemada-Boyacá, con el fin de probar y demostrar el uso de baculovirus para el control de esta plaga en almacenamiento de semilla, utilizando una cepa del virus de la granulosis de *P. operculella* (Palacios y Cisneros 1996). A partir de ese momento, tanto en la Secretaria de Agricultura de Boyacá, como en algunas regionales de Corpoica se hicieron esfuerzos para producir de forma artesanal, cantidades significativas del producto a base de baculovirus; sin embargo, estas iniciativas no tuvieron continuidad ya que en ambos casos, se suspendió la producción del virus a pesar de que existía una amplia demanda por parte de los productores de papa, haciendo necesario implementar un proceso tecnológico de alta calidad con unos niveles de producción que pidieron estar disponibles para el control de la plaga. Por lo tanto, Corpoica en el Centro de Investigaciones Tibaitatá, estableció una planta de producción de este bioplaguicida (Cotes 2000; Villamizar *et al.* 2003).

A pesar de las ventajas que representa el uso de bioplaguicidas a base de baculovirus para el control de plagas frente al uso de insecticidas químicos, como la reducción en los riesgos de contaminación de ambiente, el uso de estos controladores biológicos no ha logrado implementarse de manera exitosa debido a la tasa lenta de muerte que presentan, dificultades al producirlos masivamente a bajo costos y de una forma fácil, percepciones

populares desfavorables de su seguridad, etc. Además, la evolución de resistencia de las plagas blanco se convierte en un problema creciente. (Christian *et al.* 1993).

2.3.3. Clasificación

La clasificación actual de la familia *Baculoviridae* incluye a todos aquellos virus cuyos viriones presentan una estructura en forma de varilla o bastón y que además, en un momento determinado del ciclo biológico, pueden ser incluidos en matrices de naturaleza proteica o cuerpos de inclusión (Caballero *et al.* 2001).

Dentro de esta familia, los baculovirus han sido clasificados en tres subgrupos de acuerdo a la presencia o ausencia de cuerpos de inclusión cubriendo los viriones, y si hay presencia, en el tamaño y la forma del cuerpo de inclusión (Tabla 5) (Carter 1984).

Tabla 5. Subgrupos de Baculovirus y sus principales características.

Subgrupo	Dimensiones del cuerpo de inclusión	Viriones por cuerpo de inclusión	Nucleocápsides por virión	Hospederos
Virus de la poliedrosis nuclear (VPN)				
Nucleocápside sencilla (SVPN)	0.8 – 15 µm	Varios	Única	Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Coleoptera, Trichoptera, Crustacea
Nucleocápsides múltiples (MVPN)	0.8 – 15 µm	Varios	Múltiples (De 1 a 39)	Lepidoptera

Virus de la granulosis	0.2 – 0.5 μm	Uno	Única	Lepidoptera
Baculovirus no ocluidos	No forma cuerpos de inclusión		Única	Coleoptera, Crustacea, Ácaros.

Tomado de: Carter 1984.

A pesar de la existencia dentro de la familia de un género de baculovirus no ocluidos, estos se han investigado por aparte debido a la ausencia del cuerpo de inclusión característico. Por otra parte, los géneros VPN y VG se pueden diferenciar principalmente por características morfológicas como tamaño, forma y estructura de sus cuerpos de inclusión y también en aspectos histopatológicos que son de interés taxonómico (Caballero *et al.* 2001). Los VPNs forman cuerpos de inclusión grandes en forma de poliedro mientras que los VGs forman cuerpos de inclusión pequeños y ovoides llamados gránulos (Luque *et al.* 2001).

En cuanto a la virulencia, los VPNs son más letales que los VGs y eso se evidencia en que las dosis letales 50 (DL_{50}) para granulovirus son mayores que para nucleopoliedrovirus; esta diferencia se debe principalmente a las diferencias estructurales de los virus ya que el género granulovirus presenta un solo virión por cada cuerpo de inclusión, mientras que los nucleopoliedrovirus contienen muchos viriones por cuerpo de inclusión (Lucarotti *et al.* 2004).

2.3.4. El virus de la granulosis

El virus de la granulosis (VG) pertenece al grupo de los Bergoldiavirus, Clase Artropodófora, Orden Artropodofogales, Familia Baculoviridae y género Baculovirus (Arias *et al.* 2001).

Los Granulovirus han sido aislados de más de 100 especies, todas ellas pertenecientes al orden Lepidoptera (Caballero *et al.* 2001). Una de las especies más estudiadas ha sido el virus de la granulosis que se ha encontrado en varios países infectando naturalmente larvas de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*, denominada PhoGV y ha sido considerado por la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO), por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por el Instituto de Virología de Oxford (IVO), como una alternativa promisoría que debe ser usada en programas de control integrado de plagas (Ben Salah and Aalbu 1992, CIP 1992).

A pesar de que el tiempo e intensidad de radiación solar pueden alterar la actividad biocontroladora del PhoGV (Sporleder *et al.* 2000), se han encontrado casos exitosos de control de *P. operculella* en diferentes países desde 1974, alcanzando porcentajes de mortalidad del 87% utilizando una dosis de 112 equivalente larvales/100ml en ensayos de laboratorio (Zeddani *et al.* 1999) y del 96% a una concentración de 4.89×10^6 CI/ml (Pérez *et al.* 1988). En Perú el PhoGV se ha empleado en forma de suspensión acuosa para aplicarse por aspersión y en forma de polvo seco para aplicación por espolvoreo. Esta formulación se ha utilizado para aplicar en campo alcanzando porcentajes de mortalidad larval entre el 70 y el 100%; así mismo, se ha encontrado una persistencia del virus de hasta 60 días después de la aplicación (CIP 1992).

Por otra parte, para el control de otra de las polillas de la papa (*Tecia solanivora*) se ha reportado también el virus de la granulosis, el cual ocasionó una mortalidad de las larvas expuestas al virus entre 98% y 100%, cinco días después de su aplicación formulado con talco y con caolín bajo condiciones experimentales de laboratorio (Niño y Notz 2000b).

2.3.4.1. Morfología del virus de la granulosis

- **Nucleocápside:** consiste en una cápside proteica que contiene el ADN y otras proteínas; su función es la de transportar la información genética del virus en forma altamente compactada hasta la célula hospedera. La nucleocápside tiene un tamaño que oscila entre 30-66 nm y 250-300 nm. Tiene un extremo obtuso y el otro con una estructura como un gancho, la cual se encuentra asociada con el ADN (Carter 1984; Singaravelu y Ramakrishman 1998; Caballero *et al.* 2001).
- **Virión:** es el principal elemento infeccioso de los baculovirus tanto en la dispersión del virus entre los individuos de una población como entre los órganos y tejidos de un mismo hospedero. El virión maduro se forma cuando la nucleocápside adquiere, en un momento determinado de la replicación del virus, una envoltura o membrana que tiene una estructura trilaminar típica (Caballero *et al.* 2001). Según Carter (1984), el virión contiene más de 35 proteínas.
- **Cuerpos de inclusión:** los baculovirus, y en este caso los virus de la granulosis, sintetizan al final del proceso de infección grandes cantidades de poliedrina o granulina, según el género, las cuales son proteínas que cristalizan formando una matriz o cuerpo de inclusión (OB) con forma de poliedro irregular (poliedrina) o de gránulo (granulina) (Caballero *et al.* 2001).

Los Granulovirus generalmente forman cuerpos de inclusión ovocilíndricos cuyo tamaño varía dependiendo del aislamiento en un rango de 120-300 nm de ancho por 300-500 nm de largo (Tweeten *et al.* 1977, Singaravelu y Ramakrishman 1998, Finnerty *et al.* 2000, Sciocco-Cap *et al.* 2001). La matriz de proteína llamada granulina, es una proteína de alrededor de 245

aminoácidos y está genéticamente y serológicamente relacionada con la poliedrina de los VPN (OECD 2002).

En los cuerpos de inclusión, durante su morfogénesis, queda incluido generalmente un virión, lo cual les permite conservar su capacidad infecciosa fuera del hospedero; en casos raros, los gránulos contienen más de un virión (Sciocco-Cap *et al.* 2001).

Una pequeña parte de la masa total de proteína (hasta un 5%) de los cuerpos de inclusión corresponde a una proteína de 104 kDa la cual ha sido identificada recientemente como una metaloproteasa, la cual actúa hidrolizando las glicoproteínas específicas que componen la membrana peritrófica del intestino del insecto facilitando el movimiento del virión a través de ésta y por tanto, permitiendo una mayor permeabilidad de la estructura resultando en el aumento de la infectividad viral. Precisamente debido a su función, a esta proteína se le da la denominación de factor sinérgico de la infección viral (VEF) (Christian *et al.* 1993, Caballero *et al.* 2001).

También se encuentra asociada a los OBs una proteasa alcalina que produce una rápida digestión de la granulina una vez ha sido disuelta, favoreciendo la liberación de los viriones incluidos (Caballero *et al.* 2001); Luque *et al.* (2001) reportan que esta proteasa también puede actuar causando la proteólisis de los tejidos del hospedero y por tanto la ruptura del tegumento.

Los OBs son insolubles en agua y resistentes a la putrefacción y desintegración por agentes químicos y también a tratamientos físicos como la congelación, desecación o liofilización, todas las cuales son características que les confieren persistencia en el medio. En cambio, son

solubles en soluciones alcalinas como las que se dan en el tubo digestivo de algunos insectos (pH 9-11), lo cual facilita la liberación de los viriones para que puedan iniciar una infección (Caballero *et al.* 2001).

En la figura 7 se puede observar la estructura de un granulovirus con las partes anteriormente descritas.

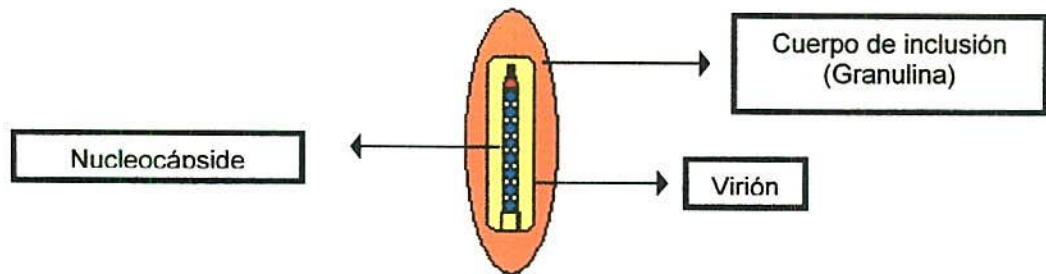


Figura 7. Características morfológicas de los granulovirus.

- **Genoma:** El genoma de los granulovirus está organizado en una única molécula circular de ADN de doble cadena que contiene 100 y 200 genes; su tamaño puede oscilar entre 80 y 180 kilopares de bases (Finnerty *et al.* 2000, Caballero *et al.* 2001). Aunque el DNA de los baculovirus se replica en el núcleo, los baculovirus llevan su propio complemento de genes que codifican las proteínas encargadas de la replicación del DNA. En el caso de los granulovirus, la replicación comienza en el núcleo de las células infectadas pero en general se produce inmediatamente la ruptura de la membrana nuclear y por consiguiente, el ciclo y la morfogénesis viral continua en la mezcla resultante de componentes citoplasmáticos y nucleares (Caballero *et al.* 2001, Herniou *et al.* 2003).

Aunque los genes de los baculovirus se encuentran en general bien conservados, es muy común observar variaciones entre los genotipos de una misma cepa o de un mismo aislamiento mantenido bajo diferentes

condiciones. Un ejemplo de estas variaciones es reportado por Vickers *et al.* (1991); en este estudio se compararon aislamientos del granulovirus de *P. operculella* de ocho regiones del mundo usando endonucleasas de restricción y mostrando los estimados del tamaño del genoma de uno de estos aislamientos. Se encontraron tres genotipos diferentes, aunque no se pudo comprobar que estas diferencias genotípicas resulten en cambios biológicos en términos de virulencia. La ocurrencia de variaciones genotípicas de un aislamiento de baculovirus ha sido atribuida al proceso de recombinación entre un pequeño número de variantes que coinfectan la larva hospedera bajo condiciones de campo (Singaravelu y Ramakrishnan 1998).

2.3.4.2. Modo de acción del virus en larvas de la polilla

El ciclo de infección comienza cuando los cuerpos de inclusión son ingeridos por las larvas al alimentarse, continúa con la dispersión de la enfermedad dentro del insecto y finaliza tras la muerte del mismo, con la liberación de nuevos cuerpos de inclusión que contienen partículas infectivas (Figura 8). Durante este ciclo se producen dos fenotipos de viriones con idéntico genotipo. Uno de ellos lo constituye los viriones derivados de los cuerpos de inclusión y son los responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad, y por ende, el causante de la infección primaria en el insecto. El otro fenotipo viral posee en su envoltura ciertas estructuras y proteínas diferentes a los virus descritos anteriormente, que juegan una función específica; este fenotipo disemina la enfermedad dentro del hemocele del insecto provocando la infección secundaria que dará como resultado la formación de nuevos cuerpos de inclusión y eventualmente la muerte de los individuos afectados. La envoltura de estos es adquirida cuando las nucleocápsides sintetizadas brotan a través de la membrana citoplasmática de la célula infectada (Carter 1984, Christian *et al.* 1993, Luque *et al.* 2001, Taha *et al.* 2000, Caballero *et al.* 2001, Herniou *et al.* 2003).

Dentro del ciclo de infección se diferencian dos tipos de infección las cuales serán descritas a continuación:

- Infección primaria: la forma más común de inicio de la infección primaria es por ingestión de los cuerpos de inclusión presentes como contaminantes en el alimento de las larvas, aunque puede ocurrir una transmisión vertical en donde el virus es transmitido de los padres a la descendencia como lo describe Kukan (1999).

Ingeridos los cuerpos de inclusión, debido a la alta alcalinidad presente en los jugos intestinales del insecto hospedero (pH 9,5–11), se produce la hidrólisis de la granulina. Una vez liberados los viriones deben atravesar la membrana peritrófica del intestino, ayudados por el VEF mencionado anteriormente. Posteriormente, los viriones se unen por fusión a la membrana citoplasmática de las microvellosidades de las células del intestino medio. Una vez producida la fusión, las nucleocápsides penetran en el citoplasma de las células y se dirigen al núcleo, donde se desnudan y liberan el DNA a través de los poros nucleares. Comienza entonces la transcripción de los genes virales, se genera nueva progenie viral y se producen alteraciones en las funciones fisiológicas del insecto en beneficio de un mejor desarrollo de la enfermedad en el hospedero (Caballero *et al.* 2001).

Se forman así nuevas nucleocápsides, las cuales pasan a través de la membrana nuclear adquiriendo una envoltura de dicha membrana; se alinean con la membrana plasmática, emergen a través de esta membrana y atraviesan la lámina basal circulando a través de la hemolinfa (Caballero *et al.* 2001).

En los VGs al producirse la ruptura de la membrana nuclear, normalmente se observan las nucleocápsides entre los componentes núcleo-citoplasmáticos resultantes de la mezcla de ambos contenidos a las 36 horas post-infección. Una vez producida la primera progenie comienza la dispersión del virus hacia las células de los tejidos a ser infectados, produciéndose la infección secundaria dentro del hemocele (Caballero *et al.* 2001).

- Infección secundaria: la diseminación de la enfermedad dentro del hospedero es causada por la progenie de virus brotantes que infectan células vecinas y diversos tejidos: una vez producida la infección secundaria, desde cada sitio de infección inicial se produce la dispersión de la enfermedad por paso de los viriones de célula en célula por endocitosis (Caballero *et al.* 2001).

2.3.4.3. Sintomatología de larvas infectadas por granulovirus

Las larvas infectadas por granulovirus exhiben un conjunto de síntomas característicos que empiezan a manifestarse varios días después de haberse iniciado la infección. Los primeros síntomas que se observan son cambios de color del tegumento y del comportamiento de larvas. Las larvas pierden el apetito y poco después cesan de alimentarse por lo que crecen más lentamente. La muerte se produce por desintegración de los tejidos y órganos y poco después se oscurece el tegumento. En las larvas muertas ó moribundas el tegumento es generalmente muy frágil y se rompe con facilidad liberando el contenido líquido con millones de cuerpos de inclusión (Caballero *et al.* 2001).

Niño y Notz (2000a) evaluaron el desarrollo y sintomatología de larvas de *Tecia solanivora* infectadas por un virus granulosis nativo. En este estudio, observaron como primera medida que las larvas sanas presentan cuatro

grupos claramente definidos y sin solapamiento entre ellos, que indican los cuatro instares larvales presentes en el desarrollo normal de *T. solanivora*. Contrariamente, en las larvas infectadas no hay una separación clara entre cada instar. También describen la coloración blanca lechosa presente en las larvas, típica de la infección por el granulovirus; esta se debe a la infección del cuerpo graso, principal tejido afectado durante la replicación del virus, aunque en los estados avanzados de la enfermedad, otros tejidos son afectados y se produce su desintegración liberando una gran cantidad de cápsulas virales. Por último, mencionan que el efecto del virus en el desarrollo de las larvas se acentúa a partir del segundo instar, en aquellas larvas que sobreviven al efecto letal inicial.

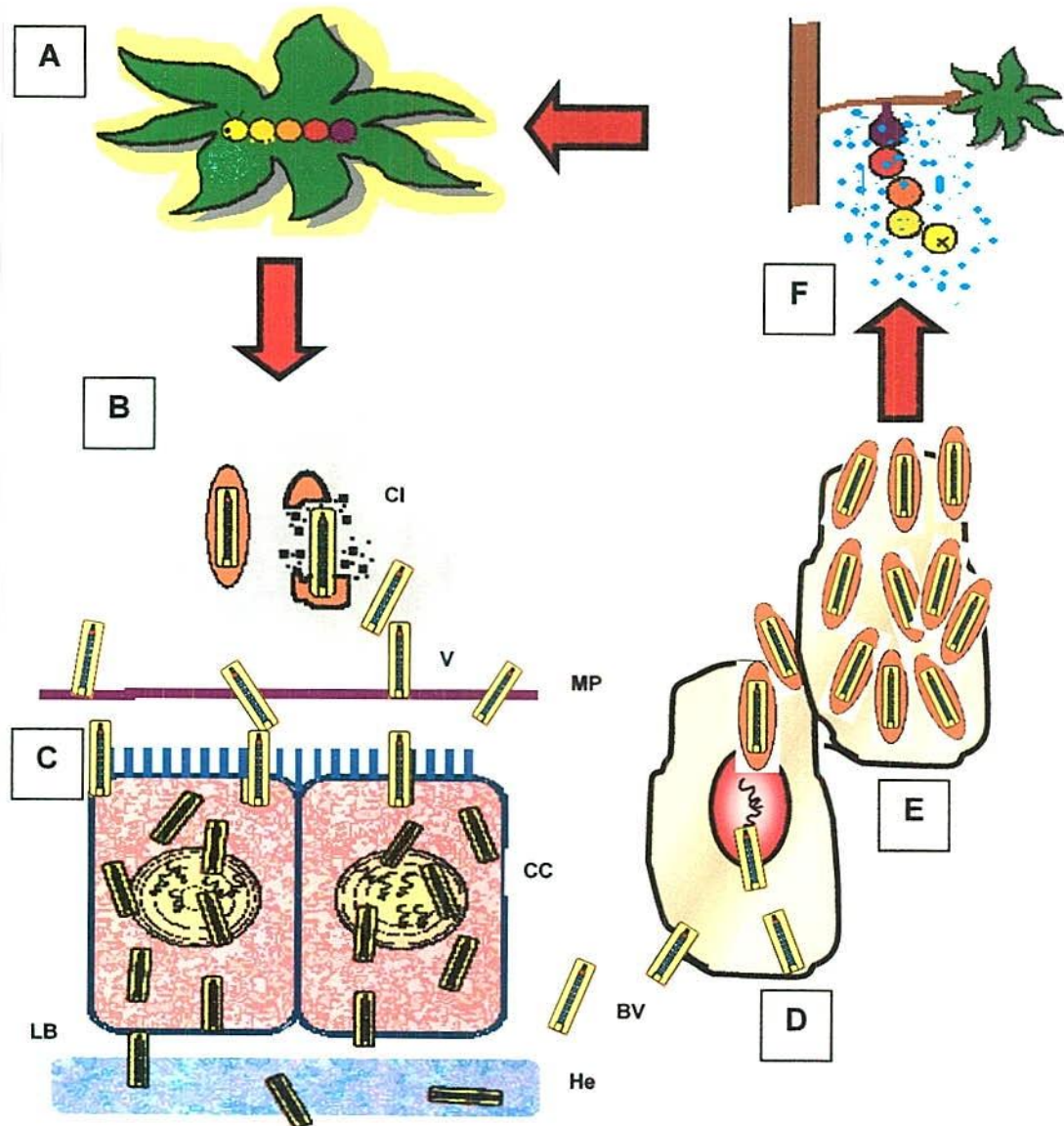


Figura 8. Esquematación del modo de acción de un baculovirus. (A) La larva ingiere los cuerpos de inclusión al alimentarse. **(B)** En el intestino medio se disuelven los cuerpos de inclusión (CI) y quedan así liberados los viriones (V) que luego de atravesar la membrana peritrófica (MP), se unen por fusión a las microvellosidades del intestino. **(C)** A partir de este estado, se inicia el ciclo de replicación en el núcleo de las células columnares (CC) del intestino medio y la progenie viral brota a través de la lámina basal (LB) a la hemolinfa (He). Los viriones brotados (BV) causan la infección secundaria dentro del hemocele. **(D)** Las partículas virales entran a las células de los tejidos susceptibles por endocitosis; las nucleocápsides se dirigen hacia el núcleo y allí se libera el ADN; se inicia un nuevo ciclo de replicación que culmina en la formación de nuevos viriones que se incluyen en los cuerpos de inclusión. **(E)** se produce la lisis nuclear y celular. **(F)** Se rompe el tegumento larval y quedan liberados los cuerpos de inclusión en el ambiente, que al ser ingeridos por otras larvas al alimentarse, comenzarán un nuevo ciclo de infección. Tomado y modificado: Caballero *et al.* 2001.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

La polilla guatemalteca *Tecia solanivora* se considera como la plaga más importante en la mayoría de zonas paperas de Colombia. El control de este insecto se basa en productos químicos, los cuales han sido insuficientes, además de la alta contaminación que conlleva su uso indiscriminado. El uso de virus entomopatógenos de la familia Baculoviridae se presenta como una opción de control eficaz y sin riesgos para el ambiente debido a su especificidad y a la alta frecuencia de aparición de estos virus causando enfermedad en diferentes lepidópteros. Sin embargo, en Colombia no existen cepas del virus de la granulosis aisladas directamente de *T. solanivora* que están adaptadas a las condiciones agroecológicas de nuestro país.

3.2. JUSTIFICACIÓN

La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* es la plaga de mayor impacto económico en el cultivo de la papa por los daños que causa durante el cultivo y en almacenamiento de semilla, los cuales pueden llegar al 100% de la producción (Palacios 1997).

En Colombia la única opción biológica y ambientalmente sostenible para el control de este insecto en condiciones de almacenamiento de semilla la constituye el bioplaguicida en polvo a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* desarrollado por el CIP, cuya tecnología fue adaptada y tecnificada por Corpoica para su producción en el país. Con este bioinsecticida se logra reducir la aplicación de plaguicidas químicos y mejorar la producción de papa. Sin embargo, dado que la cepa de virus usada para su formulación procede del Perú y fue aislada originariamente de otra especie de polilla y teniendo en cuenta la posibilidad de encontrar virus

nativos afectando a *T. solanivora* como se ha demostrado en otros países, la búsqueda y aislamiento de cepas nativas de granulovirus a partir de éste insecto surge como una alternativa promisoría. Esto permitirá contar con un virus más adaptado a este hospedero y a las condiciones ambientales de Colombia y por estas razones será posiblemente más eficiente para el control. Además, el trabajar con aislamientos nativos permite aprovechar la alta diversidad de especies que se encuentra en nuestro país.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Buscar y seleccionar aislamientos nativos de Granulovirus para el control de la Polilla Guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) en cultivos de papa de Cundinamarca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Buscar aislamientos nativos del virus de la granulosis en larvas de *T. solanivora* en cultivos de papa del departamento de Cundinamarca.

Identificar los aislamientos nativos del virus de la granulosis.

Seleccionar el aislamiento nativo más virulento contra la polilla guatemalteca de la papa *T. solanivora* y que presente el mejor rendimiento.

5. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1. UBICACIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Control Biológico del Programa de Manejo Integrado de Plagas en el centro de investigaciones – Tibaitatá de Corpoica, ubicado en el Km. 14 vía a Mosquera, a una altitud promedio de 2650 msnm. Los muestreos se realizaron en diferentes municipios del departamento de Cundinamarca.

5.2. MATERIAL BIOLÓGICO

5.2.1. Material Entomológico

El material entomológico utilizado para el montaje de los bioensayos fueron huevos y larvas de primer ínstar de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny). Esta población del insecto fue obtenida de la cría mantenida en dieta natural, establecida en los laboratorios de entomología del Programa de Manejo Integrado de Plagas de Corpoica.

5.2.2. Material Vegetal

El material vegetal usado fueron tubérculos de papa *Solanum tuberosum* sanos, de tamaño similar y de la variedad parda pastusa que provenían de supermercado. Todos los tubérculos utilizados fueron desinfectados previamente (Anexo A).

5.2.3. Microorganismos

Como virus patrón y de referencia se trabajó en todos los ensayos con el virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* aislado del Perú y con el cual se elabora en Corpoica el producto semicomercial para el control de *T. solanivora*.

5.3. RECOLECCIÓN DE LARVAS EN EL DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

El muestreo de larvas de *T. solanivora* se realizó en cinco de los principales municipios productores de papa del departamento de Cundinamarca: Chocontá, Villapinzón, Mosquera, Sibaté y Carmen de Carupa (Anexo B). En cada municipio se seleccionaron fincas con cultivos de papa y/o con papa almacenada en bodegas, silos rústicos, etc.

La búsqueda de larvas se realizó mediante una revisión de la superficie de los costales, el suelo y las paredes del sitio donde se encontraban los tubérculos almacenados. Así mismo, se hizo un muestreo destructivo al azar de los tubérculos que presentaban los signos típicos del daño causado por *Tecia solanivora* con el fin de coleccionar las larvas que se encontraban en el interior del tubérculo.

Se tuvo como límite de recolección 30 larvas por finca, aunque en algunos casos no se alcanzó esta cantidad debido a la baja densidad de la plaga presente en los municipios. De la misma manera, se estableció como criterio de selección de larvas, aquellas que presentaran los síntomas característicos de infección por un virus de la granulosis como son: color blanco lechoso, poca movilidad y consistencia blanda; sin embargo, debido a la dificultad de encontrar en campo larvas con esta descripción, se coleccionaron aquellas que presentaran al menos una de estas características.

Las larvas coleccionadas se colocaron individualmente en tubos Eppendorf con 1,5 ml de suero fisiológico para evitar la oxidación que normalmente presentan los individuos muertos al exponerse al aire y la luz, se rotularon con los datos necesarios para su posterior identificación (Finca, vereda, municipio y fecha) y se transportaron al Laboratorio de Control Biológico del C.I. Tibaitatá en bolsas de papel.

Para cada sitio de muestreo se llenó una encuesta que tuvo en cuenta datos relacionados con el nombre del colector; fecha de colección; sitio de colecta: departamento, municipio, altitud, longitud, latitud, temperatura y hospedante, entre otros (Anexo C).

Las larvas se conservaron mediante ultracongelación a -70°C hasta el momento de su evaluación.

5.4. PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES VIRALES.

A cada larva contenida en un tubo Eppendorf con suero fisiológico estéril se le realizaron varias punciones con una jeringa de insulina estéril con el fin de liberar su contenido, donde en caso de infección se debería encontrar el virus. Del tubo se retiraron los fragmentos grandes y los tejidos del insecto con la misma aguja y la suspensión obtenida fue dividida en cuatro submuestras de 200 μl y se depositaron en tubos Eppendorf con el fin de tener suficiente material para realizar las diferentes evaluaciones. Los tubos se conservaron a -70°C , debidamente rotulados.

5.5. DETERMINACIÓN DE LA POSIBLE PRESENCIA DE GRANULOVIRUS

Se determinó la presencia de partículas virales en la suspensión obtenida de cada larva mediante microscopía óptica de campo oscuro. De cada muestra se realizó una preparación en fresco y se observó en un microscopio óptico equipado con campo oscuro en el objetivo de 40 x. Las muestras en las que se observaron pequeños cuerpos blancos brillantes con ligero movimiento browniano sobre un fondo negro se reportaron como positivas para posible infección por Granulovirus.

Las muestras en las que no se observó claramente la presencia del virus se sometieron a centrifugación en ultracentrifuga Biofuge *stratos* Sorvall® a

12000 rpm durante 4 minutos con el fin de descartar la interferencia por presencia de partículas de grasa. Si después de la centrifugación se observaba un pellet blanco, éste se recuperó y fue utilizado nuevamente para una preparación en fresco, la cual se observó al microscopio óptico de campo oscuro.

A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los aislamientos que por la técnica de observación directa en microscopio de campo oscuro dieron positivo para posible infección por Granulovirus.

5.6. PROPAGACIÓN VIRAL

Para confirmar la posible presencia del virus se realizó una prueba de reproducción de síntomas virales con las muestras seleccionadas por microscopía.

Para llevar a cabo esta actividad se tomaron tubérculos de papa pastusa desinfectados y secos y se colocaron en un recipiente plástico cubierto en el fondo por hojas de papel servilleta estériles. En cada recipiente se colocaron de 6 a 10 tubérculos dependiendo del tamaño de los mismos. Con una aguja estéril se realizaron varias punciones en la superficie de los tubérculos para facilitar la entrada de las larvas recién emergidas, como recomienda Briese (1980).

Por otra parte, se tomó una submuestra de los aislamientos seleccionados contenidos en tubos Eppendorf con 200 μ l de la suspensión viral y se llevaron a 1 ml con suero fisiológico estéril. Esta suspensión se utilizó para inocular toallas de papel con posturas de *Tecia solanivora* que se encontraban próximas a la eclosión; la inoculación se realizó impregnando con 1 ml de la suspensión viral una toalla de papel de 10 cm² aproximadamente que contenía los huevos.

Una vez inoculados los huevos, las toallas de papel se dejaron secar al ambiente y posteriormente se cortaron en fragmentos de 1cm² aproximadamente. Cada fragmento se colocó sobre una papa. Los recipientes se taparon con tul blanco estéril y se mantuvieron a 22°C ± 2°C.

Al cabo de 16 días del montaje se comenzaron a realizar observaciones diarias y se recolectaron tanto las larvas muertas como las larvas vivas con sintomatología viral. Pasados 25 días se realizó un análisis destructivo de los tubérculos con el fin de extraer todas las larvas presentes y observar la reproducción de signos y síntomas virales.

Se reportaron como positivos aquellos aislamientos en los que se observaron los síntomas de infección viral en algunas o todas las larvas encontradas y estos aislamientos fueron seleccionados para continuar con el trabajo. Los aislamientos que presentaron larvas sanas con un desarrollo normal, se reportaron como negativas para presencia de granulovirus.

Las larvas con sintomatología viral se dispusieron en cajas de Petri plásticas estériles debidamente rotuladas y se guardaron en el ultracongelador a –70°C hasta el momento de su evaluación. Las pupas encontradas y las larvas sanas fueron descartadas.

5.7. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

Con el fin de confirmar la presencia de cuerpos de inclusión en las larvas de los aislamientos seleccionados, se utilizó la propiedad de estos de disolverse o solubilizarse en soluciones alcalinas (Caballero *et al.* 2001).

Para esto se preparó una solución de KOH 1M con pH 11. Se tomó una larva infectada de cada aislamiento seleccionado y se le hizo una punción para

extraer la hemolinfa, la cual se suspendió en 1.5 ml de suero fisiológico estéril. De esta suspensión se tomó una gota y se puso en una lámina portaobjetos por duplicado. A una de las gotas que se ubicaron sobre la lámina se le adicionó una gota de la solución de KOH y se dejó incubar a 35°C durante 30 minutos. Posteriormente se observó en el microscopio de campo oscuro en el objetivo de 40X la muestra sin tratamiento y la muestra después de haber sido incubada con KOH. Como tratamiento testigo se utilizó el mismo procedimiento con una larva infectada con el virus de la granulosis de *P. operculella* proveniente del Perú, cuya identidad ha sido establecida previamente. Se consideraron positivas aquellas muestras en las que se observó la disolución o desaparición parcial o total de los puntos blancos brillantes observados al microscopio de campo oscuro.

5.8. COLORACIÓN DE LOS GRÁNULOS

Brancahão *et al.* (2000) desarrollaron una técnica rápida, simple y segura para la detección de cuerpos de inclusión mediante una adaptación de la técnica de coloración de poliedros descrita anteriormente por Hamm (1966).

Con base en esta información se realizó la coloración de los gránulos a partir de la hemolinfa del insecto de la siguiente manera: se tomó una larva infectada con cada aislamiento de granulovirus seleccionado y se le hizo punción tomando una gota de la hemolinfa y colocándola sobre una lámina, la cual se puso a secar en horno a 40°C por tres minutos. Posteriormente, la lámina se sumergió en una cubeta que contenía una solución acuosa de ácido acético al 50% durante 2 minutos; este es uno de los pasos más importantes ya que los cuerpos de inclusión son resistentes a tinciones biológicas a menos que se traten previamente con un ácido débil (Pedraza *et al.* 1989). Enseguida se transfirió la lámina a otro recipiente que contenía una solución de Azocarmine G (Anexo D) y se sumergió allí durante 2 minutos. La

lámina fue cuidadosamente lavada con agua destilada y se puso a secar sobre una llama ligera.

El procedimiento se repitió con una larva infectada con el virus de la granulosis de *P. operculella* del Perú como testigo positivo y con una larva sana como testigo negativo. Se observaron las coloraciones en microscopio óptico en el objetivo de 100X con aceite de inmersión, con el fin de observar las diferencias entre la hemolinfa infectada y la hemolinfa normal y visualizar con claridad la presencia de gránulos en las muestras, lo que confirmó la presencia de virus de la granulosis.

5.9. ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE GRANULOVIRUS

Matthiessen *et al.* (1978) determinaron que los cuerpos de inclusión del granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhoGV) en suspensión en agua obedecen a la ley de Lambert-Beer, es decir, que existe una relación lineal entre la absorbancia (expresada como el número de densidades ópticas leídas a 450 nm) y la concentración de los cuerpos de inclusión. Empleando esta propiedad se elaboró una curva de calibración con diferentes concentraciones de Granulovirus con el fin de facilitar su cuantificación en los ensayos posteriores.

Para esto, se tomaron 10 larvas infectadas con el granulovirus patrón proveniente del Perú y se maceraron en mortero de porcelana estéril con 5 ml de suero fisiológico hasta obtener una suspensión homogénea. La suspensión obtenida se clarificó por muselina estéril con el fin de eliminar el material grueso como restos de tejido de larva y otras partículas que pudieran interferir con los resultados y el líquido obtenido se filtró por una membrana de 0,8 μ de poro para eliminar otras interferencias como células del insecto, esporas fúngicas y bacterias. La suspensión filtrada obtenida se

llevó a un volumen de 50 ml con suero fisiológico y esta se denominó suspensión madre, a la cual le fue determinada la concentración de cuerpos de inclusión mediante recuento en cámara de Neubauer en un microscopio óptico equipado con campo oscuro observando con el objetivo de aumento 40X. El conteo se realizó por triplicado y el resultado se expresó como cuerpos de inclusión por mililitro (CI/ml).

A partir de esta suspensión se realizaron 6 diluciones seriadas con factor de dilución 2, desde 1/2 hasta 1/64, y de cada dilución se hicieron 10 réplicas. Con la concentración de la suspensión madre se calcularon las concentraciones de cada tubo conociendo su factor de dilución.

Posteriormente se leyó la absorbancia de los tubos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm, usando como blanco el suero fisiológico usado para realizar las diluciones.

Con los resultados de concentración y absorbancia se elaboró una curva de calibración utilizando el método de mínimos cuadrados del programa estadístico Statistix para obtener la ecuación de la recta ($y = mx + b$), que permite calcular la concentración de una suspensión de granulovirus después de haber leído su absorbancia a 450 nm.

5.10. PURIFICACIÓN DEL VIRUS

Con el fin de purificar el virus para utilizarlo posteriormente en la electroforesis, se siguió el procedimiento descrito en la figura 9, el cual es una modificación de los métodos descritos por Mathiessen *et al.* (1978) y Tweeten *et al.* (1977).

Se tomaron aproximadamente 80 larvas infectadas de cada aislamiento y se maceraron en un mortero de porcelana estéril adicionando 5 ml de una solución de Tris 0.1M pH 7.5. Se pasó el macerado a través de un trozo de velo suizo estéril y posteriormente el filtrado obtenido se mezcló con 2 ml de SDS 0,05%. Esto se incubó a 25°C durante 30 minutos.

Al cabo de este tiempo la suspensión se centrifugó 7.5 minutos a 100g con el fin de eliminar los restos de tejido grande presentes. De esta centrifugación se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 27000g por una hora. El pellet obtenido se resuspendió en la solución buffer de Tris 0.1M.

Posteriormente se realizó una centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa, para lo cual se prepararon tres soluciones de sacarosa con diferentes concentraciones: 45, 65 y 80% utilizando agua destilada estéril y sacarosa grado analítico. En un tubo falcon se adicionaron 5 ml de cada solución de sacarosa y el pellet resuspendido se llevó a este colchón. Se centrifugó durante 90 minutos a 27000g. Con una pipeta Pasteur se recuperó la banda blanca que se encontraba entre las concentraciones de 65% y 80% de sacarosa, la cual correspondía a los cuerpos de inclusión de granulovirus. Esta banda se resuspendió en una relación 1:3 (solución viral / buffer Tris 0.1M) y se centrifugó durante 60 minutos a 27000g. El pellet obtenido se resuspendió en un volumen pequeño (0.5 ml aproximadamente) de buffer Tris 0.1M y se almacenó a -70°C debidamente rotulada.

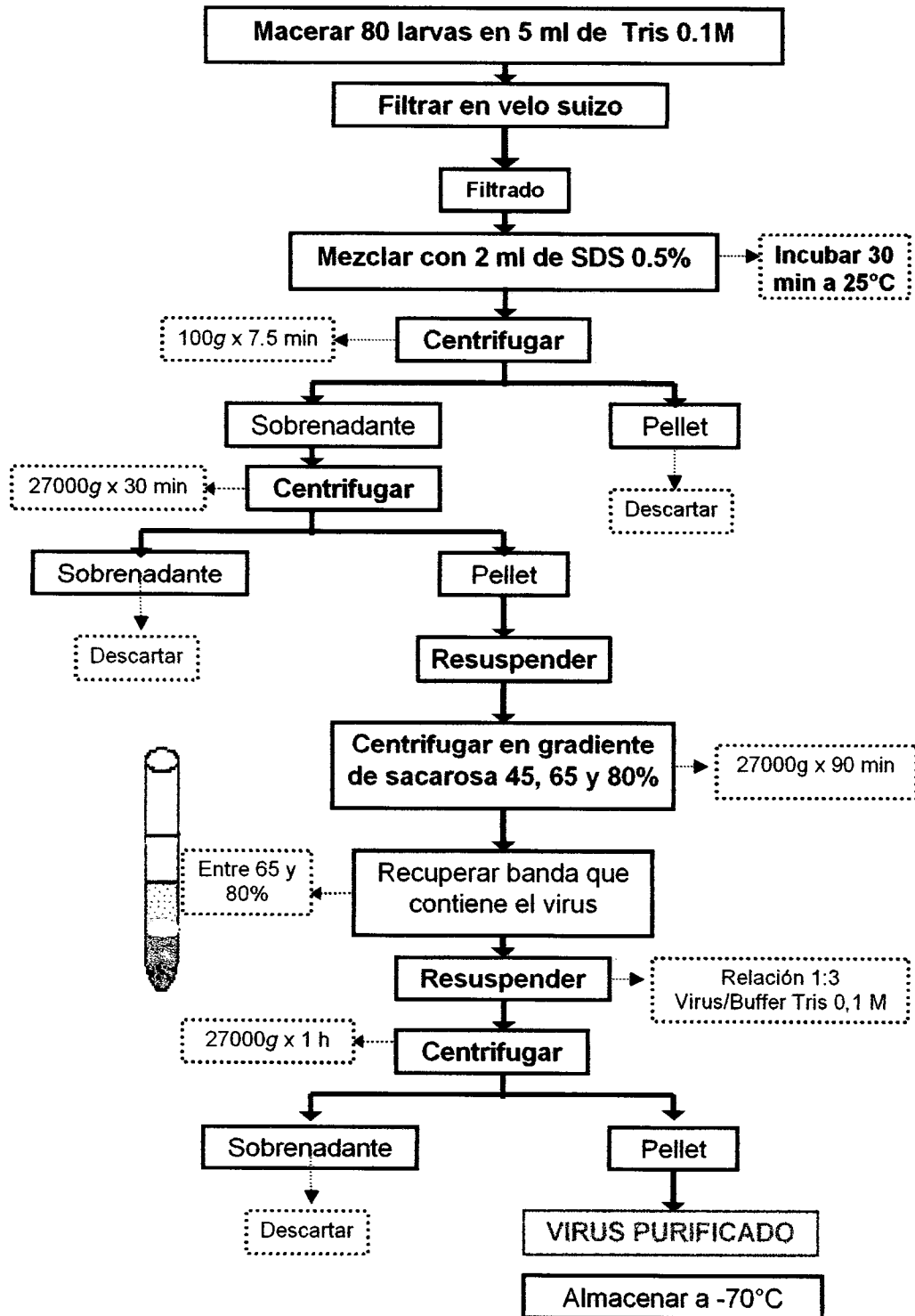


Figura 9. Procedimiento para purificación de granulovirus

5.11. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Con el fin de determinar la presencia de la proteína granulina y de esta forma confirmar la presencia de granulovirus en los aislamientos seleccionados, se realizó una electroforesis SDS-PAGE.

Para esto, se preparó el gel separador de acrilamida-bisacrilamida al 10% teniendo en cuenta un volumen final de 10 ml (Anexo D). Se vertió la mezcla lentamente por el interior de los cristales con ayuda de una pipeta evitando la formación de burbujas, hasta aproximadamente un cm del extremo inferior del peine. Se mantuvo el gel en posición vertical a temperatura ambiente por 20 minutos mientras se dio lugar a la polimerización.

Luego se preparó el gel de apilamiento acrilamida-bisacrilamida un volumen final de 10 ml (Anexo D). Después de colocar el peine se vertió la mezcla de acrilamida líquida correspondiente al gel de apilamiento sobre la fase anterior del gel ya polimerizado con ayuda de una pipeta. Una vez polimerizado el gel de apilamiento, se montaron los geles sobre el soporte de electroforesis y se añadió el tampón de corrida (10x) (Anexo D), llenando todo el tanque de forma que los pocillos de los geles quedaron bien cubiertos.

Se retiró el peine con cuidado y se lavaron los pocillos varias veces con el tampón de corrida, antes de cargar las muestras. Se mezclaron 2/3 de la muestra de virus puro con 1/3 de tampón de carga (Anexo D) en un vial de 0,5 ml y se hirvió por tres minutos.

Se centrifugaron las muestras durante 10-20 segundos para recuperar el agua condensada en la parte superior de los tubos. Posteriormente, se cargaron las muestras en los pocillos del gel. Se cerró el tanque y se conectó a la fuente de voltaje. La corrida se realizó a una intensidad constante de 40 mA durante aproximadamente 45-60 minutos. Una vez que el frente llegó al

fondo del gel se desconectó la fuente de voltaje y se desmontaron los soportes para recuperar los geles. Se introdujeron los geles durante 10-30 minutos en un recipiente con solución colorante (azul brillante de Commassie R 0,1% p/v; ácido acético 10% v/v y etanol 50% v/v) y se mantuvieron en agitación durante este tiempo para asegurar una tinción homogénea. Luego, se introdujeron los geles en un recipiente con solución decolorante (etanol 9,45% y ácido acético 6,75%) y se mantuvieron en agitación durante 40-45 minutos.

Se observó la presencia de las bandas de proteína coloreadas en el gel y se identificó su peso molecular comparándolas con el patrón de peso empleado.

5.12. COMPARACION DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

Se evaluó y comparó la actividad biocontroladora de los aislamientos seleccionados sin formular y formulados de la misma forma que el producto semicomercial elaborado en Corpoica – Tibaitatá a base de la cepa patrón proveniente del Perú. El bioensayo se desarrolló siguiendo el Procedimiento Operativo Estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas Biotécnica-Corpoica para la evaluación de la eficacia del bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* para el control de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, el cual se encuentra validado y registrado por el Instituto Colombiano Agropecuario ICA como un control de calidad de dicho bioplaguicida (Biotécnica 2004).

5.12.1. Preparación de las suspensiones virales

Para la elaboración del bioplaguicida a base de los aislamientos nativos seleccionados, se tomaron 15 larvas de cada aislamiento que presentaban los síntomas típicos de infección por granulovirus; cada grupo de larvas se trató por aparte. Se maceraron las larvas en un mortero de porcelana con 5

ml de suero fisiológico estéril, se pasaron por un trozo de muselina y se llevaron a un volumen de 20 ml. Para retirar los restos de células larvales y tejidos se centrifugó esta suspensión durante 5 minutos a 100g y se recuperó el sobrenadante (Finnerty *et al.* 2000). Luego se pasó esta suspensión por una membrana de 0,8 μ y se tomó una muestra de 2ml para leer su absorbancia en el espectrofotómetro a 450 nm y con este dato se calculó la concentración de la suspensión madre utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración. Se ajustó la concentración de cada suspensión a 1×10^8 CI/ml en un volumen de 50 ml. Estas suspensiones se entregaron a la planta de producción de Baculovirus de Corpoica – Tibaitatá para su formulación en forma de polvo fino para pelletización de semilla de papa.

Como una forma de determinar si el proceso de formulación tuvo algún efecto sobre los aislamientos, estos fueron igualmente evaluados utilizando una concentración de la suspensión viral de 10^5 CI/ml equivalente a la obtenida en el producto formulado (10^5 CI/g). Para la evaluación de los aislamientos sin formular, se tomaron 10 larvas de cada aislamiento que presentaban los síntomas típicos de infección por granulovirus y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para la preparación de la suspensión viral, pero esta vez ajustando la concentración de cada suspensión a 1×10^5 CI/ml, y conservando un volumen final de 200 ml.

5.12.2. Montaje del bioensayo

Para la evaluación de los aislamientos formulados, se pesaron tubérculos de papa pastusa (tres por tratamiento), se introdujeron en una bolsa de polietileno de alta densidad y se adicionó la cantidad de bioplaguicida calculada con base en el peso de los tubérculos, teniendo en cuenta que la dosis recomendada es de 5 g del producto de Baculovirus por 1 Kg de papa. Se cerró la bolsa y se agitó vigorosamente hasta que los tubérculos quedaron cubiertos con el polvo blanco.

Para la evaluación de los aislamientos sin formular los tubérculos se sumergieron durante 3 minutos en la suspensión viral y luego se pusieron a secar en cabina de flujo laminar durante 1 hora.

Con mucho cuidado se colocó cada tubérculo tratado con los formulados o con los aislamientos sin formular en un vaso plástico de 150 cm³ con 60 g de arena estéril en el fondo. Con la ayuda de un pincel estéril calibre 0,5 se pusieron 15 larvas de *T. solanivora* recién emergidas sobre cada tubérculo, empezando por los testigos para evitar la contaminación de este material. Cada recipiente se tapó con una tapa plástica con pequeñas perforaciones para evitar la condensación de humedad y se mantuvieron a 22°C ± 5°C. Se contó con un testigo positivo, tanto para los aislamientos formulados como sin formular, en el cual los tubérculos fueron tratados con el producto o la suspensión sin formular del granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú y un testigo absoluto que consistió en tubérculos sin ningún tratamiento.

Pasados 25 días se evaluó por un análisis destructivo de los tubérculos cada tratamiento, determinando el número de larvas muertas correspondientes al número de larvas muertas encontradas en los recipientes y el número de larvas desaparecidas las cuales se asumieron como larvas muertas en estadio de neonatos.

Se calculó el porcentaje de eficacia mediante la fórmula de Schneider – Orelly (Ciba-Geigy 1973):

$$\% \text{ de eficacia} = \frac{b - k}{100 - k} \times 100$$

donde: b = % de individuos muertos en el tratamiento con Baculovirus

k = % de individuos muertos en el testigo absoluto.

5.12.3. Diseño experimental y análisis estadístico (tabla 6).

Tabla 6. Características del diseño experimental empleado.

Unidad experimental (UE)	Recipiente plástico con tubérculo tratado y 15 larvas (Figura 10)
Tratamientos	Cepas C01-26, C04-04 y C06-11 formuladas y sin formular, testigo positivo y testigo absoluto
Réplicas	3
Diseño Experimental	Completamente al azar



Figura 10. Unidad experimental con tubérculo tratado con aislamientos sin formular y formulados

Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey con un $\alpha=0.05$ mediante el programa estadístico Statistix.

5.13. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO PROMEDIO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN PRODUCIDOS POR MILIGRAMO DE LARVA

Como otro parámetro de selección de los aislamientos de granulovirus se tomó en cuenta el rendimiento, es decir, la cantidad promedio de cuerpos de

inclusión producidos por gramo de peso larval. Para cada aislamiento seleccionado se tomaron larvas infectadas y se prepararon 10 suspensiones virales diferentes de la siguiente manera: para cada suspensión viral se tomaron muestras de larva infectada de peso conocido, las cuales se maceraron y fueron llevadas un volumen de 10 ml con suero fisiológico estéril agitando vigorosamente en un vortex durante 5 minutos. Cada suspensión se pasó por papel filtro con ayuda de una bomba de vacío, con el fin de retirar los tejidos y contaminantes de la larva. A partir del filtrado obtenido se hicieron diluciones y se leyó la absorbancia de la dilución adecuada en un espectrofotómetro a 450 nm. Con este dato se calculó la concentración de la suspensión madre (CI/ml) utilizando la ecuación obtenida en la curva de calibración y a partir de esta se calculó la cantidad de CI producidos por gramo de larva utilizando el peso de las larvas y la dilución empleada.

El diseño experimental fue completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento y con el fin de identificar diferencias entre los rendimientos de los aislamientos virales, los resultados fueron sometidos mediante una análisis de varianza (ANOVA) y a una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) con un $p=0.05$ mediante el programa estadístico Statistix.

Como un parámetro de comparación, este mismo procedimiento se llevó a cabo también para la cepa de granulovirus de *P. operculella* proveniente del Perú.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. RECOLECCIÓN DE LARVAS

La recolección de larvas de *Tecia solanivora* para la búsqueda de cepas de granulovirus llevada a cabo en el departamento de Cundinamarca se realizó durante los meses de junio y julio de 2004 en los municipios de Chocontá, Villapinzón, Mosquera, Sibaté y Carmen de Carupa. En dicha época en la mayoría de fincas paperas del departamento, acababa de finalizar el primer ciclo de cultivo de papa y por lo tanto ya se había realizado la cosecha. Por esta razón los muestreos se realizaron únicamente en los sitios de almacenamiento de la papa, considerando que la plaga no solamente hace su ataque durante la época de tuberización y maduración del cultivo, sino que también afecta la papa que se almacena para su uso como semilla o como papa de consumo (Sotelo 1997).

El número de larvas de *T. solanivora* colectadas varió drásticamente entre los municipios muestreados, en primer lugar, por las diferentes condiciones climáticas de cada sitio geográfico (Tabla 7), por factores ambientales propios de la época de muestreo y por las prácticas culturales y de control implementadas en cada finca visitada.

Como lo reportan varios autores, las variaciones en la densidad de la población de *T. solanivora* dependen de las condiciones climáticas, siendo la precipitación el factor más influyente, así como la altitud, la temperatura, la humedad, etc. A menor altitud es mayor la captura, a mayor precipitación es menor la captura y a menor temperatura menor captura (Barreto *et al.* 2003; Niño 2004).

Tabla 7. Resultados de la recolección de larvas de *T. solanivora* en el departamento de Cundinamarca y principales condiciones ambientales de los municipios de muestreo.

MUNICIPIO	Altitud (msnm)	Temperatura promedio	Número de larvas recolectadas
Chocontá	2655	13°C	62
Villapinzón	2715	13°C	24
Mosquera	2548	14°C	5
Sibaté	2574	14°C	5
Carmen De Carupa	2980	19°C	22
		Total	118

En el municipio de Chocontá se obtuvo una alta cantidad de individuos comparada con los demás municipios muestreados y por esta razón el mayor número de muestras fueron recolectadas en dicho sitio. La presencia de la plaga en este lugar fue alta a pesar de que se encuentra localizado a una altura mayor que otros municipios evaluados como Mosquera y Sibaté y presenta la menor temperatura, razones por las que se esperaba que la presencia de la polilla fuera más baja; sin embargo, según lo comentado por los agricultores, se encontraban en una época bastante seca, lo que posiblemente favoreció la pérdida de humedad del suelo durante el cultivo y por lo tanto su agrietamiento facilitando el ataque de la polilla (Saenz 1997; Núztez *et al.* 1999). Otro factor que pudo favorecer la presencia del insecto fue el hecho de que en las fincas visitadas, la papa se encontraba almacenada en bodegas externas bastante sucias y descuidadas, brindando un ambiente de oscuridad y poca aireación que es ideal para la reproducción de *T. solanivora* (Ben Salah y Aalbu 1992). Lo mismo ocurrió para los municipios de Villapinzón y Carmen de Carupa en los que se obtuvo un mayor número de larvas de la polilla.

Cundinamarca, tan sólo cinco larvas recolectadas en el municipio de Mosquera presentaron síntomas claros de la posible presencia de un virus de la granulosis; las otras muestras no exhibían síntomas o éstos no eran muy evidentes.

Como lo reporta Laarif *et al.* (2003) en su estudio sobre la epidemiología de un virus de la granulosis de *P. operculella* en Túnez, los síntomas de infección exhibidos en campo son difíciles de encontrar y algunas larvas infectadas pueden no mostrar ningún síntoma indicativo de la presencia de una enfermedad. Este fenómeno puede deberse a la presencia de bajas concentraciones del virus en el insecto o a un caso de infección latente.

6.2. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE GRANULOVIRUS

Debido a que la sintomatología provocada por el virus de la granulosis en muchas ocasiones no es observable a pesar de que los individuos puedan estar infectados, se realizó un diagnóstico de mayor fiabilidad basado en la observación al microscopio (Evans y Shapiro 1990). Para tal fin se determinó la presencia de cuerpos de inclusión en todas las muestras recolectadas mediante la técnica de microscopía óptica de campo oscuro, la cual permite la adecuada observación de los cuerpos de inclusión de granulovirus debido a su tamaño y refractibilidad, ya que el uso de esta técnica se aplica para observar estructuras pequeñas, que posean un bajo contraste y que dispersen o refracten la luz por su naturaleza sólida y compacta (Caballero *et al.* 2001). Para esta observación se tomó como referencia la cepa de granulovirus proveniente del Perú, con la cual se realizó un montaje en fresco de una larva infectada y se observó al microscopio (Figura 11); dicha imagen fue comparada con las obtenidas a partir de las muestras de campo. Como se observa en la figura 11, los cuerpos de inclusión se presentan como pequeños cuerpos blancos con un ligero parpadeo.

De las 118 muestras recolectadas en la totalidad de municipios muestreados en el departamento de Cundinamarca se detectaron nueve muestras con posible infección por granulovirus mediante microscopía óptica de campo oscuro, puesto que presentaron puntos blancos y brillantes similares a los observados con la cepa de referencia del Perú.

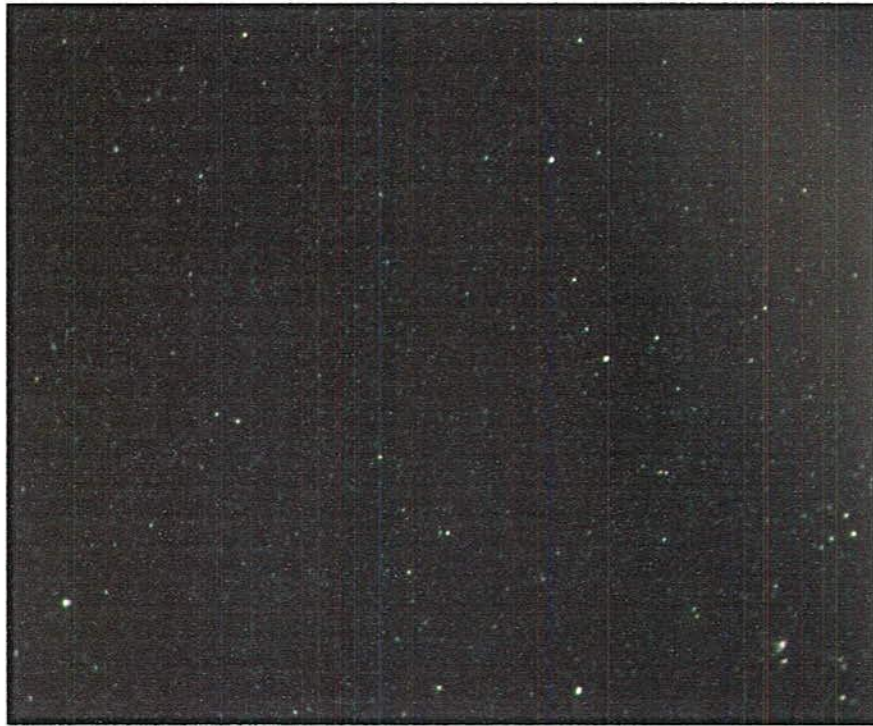


Figura 11. Hemolinfa de un insecto infectado con la cepa de granulovirus del Perú observado al microscopio de campo oscuro. Los cuerpos de inclusión corresponden a los puntos blancos, brillantes, pequeños y uniformes. (400X).

En cuanto a las otras muestras examinadas se consideraron 29 como sospechosas debido a que las estructuras observadas similares a granulovirus eran escasas, presentaban poco movimiento browniano, tenían un tamaño mayor al esperado o no se diferenciaban con claridad (Figura 12); las 80 muestras restantes se consideraron como negativas por no presentar estructuras correspondientes a cuerpos de inclusión de granulovirus (Tabla 8).

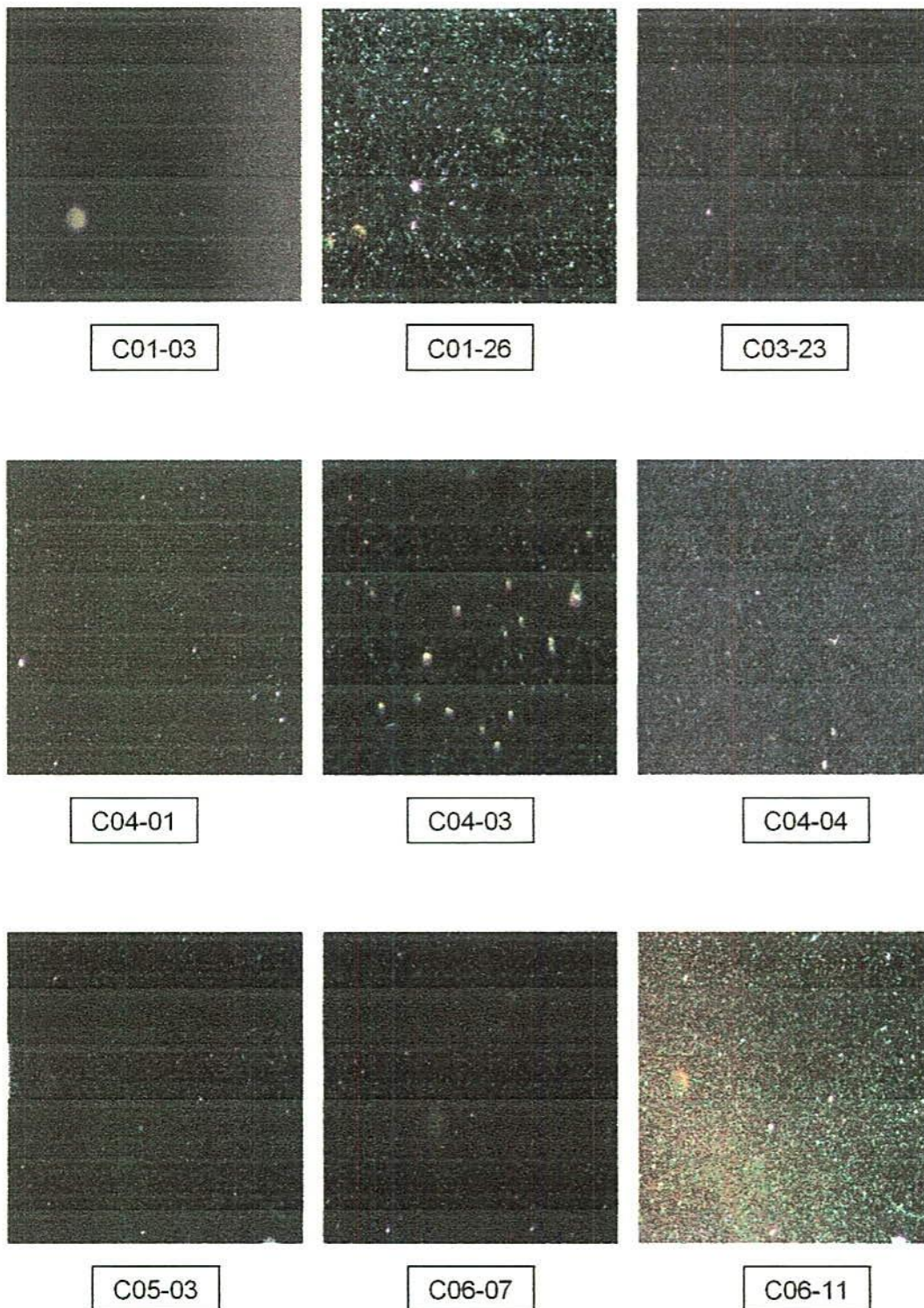


Figura 12. Muestras con posible infección por granulovirus observadas al microscopio de campo oscuro. (400X).

Tabla 8. Determinación de la presencia de cuerpos de inclusión mediante microscopía de campo oscuro de las muestras recolectadas en Cundinamarca.

Municipio	Muestras totales	Muestras positivas	Muestras sospechosas	Muestras negativas
Chocontá	62	2	9	51
Villapinzón	24	2	0	22
Mosquera	5	5	0	0
Sibaté	5	0	4	1
C. de Carupa	22	0	16	6
Total	118	9	29	80

Los niveles de infección (incidencia del virus) obtenidos en las poblaciones de campo fueron variables y en algunos casos no se pudieron determinar con exactitud debido a la presencia de muestras sospechosas; sin embargo, sobre la base de este análisis, se estableció la posible distribución de la presencia de granulovirus en larvas de *Tecia solanivora* en los municipios muestreados del departamento de Cundinamarca (Figura 13).

La presencia del virus de la granulosis en poblaciones de *T. solanivora* de los cinco municipios de Cundinamarca evaluados y la incidencia relativamente baja de este patógeno comparado con su incidencia a nivel mundial en larvas de *P. operculella* (Vickers *et al.* 1991; Ben Salah y Aalbu 1992; Zeddani *et al.* 1999; Laarif *et al.* 2003) permite asumir que las condiciones locales posiblemente no son favorables para el desarrollo de este tipo de patógeno o que el hospedero *T. solanivora* es mucho más resistente a la infección por granulovirus. Briese y Mende (1981) realizaron estudios sobre las diferencias en la susceptibilidad a una infección por granulovirus entre diferentes poblaciones de campo de la polilla de la papa *P. operculella* y encontraron que existe un considerable rango de respuestas entre diferentes poblaciones

de la polilla al virus, dependiendo de muchos factores como la densidad de la plaga, la edad de la población, las condiciones ambientales, etc., lo cual podría explicar también la baja incidencia del patógeno encontrada en esta investigación. Esto lo confirman también Cherry *et al.* (2002) en su estudio sobre la transmisión en campo del granulovirus de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), en el que encontraron que existe una variación considerable en la respuesta entre poblaciones de insectos provenientes de lugares geográficamente diferentes.

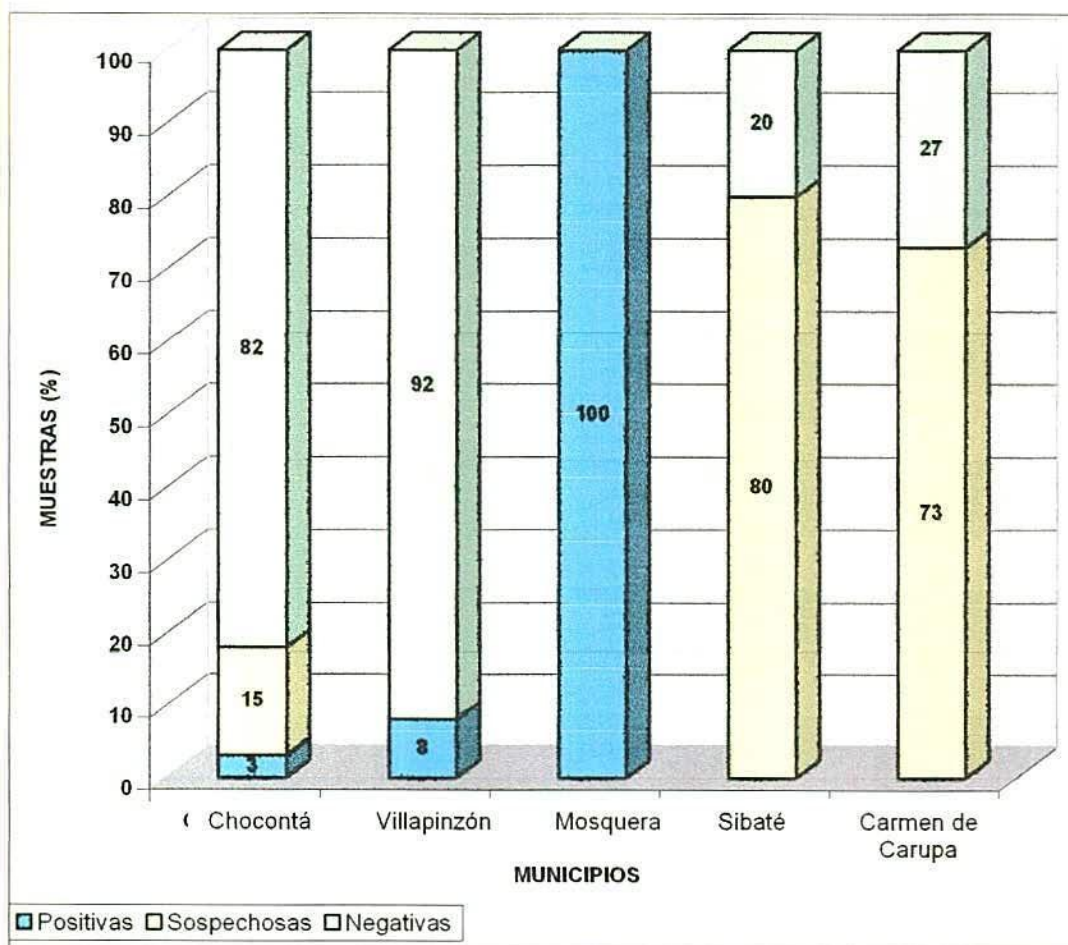


Figura 13. Determinación de cuerpos de inclusión en las muestras de larvas de *T. solanivora* colectadas en el departamento de Cundinamarca por la técnica de microscopía de campo oscuro

Mediante la técnica de observación en campo oscuro otras estructuras como partículas de polvo, esporas bacterianas, cristales, etc., pueden observarse en el campo visual de forma muy similar a un cuerpo de inclusión de baculovirus. Aunque esta técnica es una herramienta muy útil para la determinación de la presencia de baculovirus y es usada por muchos investigadores en su trabajo de rutina con este tipo de organismos (Smirnoff 1960), la infección por granulovirus no puede ser determinada ni diferenciada con seguridad usando sólo montajes frescos para ser observados en campo oscuro (Lucarotti *et al.* 2004), razón por la cual se realizaron otras pruebas confirmatorias con las muestras que se seleccionaron mediante observación al microscopio.

6.3. PROPAGACIÓN VIRAL

La reproducción de síntomas virales en el insecto hospedero y la propagación del virus son un paso determinante para confirmar la presencia de un agente viral infeccioso en una muestra sospechosa, como lo determina Koch en sus postulados. Mediante este postulado se comprueba el vínculo entre un virus y una enfermedad por parámetros como la reproducción de la enfermedad original al re-inocular el agente en su hospedero susceptible (Purves *et al.* 2001).

Se escogieron para la propagación las nueve muestras que dieron positivas para posible presencia de granulovirus por microscopía de campo oscuro y tres muestras al azar de las que se consideraron sospechosas. De las doce muestras propagadas, sólo se observó clara reproducción de síntomas virales en tres de ellas (Tabla 9).

Teniendo en cuenta las posibles variables que pudieron impedir el desarrollo de algunos aislamientos de granulovirus o la posible no presencia de agentes infecciosos en las muestras en las que no hubo reproducción de síntomas

virales, aquellos aislamientos que lograron reproducirse bajo las condiciones proporcionadas en este estudio fueron seleccionados para continuar con la investigación (Tabla 10).

Tabla 9. Reproducción de síntomas virales en larvas de 1° instar de *T. solanivora* (*Muestras propagadas dos veces por dudas en cuanto a la sintomatología exhibida)

 AISLAMIENTO 	 RESULTADO 	 AISLAMIENTO 	 RESULTADO
C01-03	Negativo	C05-03	Negativo
C01-26	Positivo*	C05-05	Negativo
C02-07	Negativo	C06-07	Negativo
C02-20	Negativo	C06-11	Positivo*
C03-14	Negativo	CO7-06	Negativo
C04-04	Positivo	C07-08	Negativo

Tabla 10. Muestras seleccionadas por presentar resultados positivos en la reproducción de síntomas virales y municipio de procedencia de cada una.

Muestras seleccionadas	Municipio
C01-26	Chocontá
C04-04	Mosquera
C06-11	Carmen de Carupa

Cada aislamiento presentó características diferentes en cuanto a la sintomatología exhibida.

Para los aislamientos C04-04 y C06-11 provenientes de Mosquera y Carmen de Carupa respectivamente (Tabla 10) se observaron patrones de

comportamiento de las larvas muy similares. En primer lugar presentaron la coloración blanca, lechosa, uniforme en todo el cuerpo del insecto, típica de la infección por granulovirus (Figura 14 a y b). También se observó retraso en el crecimiento con tamaños significativamente menores comparados con los de las larvas sanas, lo cual fue más notorio para el aislamiento C04-04. Este efecto del virus es positivo desde el punto de vista del control, si se tiene en cuenta que una larva de menor tamaño consume menos alimento, lo cual puede verse reflejado en menores porcentajes de daño en los tubérculos, es decir, a pesar de que la larva no muere, causa menores daños que una larva sana.

Para el aislamiento C01-26 proveniente del municipio de Chocontá se observaron varias características particulares (Figura 14 c). En primer lugar, aunque las larvas presentaron la coloración blanca descrita anteriormente, ésta no fue uniforme en todo el cuerpo del insecto, observándose grumos o acumulaciones en algunos sitios específicos. Esto puede deberse a que el virus presenta especificidad por algunos tejidos del insecto y esto provoca la acumulación de cuerpos de inclusión en sitios específicos de la larva. Por otra parte, aunque también se produjo una disminución en la velocidad de crecimiento de las larvas, sus tamaños fueron mayores comparados con los de las larvas sanas de cuarto ínstar y con los de las larvas infectadas con el PhoGV del Perú (Figura 14 d y e). Este fenómeno fue reportado también por Zeddám *et al.* (1999) en su estudio sobre la virulencia de un aislamiento de PhoGV sobre larvas de *P. operculella* en Indonesia, en el cual encontró que aunque la velocidad de crecimiento de las larvas infectadas comparada con larvas sanas se reduce considerablemente, sus tamaños finales pueden ser mayores. Esto puede considerarse una desventaja ya que el aumento en el tamaño de las larvas indica que han permanecido activas, es decir, en constante alimentación durante su permanencia dentro del tubérculo aún cuando se está desarrollando el proceso de infección y aunque

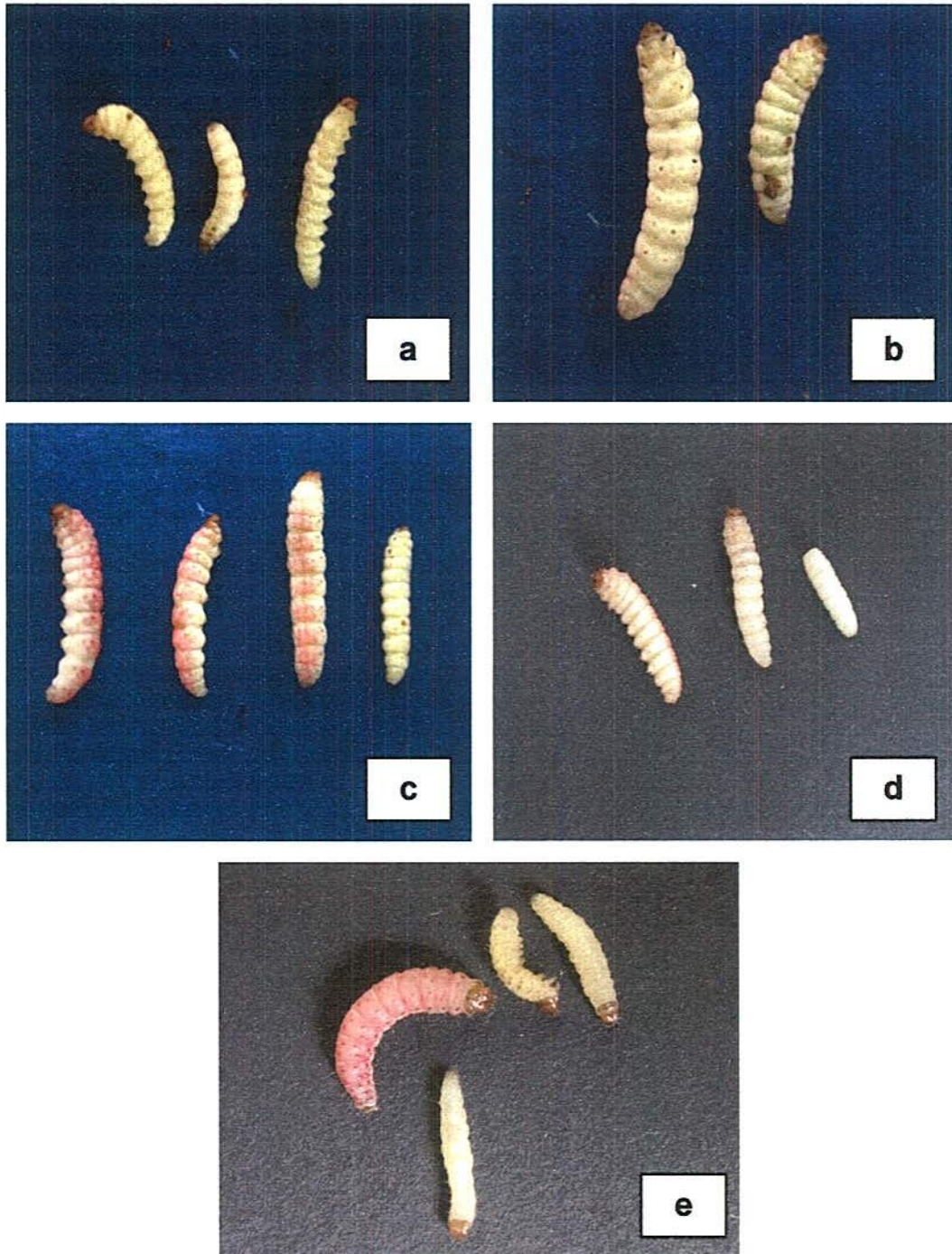


Figura 14. Sintomatología exhibida por larvas de *T. solanivora* afectadas por los diferentes aislamientos del virus de la granulosis. (a) Aislamiento C04-04. (b) Aislamiento C06-11. (c) Aislamiento C01-26. (d) PhoGV del Perú. (e) Larvas sanas

finalmente ocurra la muerte del insecto (Vasconcelos *et al.* 2005). Con este aislamiento las larvas podrían causar daños severos a los tubérculos a pesar de estar infectadas, pues posiblemente dicho virus no afectó notoriamente su capacidad de consumo de alimento.

Para los tres aislamientos seleccionados se observó como principal signo la coloración blanca lechosa de las larvas, la cual indica la presencia de granulovirus, aunque para cada aislamiento se presentaron características diferentes en cuanto a esta coloración, como se describió anteriormente. También se observó en general para todos los aislamientos el retraso evidente en el desarrollo de las larvas, de las cuales ninguna llegó al estado de pupa. Este fenómeno es importante en la detección de virus de la granulosis, ya que este tipo de virus interfiere con el empupamiento del insecto por la presencia de la enzima ecdisteroide UDP-glucosiltransferasa (EGT), la cual inhibe la muda de los insectos infectados (Nakai *et al.* 2002). Es por esto que la ausencia de pupas se consideró también como un factor indicativo de la presencia de granulovirus, al igual que el retraso en el crecimiento larval. Dicho retraso es una desventaja en los procesos de producción masiva de los virus de la granulosis, ya que debido al menor tamaño de la larva, hay menos células para que el virus se pueda replicar; por el contrario, el aumento en la duración del ciclo de desarrollo puede ser una ventaja si se considera que se maximiza la producción de cuerpos de inclusión, a diferencia de algunos virus que actúan muy rápido como los VPNs, en los cuales el virus no tiene tiempo de replicarse en todo el tejido larval (Hackett *et al.* 1999). Por tal razón, dicha consideración puede ser un factor importante en la producción de un bioplaguicida a nivel industrial, ya que se aprovecharían al máximo los recursos del hospedero utilizando como sistema de propagación viral el sistema *in vivo*. Sin embargo, desde el punto de vista práctico y aplicable en condiciones de campo, no es deseable que el insecto plaga permanezca vivo durante largos períodos de tiempo después

de haber implementado alguna estrategia de control, porque de esta forma el insecto tiene más tiempo para causar daños en el cultivo, constituyéndose ésta en una de las principales desventajas de la utilización de aislamientos del virus de la granulosis para el control de plagas en campo.

La variabilidad de síntomas observados en las larvas provenientes de la propagación viral de los tres aislamientos seleccionados pudo deberse a diferencias en la concentración del virus en la suspensión viral utilizada para la inoculación, la cual provenía de una sola larva que fue colectada en el sitio de muestreo. Una baja concentración del virus podría haber causado que la concentración de cuerpos de inclusión en la superficie de los huevos inoculados no hubiese sido homogénea, pudiendo ocurrir la infección en algunas larvas y en otras no; además, varias de aquellas larvas infectadas posiblemente adquirieron el virus a una dosis muy baja que no permitió evidenciar síntomas de la infección. Esto fue reportado por Laarif *et al.* (2003), quien demostró que las bajas concentraciones de virus presentes en las larvas pueden resultar en ausencia de sintomatología, aunque el insecto esté infectado.

Otra posible causa de dicha variabilidad es el uso de insectos de cría para la propagación viral, que en este caso pudo resultar desventajosa para algunas cepas del virus, considerando que varios autores han reportado que los insectos criados bajo condiciones de laboratorio son considerablemente más resistentes (hasta 11 veces) a infecciones por granulovirus que las líneas de campo (Briese y Mende 1981). Esta variabilidad intrínseca de los insectos es un factor a tener en cuenta en el momento de realizar bioensayos y de intentar reproducir síntomas virales, puesto que puede interferir con los resultados reales generando falsos negativos y en algunos casos resultados incoherentes. Con el fin de evitar al máximo la interferencia por la variabilidad de los insectos, en este estudio se controlaron la mayor cantidad de

condiciones que pudieran afectar el desarrollo del patógeno. Entre éstas cabe mencionar el uso de larvas de primer ínstar para propagar el virus, considerando que para *T. solanivora* este estado es el más susceptible a la infección viral tanto bajo condiciones de laboratorio como en campo (Crook *et al.* 1985). Además, según lo reportado por Lucarotti *et al.* (2004), la infección de los ínstares tempranos es vital para la infección de los ínstares tardíos. Por otra parte, durante todo el montaje de los bioensayos se mantuvo una temperatura constante y adecuada para el óptimo desarrollo de los granulovirus presentes en las muestras inoculadas, ya que entre las condiciones ambientales más influyentes, el rango de temperatura es la que más puede afectar la multiplicación y calidad del virus, afectando su replicación (Boucias *et al.* 1980). Aunque la temperatura no interfiere directamente con la infectividad del virus, sí puede hacerlo con el tiempo de desarrollo y la mortalidad del hospedero y por lo tanto es un aspecto clave en este tipo de ensayos en los que se desea observar el efecto de un determinado agente infeccioso sobre un insecto (Caballero *et al.* 2001; Sporleder 2003).

La propagación viral en larvas de primer ínstar de *T. solanivora* fue un paso fundamental para evidenciar y seleccionar los aislamientos del virus de la granulosis a partir de las muestras escogidas por microscopía. También fue útil en la medida en la que se logró aumentar la cantidad de virus presente en las muestras y por lo tanto se obtuvo una mayor cantidad de material de trabajo para los ensayos posteriores. Según lo establecido por Cherry (2002) mediante un análisis con endonucleasas de restricción, no existen diferencias entre el inóculo utilizado para propagar y la progenie viral después del pase por insectos de laboratorio, por lo que los aislamientos virales propagados obtenidos fueron utilizados con confianza para las siguientes pruebas.

6.4. CONFIRMACIÓN DE LA PRESENCIA DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

Como otra prueba para confirmar la posible presencia de granulovirus en las muestras se utilizó la técnica de disolución de los cuerpos de inclusión con una solución alcalina. Se tuvo como control positivo la hemolinfa de una larva infectada con el virus PhoGV del Perú y los tratamientos consistieron en la hemolinfa de larvas infectadas con los tres aislamientos seleccionados. Antes del tratamiento de la muestra se observaron en el microscopio las características típicas de la hemolinfa con cuerpos de inclusión de granulovirus (puntos blancos, brillantes, con movimiento browniano) y después del tratamiento con KOH 1M pH 11 se observó claramente la desaparición de dichos puntos blancos, así como la pérdida de brillo y de movimiento de los mismos (Figura 15 a y b), aunque no desaparecieron todos los cuerpos presentes en la muestra.

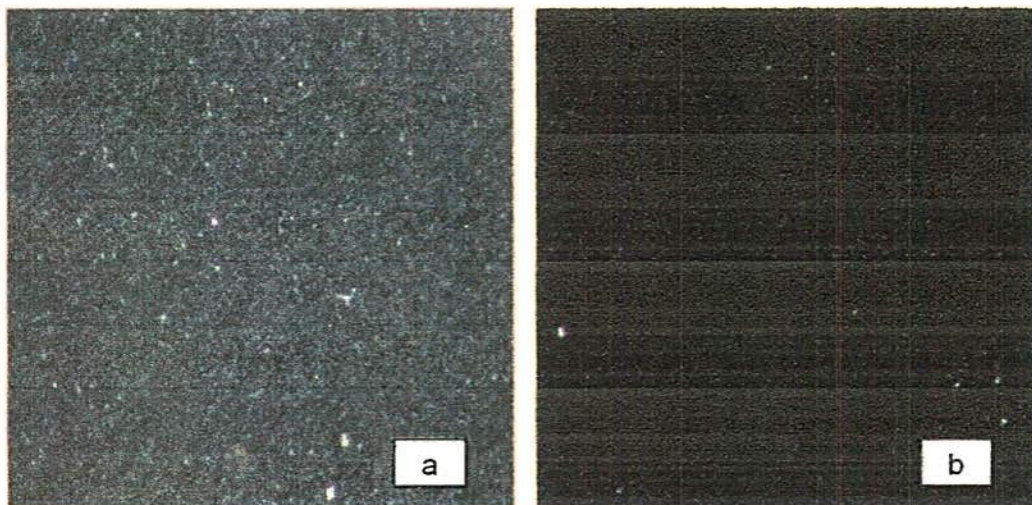


Figura 15. Cepa de granulovirus PhoGV del Perú. **(a)** Antes del tratamiento con KOH. **(b)** Después del tratamiento con KOH. Se observa la desaparición de la gran mayoría de los cuerpos blancos brillantes por disolución de la granulina de los cuerpos de inclusión. 400X.

Esta prueba confirmó que los cuerpos de inclusión de granulovirus son solubles en sustancias alcalinas como se ha reportado en la literatura (Pedraza *et al.* 1989; Zeddám *et al.* 1999; Caballero *et al.* 2001). Esta observación del virus de referencia fue utilizada como base para comparar las muestras nativas al ser tratadas con KOH siguiendo la misma metodología.

Las muestras de hemolinfa de insectos infectados con los aislamientos C04-04 y C06-11 después de someterse a la prueba de disolución de los cuerpos de inclusión, mostraron un comportamiento similar al de la cepa de granulovirus usada como referencia. Se observó la desaparición de las estructuras observadas, así como la pérdida de brillo y de movimiento que indicaría una disolución de dichos cuerpos en la solución alcalina. Estos resultados son coherentes nuevamente con que los aislamientos encontrados correspondan efectivamente a virus de la granulosis.

Para el aislamiento C01-26 proveniente de Chocontá, se observó un comportamiento un poco diferente comparado con las demás muestras analizadas, puesto que la disminución de la cantidad de cuerpos brillantes en el campo observado no fue tan evidente como la observada con la cepa de referencia del Perú; únicamente se observó una disminución en el brillo de los cuerpos más no una desaparición significativa de ellos (Figura 16 a y b). Sin embargo, no se descartó la presencia de granulovirus en esta muestra, ya que el hecho de que se observaran estructuras en el microscopio a pesar de haber adicionado la solución alcalina podría deberse a una disolución parcial de los cuerpos de inclusión, probablemente porque para una disolución completa de los gránulos de este aislamiento podría ser necesario un mayor tiempo de exposición o una concentración mayor de la solución alcalina, lo que podría estar relacionado con la alta concentración de cuerpos de inclusión en dicha muestra. También podría considerarse la presencia en

la muestra de otras estructuras resistentes a tratamientos alcalinos y con una alta refractibilidad al ser observadas al microscopio de campo oscuro, las cuales pudieron ser confundidas con gránulos y no fueron solubles a pH alcalino.

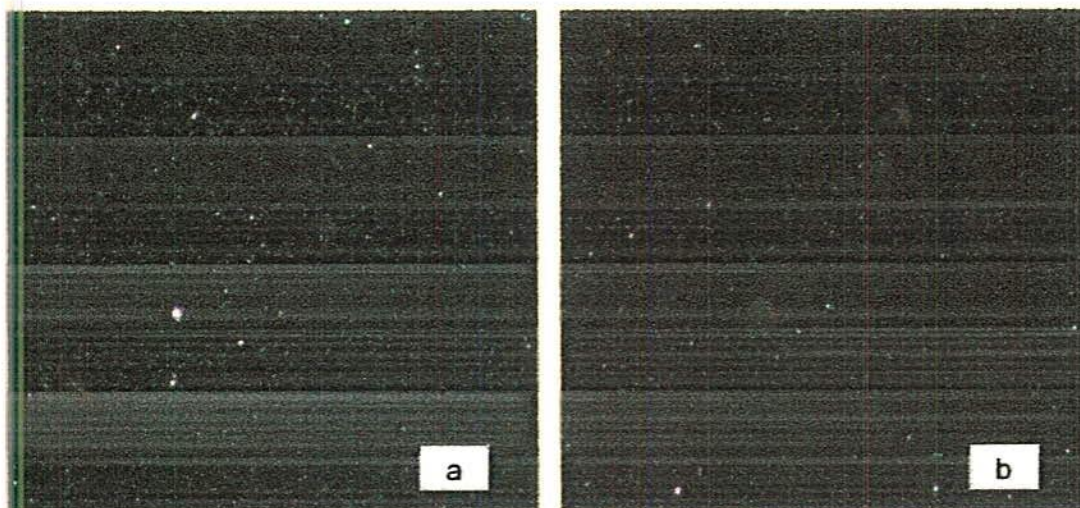


Figura 16. Aislamiento C01-26. (a) Antes del tratamiento con KOH. (b) Después del tratamiento con KOH. 400X.

Los resultados de esta prueba sugirieron nuevamente la presencia de cuerpos de inclusión de granulovirus en las muestras C04-04 y C06-11 y una posible presencia de estos en la muestra C01-26, por lo que los tres aislamientos continuaron siendo evaluados para establecer su identidad y actividad biocontroladora contra la polilla guatemalteca de la papa.

6.5. COLORACIÓN DE LOS GRÁNULOS

Otra técnica utilizada para confirmar la presencia de cuerpos de inclusión en las muestras seleccionadas fue la tinción de éstos con Azocarmine G, la cual se aplicó a la hemolinfa de larvas infectadas con todos los aislamientos en evaluación.

En primer lugar se realizó la tinción de la hemolinfa de una larva sana de *T. solanivora* con el fin de determinar si el colorante empleado presentaba algún tipo de afinidad por los componentes de la hemolinfa que pudieran interferir con los resultados dando falsos positivos. No se observó coloración de la hemolinfa del insecto sano, exceptuando algunas estructuras similares a fibras las cuales se tiñeron débilmente de rojo (Figura 17a); esto pudo deberse a que el colorante Azocarmine G presenta afinidad por algunos componentes del tejido fibroso, razón por la cual se usa en tinciones especiales para colorear algunos tipos de fibras, según lo reportado por Hasumi (2003). Este autor hizo una descripción detallada de la utilización del colorante Azocarmine G para tinciones histológicas empleando una metodología diferente a la desarrollada en esta investigación. Con esta tinción, las fibrinas y fibrinoides presentes en los tejidos se tiñen de rojo (Hasumi 2003) lo que podría explicar los resultados obtenidos con la hemolinfa del insecto sano. Esta misma metodología se encuentra ampliamente descrita en la literatura para el diagnóstico de enfermedades fibrosas y para estudios de tejidos, especialmente conectivo y muscular y aquellos en los que se presentan fibras de colágeno (Carvalho 1977; Yoshikawa *et al.* 2002). A pesar de la presencia de dichas estructuras en la muestra, dichas fibras coloreadas no significaron ningún tipo de interferencia para la determinación de la presencia de gránulos mediante la coloración con Azocarmine G, debido a que fueron fácilmente distinguibles, por lo que se utilizó este resultado como control negativo para el análisis de los aislamientos nativos.

Como control positivo se utilizó la coloración realizada a la hemolinfa de una larva infectada con la cepa de referencia PhoGV del Perú, la cual se comparó con la tinción de la hemolinfa de la larva sana y de esta forma se determinó que existe una diferencia considerable entre la hemolinfa de la larva con infección viral y la hemolinfa de una larva sana después de la tinción. En el

microscopio óptico se observó para la hemolinfa con cuerpos de inclusión, una alta densidad de puntos de color rojo intenso entre restos de tejidos y células de la larva (Figura 17b), sugiriendo que el colorante presentó afinidad por determinadas estructuras presentes en el insecto infectado, que no se observaron en el insecto sano, las cuales muy probablemente corresponden a los cuerpos de inclusión de granulovirus.

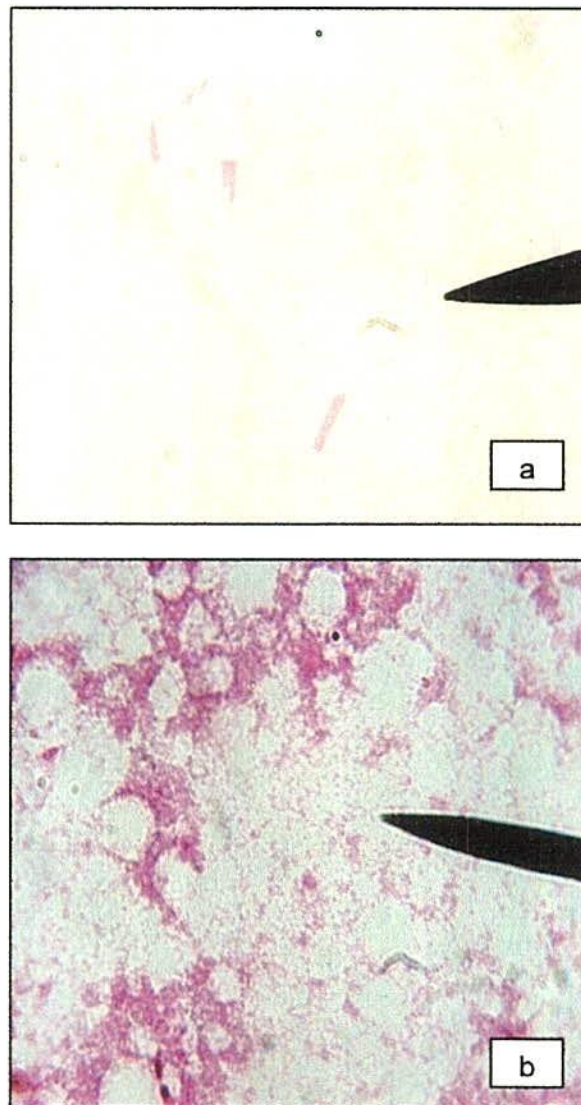


Figura 17. Coloración con Azocarmine G realizada a la hemolinfa de larvas de *T. solanivora* (a) Larva sana. (b) Larva infectada con PhoGV del Perú. 1000x.

Según Hamm (1966) cuando se realiza la coloración de tejidos de lepidópteros infectados con baculovirus, los cuerpos de inclusión se observan de color rojo y esto concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación. La presencia de este color rojo intenso en las muestras de tejido infectado es debida a la presencia de cuerpos de inclusión de granulovirus y al alto grado de desintegración celular (Sciocco-Cap *et al.* 2001).

Aunque la forma de los gránulos no se observó claramente debido a su tamaño, el cual se encuentra al límite de la resolución del microscopio óptico (Huger 1961), al comparar con la coloración de la hemolinfa de una larva sana en la que no se observó una tinción de estructuras definida y abundante como la obtenida con la hemolinfa de la larva infectada, se puede sugerir que muy probablemente los cambios en la coloración son debidos a la infección por granulovirus.

Para el aislamiento C04-04 proveniente de Mosquera, la hemolinfa teñida presentó un aspecto muy similar al de la cepa de referencia y diferente de el obtenido con la hemolinfa de la larva sana (Figura 18a), sugiriendo nuevamente la posible infección por granulovirus en las larvas de *T. solanivora* inoculadas con este aislamiento. En este caso la coloración se presentó con un color rojizo mucho más intenso comparado con el obtenido con la cepa de referencia. Esto pudo deberse probablemente a que el virus evaluado presentó afinidad hacia ciertos tejidos de la larva diferentes a los que fueron afines para la cepa de referencia, lo que hizo que los gránulos se acumularan en sitios específicos del cuerpo del insecto. Pudo ocurrir también que este aislamiento del virus de la granulosis haya generado una mayor producción de cuerpos de inclusión por gramo de tejido de las larvas de *T. solanivora* que los producidos con la cepa de referencia, lo que posiblemente produjo una mayor concentración de gránulos en la muestra de hemolinfa del

aislamiento C04-04 y por lo tanto una mejor fijación del colorante y una coloración más intensa en el montaje. Una mayor producción de cuerpos de inclusión por parte de este aislamiento sugeriría una mayor especificidad hacia el hospedero.

En cuanto al aislamiento C06-11 proveniente del municipio de Carmen de Carupa, aunque se observó también una tinción de la hemolinfa infectada con las mismas características obtenidas con la cepa de referencia del Perú, esta tinción fue más tenue, observándose un color fucsia pálido (Figura 18b). Este resultado sugiere que probablemente la producción de cuerpos de inclusión de este aislamiento de granulovirus en larvas de *T. solanivora* fue menor que la obtenida con el aislamiento C04-04 y con la cepa de referencia del Perú; por lo tanto, se podría sugerir que la muestra de hemolinfa posiblemente contenía menos cuerpos de inclusión y en consecuencia la fijación del colorante fue más tenue.

Por último, para el aislamiento C01-26 proveniente de Chocontá se presentó un fenómeno particular en la coloración de la hemolinfa, ya que aunque se observaron de igual manera cuerpos pequeños de color rojo intenso (Figura 19a) similares a los observados con la cepa de referencia, estos se presentaron con una menor densidad. Por otra parte también aparecieron en la coloración una gran cantidad de estructuras de mayor tamaño, de forma ovalada y claramente definidas (Figura 19b), con características similares a las de endosporas bacterianas. Con el fin de corroborar esta sospecha e identificar el tipo de estructura correspondiente a los cuerpos observados, se hizo una coloración con verde de malaquita-safranina para endosporas bacterianas (Anexo E) con otra muestra de la hemolinfa del insecto infectado. Como resultado de esta coloración se encontraron algunas células vegetativas con forma bacilar y una cantidad significativa de endosporas, las cuales se colorearon de verde. Se aisló el microorganismo utilizando la

metodología para aislar bacterias mesófilas esporuladas (Anexo E) con el fin de facilitar su identificación y realizar investigaciones posteriores con este microorganismo en las que se estudie el papel que desempeña en las larvas de *T. solanivora*. Esto podría explicar los dos fenómenos anteriormente descritos para el aislamiento C01-26 en cuanto a las diferencias en la sintomatología de las larvas infectadas (presencia de grumos blancos en el interior de la larva) y a los resultados dudosos de la prueba de disolución de los cuerpos de inclusión con KOH (ausencia de disolución de los cuerpos observados).

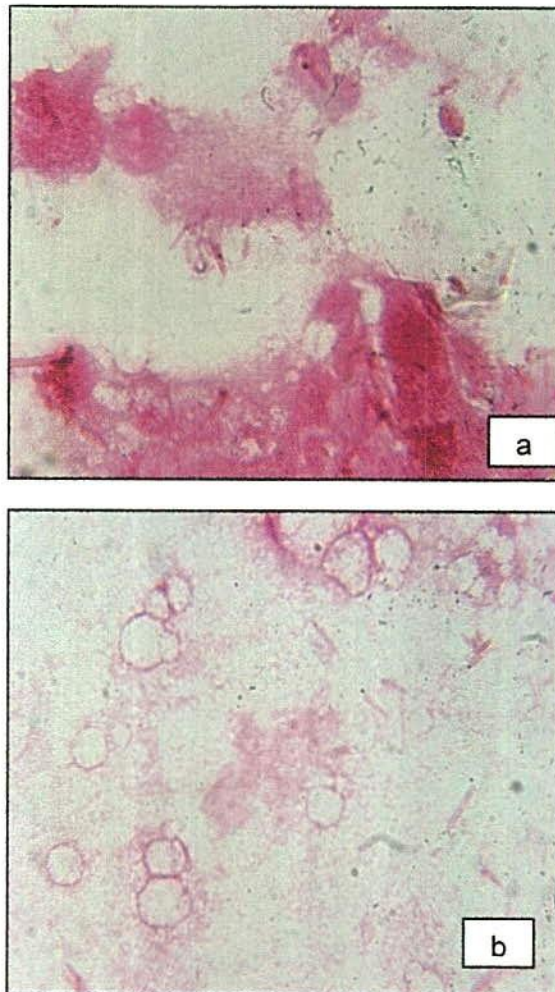


Figura 18. Coloración con Azocarmine G realizada a la hemolinfa de larvas de *T. solanivora* (a) Aislamiento C04-04. (b) Aislamiento C06-11. 1000x.

La presencia de este otro agente en las larvas analizadas podría sugerir una coinfección en el insecto, es decir, que las larvas del aislamiento C01-26 pudieron presentar infección por un virus de la granulosis y al mismo tiempo por una bacteria esporulada. Es importante realizar estudios acerca de este fenómeno ya que, como lo señala Hackett *et al.* (1999), las coinfecciones en insectos pueden resultar en una inhibición del agente viral, es decir, que se obtengan menores mortalidades que con cada agente por separado o pueden resultar en una potencialización por interacciones sinérgicas; en este caso estos efectos no se estudiaron pero se dejó la puerta abierta para el análisis de la presencia de más de un agente infeccioso en las larvas de *T. solanivora* y las implicaciones que esto conlleva.

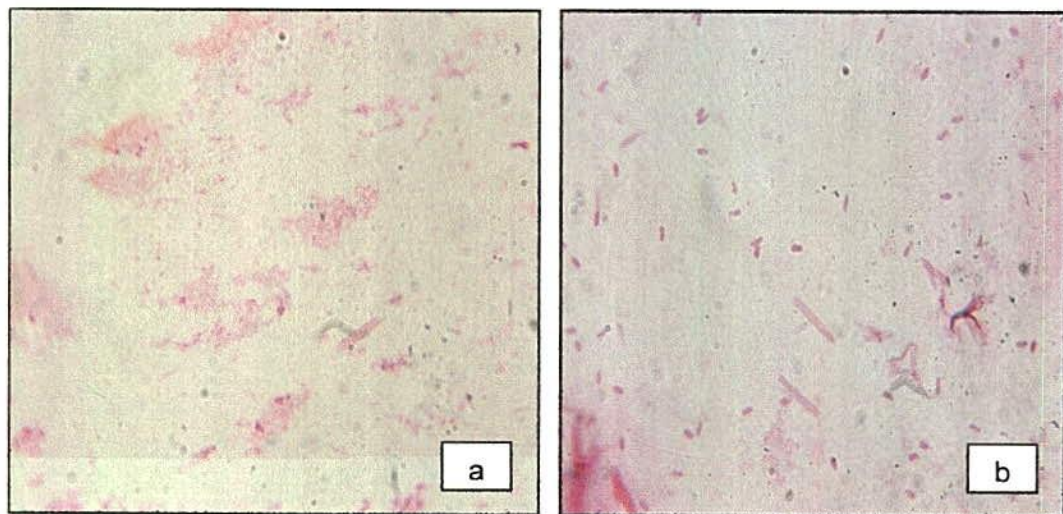


Figura 19. Coloración con Azocarmine G de la hemolinfa de una larva infectada con el aislamiento C01-26. **(a)** Posible presencia de granulovirus. **(b)** Estructuras parecidas a endosporas bacterianas. 1000x

Hamm (1966) desarrolló la tinción a base del colorante Azocarmine G para cuerpos de inclusión virales presentes en los tejidos de algunos lepidópteros, basándose en la tinción de Azan empleada en pruebas histológicas de rutina, pero en este caso tratando la muestra previamente con un ácido, ya que los

cuerpos de inclusión son resistentes a tinciones biológicas a menos que se traten con un ácido débil, como el ácido acético (Pedraza *et al.* 1989). La técnica desarrollada fue exitosa para la observación de virus de la poliedrosis así como de virus de la granulosis en tejidos de insectos, presentando estos cuerpos un color rojo intenso que permitió diferenciarlos de otras estructuras propias de las células y tejidos; sin embargo, la técnica era demorada y demandaba altos costos (Brancahão *et al.* 2000).

Años más tarde, Brancahão *et al.* (2000) adaptaron esta técnica para la detección de cuerpos de inclusión de virus de la poliedrosis en larvas del gusano de seda *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Esta adaptación resultó en una técnica más rápida, sencilla y económica que la original y fue desarrollada para detectar los cuerpos de inclusión en muestras de hemolinfa, tejido y virus purificado. Sumado a esto, el tamaño de los cuerpos de inclusión de los virus de la poliedrosis, el cual es mayor que el de los virus de la granulosis, permite su identificación fácilmente al ser observados al microscopio de luz convencional, pudiendo determinar también características morfológicas importantes para su diagnóstico (Brancahão *et al.* 2000), a diferencia de las estructuras de granulovirus observadas en este estudio, las cuales no presentaron formas definidas debido a su menor tamaño.

En otras investigaciones se ha reportado la utilización del colorante Azocarmine G para la detección y estudio de cuerpos de inclusión tanto de nucleopoliedrovirus (Maracajá *et al.* 1999) como de granulovirus (Sciocco-Cap *et al.* 2001) en tejidos de larvas, obteniéndose resultados exitosos en cuanto a la tinción de cuerpos de inclusión, lo que ha permitido determinar aspectos importantes tales como presencia y especificidad del virus hacia ciertos tejidos, velocidad y severidad de la infección, etc.

Por estas razones, y aunque no se conocen los aspectos bioquímicos que hacen parte de la interacción entre el colorante y la granulina, la utilización de Azocarmine G bajo la técnica empleada en este estudio puede ser considerada una herramienta útil en la determinación de una infección por granulovirus; sin embargo, al ser una adaptación y modificación de otras técnicas, está sujeta a cambios y mejoras con el fin de obtener óptimos resultados.

Los resultados de esta prueba confirmaron la posible presencia de granulovirus en las muestras C01-26, C04-04 y C06-11, por lo que se continuó el estudio con los estos aislamientos.

6.6. ELABORACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN PARA CUANTIFICACIÓN DE GRANULOVIRUS

Los datos de absorbancia obtenidos para las suspensiones con diferentes concentraciones de Granulovirus (Anexo F) permitieron establecer la ecuación de regresión que relaciona la absorbancia con la cantidad de cuerpos de inclusión por mililitro de muestra (Figura 20), tal como lo reportaron Mathiessen *et al.* (1978), quienes establecieron que la turbidez de una suspensión de virus de la granulosis presenta una relación lineal con la absorbancia leída a 450 nm, cumpliendo con la ley de Lamber-Beer.

El método de mínimos cuadrados aplicado a los datos utilizando el programa Statistix permitió determinar la ecuación que mejor se ajustó al comportamiento de los datos. La repetibilidad de los resultados fue alta considerando que el coeficiente de correlación presentó un valor de 0,99, lo que indicó una buena linealidad y uniformidad entre las repeticiones. Además se obtuvo un coeficiente de variación de los factores inferior al 5%, límite establecido para los métodos espectrofotométricos (Daniel 2000). Basados en estos resultados se puede concluir que la ecuación obtenida es confiable

y puede utilizarse para determinar matemáticamente la cantidad de cuerpos de inclusión de granulovirus presente en muestras de concentración desconocida, mediante la lectura de su absorbancia.

La ecuación obtenida fue:

$$A = 1.26 \times 10^{-8} * X + 7,13 \times 10^{-3}$$

Donde A = absorbancia y X = concentración

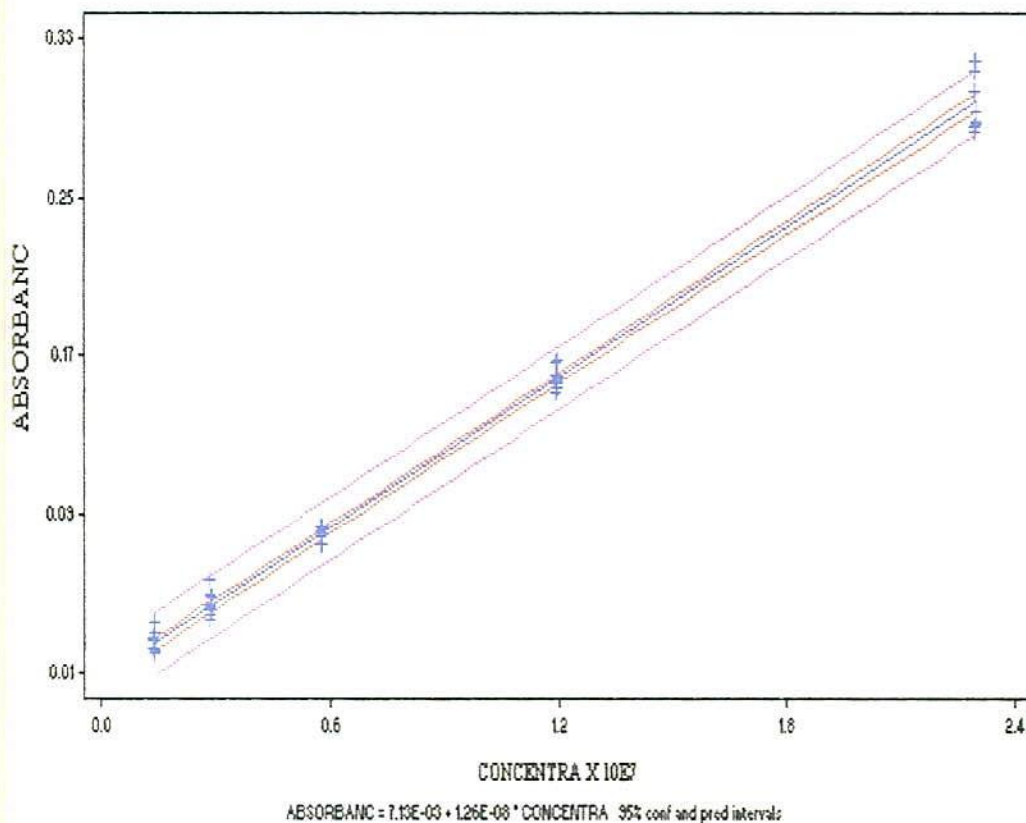


FIGURA 20. Curva de calibración para la cuantificación de granulovirus.

Aunque los resultados corroboran lo reportado por Mathiessen *et al* (1978), se encontraron diferencias en cuanto a la ecuación de la recta obtenida, ya que estos autores determinaron que el número de cuerpos de inclusión presentes en 1 ml de una suspensión de granulovirus con una absorbancia

de 1 (DO 450) era de aproximadamente $6,9 \times 10^9$ CI. Con los datos encontrados en esta investigación se encontró un valor de 1×10^8 CI para una muestra con la misma absorbancia, aproximadamente 70 veces menos que el resultado anteriormente reportado. Esto podría deberse a los métodos de purificación empleados en los dos trabajos, los cuales fueron distintos y pudieron resultar en la obtención de cuerpos de inclusión virales con diferentes grados de pureza. Por tales razones en la muestra obtenida por alguno de los dos métodos de purificación se pudieron presentar partículas interferentes que generaron difracción en las absorbancias leídas. Por otra parte, para el recuento de los cuerpos de inclusión, los autores anteriormente mencionados utilizaron una metodología diferente al recuento en cámara de Neubauer mediante microscopía de campo oscuro utilizada en el presente trabajo. La metodología descrita por dichos autores consistía en adherir las partículas virales purificadas sobre bolitas de látex y luego contar mediante microscopía electrónica el número de partículas adheridas (Mathiessen *et al* 1978).

Por otra parte, Zeddarn *et al.* (2003) siguiendo la misma metodología empleada en este estudio, determinaron que el número de cuerpos de inclusión presentes en 1 ml de una suspensión de granulovirus con una absorbancia de 1 (DO 450) era de aproximadamente $6,8 \times 10^8$ CI, valor similar al calculado en este estudio (1×10^8 CI). Por tal razón se puede establecer que la técnica para la elaboración de una curva de calibración para cuantificación de granulovirus es reproducible y con ella se obtienen resultados útiles si se manejan adecuadamente todos los factores implicados. Otra ventaja es la disminución del error que se puede presentar al utilizar el método de conteo de cuerpos de inclusión en el microscopio de campo oscuro, método que además es demorado y dispendioso.

Con la ecuación obtenida para esta curva se calcularon las concentraciones de las suspensiones de granulovirus de los tres aislamientos seleccionados y de la cepa de referencia del Perú, las cuales fueron utilizadas para el montaje de los bioensayos.

6.7. PURIFICACION DEL VIRUS

Se realizó la purificación de los cuerpos de inclusión de granulovirus en primer lugar utilizando la cepa de referencia del Perú. El virus fue purificado mediante centrifugaciones diferenciales en gradientes de sacarosa, los cuales facilitan la separación de los gránulos de otros materiales contaminantes como grasa, bacterias, residuos celulares y limos provenientes de la larva (Pedraza *et al.* 1989). Posteriormente se siguió el mismo procedimiento de purificación con los tres aislamientos de granulovirus nativos seleccionados.

El método descrito para la purificación de las partículas virales permitió la obtención de una banda blanca en el gradiente de sacarosa entre las concentraciones de 65% y 80% correspondientes a los cuerpos de inclusión de granulovirus concentrados (Vázquez *et al.* 2002) y se observaron otras dos fracciones, una en la parte superior correspondiente a partículas de grasa y bacterias y otra en la parte inferior en la cual se encontraban los materiales más pesados como restos celulares (Figura 21).

Una muestra de la banda blanca obtenida se observó al microscopio óptico de campo oscuro observándose numerosos cuerpos de inclusión en forma de puntos blancos, brillantes, con ligero movimiento browniano, los cuales no mostraron ningún tipo de contaminación por presencia de otras partículas, indicando así que el proceso de purificación fue útil para eliminar gran parte de la contaminación proveniente del hospedero. Sin embargo, presenta algunas desventajas puesto que se ha determinado que esta clase de

procedimientos usados para purificar cuerpos de inclusión de tejidos larvales puede eliminar más de la mitad de las partículas virales infecciosas, recuperándose tan solo un 37% (Tweeten *et al.* 1977; Hughes y Wood 1996), por lo que no sería recomendable la utilización de gránulos purificados para la producción de un bioplaguicida a nivel comercial.

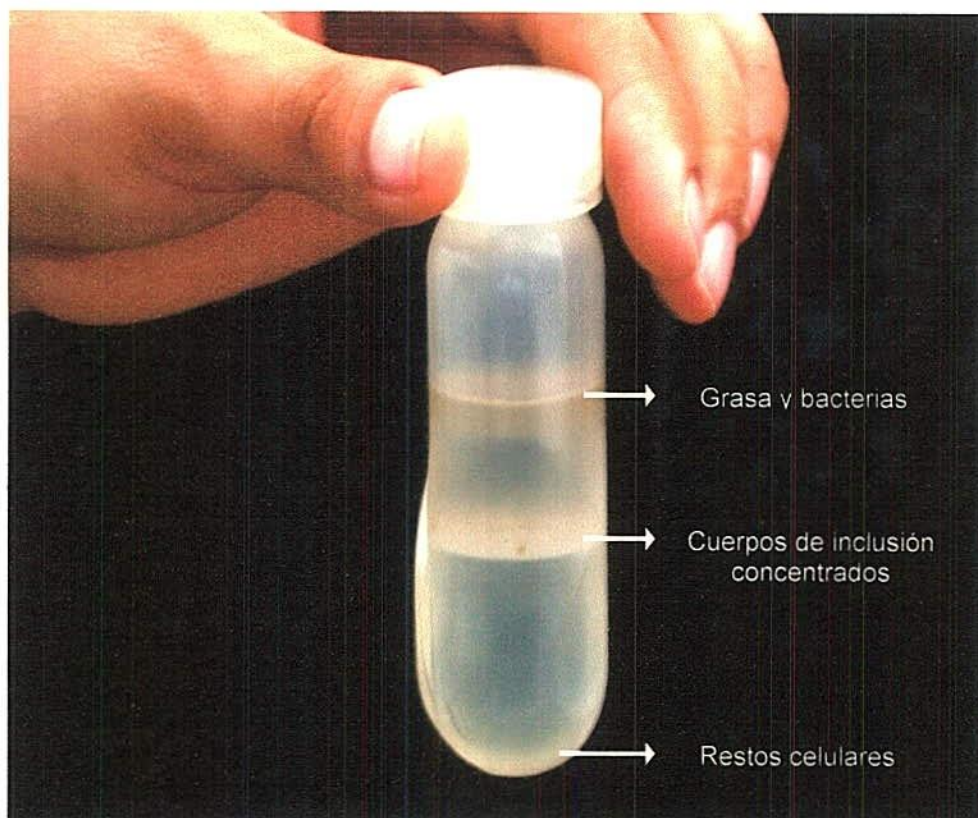


FIGURA 21. Fracciones obtenidas después de someter la suspensión viral a centrifugación en gradiente de sacarosa de 45%-80% a 27000g x 90 minutos

Tweeten *et al.* (1977) evaluaron la calidad de un proceso de purificación de granulovirus similar al descrito en este estudio, basados en tres criterios: contaminación proveniente del hospedero, integridad estructural del virus purificado e infectividad de las partículas virales. Se encontró que el procedimiento de purificación libera los cuerpos de inclusión virales de

contaminación del hospedero, preserva los componentes estructurales los cuales se mantienen intactos y resulta en el aislamiento de virus altamente infecciosos, los cuales mantienen su actividad biológica. Además, estos autores describieron la importancia de cada paso en el proceso de purificación, encontrando que (Tweeten *et al.* 1977):

- El tratamiento del macerado de larvas con un detergente aniónico como el SDS facilita la ruptura de los tejidos celulares que permanecen intactos y la liberación de los cuerpos de inclusión; además, elimina gran parte de las proteínas larvales.
- La centrifugación a bajas velocidades remueve el 37% de las proteínas del hospedero.
- La centrifugación a altas velocidades sedimenta el virus y elimina el 5% de la contaminación del hospedero.
- Las centrifugaciones diferenciales remueven cantidades sustanciales (95%) del material del hospedero.

La utilización de gradientes de sacarosa para la separación y purificación de cuerpos de inclusión de baculovirus ha sido ampliamente documentada por diferentes autores, quienes han confirmado por microscopía electrónica la pureza de los cuerpos de inclusión obtenidos. Las partículas virales purificadas facilitan el desarrollo de investigaciones más finas en cuanto a morfología, análisis estructurales, bioquímicos y moleculares, siendo de gran utilidad eliminar las interferencias por material contaminante (Arif *et al.* 1986; Singaravelu y Ramakrishman 1998; Finnerty *et al.* 2000; Vázquez *et al.* 2002).

6.8. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Para confirmar la identidad de los aislamientos nativos se realizó una electroforesis de proteínas con las muestras de virus purificado de los

aislamientos C01-26, C04-04 y C01-26, dos aislamientos codificados como N01-08 y Nr-004 provenientes de los departamentos de Nariño y Norte de Santander respectivamente y se tuvo como referencia la cepa PhoGV proveniente del Perú.

En la electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida de los cuerpos de inclusión se observó una banda para todos los aislamientos en la misma posición (Figura 22), correspondiente a una proteína del mismo peso molecular. Esta banda sugiere la presencia de un polipéptido simple con un peso molecular ligeramente mayor a 35 kDa, coherente con el peso molecular promedio de la granulina reportado en la literatura por varios autores, la cual oscila entre 29 a 38 kDa (Caballero *et al.* 2001). Crook y Brown (1982) aislaron y caracterizaron dos granulovirus de la polilla del tomate *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae); la electroforesis realizada con estos dos aislamientos produjo un polipéptido de 29 kDa. Finnerty *et al.* (2000) analizaron los polipéptidos de un granulovirus del gusano de la yuca *Erinnys ello* mediante electroforesis SDS-PAGE y detectaron 10 proteínas, de las cuales la proteína mayoritaria correspondiente a la granulina tenía un peso molecular de 32 kDa. Sciocco-Cap *et al.* (2001) caracterizaron un granulovirus de la polilla del frijol *Epinotia aporema* (Lepidoptera: Tortricidae), obteniendo mediante electroforesis, una banda de 29 kDa correspondiente a la granulina.

El hecho de que la granulina de todos los aislamientos virales evaluados presenten un peso molecular muy similar puede deberse a la alta estabilidad del gen que codifica para la esta proteína, que según algunos autores se encuentra altamente conservado lo cual resulta en proteínas que varían muy poco en sus pesos (Singaravelu y Ramakrishnan 1997).

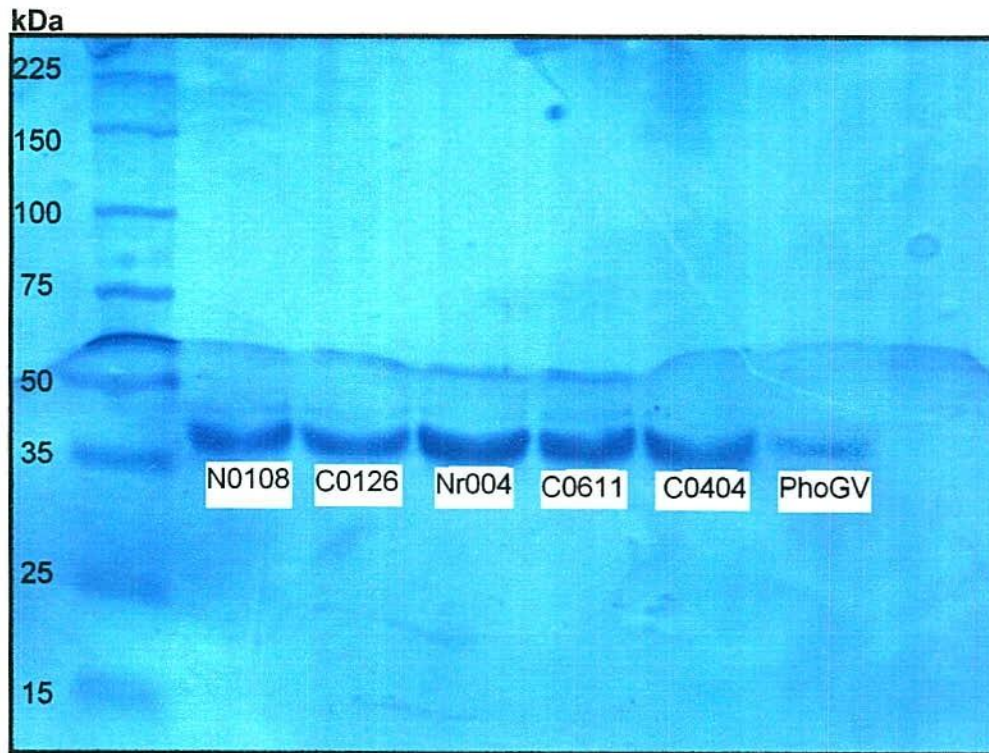


FIGURA 22. Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida de los diferentes aislamientos de granulovirus.

Por otra parte, aunque para todos los aislamientos de granulovirus se observó una banda de proteína de igual peso molecular, estas bandas variaron en la intensidad de su color, obteniéndose bandas tenues como la de la cepa de referencia del Perú. La variación en la intensidad de la tinción puede deberse a que probablemente los cuerpos de inclusión de esta cepa se denaturan menos fácilmente que los de los otros aislamientos cuando son calentados en el tampón de carga (Finnerty *et al.* 2000). Otra posible causa de la variación en la intensidad de la tinción pudo ser la diferencia en la concentración de las suspensiones virales purificadas empleadas, puesto que este parámetro no se tuvo en cuenta para el montaje de la electroforesis. Esto pudo resultar en suspensiones virales con una concentración baja de

cuerpos de inclusión, las cuales se tiñeron más débilmente que aquellas que presentaban concentraciones de cuerpos de inclusión mayores.

Los resultados de esta prueba confirmaron la identidad de los aislamientos C01-26, C04-04 y C06-11 como granulovirus, pero no fue posible establecer diferencias entre estos puesto que la proteína de todos presentó aproximadamente el mismo peso molecular, por tal razón, para determinar si los virus evaluados son diferentes se recomienda realizar análisis del ADN mediante la elaboración de perfiles con enzimas de restricción.

6.9. COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS

Para establecer diferencias entre los aislamientos virales nativos y el efecto de la formulación sobre estos, se desarrolló un bioensayo bajo condiciones controladas. Los porcentajes de eficacia obtenidos fueron del 86,2%, 63,6%, 36,4% y 59,1% para los aislamientos C04-04, C01-26, C06-11 y la cepa de referencia del Perú respectivamente, cuando fueron utilizados sin formular y porcentajes de eficacia del 93,2%, 88,7%, 100% y 88,7% para los aislamientos C04-04, C01-26, C06-11 y la cepa de referencia del Perú respectivamente, cuando fueron sometidos al proceso de formulación estandarizado en la planta de producción semicomercial de Baculovirus de Corpoica (Figura 23) (Anexo G).

La prueba de comparación de medias de Tukey detectó diferencias significativas entre los tratamientos formulados y sin formular para los aislamientos virales C01-26, C06-11 y la cepa de referencia del Perú siendo en estos casos significativamente mayor ($p=0,00$) el porcentaje de eficacia obtenido cuando fueron sometidos al proceso de formulación. Este resultado sugiere que posiblemente los auxiliares de formulación empleados para elaborar el producto tuvieron un efecto sobre las larvas de *T. solanivora*, ya

sea causando su muerte o aumentando su susceptibilidad al virus. Dicho efecto podría deberse a la presentación del producto en forma de polvo que además tiene un tamaño de partícula muy pequeño (100 μm) (Villamizar *et al.* 2005), lo cual pudo producir el taponamiento de los espiráculos de las larvas impidiendo su respiración y en consecuencia causando la muerte. Éste taponamiento también podría haber causado una disminución de la tasa respiratoria de los insectos, debilitándolos y por ende haciéndolos más susceptibles a la infección (McVean *et al.* 2002).

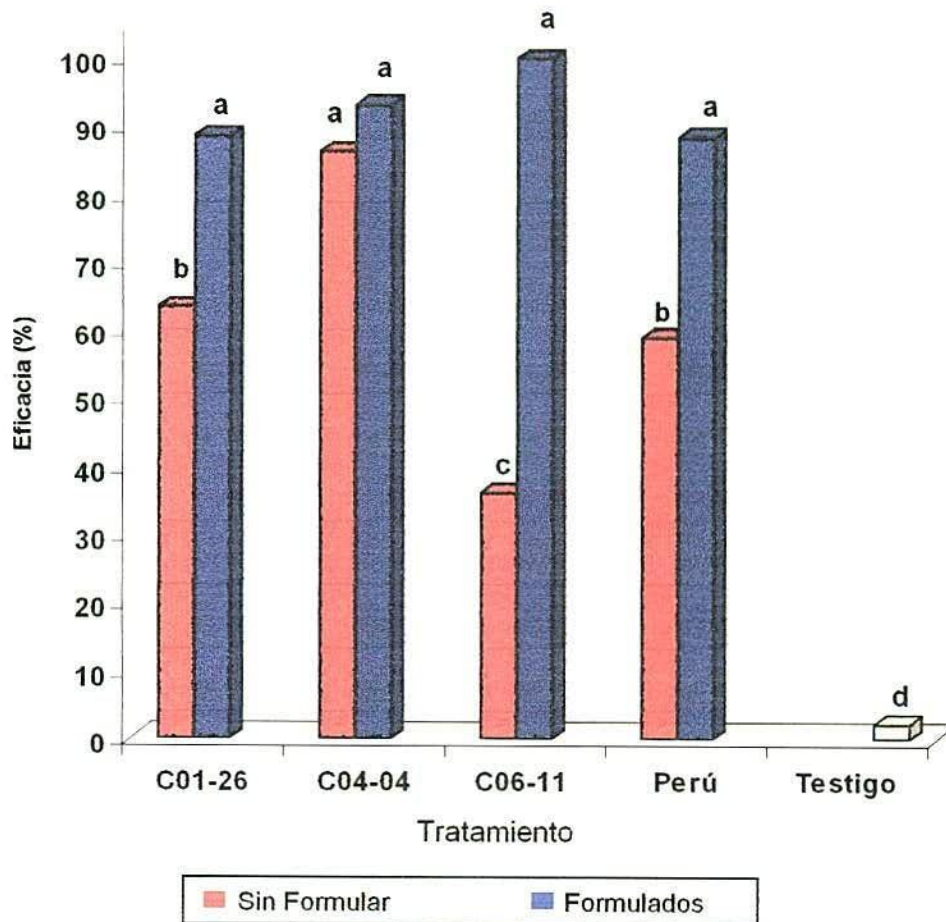


Figura 23. Actividad biocontroladora de los aislamientos nativos de granulovirus formulados y sin formular, sobre larvas de *T. solanivora*

* Valores con letras distintas difieren significativamente entre sí conforme a Tukey
 $P = 0.05$

Resultados similares fueron reportados por Ben Salah y Aalbu (1992) quienes evaluaron el uso de un granulovirus para el control de *P. operculella* en condiciones de campo y observaron que el talco usado para la formulación, el cual presentó características fisicoquímicas similares a las del producto elaborado en el presente trabajo, causó la muerte de las larvas de la polilla por taponamiento de sus espiráculos. Araque y García (1999) reportaron también que las larvas de primer ínstar de *Tecia solanivora* son susceptibles al contacto con polvos finos, los cuales causan deshidratación del insecto. Este efecto pudo haberse presentado también con los aislamientos formulados evaluados en el presente estudio, ya que la formulación presenta una muy baja humedad (< 5%) y contiene silicatos que se caracterizan por su capacidad para absorber agua (American Pharmaceutical Association 1983). En consecuencia, los formulados posiblemente generaron un estrés evaporativo en las larvas, fenómeno que ha sido reportado como fundamental en la respiración de los insectos y por tanto en la sobrevivencia de los mismos (Meyer 2002). A pesar del efecto de los auxiliares de formulación sobre las larvas, no se han encontrado resultados exitosos de control de la plaga con la utilización de estos solos, sin aplicar virus (Ben Salah y Aalbu 1992). Tal es el caso del trabajo de Alcázar *et al.* (1992) quienes realizaron un estudio sobre la efectividad de un virus de la granulosis formulado en polvo para controlar *P. operculella*, en el cual utilizaron como testigo el tratamiento de tubérculos únicamente con talco; en los tratamientos en los que utilizaron el agente viral no se recuperó casi ninguna pupa, mientras que el tratamiento con talco sin el agente viral presentó un número de pupas mayor y significativamente diferente del tratamiento con el virus. En otros estudios se ha reportado que el tratamiento de tubérculos únicamente con talco para el control de *T. solanivora*, no supera el 30% de mortalidad larval (Villamizar *et al.* 2005).

El análisis estadístico también detectó diferencias significativas entre los porcentajes de eficacia de los aislamientos sin formular ($p=0.00$). Los aislamientos C01-26, C04-04 y C06-11 fueron estadísticamente diferentes entre sí y los aislamientos C04-04 y C06-11 presentaron diferencias con respecto a la cepa de referencia del Perú, pero no se encontraron diferencias entre esta última y el aislamiento nativo C01-26. Estos resultados indican que posiblemente existen diferencias en la virulencia de los tres aislamientos nativos, lo que podría estar asociado a variabilidad genotípica entre los mismos. Generalmente, el hallazgo de diferentes aislamientos de Baculovirus en distintas regiones geográficas a partir de un mismo insecto hospedero, ha resultado en cepas de virus que tienen el mismo origen, pero que debido a su adaptación a las diferentes condiciones, tanto del insecto como del ecosistema, han sufrido pequeñas variaciones genotípicas que pueden resultar en grandes diferencias en cuanto a su virulencia respecto a la cepa original (Harvey y Volkman 1983).

Las variaciones genéticas en poblaciones de baculovirus han sido detectadas a varias escalas ecológicas entre regiones geográficas; también se han encontrado diferencias en la patogenicidad entre los aislamientos de diferentes regiones y entre genotipos derivados del mismo aislamiento (Hodgson *et al.* 2001).

Uno de los casos más estudiados a nivel mundial ha sido el del granulovirus de *P. operculella*, el cual ha sido ampliamente investigado en términos de diferencias genéticas entre los diferentes aislamientos de diversos orígenes geográficos. Vickers *et al.* (1991) compararon 14 aislamientos del PhoGV de ocho regiones del mundo usando endonucleasas de restricción y utilizando bioensayos para comparar la actividad biocontroladora. Se encontraron tres genotipos diferentes y diferencias significativas en la actividad biológica de

los aislamientos, aunque no se pudo comprobar que estas diferencias se derivaran de las variaciones genotípicas.

Léry *et al.* (1998) en su estudio sobre la heterogeneidad genética de diferentes aislamientos de PhoGV, describen que la mayoría de granulovirus aislados en condiciones de campo consisten en mezclas de variantes genéticamente heterogéneas. En este estudio encontraron que efectivamente existen muchas variantes del virus nativo original aislado en Túnez, las cuales fueron demostradas por la presencia de diferentes fragmentos en los perfiles obtenidos usando endonucleasas de restricción. Estos autores atribuyen las variaciones a una adaptación del aislamiento original a las condiciones proporcionadas o a una recombinación entre el aislamiento original y otras cepas de granulovirus endógenas del hospedero, situación reportada también por Singaravelu y Ramakrishman (1998), quienes atribuyeron las variaciones genotípicas de un solo aislamiento de baculovirus, al proceso de recombinación entre un pequeño número de variantes del virus que coinfectan la larva hospedero bajo condiciones de campo.

Para otro tipo de granulovirus ha sido reportada también la variabilidad genética entre aislamientos de una misma especie de virus. Crook *et al.* (1985), reportaron que diferentes aislamientos del granulovirus de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) de varios países presentaron pequeñas variaciones genéticas; sin embargo, estas variaciones no resultaron en diferencias en la actividad biológica, concluyendo que los aislamientos provenían de un mismo virus nativo aislado en México en 1963. Arif *et al.* (1986) compararon tres granulovirus aislados de la plaga de abetos *Choristoneura* sp. (Lepidoptera: Tortricidae) y el análisis por endonucleasas de restricción reveló que los tres virus estaban muy cercanamente relacionados pero no eran idénticos.

La variabilidad genética entre los aislamientos que generó las diferencias en la actividad biocontroladora de los mismos podría estar relacionada con los genes con actividad antiapoptótica que poseen los baculovirus, los cuales pueden expresarse de diferentes maneras en los aislamientos del virus (Quansheng *et al.* 1999). La apoptosis es el suicidio celular programado que juega un papel crítico durante el desarrollo normal y la homeóstasis de los tejidos, eliminando las células no deseadas, incluyendo las dañadas o las infectadas por virus. Los baculovirus poseen dos tipos de genes con actividad antiapoptótica, el *iap* y el *p35*, los cuales inhiben la apoptosis principalmente por la inhibición de algunas proteasas (caspasas) que juegan un papel determinante en la muerte celular, como lo reportaron Quansheng *et al.* (1999).

El aislamiento nativo que al ser utilizado sin formular produjo el mejor porcentaje de eficacia fue el C04-04 proveniente de Mosquera (Cundinamarca), sugiriendo que es el aislamiento más virulento. Sin embargo, cuando los aislamientos fueron formulados, no se detectaron diferencias significativas entre estos ($p=0.11$), resultado que indica que los cuatro virus evaluados en el presente estudio al ser utilizados como producto formulado presentaron una actividad biocontroladora similar, a pesar de las diferencias obtenidas cuando estos fueron usados sin formular. Este comportamiento podría deberse al efecto de la formulación sobre la dispersión del virus, la cuál es más homogénea y logra cubrir mejor la superficie de los tubérculos al momento de la aplicación (Lewis 1989), mientras que al evaluar los aislamientos virales sin formular, la inmersión de los tubérculos en la suspensión viral pudo generar escurrimiento del líquido y por lo tanto arrastre de las partículas virales, las cuales no estuvieron distribuidas homogéneamente en el tubérculo. Posiblemente la virulencia de todos los aislamientos es similar, pero cuando se evaluó la eficacia de los virus sin formular, por las razones antes mencionadas, se presentó

heterogeneidad en las dosis de cuerpos de inclusión por cm^2 de la superficie de cada tubérculo y en consecuencia algunas larvas pudieron ingresar a la papa por lugares en los que no había virus, por lo que estas no desarrollaron infección. Con miras a esclarecer este fenómeno, sería recomendable modificar la metodología de aplicación del virus sin formular para asegurar la distribución uniforme de éste sobre la papa.

A pesar de no encontrarse diferencias estadísticas entre los porcentajes de eficacia de los aislamientos virales formulados, se observa que numéricamente los tres aislamientos nativos presentaron mayor actividad que la cepa de referencia proveniente del Perú que fue aislada originalmente de *P. operculella*. Esto podría sugerir que los aislamientos nativos obtenidos a partir de *T. solanivora* posiblemente presentaron mayor afinidad por este hospedero, además de que pueden estar mejor adaptados a las condiciones medioambientales de nuestro país. Por tales razones, los tres aislamientos nativos presentan alto potencial para su utilización en control de la plaga, mediante su formulación e inclusión en un programa de manejo integrado del insecto.

6.10. ESTIMACIÓN DEL NÚMERO PROMEDIO DE CUERPOS DE INCLUSIÓN PRODUCIDOS POR MILIGRAMO DE LARVA

Se determinó la cantidad promedio de cuerpos de inclusión producidos por miligramo de tejido larval para los tres aislamientos nativos seleccionados y para la cepa de referencia del Perú. Los resultados obtenidos fueron 4.7×10^7 , 4.5×10^7 , 4.3×10^7 y 4.1×10^7 CI/mg de larva para los aislamientos C01-26, C04-04, C06-11 y la cepa de referencia del Perú respectivamente (Tabla 11) (Anexo H).

Tabla 11. Producción de cuerpos de inclusión de los aislamientos de granulovirus en larvas de *T. solanivora*

Aislamientos	Promedio CI/mg tejido larval	Promedio CI/larva	Grupos homogéneos
C01-26	4.7×10^7	1.1×10^9	a
C04-04	4.5×10^7	1×10^9	a
C06-11	4.3×10^7	1.1×10^9	a
Perú	4.1×10^7	9×10^8	a

* Promedios con letras distintas son diferentes estadísticamente según la prueba de LSD (P=0.05)

La prueba de diferencia mínima significativa (LSD) no detectó diferencias significativas entre los aislamientos tanto los nativos como la cepa de referencia del Perú ($p=0,31$). Este resultado indica que el rendimiento, es decir la cantidad de cuerpos de inclusión producidos y liberados por miligramo de tejido de las larvas o por larva del insecto hospedero, en este caso *T. solanivora*, es igual para todos los aislamientos con un promedio de 4.4×10^7 CI/mg de peso larval y 1×10^9 CI/larva.

El rendimiento es un parámetro muy importante en la investigación de baculovirus, el cual ha sido ampliamente estudiado por varios autores con el fin de determinar características esenciales de los aislamientos virales para ser utilizados en formulaciones de insecticidas biológicos (Vázquez *et al.* 2002).

En el caso específico del virus de la granulosis de *P. operculella* se han realizado algunas investigaciones, como el caso de Matthiessen *et al.* (1978), quienes mediante observaciones al microscopio electrónico asumieron que un equivalente larval (una larva de *P. operculella*) correspondía a 4×10^9 CI.

Zeddám *et al.* (2003) determinaron la producción de virus de la granulosis en larvas de las polillas *P. operculella* y *T. solanivora* muertas por la infección viral a nivel de laboratorio; en este estudio encontraron que la producción fue de 2.35×10^9 CI/larva y 1.3×10^8 CI/mg para la especie *T. solanivora*. Se observó una coherencia de los resultados del presente estudio con lo reportado por estos autores en cuanto a la producción de cuerpos de inclusión por larva, la cual para todos presentó un valor promedio de 10^9 , lo cual podría indicar que para los granulovirus aislados a partir de larvas de las polillas de la papa, el mayor rendimiento encontrado corresponde a este valor. Esto concuerda con lo reportado por Hodgson *et al.* (2001), quienes concluyeron que para la mayoría de larvas de lepidópteros infectadas por virus de la familia *Baculoviridae*, el rendimiento promedio obtenido es de 10^9 CI en larvas de último instar, presentándose la invasión de una gran variedad de tejidos del hospedero durante el ciclo de infección. Estos autores reportaron también que el rendimiento de baculovirus difiere significativamente entre diferentes genotipos y entre diferentes aislamientos; sin embargo, en el caso de los resultados obtenidos en la presente investigación, no se presentaron diferencias entre los rendimientos obtenidos con los aislamientos nativos de granulovirus, ni entre estos y la cepa de referencia del Perú.

El rendimiento de un virus se ve afectado por muchos otros factores involucrados en el ciclo de infección sobre el insecto hospedero como el tiempo letal y la virulencia (Kamiya *et al.* 2004). Cherry *et al.* (2002) evaluaron entre otros factores, el rendimiento de un virus de la granulosis sobre larvas de la polilla dorso de diamante *Plutella xylostella*. En este estudio encontraron que a pesar de la alta patogenicidad de este aislamiento sobre las larvas de la polilla, reflejada en la dosis letal media, se obtuvieron menores rendimientos debido a la reducción de los tiempos de mortalidad. Al igual que el tiempo letal, la dosis proporcionada a las larvas y el aumento del

peso y el tamaño inicial, son factores que pueden afectar el rendimiento del virus, obteniéndose menores rendimientos cuando el insecto se infecta consumiendo altas concentraciones virales debido a que su muerte ocurre más rápidamente (Boucias *et al.* 1980; Hodgson *et al.* 2001).

En la presente investigación, aunque no se evaluaron los tiempos letales de los aislamientos nativos seleccionados, sí se observaron diferencias en cuanto a la velocidad de crecimiento de las larvas y a los tamaños finales obtenidos, lo cual fue más evidente para el aislamiento C04-04 proveniente de Mosquera. Como se mencionó anteriormente, con el uso de este aislamiento se obtuvieron larvas de menor tamaño, lo que implicaría que probablemente sea necesario infectar un número mayor de larvas para obtener mayores cantidades de tejido infectado y por ende la recuperación de una mayor cantidad de partículas virales con miras a la producción masiva de principio activo para un bioplaguicida. Esto representa una desventaja económica si se piensa en la producción del virus a nivel comercial. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la obtención de larvas de menor tamaño implica un consumo menor de alimento que resulta en una ventaja por la obtención de porcentajes de daño de los tubérculos más bajos. Por el contrario, con el aislamiento C01-26 proveniente de Chocontá se obtuvieron larvas de mayor tamaño comparadas con las obtenidas con los otros aislamientos nativos y con la cepa de referencia del Perú, lo que permite obtener mayor cantidad de tejido larval infectado y por ende una mayor producción de cuerpos de inclusión con este aislamiento que con los demás, aunque se infecte el mismo número de larvas. Esto representa una ventaja tecnológica para la producción a escala de un bioplaguicida, pero una desventaja en cuanto a la protección de tubérculos proporcionada por este aislamiento, ya que por permitir un mayor desarrollo de las larvas, éstas consumen mayores cantidades de alimento y generan mayores daños.

Al igual que en el caso de la comparación de la actividad biocontroladora, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticas entre los rendimientos de los aislamientos virales, se observó un rendimiento ligeramente mayor con los virus nativos aislados a partir de *T. solanivora* comparados con la cepa de referencia proveniente del Perú, que fue aislada originalmente de *P. operculella*. Este comportamiento sugeriría de nuevo la hipótesis de que los aislamientos nativos obtenidos a partir de *T. solanivora* posiblemente se encuentran mejor adaptados tanto al hospedero como a las condiciones medioambientales de nuestro país. La adaptación de los baculovirus a su hospedero ha sido reportada por Hodgson *et al.* (2002) en su estudio sobre la selección diferencial de genotipos de virus de la poliedrosis de la polilla de los pinos *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae), influenciada especialmente por el tipo de ambiente en el que se desarrolla el insecto hospedero y su alimentación. Estos autores mencionan que diferentes aislamientos de baculovirus pertenecientes a la misma especie pueden infectar a un mismo insecto hospedero; sin embargo, tan sólo aquellos que se encuentren mejor adaptados a las condiciones brindadas por el insecto hospedero se mantendrán en éste logrando posiblemente desarrollar su ciclo infectivo. Dentro de los factores que influyen la adaptación de los baculovirus se encuentran la especificidad de la respuesta inmune del hospedero, interacciones entre diferentes genotipos presentes en el hospedero e interacciones entre los aspectos que componen la ecología del patógeno y el ambiente, factores que influyen positiva o negativamente el rendimiento, la tasa de mortalidad y la virulencia de los diferentes aislamientos (Hodgson *et al.* 2002).

Con base en los resultados de eficacia y rendimiento obtenidos con los tres aislamientos nativos de granulovirus evaluados y la cepa de referencia del Perú, se seleccionaron los aislamientos C04-04 y C06-11 provenientes de los municipios de Mosquera y Carmen de Carupa (Cundinamarca) como los

granulovirus más promisorios para el control de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, considerando que con estos aislamientos se obtuvieron los mayores porcentajes de eficacia, tanto formulados (C06-11) como sin formular (C04-04). Adicionalmente, estos aislamientos presentaron una alta producción de cuerpos de inclusión por miligramo de tejido larval y además causaron un retardo notorio en el crecimiento de las larvas, razones que sugieren que dichos virus representan una alternativa promisoriosa para el desarrollo de un bioplaguicida seguro, eficaz y confiable.

7. CONCLUSIONES

1. Se aislaron e identificaron tres aislamientos de granulovirus obtenidos a partir de larvas de *Tecia solanivora* provenientes de tres municipios del departamento de Cundinamarca.
2. No es frecuente encontrar larvas con sintomatología viral bajo condiciones de campo.
3. A pesar de que las larvas presenten agentes infecciosos virales, pueden no presentar síntomas de infección.
4. Los aislamientos C04-04 y C06-11 provenientes de Mosquera y Carmen de Carupa fueron seleccionados por su alta actividad biocontroladora sobre larvas de *Tecia solanivora* y producción de CI por mg de tejido larval, así como por sus efectos sobre el desarrollo de las larvas.
5. El proceso de formulación incrementó la actividad biocontroladora de los aislamientos de granulovirus, posiblemente por un efecto nocivo de los auxiliares de formulación sobre las larvas de la polilla.
6. Los tres aislamientos nativos producen igual cantidad de cuerpos de inclusión en tejido larval de *T. solanivora*.

8. RECOMENDACIONES

Se deben desarrollar e implementar técnicas más sensibles y específicas para la detección e identificación de granulovirus, como las técnicas inmunológicas tipo ELISA .

Estandarizar una dieta artificial para *Tecia solanivora* con el fin de disminuir la variabilidad en el montaje de los bioensayos.

Es necesario determinar otros parámetros importantes de los aislamientos virales relacionados con su patogenicidad como lo son las dosis letales 50 (DL₅₀) y 90 (DL₉₀), los tiempos letales 50 (TL₅₀) y 90 (TL₉₀) y detalles finos del proceso de infección.

Realizar análisis moleculares y genéticos comparativos de cada aislamiento para determinar con certeza si existen diferencias genotípicas entre estos y establecer de igual manera la cercanía y especificidad de estos virus.

Buscar otros virus patógenos de *T. solanivora* que puedan ser incluidos con el granulovirus en un programa de manejo eficiente de la plaga.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alcázar, J.; Cervantes, M.; Raman, K. 1992. Efectividad de un virus de la granulosis formulado en polvo para controlar *Phthorimaea operculella* en papa almacenada. *Revista Peruana de Entomología*. 35: 113-116.

Alcázar, J.; Raman, K. 1992. Control de *Phthorimaea operculella* en almacenes rústicos, empleando virus granulosis en polvo. *Revista Peruana de Entomología* 35: 117-120.

American Pharmaceutical Association. 1983. Handbook of pharmaceutical excipients. Pennsylvania, USA. Pp. 321-323.

Araque, C.; García, J. 1999. Manual integrado de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny). CRECED Provincia de Pamplona. Santander, Colombia. 44 p.

Araque, C. 2000. Manejo integrado de la polilla Guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* Povolny en el CRECED provincia de Pamplona. Memorias del primer seminario de entrega de resultados para una agricultura sostenible en Santander, Norte de Santander y Boyacá. Bucaramanga – Colombia. Pp. 23-30.

Arévalo, C.; Castro, R. 2003. Evaluación post-registro de los insecticidas con licencia de uso para controlar la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny 1973) (Lepidoptera: Gelechiidae) en Colombia. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia. Pp. 86-93.

Arias, B.; Herrera, C.; Belloti, A. Hernández, G. 2001. Control Biológico y Microbiológico del Gusano Cachón de la Yuca (*Erinnys ello*). Plegable técnico. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT.

Arif, B., Guangyu, Z.; Jiamiespn, P. 1986. A comparison of three granulosis virus isolated from *Choristoneura* Spp. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 180-186.

Barreto, N.; Espitia, E.; Galindo, R.; Gordo, E.; Cely, L.; Martínez, L.; Lozano, F; López-Ávila, A. 2003. Estudios de fluctuación de poblaciones de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en tres intervalos de altitud en Cundinamarca y Boyacá. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia. Pp. 153-157.

Ben Salah, H.; Aalbu, R. 1992. Field Use of granulosis virus to reduce initial storage infestation of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller), in North Africa. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 38: 119-126.

Biotécnica. Laboratorio de control de calidad de bioplaguicidas. CORPOICA. 2004. Procedimiento Operativo Estandar para la evaluación de la actividad biocontroladora del bioplaguicida a base de *Baculovirus phthorimaea* para el control de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae).

Boucias, D.; Jonson, D.; Allen, G. 1980. Effects of host age, virus dosage and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* larvae. *Environmental Entomology*. 9(1): 59-61.

Brancahã, R.; Souza, V.; Fortes, J. 2000. Método Simplificado para Detecção de Nucleopolyhedrovirus em *Bómbix mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). Arquivos Instituto Biológico. 67:1. <http://www.biologico.sp.gov.br/arquivos/v67_1/metodo_simplif.html> [Consulta: 25 sept. 2004]

Briese, D. 1980. Characterization of a laboratory strain of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bulletin of Entomological Research*. 70: 203-212.

Briese, D.; Mende, H. 1981. Differences in susceptibility to a granulosis virus between field populations of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bulletin of Entomological Research*. 71: 11-18.

Caballero, P.; López-Ferber, M.; Williams, T. 2001. Los baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas. Universidad Pública de Navarra. Editorial Phytoma. España. 517 pp.

Carter, J. 1984. Viruses as Pest Control Agents. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*. 1: 375-419.

Carvalho, C. 1977. Methods for differentiation of collagen, muscular and elastic fibers in stereomicroscopic specimens. *Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*. 10(5):293-298.

Cherry, A. 2002. The strain variation and virulence of granulovirus of diamondback moth (*Plutella xylostella* Linnaeus, Lep., Yponomeutidae) isolated en Kenya. *Journal of Invertebrate Pathology*. 79: 192-196.

Cherry, A.; Osa, M.; Djegui, D. 2002. Relative potency, yield and transmission of a Kenyan isolate of *Plutella xylostella* granulovirus in a population of diamondback moth from Benin, West Africa. En: Memorias del Primer Simposio Internacional de mejoramiento del control biológico de *Plutella xylostella*. CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) Montpellier, Francia. <<http://dbm2002.cirad.fr/>> [Consulta: 28 de Marzo de 2005]

Christian, P.; Hanzlik, T.; Dall, D.; Gordon, K. 1993. Insect Viruses: New Strategies for pest Control. En: Oakeshott, J and Whitten, M.J. 1993. Molecular Approaches to Fundamental and Applied Entomology. Springer-Verlag. New York. Pp. 128-163.

Ciba – Geigy. 1973. Cómo realizar un bioensayo. Manual de ensayos de campo. Ed. Ciba - Geigy. Pp. 2-10.

CIP, Centro Internacional de la Papa. 1992. Control Biológico de la polilla de la Papa con *Baculovirus phthorimaea*. Boletín de Capacitación CIP-2. Lima-Perú. 19 p.

Contreras, S. 1998. Caracterización de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Tecia solanivora* (Povolny). Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.

Corredor, D.; Florez, E. 2003. Estudios básicos de biología y comportamiento de la polilla guatemalteca de la papa en un área piloto del municipio de Villapinzón. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia. Pp. 37-45.

Cotes, A. 2000. Programa de almacenamiento de semilla de papa certificada a nivel del agricultor. Manejo Integrado de Plagas Parte I. Redepapa - Corpoica.

Crook, N.; Spencer, R.; Payne, C.; Leisy, D. 1985. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. *Journal of General Virology* 66: 2423 – 2430.

Crook, N.; Brown, J. 1982. Isolation and characterization of a granulosis virus from the tomato moth, *Lacanobia oleracea*, and its potential as a control agent. *Journal of Invertebrate Pathology* 40: 221-287.

Daniel, W. 2000. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. Tercera edición. Editorial Limusa, S.A. México. 878 pp.

El Correo de la Papa. 2001. SINAIPA (Sistema Nacional de Información de Papa). Boletín mensual No. 03. Bogotá, Colombia. 14 p.

El Correo de la Papa. 2002a. SINAIPA (Sistema Nacional de Información de Papa). Boletín mensual No. 09. Bogotá, Colombia. 14 p.

El Correo de la Papa. 2002b. SINAIPA (Sistema Nacional de Información de Papa). Boletín mensual No. 12. Bogotá, Colombia. 19p.

El Correo de la Papa. 2002c. SINAIPA (Sistema Nacional de Información de Papa). Boletín mensual No. 12. Bogotá, Colombia. 19p.

EPA (Environmental Protection Agency). 2000. Biopesticide Fact Sheet. Nucleopolyhedrovirus (NPV) of various insects and Granulovirus (GV) of codling moth. Office of Pesticide Programs. <www.epa.gov/pesticides/biopesticides/factsheets/fs107300e.htm> [Consulta: 10 Oct 2004]

Evans; Shapiro. 1990. Viruses, Manual of techniques in insect pathology. Biological techniques series. San Diego, California. pp 17-18.

Feris, M.; Gutiérrez, C. Varela, A.; Espitia, E. 2002. Evaluación de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisopliae* sobre *Tecia solanivora*. *Revista Colombiana de Entomología* 28(2).

Finnerty, C.; Li, G.; Granados, R. 2000. Characterization of a Granulovirus from the Cassava Hornworm (*Erinnys ello*: Sphingidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 75: 273-278.

Galindo, J.; Español, A. 2003. Una metodología para la evaluación de tratamientos de manejo de polilla guatemalteca mediante el seguimiento de poblaciones y el muestreo de la cosecha. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia. Pp. 14-19.

Hackett, K.; Boore, A.; Deming, C.; Buckley, E.; Camp, M.; Shapiro, M. 1999. *Helicoverpa armigera* granulovirus interference with progression of *H. zea* nucleopolyhedrovirus disease in *H. zea* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 99-106.

Hamm, J. 1966. A Modified Azan Staining Technique for Inclusion Body Viruses. *Journal of Insect Pathology* 3: 338-341.

Harvey, J.; Volkman, L. 1983. Biochemical and biological variation of *Cydia pomonella* (codling moth) granulosis virus. *Virology* 124: 21-34.

- Hasumi, M.** 2003. Azan Staining Method. <http://www5d.biglobe.ne.jp/~hasumi/method/azan_e.html> [Consulta: 3 abril de 2005]
- Herniou, E.; Olszewski, J.; Cory, J.; O'Reilly, D.** 2003. The Genome Sequence and Evolution of Baculoviruses. *Annual Review of Entomology*. 48: 211-234.
- Hodgson, D.; Vanbergen, A.; Watt, A.; Hails, R.; Cory, J.** 2001. Phenotypic variations between naturally co-existing genotypes of a Lepidopteran baculovirus. *Evolutionary Ecology Research* 3. 687-701.
- Hodgson, D.; Vanbergen, A.; Watt, A.; Hartley, S.; Hails, R.; Hails, R.; Cory, J.** 2002. Differential selection of baculovirus genotypes mediated by different species of host food plant. *Ecology Letters* 5: 512-518.
- Huger, A.** 1961. Methods for staining capsular virus inclusion bodies typical of granuloses insects. *Journal of Insect Pathology* 3: 338-341
- Hughes, P.; Wood, A.** 1996. In vivo production, stabilization and infectivity of baculovirus preoccluded virions. *Applied and Environmental Microbiology* 62(1): 105 – 108.
- Kamiya, K.; Zhu, J.; Murat, M.; Laviña-Caolili, B.; Ikeda, M.; Kobayashi, M.; Kawamura, S.** 2004. Cloning and comparative characterization of three distinct nucleopolyhedroviruses isolated from the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) in Japan. *Biological Control* 31: 38-48.
- Kukan, B.** 1999. Vertical Transmission of Nucleopolyhedroviruses in Insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 74: 103-111.
- Laarif, A.; Fattouch, S.; Essid, W.; Marzouki, N.; Ben Salah, H.; Ben Hammouda, M.** 2003. Epidemiological survey of *Phthorimaea operculella* granulosis virus in Tunisia. *Bulletin OEPP/EPPO* 37: 335-338.
- Léry, X.; Abol-ela, S.; Giannotti, J.** 1998. Genetic heterogeneity of *Phthorimaea operculella* granulovirus: restriction analysis of wild-type isolates and clones obtained *In vitro*. *Acta Virologica* 42: 13-21.
- Lewis, R.** 1989. Baculovirus for biocontrol and biotech. *BioScience* 39(7): 431- 434.

López-Ávila, A.; Espitia, E. 2000. Plagas y benéficos en el cultivo de la papa en Colombia. Boletín Técnico Divulgativo. CORPOICA – PRONATTA. Bogotá, Colombia. 35 p.

López-Ávila, A.; Cifuentes, A.; Rincón, C.; Rubio, S.; Vargas, B.; Urrea, A. 2003. Estudios biológicos y generación de tecnologías para el uso del parasitoide de huevos *Trichogramma lopezandinensis* como controlador biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia. Pp. 76-84.

Lucarotti, C.; Eveleigh, E.; Royama, T.; Morit, B.; McCarthy, P. 2004. Prevalence of baculoviruses in spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) populations in New Brunswick. *Canadian Entomologist* 136(2): 255-264.

Luján, C. 1970. Evolución del Cultivo de la Papa en Colombia. ICA – Tibaitatá. Bogotá, Colombia. p. 124.

Luque, T.; Finch, R.; Crook, N.; O'Reilly, D.; Winstanley, D. 2001. The complete sequence of the *Cydia pomonella* Granulovirus genome. *Journal of General Virology* 82: 2531 – 2547.

Magnarelli, L.; Andreadis, T. 2004. An Epizootic of Nuclear Polyhedrosis Virus in Armyworms (*Pseudaletia unipuncta*) in Connecticut. *Northeastern Naturalist* 11(1): 75-80.

Maracajá, P.; Vargas, C.; Santiago, E. 1999. Histopathology of the *Heliothis armigera* nuclear polyedrosis virus (HaNPV) in larvae of the primary and alternate *Spodoptera exigua* hosts. *Caatinga, Mossoró-RN*, 12(1/2):35-40.

Martínez, W.; Uribe, D.; Cerón, J. 2003. Efecto de proteínas Cry1 De *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología* 29(1): (89 – 93).

Mathiessen, J.; Christian, R.; Grace, T.; Filshie, K. 1978. Large-scale Field Propagation and the Purification of the Granulosis Virus of the Potato Moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bulletin of Entomological Research* 68: 385-391.

McVean, R.; Sait, S.; Thompson, D.; Begon, M. 2002. Dietary stress reduces the susceptibility of *Plodia interpunctella* to infection by a granulovirus. *Biological Control* 25 (1): 81-84.

Meyer, J. 2002. Insect physiology, respiratory system. Departamento de entomología. NC State University.
<<http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/tutorial/respire.html>> [Consulta: 31 Mayo. 2005]

Moreno, D.; Rojas, A.; Espitia, E.; Valbuena, J.; Carvajal, G.; Morales, A. 1998. Plan de Investigación para Aumentar la Sostenibilidad y Competitividad de los sistemas de producción de papa en Colombia. CORPOICA. Bogotá, Colombia. 57 p.

Nakai, M.; Goto, C.; Shiotsuki, T.; Kunimi, Y. 2002. Granulovirus prevents pupation and retards development of *Adoxophyes honmai* larvae. *Physiological Entomology* 27: 157 – 164.

Niño, L. 2004. Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Sudamérica. Suplemento revista latinoamericana de la papa. <www.uach.cl/alap2004/08LNinoinExtensoRevisionPolilladelaPapa.pdf> [Consulta: 10 Sept. 2004]

Niño, L.; Notz, A. 2000a. Desarrollo y sintomatología de larvas de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) infectadas por un virus granulosis nativo. *Boletín Entomológico de Venezuela* 15(1): 29-38.

Niño, L.; Notz, A. 2000b. Patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Mérida, Venezuela. *Boletín Entomológico de Venezuela* 15(1):39-48.

Núñez, C.; Ariza, A.; Becerra, J.; Fuentes, L.; García, G.; González, D.; Medina, X.; Rabón, W.; Solórzano, L. 1999. Resultados preliminares de la observación del comportamiento de *Tecia solanivora* en campos de Cultivo. Conclusiones y Memorias del Taller “Planeación Estratégica para el Manejo de *Tecia solanivora* en Colombia”. Universidad Nacional de Colombia, FEDEPAPA, IICA. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. p. 48-49.

OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) Environment, Health and Safety Publications. 2002. Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Applications Involving Baculovirus. Series of Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology. No 20. Paris – Francia.

Palacios, M. 1997. Principales Plagas de la Papa: La Polilla de la Papa y La Mosca Minadora. Fascículo 3.7. Producción de Tubérculos-semillas de Papa- Manual de Capacitación. Centro Internacional de la Papa (CIP). Perú. 12 p.

Palacios, M.; Cisneros, F. 1996. Integrated management for the Potato Tuber Moth in Pilot Units in the Andean Region and the Dominican Republic. Integrated Pest Management. Program 4. Centro Internacional de la Papa (CIP). <<http://www.cipotato.org/market/PgmRprts/pr95-96/program4/prog42.htm>> [Consulta: 24 Nov. 2004]

Parada, J.; Luque, J. 2003. Patogenicidad de *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae), cepa Colombia, sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae), en condiciones de campo. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia. Pp. 126-131.

Pedigo, L. 2002. Entomology and Pest Management. Fourth Edition. Editorial Prentice Hall. New Jersey, USA. 742 p.

Pedraza, J.; Luque, E.; Franco, P. 1989. Aislamiento, identificación y caracterización de un virus en larvas de *Eprosterna alaeasa* Dyar. (Lepidoptera: Limacodidae). *Revista Colombiana de Entomología* 15(2): 21 – 27.

Pérez, O.; Rodríguez, A.; Cotes, A. 1997. Método rápido y confiable para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología* 2(3-4): 113-118.

Pérez, L.; Puerta, A.; Bustillo, A.; Madrigal, A. 1988. Evaluación del *Baculovirus phthorimaea* VG en larvas de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Revista Colombiana de Entomología* 14(2): 33 –40.

Purves, W.; Sadava, D.; Orinas, G.; Séller, H. 2001. Life: the science of biology. Sexta edición. Sinauer associates. Massachussets, U.S.A. Pp. 466-467.

Quansheng, D.; Lehavi, D.; Faktor, O.; Yipeng, Q.; Chejanovsky, N. 1999. Isolation of an apoptosis suppressor gene of the *Spodoptera littoralis* Nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology* 73: 1278 – 1285.

Sáenz, E. 1997. Experiencias de campo en el manejo integrado de *Tecia solanivora* (Povolny) en Ventaquemada, Boyacá. II Curso - Taller : Manejo Integrado de Plagas de la papa. CRECED Valles de Ubaté y Chiquinquirá. Colombia. pp. 35-42.

Sciocco-Cap, A.; Parola, A.; Goldberg, A.; Ghiringhelli, P.; Romanowski, V. 2001. Characterization of a Granulovirus Isolated from *Epinotia aporema*

Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) Larvae. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (8): 3702 – 3706.

Singaravelu, B.; Ramakrishnan, N. 1998. Characterization of a Granulosis Virus from the Castor Semilooper, *Achaea janata* L. *Journal of Invertebrate Pathology* 71: 227-235.

Smirnoff, W. 1960. Rapid staining of polyhedra from Lepidopterous and Hymenopterous hosts. *Journal of Insect Pathology* 3: 218-220.

Sotelo, G. 1997. La polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) y su control con Baculovirus. II Curso - Taller : Manejo Integrado de Plagas de la papa. CRECED Valles de Ubaté y Chiquinquirá. Colombia. pp. 32-34

Sporleder, M., Zegarra, O., Kroschel, J., Huber, J. and Lagnaoui, A. 2000. Assessment of the Inactivation Time of *Phthorimaea operculella* Granulovirus (PoGV) at Different Intensities of Natural Irradiation. CIP Program Report. Research on Potato. pp. 123-128.

Sporleder, M. 2003. The granulovirus of the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) – Characterization and prospects for effective mass production and pest control. <<http://www.troz.uni-hohenheim.de/research/Thesis/PhDtheses/PhDPP>> [Consulta: 1 de Abril de 2005].

Taha, A.; Nour-El-Din, A.; Crizier, L.; López, M.; Croizier, G. 2000. Comparative Analysis of the Granulin Regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* Granuloviruses. *Virus Genes* 21(3): 147-155.

Torres, F.; Notz, A.; Valencia, L. 1997. Ciclo de vida y otros aspectos de la biología de la polilla de la papa, *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado Táchira, Venezuela. *Boletín Entomológico de Venezuela* 12 (1): 95-106.

Tweeten, K.; Bulla, L.; Consigli, R. 1977. Isolation and Purification of a Granulosis Virus from Infected Larvae of the Indian Meal Moth *Plodia interpunctella*. *Applied and Environmental Microbiology* 34(3): 320-327.

Vasconcelos, S.; Hails, R.; Speight, M.; Cory, J. 2005. Differential crop damage by healthy and nucleopolyhedrovirus-infected *Mamestra brassicae* L. (Lepidoptera. Noctuidae) larvae: a field examination. *Journal of Invertebrate Pathology*. In Press.

Vázquez, J.; Zeddám, J.; Tresierra, A. 2002. Control biológico del “cogollero del maíz” *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) con el baculovirus SfVPN en Iquitos – Perú. *Folia amazonica* 13 (1-2): 25–39.

Vickers, J.; Cory, J.; Entwistle, P. 1991. DNA Characterization of Eight Geographic Isolates of Granulosis Virus from the Potato Tuber Moth (*Phthorimaea operculella*) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 334-342.

Villamizar, L.; Gómez, M.; Cotes, A.; López, J. 2003. Desarrollo tecnológico de un bioplaguicida a base de Baculovirus para el control de la polilla guatemalteca. En: Memorias II Taller Nacional, *Tecia solanivora*. CEVIPAPA. CNP. Bogotá, Colombia. Pp. 132-136.

Villamizar, L.; Zeddám, J.; Espinel, C.; Cotes, A. 2005. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhoGV. *Revista Colombiana de Entomología*. En prensa.

Yoshikawa, H.; Fukuda, H.; Oyamada, T. 2002. Congenital Hepatic Fibrosis in a Newborn Calf. *Veterinary Pathology* 39:143-145.

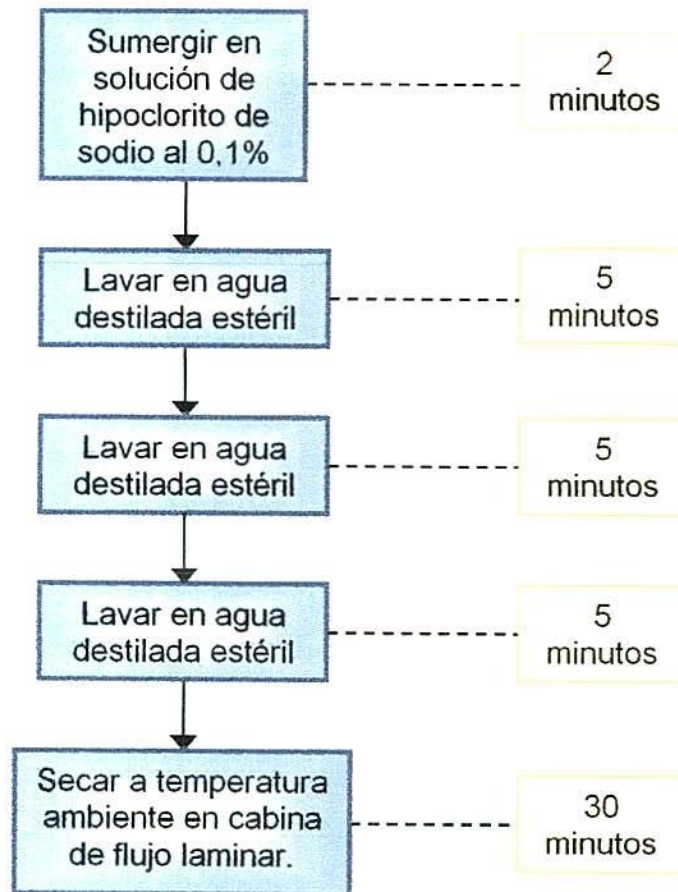
Zeddám, J.; Pollet, A.; Mangoendiharjo.; Haris Ramadhan, T.; López-Ferber, M. 1999. Occurrence and Virulence of a Granulosis Virus in *Phthorimaea operculella* (Lep., Gelechiidae) Populations in Indonesia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74: 48-54.

Zeddám, J.; Vázquez R.; Vargas, Z.; Lagnaoui, A. 2003. 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). *Bol San Veg Plagas* 29: 657-665.

ANEXOS

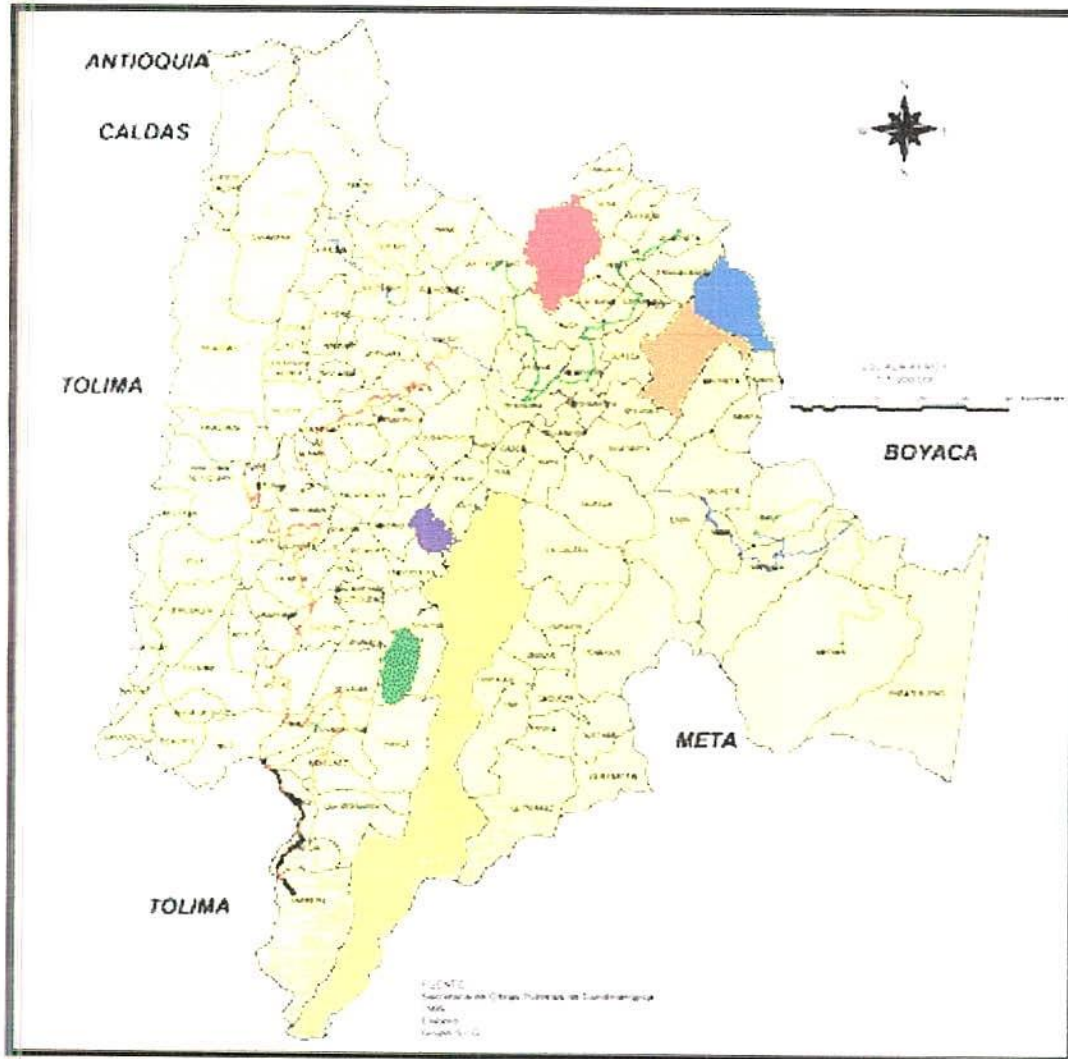
ANEXO A






Esquema de desinfección de tubérculos



ANEXO B

Sitios de recolección de larvas en el departamento de Cundinamarca



-  Villapinzón
-  Chocontá
-  Carmen de Carupa
-  Mosquera
-  Sibaté

ANEXO C

ENCUESTA

I. DATOS DE ENTREVISTA

1. Código de la muestra _____
2. Fecha día _____/mes _____/año _____
3. Encuestador / Colector _____
4. Nombre del entrevistado (Dir. y Tel.) _____

II. POSICIÓN GEOGRÁFICA

5. País _____
6. Departamento/ Municipio/ Vereda _____
7. Altitud _____
8. Latitud _____ N Longitud _____ O
9. Temperatura (promedio) _____ ° C HR _____ %

III. CARACTERÍSTICAS DEL SITIO DE MUESTREO

- * Cultivo Estado fenológico _____
- Variedad _____
- Rotación _____ ¿Qué cultivos? _____

*Almacenamiento Cubierto: Tipo Bodega _____ Silo Rústico _____

Otro (Cuál?) _____

Descubierto _____

*Forma de almacenamiento: Costales __ Canastillas __ Granel __ Otro __

IV. MANEJO DE LA PLAGA

Control de la plaga Químico __ Biológico __ Cultural __ Otro __

Plaguicidas usados:

Cultivo _____ Frecuencia _____

Cultivo _____ Frecuencia _____

Almacenamiento _____ Frecuencia _____

Almacenamiento _____ Frecuencia _____

Observaciones:

ANEXO D

Medios de cultivo y reactivos

Solución I

Disolver 0,1 g de Azocarmine G en 100 ml de agua destilada y mezclar la solución durante 5 minutos. Dejar enfriar y adicionar 2 ml de ácido acético glacial. Filtrar antes de usar.

Gel de separación

Adicionar 3,3 ml de acrilamida-bisacrilamida; 1,25 ml de Tris-HCl 3,0 M pH 8,8; 0,1 ml de SDS (lauryl sulfato sódico) 10% (p/v); 5,5 ml de agua bidestilada; 0,4 ml de APS (persulfato amónico) 10% (p/v) y 0,09 ml de TEMED (N,N,N',N',-tetrametil-etilendiamina).

Gel de apilamiento

Mezclar acrilamida-bisacrilamida 2,5%; Tris-HCl 125 mM pH 6,8; SDS 0,1%; TEMED 0,1% y APS 0,12%.

Tampón de carrera

Tris 250 mM; Glicina 1,92 M; SDS 1% (p/v) pH 8,3.

Tampón de carga

Tris-HCl 125 mM; SDS 2% (p/v) pH 6,2; glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,001% (p/v) y 2-mercaptoetanol 5% (v/v);

Agar LB

Triptona	-----	10 g/l
Extracto de levadura	-----	5 g/l
NaCl	-----	10 g/l
Agar	-----	18 g/l

ANEXO E

Aislamiento de bacterias mesófilas esporuladas

- Tomar dos larvas y se desinfectar exteriormente con un pincel humedecido con hipoclorito de calcio al 0,5%.
- Macerar las larvas, suspender cada una en 9 ml de tween 80 al 0,1% en buffer acetato de sodio 0.25N pH 6.8 y agitar por 5 minutos.
- Colocar los dos tubos en incubación a 30°C durante 4 horas en agitación constante.
- Someter uno de los tubos a choque térmico a 80°C durante 10 minutos.
- Hacer diluciones de cada suspensión (con choque y sin choque) de 10^{-1} a 10^{-8} en tween 80 al 0,1% en buffer acetato.
- Sembrar 0,1 ml de las diluciones 10^{-3} a 10^{-8} en agar LB (Anexo D)
- Incubar 3 días a 28°C.

Coloración King Young (verde de malaquita – Safranina)

- Realizar frotis
- Fijar la lámina en mechero
- Calentar agua hasta que hierva y sostener la lámina sobre el vapor que emita el agua que está hirviendo por 10 segundos.
- Cubrir la lámina con una toalla de papel y mantener saturado con verde de malaquita sobre el vapor del agua caliente por 5 minutos.
- Retirar y desechar la toalla. Lavar con agua el exceso de colorante.
- Contrastar con safranina por 45 segundos y lavar con agua.
- Observar en microscopio óptico en 100x con aceite de inmersión

ANEXO F

Absorbancia a 450 nm de suspensiones con diferentes concentraciones de granulovirus

Concentración	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2.3 x 10 ⁷ CI/ml	0.282	0.287	0.284	0.287	0.292	0.302	0.317	0.314	0.317
1.2 x 10 ⁷ CI/ml	0.155	0.152	0.158	0.159	0.153	0.156	0.161	0.165	0.167
5.8 x 10 ⁶ CI/ml	0.080	0.075	0.082	0.084	0.074	0.082	0.080	0.084	0.078
2.9 x 10 ⁶ CI/ml	0.042	0.036	0.041	0.056	0.039	0.042	0.050	0.048	0.044
1.4 x 10 ⁶ CI/ml	0.031	0.019	0.022	0.035	0.020	0.025	0.027	0.025	0.021

Regresión lineal

STATISTIX FOR WINDOWS					
04/21/05, 14:31					
UNWEIGHTED LEAST SQUARES LINEAR REGRESSION OF ABSORBANC					
PREDICTOR VARIABLES	COEFFICIENT	STD ERROR	STUDENT'S T	P	
-----	-----	-----	-----	-----	
CONSTANT	0.00713	0.00175	4.07	0.0002	
CONCENTRA	1.264E-08	1.464E-10	86.28	0.0000	
R-SQUARED	0.9943	RESID. MEAN SQUARE (MSE)		5.988E-05	
ADJUSTED R-SQUARED	0.9941	STANDARD DEVIATION		0.00774	
SOURCE	DF	SS	MS	F	P
-----	-----	-----	-----	-----	-----
REGRESSION	1	0.44578	0.44578	7444.92	0.0000
RESIDUAL	43	0.00257	5.988E-05		
TOTAL	44	0.44836			
CASES INCLUDED 45		MISSING CASES 0			

ANEXO G

Comparación de la actividad biocontroladora de los aislamientos seleccionados

	Pupas	Vivas		Muertas	Desaparecidas	Total vivas	Total muertas	% de vivos	% de muertos	% de eficacia
		Sanas	Enfer.							
FORM.										
Testigo absoluto										
R1	12	2	0	1	1	14	1	93.3%	6.7%	2.20%
R2	15	0	0	0	0	15	0	100%	0%	
R3	13	2	0	0	0	15	0	100%	0%	
C04-04										
R1	0	0	1	1	13	1	14	6.7%	93.3%	93.20%
R2	0	0	0	0	15	0	15	0%	100%	100%
R3	0	1	1	0	13	2	13	13.3%	86.7	86.40%
C01-26										
R1	1	1	0	0	13	2	13	13.3	86.7%	86.40%
R2	2	0	0	0	13	2	13	13.3	86.7%	86.40%
R3	0	1	0	0	14	1	14	6.7%	93.3%	93.20%
C06-11										
R1	0	0	0	0	15	0	15	0%	100%	100%
R2	0	0	0	1	14	0	15	0%	100%	100%
R3	0	0	0	0	15	0	15	0%	100%	100%
Bac										
R1	0	1	0	0	14	1	14	6.7%	93.3%	93.20%
R2	0	1	0	0	14	1	14	6.7%	93.3%	93.20%
R3	1	1	1	0	12	3	12	20%	80%	79.50%
SIN FORM.										
C04-04										
R1	1	1	1	1	11	3	12	20.0%	80.0%	79.6%
R2	1	0	0	0	14	1	14	7%	93%	92.8%
R3	1	0	1	0	13	2	13	13.3%	86.70%	86.4%
C01-26										
R1	1	0	4	0	10	5	10	33.30%	66.7%	65.90%
R2	1	1	3	1	9	5	10	33.30%	66.7%	65.90%
R3	2	1	3	0	9	6	9	40.0%	60.0%	59.10%

C06-11										
R1	5	1	3	0	6	9	6	60.0%	40.0%	38.7%
R2	6	0	4	1	4	10	5	66.7%	33.3%	31.8%
R3	4	1	4	4	2	9	6	60.0%	40.0%	38.7%
Bac										
R1	5	0	0	2	8	5	10	33.30%	66.70%	65.90%
R2	5	0	1	1	8	6	9	40.00%	60.00%	59.10%
R3	1	3	3	1	7	7	8	46.70%	53.30%	52.20%

Análisis de varianza

STATISTIX FOR WINDOWS					
04/21/05, 15:02					
ONE-WAY AOV FOR: C0126F C0126S C0404F C0404S C0611F C0611S					
PERUF PERUS TESTIGO					
SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	8	24792.3	3099.04	106.88	0.0000
WITHIN	18	521.920	28.9956		
TOTAL	26	25314.2			
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS				1023.35	
EFFECTIVE CELL SIZE				3.0	
VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV		
C0126F	88.667	3	3.9260		
C0126S	63.633	3	3.9260		
C0404F	93.200	3	6.8000		
C0404S	86.267	3	6.6010		
C0611F	100.00	3	0.0000		
C0611S	36.400	3	3.9837		
PERUF	88.633	3	7.9097		
PERUS	59.067	3	6.8501		
TESTIGO	2.2333	3	3.8682		
TOTAL	68.678	27	5.3848		
CASES INCLUDED 27		MISSING CASES 0			

ONE-WAY AOV FOR: C0126F C0404F C0611F PERUF

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	258.969	86.3231	2.78	0.1101
WITHIN	8	248.433	31.0542		
TOTAL	11	507.402			

AT LEAST ONE GROUP VARIANCE IS NEAR ZERO;
VARIANCE-EQUALITY TESTS CANNOT BE COMPUTED.

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 18.4230
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV
C0126F	88.667	3	3.9260
C0404F	93.200	3	6.8000
C0611F	100.00	3	0.0000
PERUF	88.633	3	7.9097
TOTAL	92.625	12	5.5726

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Comparación de medias de Tukey

STATISTIX FOR WINDOWS
DATFOR, 04/21/05, 15:10
TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
C0611F	100.00	I
C0404F	93.200	I
C0126F	88.667	I
PERUF	88.633	I
C0404S	86.267	I
C0126S	63.633	.. I
PERUS	59.067	.. I
C0611S	36.400 I
TESTIGO	2.2333 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.955
REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 15.404
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.3966

ANEXO H

Estimación del número promedio de cuerpos de inclusión producidos por miligramo de larva

C04-04		C06-11		C01-26		Perú	
Peso (g)	Abs (Dil 10 ⁻¹)	Peso (g)	Abs	Peso (g)	Abs	Peso (g)	Abs
0.055	0.184	0.020	1.123	0.031	1.436	0.022	1.099
0.048	0.191	0.022	0.980	0.023	0.982	0.020	1.000
0.053	0.218	0.030	1.158	0.020	1.090	0.023	0.921
0.052	0.339	0.021	0.818	0.020	1.039	0.022	0.895
0.049	0.239	0.022	0.897	0.025	1.106	0.023	0.889
0.048	0.225	0.031	1.218	0.031	1.320	0.020	0.786
0.047	0.185	0.025	1.160	0.022	0.889	0.021	0.805
0.050	0.252	0.027	0.993	0.025	1.044	0.021	0.813
0.054	0.224	0.026	1.221	0.023	1.114	0.025	0.960
0.051	0.245	0.022	0.991	0.024	1.230	0.023	0.974
22.8		24.6		24.4		22	
Cl/g	log Conc	Cl/g	log Conc	Cl/g	log Conc	Cl/g	log Conc
3.3E+10	10.519	5.5E+10	10.740	6.7E+10	10.826	5.0E+10	10.699
3.8E+10	10.580	4.4E+10	10.643	4.2E+10	10.623	4.9E+10	10.690
3.9E+10	10.591	4.0E+10	10.602	4.6E+10	10.663	3.9E+10	10.591
6.3E+10	10.799	3.9E+10	10.591	5.0E+10	10.699	4.0E+10	10.602
4.4E+10	10.643	4.1E+10	10.613	4.4E+10	10.643	3.8E+10	10.580
5.9E+10	10.771	3.9E+10	10.591	4.2E+10	10.623	3.9E+10	10.591
3.8E+10	10.580	4.8E+10	10.681	4.0E+10	10.602	3.8E+10	10.580
5.0E+10	10.699	3.6E+10	10.556	4.0E+10	10.602	3.7E+10	10.568
4.1E+10	10.613	4.6E+10	10.663	4.8E+10	10.681	3.8E+10	10.580
4.7E+10	10.672	4.5E+10	10.653	5.0E+10	10.699	4.2E+10	10.623
4.5E+10	10.647	4.3E+10	10.633	4.7E+10	10.666	4.1E+10	10.610

Análisis de Varianza

STATISTIX FOR WINDOWS 04/21/05, 14:42					
ONE-WAY AOV FOR: C0126 C0404 C0611 PERU					
SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	0.01644	0.00548	1.25	0.3055
WITHIN	36	0.15762	0.00438		
TOTAL	39	0.17406			
		CHI-SQ	DF	P	
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES		4.19	3	0.2418	
COCHRAN'S Q			0.4535		
LARGEST VAR / SMALLEST VAR			3.6213		
COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS				1.102E-04	
EFFECTIVE CELL SIZE				10.0	
VARIABLE	MEAN	SAMPLE SIZE	GROUP STD DEV		
C0126	10.666	10	0.0670		
C0404	10.647	10	0.0891		
C0611	10.633	10	0.0537		
PERU	10.610	10	0.0468		
TOTAL	10.639	40	0.0662		

Comparación de medias por Diferencia Mínima Significativa (LSD)

STATISTIX FOR WINDOWS 04/21/05, 14:44		
LSD (T) COMPARISON OF MEANS		
VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
C0126	10.666	I
C0404	10.647	I
C0611	10.633	I
PERU	10.610	I
THERE ARE NO SIGNIFICANT PAIRWISE DIFFERENCES AMONG THE MEANS		
CRITICAL T VALUE		2.028
REJECTION LEVEL		0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON		0.0600
STANDARD ERROR FOR COMPARISON		0.0296