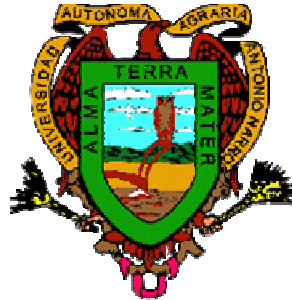


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

**DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



Métodos de propagación *in vivo* del virus de la granulosis de la palomilla de papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) bajo condiciones de laboratorio.

Por:

EULALIO CRISTÓBAL GARCÍA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el

Título de:

Ingeniero Agrónomo Parasitólogo

Buenavista Saltillo, Coahuila; México.

Noviembre del 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA**

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Métodos de propagación *in vivo* del virus de la granulosis de la palomilla de papa
Phthorimaea operculella (Zeller) bajo condiciones de laboratorio.

POR:

EULALIO CRISTÓBAL GARCÍA

TESIS

Que somete a consideración del H. jurado examinador como requisito parcial para
obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO.

APROBADA POR:

M.C. JORGE CORRALES REYNAGA

PRESIDENTE

DR. GABRIEL GALLEGOS MORALES

SINODAL

DR. FIDEL A. CABEZAS MELARA

SINODAL

DR. ALFONSO PAMANES GUERRERO

SINODAL

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

M.C. ARNOLDO OYERVIDES GARCÍA

Buenavista Saltillo, Coahuila; México.
Noviembre del 2006

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por darme la salud y la vida para lograr terminar mis estudios profesionales.

A mi alma mater

Por brindarme la oportunidad de seguir preparándome y por abrir sus puertas para superarme como profesionista.

Al comité asesor

Al M.C. Jorge Corrales Reynaga

Por brindarme su confianza y por haber sido mas que un profesor, por la paciencia, dedicación y el tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Gabriel Gallegos Morales

Por su colaboración en la revisión del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Fidel Antonio Cabezas Melara

Por su colaboración en la revisión del presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mis Padres y Hermanos

Por su apoyo decidido y por los esfuerzos que hicieron para que lograra terminar mi carrera profesional.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CUADROS-----	i
ÍNDICE DE FIGURAS-----	iii
INTRODUCCION-----	1
Objetivo-----	2
REVISIÓN DE LITERATURA-----	3
Palomilla de la papa-----	3
Ubicación taxonómica-----	3
Ciclo de vida y descripción morfológica-----	4
Hospederos-----	7
Estrategias de control-----	7
Control cultural-----	7
Control biológico-----	8
Control de temperaturas en almacén-----	9
Control genético-----	9
Esterilización-----	9
Control químico-----	10
Antecedentes históricos del control microbiano-----	11
Clasificación de virus entomopatógenos-----	11
Familia baculoviridae-----	12
Género granulovirus-----	13
Transmisión, infección y síntomas-----	14
Producción de baculovirus <i>in vivo</i> -----	16
Factores que afectan la multiplicación <i>in vivo</i> -----	16
El insecto huésped-----	16
Edad y estadio de desarrollo-----	17
Sexo-----	18
Huéspedes alternativos-----	18
El inóculo viral-----	19

Origen-----	19
Actividad-----	19
Dosis-----	20
Condiciones ambientales-----	21
Temperatura-----	21
Humedad-----	21
Alimentación-----	22
Uso del virus de la granulosis en pruebas de campo-----	23
Ventajas y limitaciones-----	24
MATERIALES Y MÉTODOS-----	28
Localización de la zona de estudio-----	28
Material biológico-----	28
Método de evaluación-----	29
Tratamientos y diseño experimental-----	29
RESULTADOS-----	32
DISCUSIÓN-----	34
CONCLUSIONES-----	36
LITERATURA CITADA-----	37
APÉNDICE-----	42

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Especies descritas en el género Granulovirus. -----	14
Cuadro 2. Tratamientos a evaluar de métodos de propagación <i>in vivo</i> del virus de la granulosis. -----	30
Cuadro 3. Calendarización de actividades del estudio. -----	31
Cuadro 4. Porcentaje promedio de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) en las evaluaciones. -----	33
Cuadro 5. Registro de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) tomados a los 5 días después de la aplicación del 1 ^{er} , 2 ^o y 3 ^{er} método de propagación <i>in vivo</i> . -----	43
Cuadro 6. Registro de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) tomado a los 5 días después de la aplicación del cuarto método. -----	43
Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) corregida por Abbott a los 5 días después de la aplicación de los 4 métodos y el testigo. -----	43
Cuadro 8. Porcentaje de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) a los 5 días después de la aplicación transformado con la función arco seno $\sqrt{\% / 100}$. -----	44
Cuadro 9. Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas a los 5 días después de la aplicación. -----	44
Cuadro 10. Comparación de medias por Tukey al 0.05 de significancia a los 5 días después de la aplicación. -----	44
Cuadro 11. Registro de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) tomada a los 10 días después de la aplicación del 1 ^{er} , 2 ^o y 3 ^{er} método de propagación <i>in vivo</i> . -----	45

Cuadro 12.	Registro de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) tomadas a los 10 días después de la aplicación del cuarto método de propagación <i>in vivo</i> .-----	45
Cuadro 13.	Porcentaje de mortalidad de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) corregida por Abbott a los 10 días después de la aplicación de los 4 métodos y el testigo.-----	45
Cuadro 14.	Porcentaje de mortalidad de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) acumulada a los 10 días después de la aplicación. -----	46
Cuadro 15.	Porcentaje de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) a los 10 días después de la aplicación transformadas con la función arco seno $\sqrt{\%/100}$.-----	46
Cuadro 16.	Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas a los 10 días después de la aplicación. -----	46
Cuadro 17.	Comparación de medias por Tukey al 0.05 de significancia a los 10 días después de la aplicación. -----	47
Cuadro 18.	Registro de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) tomada a los 15 días después de la aplicación del 1 ^{er} , 2 ^o y 3 ^{er} método de propagación <i>in vivo</i> . -----	47
Cuadro 19.	Registro de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) tomado a los 15 días después de la aplicación del cuarto método de propagación <i>in vivo</i> . -----	47
Cuadro 20.	Porcentaje de mortalidad de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) acumulada a los 15 días después de la aplicación. -----	48
Cuadro 21.	Porcentaje de larvas muertas de <i>Phthorimaea operculella</i> (Zeller) a los 15 días después de la aplicación transformado con la función arco seno $\sqrt{\%/100}$.-----	48
Cuadro 22.	Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas a los 15 días después de la aplicación. -----	48
Cuadro 23.	Comparación de medias por Tukey al 0.05 de significancia a los 15 días después de la aplicación. -----	49

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) a los 5, 10 y 15 días después de la aplicación. ----- **34**

INTRODUCCIÓN

La palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) es una plaga que posee una distribución cosmopolita; se presenta en la mayor parte de las áreas donde se cultivan o se embarcan papas u otras plantas solanáceas. Su distribución es mundial y se le encuentra desde los 40º latitud norte hasta los 40º latitud sur de América, África, Sur de Europa y Oceanía (Valencia, 1986).

Esta plaga representa un problema grave para este cultivo en México, ya que se encuentra prácticamente en todas las regiones donde se cultiva esta solanácea, con excepción del Valle de Toluca, Edo. de México (Domínguez *et al.*, 1998). Así mismo, García y Medrano (2001) mencionaron que actualmente se considera a ésta como la plaga más importante de la papa tanto en campo como en almacén, ya que además, el tubérculo dañado pierde agua, se encoge y está expuesto a la invasión de patógenos.

En regiones cálidas puede llegar a ocasionar daños severos al cultivo en condiciones de campo, afectando alrededor del 50% de la producción (Rocha y Paredes, 1982).

La gran demanda que actualmente existe de productos agrícolas ha generado un conflicto entre la reducción en el uso de plaguicidas químicos y la necesidad de mantener un adecuado nivel productivo. Esta situación ha hecho que se realicen constantes esfuerzos para desarrollar alternativas efectivas en la utilización de plaguicidas convencionales. Entre estas alternativas está el control microbiológico que se refiere al tipo de control biológico que involucra la utilización de microorganismos (en el sentido amplio incluyen los nemátodos) para el control de plagas (Castillo *et al.*, 1995).

Los virus son entidades submicroscópicas y de obligada patogenicidad que poseen su propio material genético y presentan un estado infectivo, el virión, que sirve como vehículo para introducir el genoma viral en la célula del hospedero (Lwoff y Tournier, 1971). Su importancia radica en su especificidad, su naturaleza infecciosa y su relativa estabilidad en el ambiente, lo que los convierte en entidades con gran potencial para ser usadas como agentes de control de plagas (Granados y Federici, 1986).

Es importante acentuar que es una alternativa específica y de bajo impacto ambiental, para el control de una de las plagas de mayor importancia en el cultivo de la papa. Este método de control, será de gran utilidad para los productores orgánicos de papa en México. Por lo anterior el objetivo del presente estudio es evaluar cuatro métodos de propagación *in vivo* del virus de la granulosis y determinar la eficiencia en términos de mortalidad de *Phthorimaea operculella*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Palomilla de la papa

La palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) es una plaga originaria de América del Sur y de las áreas andinas de Colombia, Bolivia y Perú, siendo éstos, centros de distribución botánica de la hospedera; se desarrolla sobre numerosas especies de solanáceas silvestres y cultivadas, haciéndolo con más facilidad en áreas con veranos calientes y secos. Se le considera una plaga cosmopolita presente en todas las regiones paperas de América, Australia, Europa, África y Asia (Valencia, 1986). Esta plaga causa daños al follaje, al sistema vascular y a los tubérculos de la papa en todas las regiones calientes y secas del mundo (Rocha *et al.*, 1990). Esta plaga representa un problema grave para este cultivo en México, ya que se encuentra prácticamente en todas las regiones donde se cultiva está solanácea.

Ubicación taxonómica.

Triplehorn *et al.* (2005) señalaron la posición taxonómica de la palomilla de la papa de la siguiente manera:

Reino Animal

Phylum Artropoda

Subphylum Atelocerata

Clase Hexapoda

Orden Lepidoptera

Suborden Frenatae

Superfamilia Gelenchioidea

Familia Gelechiidae

Género *Phthorimaea*

Especie *P. operculella* (Zeller).

Otros sinónimos científicos aplicados a *Phthorimaea operculella* (Zeller) son:

- *Gnorimoschema operculella*
- *Prorictemia operculella*
- *Gelechia operculella*
- *Gelechia solanilla*
- *Lita solanilla* (Champ, 1986).

Ciclo de vida y descripción morfológica.

Domínguez *et al.* (1998) mencionaron que este insecto presenta cuatro fases: huevecillos, larva, pupa y adulto.

Huevecillos. Son de color blanco amarillento, de forma ovalada con un extremo más angosto, miden de 0.32 a 0.47 mm en promedio, son depositados individualmente en el envés de las hojas, en los tallos y en grupos de 150 a 200 huevecillos sobre los tubérculos (Llanderal *et al.*, 1984). En el período de incubación con un umbral de temperatura inferior (UTI) de 11° C es de 64.8 unidades calor (UC) (Sánchez, 1989).

Larva. Rocha *et al.* (1990) reportaron que el desarrollo larval presenta cuatro instares; el primero es de color amarillo cremoso y mide de 1.25 mm de longitud. Con respecto al ancho de la cápsula cefálica; García y Medrano (2001) citaron que la larva es de color blanco - verdoso en sus primeras etapas de vida y conforme crece adquiere el color amarillento; escudo protorácico café oscuro dividido longitudinalmente en dos; setas abdominales del segmento IX con una disposición triangular; patas de color oscuro, y la longitud varía entre 10 y 12 mm. al respecto Metcalf y Flint (1981) citaron que presentan tres segmentos torácicos, diez segmentos abdominales, en el extremo del labium presenta un órgano hilandero del cual exuda seda, y presenta pseudópodos o propatas en los segmentos 3,4,5,6 y 10 del abdomen.

Las larvas que eclosionan de los huevecillos que fueron ovipositados en el follaje minan las hojas y barrenan el tallo, el mayor daño lo hacen durante la formación del tubérculo y durante el desvare, ya que el adulto aprovecha las grietas que se forman en el suelo para ovipositar en los tubérculos. Una vez dentro del tubérculo, la larva comienza su alimentación excavando galerías, al principio en la superficie y a medida que crece, continua barrenado hacia el interior (Ross, 1973).

Por otro lado, Bacon (1960) citó que las larvas hacen galerías en las hojas, donde penetran para alimentarse del parénquima de los folíolos, también pueden barrenar los tallos, causando la muerte de los puntos de crecimiento y el debilitamiento y ruptura de los mismos. El insecto es más dañino cuando ataca los tubérculos, ya que les resta calidad comercial y permite la entrada de otros organismos secundarios, (García y Medrano, 2001). La actividad de la larva minadora es muy favorecida por el clima seco, por el contrario, las lluvias limitan su desarrollo, ya que estas rompen la epidermis de la hoja donde se instaló la larva obligándola a salir a la superficie de la hoja para empezar la excavación de otra mina, en ese lapso queda expuesta a las adversidades climáticas y a los enemigos naturales. Cuando la larva nace sobre el tubérculo realiza una excavación, forma una galería y protege la entrada con secreciones de seda que se mezcla con los excrementos de color negro (Santoro, 1960). En condiciones favorables las larvas requieren 14 días para su desarrollo, que en tiempo fisiológico equivale a 154.94 UC con un UTI de 11° C (Sánchez, 1989); así mismo, Langford y Cory (1932) mencionan que el período de desarrollo larval se cumple en aproximadamente 12 días a una temperatura de 26.7° C.

Pupa. Una vez que la larva completa su desarrollo, se dirige al suelo para pupar, para lo cual forman una cubierta de seda mezclada con partículas de suelo, en el campo se localizan principalmente en el suelo y en hojas viejas. En almacén pupan sobre la superficie del tubérculo, en desperdicios dejados en el almacén y en tubérculos viejos y dañados; las pupas son de color marrón y miden 0.6 mm de largo Rocha *et al.* (1990). Por su parte, Padilla y Ortega (1963) aseguraron que éstas se

localizan en el suelo, hojarascas secas, basura de suelo, costales, etc. El periodo pupal puede durar seis días a una temperatura media de 32° C o 26 días a una temperatura media de 17° C (Langford y Cory, 1932; Padilla y Ortega, 1963).

Adulto. Es una palomilla pequeña, de aproximadamente de 8 mm de longitud y 1.4 cm de expansión alar, es de coloración grisácea con brillo “platinado” presenta manchas no muy sobresalientes en las alas anteriores; posee dos espuelas fuertes y largas en las tibias metatorácicas, donde presentan flecos de casi del tamaño de éstas (Domínguez *et al.*, 1998). Presenta ojos compuestos con dos ocelos, tarsos de cinco segmentos y protórax muy pequeño (Metcalf y Flint, 1981). Al respecto, Santoro (1960) señaló que las palomillas son activas solo por la noche, dado que en el día se esconden debajo de las hojas o sobre el terreno del cultivo.

La longevidad del adulto varía de 10 a 15 días (Llanderal *et al.*, 1984), aunque en condiciones de 25° C de temperatura puede vivir más de 40 días (Briese, 1980). La hembra pasa por un período de preoviposición que es de 37.7 UC con un UTI de 11° C (Sánchez, 1989). Puede ovipositar de 150 a 200 huevecillos en forma aislada (Metcalf y Flint, 1981).

Las palomillas emergen con la llegada del clima cálido, las hembras comienzan a depositar sus huevecillos. El tiempo promedio que se requiere para producir una generación es de 15 a 30 días. En una temporada se producen varias generaciones, de las cuales las últimas atacan los tubérculos expuestos o apenas cubiertos por un poco de tierra. Durante el almacenaje, el insecto puede proseguir su cría si la temperatura es de 10° C o más (Davidson, 1992).

Hospederos.

Se reportan al menos 40 especies de plantas por lo común solanáceas; como hospederas de la palomilla de la papa (Callan, 1967).

Estrategias de control.

Cultural. El campo donde se va a sembrar debe de mantenerse libre de malezas, lo mismo que el cultivo, especialmente de solanáceas silvestres. Debe de efectuarse una rotación sistemáticas de cultivos y realizar buenas labores de aporque. Asimismo debe de efectuarse una cosecha rápida y no tapar los tubérculos que quedan en el campo de un día para otro con follaje de papa ya que de esta manera puede pasarse la infestación a los tubérculos sanos (Delorit y Ahlgren, 1983).

Las prácticas culturales son de gran valor para el control de la palomilla de la papa, entre las más importantes se citan algunas como sembrar temprano el cultivo de primavera, mantener el desarrollo del tubérculo por lo menos 5 cm abajo del nivel del suelo, cosechar tan pronto como sea posible, evitar que las papas pasen la noche expuestas en el campo, destruir todas las papas infestadas o desechadas que pudieran alojar al insecto, evitar sembrar el cultivo en otoño adyacente a cultivos de primavera y procurar la venta rápida del producto (Davidson, 1992).

Zenner, (1986) señaló que una siembra a una buena profundidad y bien tapada evita que los adulto ovipositen sobre los tubérculos. Por su parte, Shelton y Wyman (1979) indicaron que el aporque es una técnica que protege a los tubérculos del ataque de la palomilla ya que los surcos aporcados y sellados tuvieron un menor daño que los surcos que sólo fueron sellados; así mismo, señalan que el objetivo del aporque es formar una barrera entre los tubérculos y las hembras de *Phthorimaea operculella* (Zeller) comentan, además, que el aporcado acompañado de riegos por aspersión evita en gran medida la infestación del cultivo a lo largo del ciclo ya que se

evita el agrietamiento del suelo y consecuentemente la oviposición sobre los tubérculos.

Una cosecha oportuna reduce el periodo de exposición de los tubérculos a este insecto, según Zenner (1986), quien además mencionó que la causa más importante de infestación en el campo son los tubérculos no cosechados, por lo que se sugiere evitar en lo posible dejar papas expuestas por una noche, así como eliminar residuos de cosecha y plantas voluntarias, lo cual puede lograrse con algún producto químico desecante de baja residualidad.

Biológico. Cisneros (1986) argumentó la presencia de varias especies de parasitoides nativos que se encuentran atacando *Phthorimaea operculella* en la región del Valle del Cañate en Perú; entre ellos citó a *Apanteles gelechiidivoris* (Mars) y a *Apanteles scutellaris* que son endoparásitos de larvas de I y II estadios en minas de folíolos de papa. La avispa *Copidosoma koeheleri* (Blanchard) de la familia Encyrtidae, también es un parasitoide poliembriónico huevo-larva. Reportaron también a las familias: *Ichneumonidae*, *Crematus* sp, *Prestomerus* sp y *Temelucha* sp; el Eulophidae, *Dineulopulus phthorimae* y *Encyrtidae*, *Litomastix* sp y de la familia Tachinidae reportaron a *Icamyia cuzcensis* y *Schizactia* spp. Valencia (1986) reportó la introducción de la avispa parasítica *Copidosoma desantisi*, la cual se encuentra parasitando huevecillos de *P. operculella*.

El efecto del parasitismo sólo se nota cuando la larva de la palomilla abandona el tubérculo y baja a pupar, dado que es un parásito de huevo-larva. En este caso la larva no forma la pupa característica, sino una momia que contiene un número variable de individuos del parasitoide. Davidson (1992) reportó a las avispas braconíidas *Orgilus lepidus* (Muesebeck) *Bracon gelecchiae* (Ashmead) como parasitoides de larvas.

En México son pocos los trabajos que se han realizado en este aspecto. En lo que concierne a parasitoides, Nieto *et al.* (1989) afirmaron que en León, Guanajuato,

reconocieron cuatro especies de himenópteros parasíticos pertenecientes a las familias Ichneumonidae y Braconidae de las que *Orgilus sp* fue la más abundante, por lo que infieren que está bien establecida en esta región papera. En el invierno de 1987 registraron un parasitismo total de 73.4 %, mientras que en el verano de 1998 fue de 25 %, en el invierno del mismo año se registró un parasitismo total de 20.5 %, cabe aclarar que los porcentajes más altos obtenidos de parasitismo se registraron en sitios donde la aplicación de insecticidas fue mínima.

Las trampas usadas que contenían agua con feromonas sexuales son efectivas para la capturar de machos de *P. operculella* (Zeller). Dichas trampas deben de contener suficiente agua para evitar problemas de evaporación (Del Ángel, 1985).

Control de temperatura en almacén. Aparentemente, las papas que son almacenadas a 10° C o menos no resultan dañadas por la palomilla, pero en estas condiciones el desarrollo de la plaga sólo se detiene, y se reanuda cuando prevalecen temperaturas mayores (Davidson, 1992).

Genético. El uso de variedades resistentes al ataque de la palomilla de la papa está considerado como una posible estrategia dentro de un sistema integrado de control de esta plaga. Foot (1976) comparó 20 cultivares de papa considerando el daño al tubérculo y al follaje, aunque ninguno mostró resistencia evidente, sólo encontró que las variedades con un crecimiento erecto y con pocas hojas presentaban un daño menor, en tanto que la infestación de los tubérculos estaba relacionada con su profundidad.

Esterilización. Harwalker *et al.*, citados por Cruz (1990) reportaron la esterilización de la palomilla de la papa con Metepa en laboratorio; los estudios de competencia indicaron que los machos estériles compitieron efectivamente con los machos normales.

Nabi (1983) esterilizó machos de *P. operculella* menores de 24 h de edad por medio de fumigaciones con Thiotepa en laboratorio, los cuales compitieron efectivamente con machos normales. A nivel de campo los resultados indicaron que los machos estériles fueron significativamente menos competitivos, pero aún así disminuyó considerablemente el crecimiento de la población.

Químico. Rocha *et al.* (1990) mencionaron que la mayoría de las estrategias de manejo de la palomilla en el país se basa en el uso casi exclusivo de insecticidas y se caracteriza por un elevado número de aplicaciones, dependiendo de la zona donde se cultiva papa. Esto puede ser causa de que las poblaciones de insectos se vuelvan resistentes a dichos productos (Georghiou, 1971).

Gálvez (1989) después de evaluar bajo condiciones de laboratorio e invernadero los productos Paration metílico, Azinfós metil, Metamodofos, Permetrina y Thiodiocarb, encontró que estos productos presentan un control eficiente sobre adultos de *Phthorimaea operculella*. De manera general citaron que los productos Paration metílico, Azinfos metil, Metamidofós, y Permetrina presentan un control efectivo sobre huevecillos, larvas y adultos de la plaga.

El tratamiento debe de iniciarse cuando se observe un promedio de 5 a 10 plantas infestadas de cada 100 con dos o tres larvas vivas. Después del corte del follaje debe realizarse una o dos aplicaciones, sobre todo en terrenos que se agrietan y cuando la infestación del follaje haya sido alta. La presencia de excrementos de color café oscuros y que semejan montoncillos de aserrín podrido denota la presencia de insectos. Estos excrementos se localizan en los ojos de las papas, que son las partes débiles por donde penetra la larva (Lagunes, 1987).

Antecedentes históricos del control microbiano.

Los primeros investigadores que estudiaron los virus ocluidos en poliedros ó gránulos fueron Maestri y Cornalia en 1856, y relacionaron la presencia de estas estructuras con el colapso de una población de gusanos de la seda que presentaron la enfermedad. En 1926, Paillot describió por vez primera un virus de la granulosis (granulovirus, GV), citado por Maramorosch y Sherman, 1985. Así mismo en 1934, Ishimori describió por primera vez, a un nuevo tipo de poliedrosis en el gusano de seda, el cual se caracterizó por formar poliedros ó gránulos en el citoplasma de la células infectadas, lo que más tarde se conoció como virus de la poliedrosis citoplásmica (VPC).

Con el desarrollo del microscopio electrónico, surgió una nueva era en el estudio de los virus entomopatógenos; ya que Bergold en 1947 confirmó la presencia de nucleocápsides en forma de bastón dentro de los poliedros ó gránulos de baculovirus del tipo de la poliedrosis nuclear (nucleopoliedrovirus, NPV) (Mazzone, 1985). Más tarde, Steinhaus y Thompson en 1949 realizaron las primeras aplicaciones en campo con baculovirus, mediante la introducción artificial del VPN del gusano de la alfalfa (Steinhaus, 1975).

Clasificación de virus entomopatógenos.

Los virus de insectos se clasificaron originalmente por la presencia o ausencia de poliedros ó gránulos y la morfología del virión. Más tarde se utilizaron los criterios de grupo de hospedero y tipo de tejido que infectan (Poinar y Thomas, 1984; Evans y Entwistle, 1987; Vaughn, 1992). Actualmente los virus patógenos de insectos son clasificados siguiendo los criterios que se utilizan para clasificar los virus de animales, dentro de los cuáles se pueden citar, al tipo de ácido nucleico, la morfología de la partícula, la simetría de las subunidades de la cubierta de proteína la presencia o ausencia de una envoltura que rodea a la partícula, y el tamaño de la partícula (Vaughn, 1992).

La morfología de la partícula es un criterio importante para la clasificación de virus y algunos grupos de virus de invertebrados (incluyendo a los entomopatógenos) presentan la particularidad de que los viriones o nucleocápsides son ocluidos en poliedros o gránulos. A estos se les denomina poliedros en los NPV's (virus de la poliedrosis nuclear) ó CPV's (virus de la poliedrosis citoplásmica), gránulos o cápsula en los GV y esferoides para los entomopoxivirus (Adams, 1991). Para los virus entomopatógenos que los presentan, los poliedros ó gránulos constituyen una cualidad muy importante, ya que les confieren mayor resistencia a las condiciones ambientales, requerimiento fundamental si se desean desarrollar como agentes de control biológico.

Dentro de los entomopatógenos, los más estudiados y utilizados como agentes de control comprenden básicamente 4 familias: Baculoviridae, Poxviridae, Reoviridae (todos ellos con virus ocluidos) e Iridoviridae, aunque también existen reportes actuales de virus aún no clasificados dentro de las familias de virus de invertebrados existentes, que podrían tener un alto potencial como agentes de control (Poinar *et al.*, 1991; Allen y Ball, 1992; Cooper y Zhang, 1992; Glare, 1992 citados por Badii *et al.*, 2000).

Familia baculoviridae.

Los virus de esta familia contienen DNA de doble cadena y una partícula viral con forma de bastón o varilla. Estas partículas virales se ocluyen en OB's que se conocen como poliedros o gránulos (Tinsley y Kelly, 1985). Dentro de esta familia se han reconocido básicamente dos grupos: virus de la poliedrosis nuclear o Nucleopolyhedrovirus (NPV), y los virus de la granulosis o granulovirus (GV). Dentro de los NPV existen dos subgrupos: los virus de la poliedrosis nuclear (NPV's), los cuáles poseen una sola nucleocápside por envoltura viral, y los virus de la poliedrosis nuclear múltiple (NPVM) los cuáles pueden tener más de una nucleocápside por envoltura.

Los baculovirus se han aislado únicamente de artrópodos, y en mayor proporción de insectos. No existe ningún reporte que notifique la presencia de estos agentes en plantas o animales vertebrados. Se han reportado cerca de 600 especies de insectos que han sido infectados por baculovirus, principalmente del Orden Lepidóptera (Faulkner, 1981; Vlaskovits, 1992; citados por Badii *et al.*, 2000). Esta alta especificidad ha sido una característica fundamental para que los miembros de esta familia presenten el mayor potencial para utilizarse como bioinsecticidas, dentro de los virus entomopatógenos y es la razón por la cual sean los virus entomopatógenos más estudiados y desarrollados como agentes de control.

Género granulovirus.

Los granulovirus (GV's) han sido aislados de más de 100 especies todas ellas pertenecientes al orden lepidóptera de la clase insecta (Volkman *et al.*, 1996), también en este género; la mayoría de los aislados conocidos han sido identificados solo por su característica morfológica. En general, se admite que los GVs tienen un espectro de huéspedes más restringido que los NPV's. Sin embargo, en los GVs los estudios de espectro de huéspedes han sido muy limitados ya que se ha hecho para muy pocos virus y, en general han incluido un reducido número de especies de insectos. En la mayoría de los casos en los que se ha podido verificar la existencia de infección cruzada, no se ha cuantificado la dosis requerida para producir la infección y tampoco se ha confirmado la identidad del virus causante de la mortalidad (Crook, 1991). Esta falta de precisión dificulta nuestro conocimiento real del espectro de huéspedes de los GV's ya que en algunos casos se ha podido comprobar que en lugar de replicarse el virus utilizado como inóculo se replica el virus homólogo del insecto (Crook, 1991).

No obstante se tiene constancia de que algunos GV's, entre los cuales cabe incluir a los de *Cydia pomonella*, *Heliothis armigera* y *Scotogramma trifolii* tienen un espectro de huéspedes que abarca especies pertenecientes a dos o más géneros

(Crook, 1991). Hasta la fecha, solo un limitado número de GVs han sido comparados por técnicas con un mayor poder discriminatorio como pueden ser la serología, el análisis de péptidos estructurales, hibridación de ADN y análisis del Genoma con enzimas de restricción. Estos estudios han permitido establecer 6 especies en el género (cuadro 1).

Cuadro 1. Especies descritas en el género Granulovirus.

Nombre de la especie	Cultivo
<i>Cydia pomonella</i>	Manzana, pera.
<i>Phthorimaea operculella</i>	Papa
<i>Plutella xylostella</i>	Repollo
<i>Pieris rapae</i>	Repollo
<i>Adoxophyes orana</i>	Manzana
<i>Erinnyis ello</i>	Casova

Transmisión, infección y síntomas.

Casi todos los virus con poliedros ó gránulos tienen capacidad para mantenerse en campo por periodos de tiempo considerables, siempre y cuando no estén expuestos a la radiación ultravioleta UV del sol o a agentes químicos degradables. Algunos de ellos, como los baculovirus, son capaces de causar epizootias naturales en poblaciones del insecto hospedero, lo cual produce una gran cantidad de inóculo para las generaciones subsiguientes, persistiendo en el suelo por largos periodos de tiempo (Thomas *et al.*, 1972; Caballero *et al.*, 1992).

Adicionalmente, los poliedros ó gránulos que quedan en las hojas de las plantas, después de que la larva muere, pueden ser arrastrados por la lluvia, el

viento, o acarreados por vertebrados y por los propios depredadores y parasitoides del insecto susceptible, hacia otras regiones (Hostetter y Bell, 1985).

La ruta principal de entrada de los virus entomopatógenos al hospedero es por ingestión oral o a través de alimento contaminado. Sin embargo, existen otras rutas alternas como son la contaminación de la superficie del huevo (ruta transovum), transmisión dentro del huevo (ruta transovárica) y la infección por medio de parasitoides, durante la oviposición (Granados, 1980; Mazzone, 1985).

Una vez que el virus entra al insecto, llega primero al lumen del intestino medio; dentro de este, debido al alto pH de los jugos intestinales (de 9.5 a 11.5) y a la acción de algunas enzimas hidrolíticas, se degradan los poliedros ó gránulos y se liberan los viriones (Granados, 1980). En los baculovirus, éstos se fusionan a las microvellosidades de las células epiteliales mediante su envoltura, y posteriormente las nucleocápsides desnudas se dirigen hacia el núcleo celular, en el cual se replica el virus (Mazzone, 1985; Granados y Williams, 1986; citado por Badii *et al.*, 2000).

Los viriones de los baculovirus presentan 2 fenotipos, durante su infección en el hospedero (Granados, 1980); en el primero, las nuevas nucleocápsides pueden adquirir una envoltura sintetizada de *novo* en el núcleo y se ocluyen dentro de un poliedro ó granulo, éste es el fenotipo conocido como virus ocluido y es el responsable de la transmisión horizontal de los baculovirus. En el segundo, las nuevas nucleocápsides salen del núcleo al citoplasma, para después germinar a través de la membrana celular, adquiriendo una envoltura de naturaleza membranal y son liberados al hemocele. Este es el fenotipo conocido como virus extracelular (VE), el cual es el responsable de la infección sistémica de los tejidos secundarios dentro del mismo insecto.

Los baculovirus atacan a una gran diversidad de tejidos, como el adiposo, la epidermis, la matriz traqueal (traqueoblastos), los hemocitos, la hipodermis, etc. (Badii *et al.*, 2000).

Las larvas infectadas con baculovirus no presentan síntomas durante los primeros días después de la infección, e incluso crecen en forma normal (y a veces más de lo normal). Posteriormente se observa un cambio en el comportamiento del insecto, ya que sus movimientos son más lentos, deja de comer y el crecimiento se detiene (Mazzone, 1985; Granados y Williams, 1986,; citado por Badii *et al.* 2000). La larva se torna blanquecina y opaca, debido principalmente a la infección masiva del tejido adiposo, para posteriormente perder la integridad tisular. Finalmente, la larva migra hacia las partes altas de la planta y muere, y el exoesqueleto se decolora y reblandece hasta romperse y liberar un fluido blanco-grisáceo, que contiene poliedros ó gránulos en elevadas concentraciones. La larva muerta queda colgando generalmente de las propatas en una posición de V invertida, lo cual es un comportamiento que favorece la dispersión del virus en el medio ambiente.

Propagación *in vivo* de baculovirus.

Factores que afectan la multiplicación *in vivo* de baculovirus.

En la producción de baculovirus *in vivo*, a nivel experimental o industrial, el objetivo principal es lograr el mayor rendimiento de cuerpos de inclusión biológicamente activos, al costo mas bajo. En ese proceso, se deben tener en cuenta una serie de factores de importancia fundamental para la optimización de la producción, los que influyen además en la calidad del producto final (Jaques, 1977; Sherman, 1985; Shapiro, 1986; Shieh, 1989; Sosa Gómez y Moscardi, 1996; Hunter - Fujita *et al.*, 1998).

El insecto huésped. Para la multiplicación *in vivo* es recomendable contar con una colonia de insectos establecida, preferentemente, en condiciones de laboratorio sobre medio artificial. Este sistema de cría, permite un mayor control de la

calidad y la sanidad de los individuos destinados tanto a producción como a estudios de caracterización viral. La cría de los insectos huéspedes demanda el conocimiento previo de los hábitos de la especie y de sus requerimientos nutricionales y ambientales. En ciertos casos, es posible criar masivamente los individuos durante el estado larval, sin que ello afecte el rendimiento y la calidad del material ni la obtención de los adultos necesarios para la manutención de la cría (*A. gemmatalis*, *Diatraea spp.*, *Trichoplusia ni*). En otros, es necesario recurrir a métodos de cría individual debido a que la especie presenta hábitos de canibalismo a partir de cierto estadio larval (*Spodoptera frugiperda*) o bien, son especies naturalmente solitarias (*Cydia pomonella*).

Edad y estadio de desarrollo. Como se expreso anteriormente, el objetivo principal es el de obtener el máximo rendimiento de virus y en tal sentido, uno de los factores mas importantes es la edad larval. Existe una relación constante entre el peso del huésped al momento de la muerte y la producción de cuerpos de inclusión (occlusion body, OB). La producción de OBs por miligramo de larva varia normalmente entre 9.2×10^6 y 4.3×10^7 en NPV's de lepidópteros, 2×10^5 y 5×10^6 en NPVs de himenópteros, aproximándose 2×10^7 para granulovirus en lepidópteros (Entwistle y Evans, 1985; Hunter-Fujita *et al.*, 1998). Sin embargo, tal relación no depende solo del peso inicial de la larva, sino del incremento de peso registrado durante el proceso de infección (Shapiro, 1986). Para maximizar los rendimientos se utilizan larvas de los últimos estadios de desarrollo (generalmente cuarto estadio), adoptándose en ciertos casos métodos que contribuyen a lograr un mayor incremento de peso en las larvas enfermas.

El agregado de hormonas juveniles en la dieta artificial aumenta el rendimiento de OB's; este método es utilizado en la producción de diversos baculovirus. Por ejemplo la adición de methoprene (como "Altosid") incrementa el rendimiento de gránulos por larva en la producción del virus granulosis de *Cydia pomonella* (Glen Y Payne, 1984). De igual manera, esta hormona juvenil, fue probada en la producción de NPV en *Heliothis zea* incorporándola en una concentración del 0.4% en la dieta

artificial, con el logro de un incremento de peso larval del 28% y un aumento de productividad de cuerpos de inclusión del 15.8% (Sheih, 1989).

La máxima producción de cuerpos de inclusión ocurre en los tejidos mas ricos en nutrientes y metabòlicamente activos, tales como el cuerpo graso, la epidermis y la matriz traqueal (Federici, 1993). Para un estudio de desarrollo dado, el tiempo requerido para alcanzar la fase de inclusión depende del aislamiento viral, de la dosis suministrada y de la temperatura ambiente. En general, en larvas de lepidópteros infectadas con baculovirus que producen infecciones poliorganotrópicas, la producción máxima se alcanza a los 5-10 días post-tratamiento (Federici, 1998).

Sexo. Según experiencias realizadas por Shapiro *et al.*, (1981) las hembras de *Lymantria dispar* presenta un estadio adicional respecto a los machos y mayor peso larval. Las hembras infectadas con NPV durante su cuarto y quinto estadio produjeron mayor cantidad de cuerpos de inclusión por larva que los machos, mientras que el rendimiento por gramo de larva en ambos sexos no mostró diferencias altamente significativas. Por tal motivo, en esta especie, la utilización de hembras para la producción de virus sería el sistema ideal mientras que los machos pudieran ser utilizados para la producción de machos estériles (Shapiro, 1986).

Huéspedes alternativos. En ciertos casos, donde el huésped homólogo es difícil de criar a gran escala por no disponer de dietas artificiales, presentar tamaño pequeño o causar problemas alergógenos, se ha recurrido a la amplificación viral sobre huéspedes alternativos. Por ejemplo, las larvas de *Trichoplusia ni* son utilizadas para la producción de AcMNPV y de *Anagrapha falcifera* AfNPV. Del mismo modo, *Panolis flammea* NPV es propagado en larvas de *Mamestra brassicae* (Kelly y Entwistle, 1988).

En todos los casos es necesario tener en cuenta que este tipo de sistemas puede acarrear inconvenientes. Ya que debe mantenerse un estricto control acerca de la identidad viral, puesto que el suministro de un virus dado puede estimular la

aparición de infecciones debidas a virus latentes (Hughes *et al.*, 1993) y generar o seleccionar variantes con especificidad aumentada para el huésped alternativo, pero disminuida para el huésped primario (Weitzman *et al.*, 1992).

El inóculo viral. El inóculo a ser utilizado para la producción de virus es previamente amplificado y caracterizado morfológica, biológica y bioquímicamente con el fin de establecer parámetros de calidad utilizables a lo largo del proceso de propagación.

Origen. Cuando se trata de un nuevo aislamiento viral, lo más factible es que el virus sea aislado a partir de larvas muertas o enfermas colectadas en campo. Para obtener un inóculo libre de contaminantes se puede infectar cultivos celulares, pero no en todos los casos es factible disponer de líneas permisivas. En tales casos, se realiza una primera amplificación en un número limitado de individuos de la especie susceptible, posteriormente se purifican los cuerpos de inclusión obtenidos. Luego se efectúa una segunda amplificación, a la mayor escala posible de acuerdo con la cantidad de inóculo purificado disponible. A partir de la tercera amplificación, bajo estricto control de calidad, se obtiene el producto que será utilizado en futuras multiplicaciones (Martignovi, 1999). El inóculo debe estar libre de contaminantes y en tal sentido, uno de los métodos mas utilizados es la purificación de los cuerpos de inclusión en gradientes de densidad de sacarosa. Para el control de la pureza y calidad del inóculo se realizan exámenes por microscopia óptica y electrónica. Paralelamente, es requisito realizar ensayos para la determinación cuali-cuantitativa de contaminantes tales como bacterias, virus u otros microorganismos patógenos.

Actividad. Entre baculovirus de una misma especie existen aislamientos que en muchos casos presentan diferente actividad biológica y por ende, diferente virulencia y rendimiento. Por tal motivo, se debe seleccionar al que presente mayor actividad, considerando que en ciertos casos ello también depende de la población de insectos blanco a tratar. Pruebas realizadas con 19 aislamientos de LdNPV procedentes de diversos países, mostraron que el mas activo contra *L. dispar* resulto

ser uno de USA, mientras el menos activo fue el de Japón (Shapiro, 1986). De igual manera, trabajos realizados con 14 aislamientos de *Heliothis* NPV mostraron diferencias de hasta un 50% en tiempo letal (Hughes *et al.*, 1983).

Se sabe que una especie de virus puede presentar diferencias en su genoma las cuales permiten identificar variantes. Se han descrito numerosas variantes geográficas de diferentes baculovirus, pero hasta el presente, en la mayoría de los casos, no se ha podido establecer una correlación fehaciente entre dichas variantes, distribución geográfica y diferencias significativas en virulencia. Ejemplo de ellos es el nucleopoliedrovirus de *S. frugiperda* (SfMNPV), y uno de los factores que puede incidir es el hábito migratorio de esta especie plaga (Shapiro *et al.*, 1991). Resultados obtenidos con posterioridad en relación con la virulencia de variantes de SfMNPV hacia determinadas poblaciones del huésped (Berretta *et al.*, 1998; Escribano *et al.*, 1999) sugieren que existe una marcada presión de selección natural que deriva en la retención de alta efectividad hacia la población local, presumiblemente por medio de un proceso de co-evolución huésped-patógeno. Entre los granulovirus, el más estudiado ha sido el de *C. pomonella* (CpGV). Estudios realizados con diversos aislamientos geográficos, mostraron diferencias en virulencia hacia larvas de primer estadio (Harvey y Volkman, 1983). Posteriores estudios realizados por Crook *et al.* (1985) permitieron establecer los patrones de restricción enzimática del ADN de CpGV de siete orígenes diferentes y el mapa físico de tres variantes geográficas. En este último trabajo, expuesto con anterioridad, no se encontraron diferencias significativas de efectividad entre los aislamientos analizados.

Dosis. Para obtener el máximo rendimiento de OBs por gramo o por larva, se selecciona la dosis más baja que produce el 100% de mortalidad de las larvas destinadas a la producción. Dosis menores pueden implicar que ciertos individuos alcancen el estado pupal y de esa manera, disminuyan el rendimiento total. Para cada sistema en particular es necesario ajustar la dosis y la metodología de aplicación del inóculo adecuadas. El inóculo puede ser utilizado por incorporación en la dieta artificial, por contaminación superficial o por aplicación a trocitos de dieta

(cuando se realizan multiplicaciones individuales). En sistemas de producción a gran escala la contaminación superficial es la más utilizada. Según Shapiro (1986), las dosis varían entre 1×10^5 a 5×10^7 poliedros por mililitro de dieta, en la mayoría de los sistemas descritos. Es interesante destacar que el incremento de las dosis no asegura un mayor rendimiento, sino que por el contrario, dosis altas pueden ser contraproducentes, ya que disminuyen el tiempo letal y por lo tanto la capacidad de crecimiento de la larva.

Condiciones ambientales.

Hasta ahora se han considerado factores intrínsecos de la relación huésped-patógeno, pero en el proceso de producción también los factores ambientales poseen gran importancia, tanto en el rendimiento como en la calidad del producto a obtener.

Temperatura. Para una misma dosis de inóculo, el incremento de la temperatura afecta el proceso de infección disminuyendo el tiempo letal. La producción se efectúa a temperaturas entre los 20 y los 26° C (Shapiro, 1986). Para determinar la temperatura óptima de producción del sistema, se realizan experimentos donde se toman en cuenta la temperatura, el rendimiento por larva o por gramo de larva, el tiempo letal y la calidad del producto obtenido.

En general, temperaturas mayores a las mencionadas anteriormente, producen una disminución en el rendimiento y calidad del virus. Ensayos realizados para la determinación de la temperatura de producción de LdMNPV, mostraron que tanto el rendimiento como la actividad del virus producido fue similar en larvas expuestas a 23, 26 y 29° C, mientras que a 32° C tales parámetros fueron menores (Shapiro, 1986).

Humedad. Mientras que la temperatura juega un papel importante en la producción viral, la humedad relativa no presenta casi efecto sobre ella. Su

importancia reside principalmente en la calidad del producto, ya que la humedad excesiva puede provocar estrés en el insecto huésped y favorecer la proliferación de bacterias, hongos u otros microorganismos contaminantes (Sosa-Gómez Y Moscardi, 1988). En los recipientes de multiplicación, es aconsejable que la humedad se mantenga entre el 50 y 70 %. De esta manera, se evita la deshidratación de la dieta artificial que sirve como alimento de las larvas y se obtiene una buena calidad de producción. Cabe considerar que en tales recipientes la humedad es mayor que la ambiental, por lo que para lograr dicha humedad relativa, la cámara de incubación debe mantenerse en un 20% por debajo del nivel de humedad deseada dentro de los recipientes. Por otra parte, se deben evitar procesos de condensación de humedad durante la manipulación de los recipientes de producción.

Alimentación. La composición de la dieta para la alimentación de los insectos bajo cría constituye uno de los principales componentes del costo de producción de baculovirus *in vivo*. Desde el punto de vista de su composición, las dietas pueden ser totalmente naturales o semisintéticas. La utilización de dietas naturales (follaje, frutos, tubérculos) presenta la ventaja de la adaptación del insecto a su fuente habitual de nutrición. Sin embargo, dadas las restricciones en la disponibilidad, que en ocasiones pueden impedir la continuidad de la producción, y las dificultades en estandarizar la calidad, se aconseja que su uso se restrinja a la alimentación de aquellos insectos para los cuales no se disponga de una dieta artificial. El desarrollo de las dietas semisintéticas (Vanderzant *et al.*, 1962) marcó el comienzo del desarrollo de procesos para la producción de baculovirus en forma masiva, al disponer en forma continua de una fuente de alimentación cuya calidad puede ser controlada y asegurada con relativa facilidad. Estas dietas incorporan fuentes de proteínas (gérmen de trigo, caseína, hidrolizados de distintas proteínas, etc.), de lípidos y esteroides (aceite de gérmen de trigo, colesterol), de carbohidratos (azúcar, harinas), de vitaminas (extractos de levaduras, complementos vitamínicos) y en ciertos casos, de sales (ejemplo: sales de wesson). En función de la respuesta de cada sistema, algunos de estos ingredientes pueden ser omitidos para obtener medios de costos mas reducidos. Valores de pH entre 5 y 6 permiten un adecuado

desarrollo de los insectos, una buena replicación viral, y además permite controlar el desarrollo de contaminantes microbianos. Sin embargo, para lograr una adecuada conservación de la dieta y mantener una sanidad adecuada en la cría de los insectos, se adicionan conservantes (ácido sórbico, metil parahidroxibenzoato, ácido benzoico, formaldehído) y antibióticos. Por último, las formulaciones deben incluir algún agente geleificante (agar, alginatos, etc.) para darle al sustrato la consistencia adecuada.

Uso del virus de la granulosis en pruebas de campo.

En 1926 Paillot, citado por DeBach (1981) observó una enfermedad en el gusano europeo de la col, *Pieris brassicae* caracterizada por la presencia de numerosas inclusiones granulares pequeñas que la designó como "pseudograsserie".

Comparada con la poliedrosis nuclear, los síntomas de la granulosis son más notorios, varían de acuerdo a la especie hospedera, y la larva enferma es menos activa que la larva sana, más flácida y toma un aspecto pálido translúcido. El periodo desde la infección hasta la muerte varía de 6 a 20 días (DeBach, 1981).

Los principales tejidos afectados por la granulosis son el tejido adiposo, la epidermis, y frecuentemente la matriz traqueal y las células de la sangre. Hay algunas dudas sobre si el virus se desarrolla en el núcleo o en el citoplasma de las células afectadas. Algunos científicos creen que hay una dicotomía y que algunas granulosis pueden ser llamadas granulosis nucleares y otras granulosis citoplásmicas. En cualquier caso hay una acumulación de pequeños cuerpos granulares incluidos, llamados "cápsulas", cada una de las cuáles contiene una partícula virosa. Estos cuerpos incluidos helipsoidales tienen un tamaño de aproximadamente de 200x500 milimicras. En las células grasas estas capsulas

pueden juntarse en vacuolas o "burbujas" de varias micras de diámetro. (DeBach, 1981).

Los tejidos infectados eventualmente se desintegran y el cuerpo fluido de la larva se llena con las inclusiones. En todas las granulosis que se han estudiado, cada cápsula contiene típicamente una partícula virosa de forma bacilar. Poseen membranas íntima y de desarrollo; pasan por diferentes estados de crecimiento. En tamaño varían de 40-80 milimicras de ancho por 200-300 de largo. Tanada, citado por DeBach, (1981) sugiere que el virus está formado por 2 componentes, una porción infectiva y una porción de invasión.

Ventajas y limitaciones de los baculovirus.

El éxito o fracaso de los baculovirus como agentes de control microbiano de plagas se basa en las ventajas y desventajas que éstos presentan. Dentro de las primeras destaca el hecho de que los miembros de la familia Baculoviridae sólo se han encontrado infectando a organismos del Phylum Arthropoda, mayoritariamente a los de la clase insecta (Groner, 1986). Ninguna otra familia de virus entomopatógeno presenta tales características, lo que permite desarrollarlos con un mejor número de restricciones de bioseguridad. Adicionalmente, al igual que muchos otros virus, la gran mayoría de las cepas de los baculovirus presentan un reducido espectro de huéspedes. Esta cualidad implica que las diversas cepas de baculovirus pueden utilizarse como bioinsecticidas contra muchas especies de insectos, sin afectar a las plantas y a los vertebrados incluyendo al hombre, a los insectos benéficos que son parasitoides y depredadores de las plagas o a otros insectos benéficos como las abejas. Sin embargo, desde el punto de vista práctico y comercial, la alta especificidad de la mayoría de las cepas de baculovirus también podría constituir una desventaja, ya que el mercado de cada cepa es muy estrecho, por lo que el atractivo de desarrollo industrial se reduce, principalmente, a aquellas especies de plagas de gran importancia económica (Yearian y Young, 1982).

Otra ventaja de los baculovirus se basa en la persistencia que éstos presentan en los ambientes naturales (principalmente en el suelo y la hojarasca), lo cual constituye la fuente de inóculo para generaciones subsiguientes de la plaga. Esta persistencia en el medio ambiente permite prolongar el efecto de una aplicación o el establecimiento del baculovirus como factor regulador de las poblaciones del insecto huésped. Este último fenómeno se presenta cuando el baculovirus provoca epizootias naturales y es un factor dependiente de la densidad poblacional de su huésped (Kalmakoff y Crawford, 1982). No obstante, a pesar de la persistencia de los inóculos en el ambiente, después de una aspersión de baculovirus en el campo quedan muy pocos residuos. Uno de los factores naturales más importantes que limitan los residuos de los baculovirus en los agroecosistemas son los rayos ultravioleta del sol, de ahí que sean cruciales la apropiada formulación de los baculovirus, cuando se utilizan como bioinsecticidas.

Adicionalmente, el desarrollo de resistencia de los insectos hacia los baculovirus es poco probable. A pesar de que existen muy pocos estudios relacionados con este fenómeno, se sabe que depende de la duración de la presión de selección, así de como de la variación genética del huésped (Kaomini y Roush, 1988).

Más que de desarrollo de resistencia, se ha descrito principalmente una variación intraespecífica de la susceptibilidad de los huéspedes a la infección con baculovirus, como en el caso del gusano de seda *Bombyx mori* infectado con nucleopolyhedrovirus (NPV), la mariposa blanca de la col *Pieris brassicae* infectada con granulovirus (GV) (Briese y Podgwaite, 1985), y la polilla café de la manzana *Epiphyas postvittana* infectada con un NPV (Briese *et al.*, 1980). Cabe hacer notar que, aunque se detectaron diferencias en susceptibilidad a estos baculovirus, estas también podrían deberse a la manipulación de las cepas en el laboratorio.

Además de las características mencionadas anteriormente, los baculovirus también causan epizootias (naturales o inducidas) en las poblaciones de los insectos, las cuales en ocasiones llegan a regular en forma natural a las mismas. Esta característica ha sido ampliamente aprovechada en algunos programas de control biológico de plagas, mediante la inducción de epizootias artificiales. Las epizootias causadas por los baculovirus se han utilizado eficazmente en el control de diversas plagas forestales como la palomilla gitana *Lymantria dispar*, en los bosques de Estados Unidos y Canadá, así como también en plantaciones de palma de coco que han sido protegidas del escarabajo de la palma *Oryctes rhinoceros*, mediante la aplicación de un virus previamente clasificado como un baculovirus (Hubeer, 1986).

Sin embargo, los baculovirus poseen algunas desventajas que limitan su uso como agentes de control biológico de plagas. Una de las principales limitaciones se presenta en los procesos de producción. Como todos los virus, los baculovirus se reproducen exclusivamente en el interior de su huésped o en células cultivadas *in vitro*. En la actualidad, todos los bioinsecticidas a base de baculovirus son producidos en las larvas de su huésped, las cuales deben de ser criadas en grandes cantidades. Esto propicia que los costos de producción aumenten significativamente, principalmente a causa de la mano de obra intensiva que se requiere (Shapiro, 1986). Sin embargo, esta limitación podría ser menos ponderosa en los países en vías de desarrollo, donde se ha llegado incluso a emplear la colecta de larvas enfermas en el campo, para su subsecuente aspersión. Además, el desarrollo de sistemas de producción *in vivo* que mejoran la relación costo-beneficio, implementados por compañías comerciales como Crop Genetics International y AgriVirion, ha repercutido en la disminución del costo de producción de los baculovirus (Wood, 1996).

A pesar de las desventajas ya mencionadas, sin duda alguna la limitación que más ha influido en el empleo de los baculovirus como bioinsecticidas la constituye su lento modo de acción. Un insecto infectado puede promediar hasta 7 días en morir, dentro de un intervalo que va de los 5 a 15 días, dependiendo del insecto y de la

cepa viral (Wood y Granados, 1991). Durante el proceso de infección, el insecto continua su alimentación y, por ende, el daño del cultivo. Esto restringe el desarrollo sólo a aquellos baculovirus que poseen un alto grado de virulencia y/o que ataquen a plagas de alta importancia económica. Sin embargo, el reciente avance en biología molecular de los baculovirus ha propiciado la obtención de cepas recombinantes con mayores niveles de virulencia, al introducir a su genoma, genes que expresan factores que aumentan su virulencia (Bonning y Hammock, 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS.

Localización de la zona de estudio.

El presente estudio se realizó bajo condiciones de laboratorio dentro de las instalaciones del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro” de Buenavista Saltillo, Coahuila; que se encuentra ubicada entre los paralelos 25º 22’ de latitud Norte y 25º 21’ de longitud Oeste y una altitud de 1754 msnm.

Material biológico.

Para poder llevar a cabo el bioensayo se tuvo que incrementar el virus lo cual se logró con dos salidas a campo para coleccionar el material infectado con población de larvas de palomilla de la papa al rancho “El Rodeo” ubicado en las afueras de la ciudad de Benito Juárez, NL. Este material fue trasladado a las cámaras bioclimáticas del Departamento de Parasitología, las condiciones de la temperatura de las cámaras bioclimáticas fueron de $25 \pm 2^{\circ}$ C y una humedad relativa entre 40 y 50 %.

La primera salida se hizo con el objetivo de incrementar el virus, que consistió en extraer larvas de los tubérculos traídos de campo para luego infectarlas con el virus y colocarlas dentro de recipientes de plástico transparente provistos con alimento (tubérculos sanos); al paso del segundo día se empezó a monitorear y a extraer larvas ya muertas por la acción del virus, que posteriormente se pusieron en refrigeración para su conservación y luego ser usadas para la preparación de la solución viral fue a base de 10 larvas/ litro de agua.

El material de colecta de la segunda salida a campo se utilizó para la evaluación de los cuatro métodos de propagación *in vivo*, colocando en cada unidad experimental (recipiente de plástico transparente) 10 larvas de segundo y tercer estadio.

Método de evaluación.

Para medir la eficiencia de los tratamientos se tomaron datos de mortalidad en tres fechas diferentes realizando muestreos cada 5 días después de la inoculación de las larvas y/o tubérculos. La evaluación visual consistió en revisar cada recipiente de los diferentes tratamientos con sus respectivas repeticiones en cada fecha de muestreo, contabilizando el número total de larvas muertas en cada unidad experimental. Los datos obtenidos expresados en porcentaje fueron transformados para su análisis a la función arco seno $\sqrt{\%/100}$. Posteriormente se procedió a su análisis de varianza y la prueba de comparación de medias por Tukey al 0.05 de significancia.

Tratamientos y diseño experimental.

Para la realización del experimento se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco tratamientos y cuatro repeticiones, conformándose un total de 20 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistió en colocar a 10 larvas de segundo y tercer estadio en un recipiente de plástico con previo suministro de alimento (tubérculos de papa), los cuales fueron cubiertos con tela de organza para evitar el escape de adultos sobrevivientes. Las técnicas de propagación *in vivo* del virus granulosis se muestran en el cuadro 2.

Los tratamientos establecidos fueron: inmersión de tubérculos en la solución viral con una exposición de 30 segundos; aplicación tópica que consiste en impregnar a las larvas con un cotonete; aspersión de larvas (atomizador), e inmersión de larvas al igual que en el primer tratamiento el tiempo de exposición fue de 30 segundos y se concluyó con un testigo sin aplicación.

Cuadro 2. Tratamientos a evaluar de métodos de propagación *in vivo* del virus de la granulosis.

TRATAMIENTOS	MÉTODOS DE PROPAGACIÓN <i>IN VIVO</i>
1	Inmersión de tubérculos
2	Tópica
3	Asperjado de larvas(atomizador)
4	Inmersión de larvas
5	Testigo absoluto

El cuadro 3 muestra el calendario de actividades realizadas en el presente trabajo, desde la colecta de larvas de palomilla, hasta la toma de datos de mortalidad en cada uno de los tratamientos evaluados.

Cuadro 3.- Calendario de actividades.

FECHA (2006)	ACTIVIDADES
23 febrero	1 ^a salida a campo (Rancho "el Rodeo" Cd. Benito Juárez, NL.).
27 feb-2 marzo	Extracción de larvas, incremento del virus.
21 marzo	2 ^a salida a campo (Rancho "el rodeo" Cd. Benito Juárez, NL.).
25-28 marzo	Aplicación de los tratamientos 1, 2, 3, 4 y testigo.
30 marzo	1 ^{era} evaluación de mortalidad de los tratamientos 1, 2, 3 y testigo.
2 abril	1 ^{era} evaluación de mortalidad del tratamiento 4 y testigo.
4 abril	2 ^a evaluación de mortalidad de los tratamientos 1, 2, 3 y testigo.
7 abril	2 ^a evaluación de mortalidad del tratamiento 4 y testigo.
9 abril	3 ^{era} evaluación de mortalidad de los tratamientos 1, 2, 3 y testigo.
12 abril	3 ^{era} evaluación de mortalidad del tratamiento 4 y testigo.
16 abril	Inicio de emergencia de adultos de los tratamientos y el testigo.

RESULTADOS

En el cuadro 4 se presentan los valores promedio del porcentaje de larvas muertas en las tres evaluaciones. La primera columna corresponde a la 1ª evaluación, donde se observó que los niveles de mortalidad fueron altos, excepto en el tratamiento 3 y el testigo absoluto. Debido a la información que arroja el análisis estadístico los tratamientos se presentan en cuatro grupos estadísticos diferentes.

Los tratamientos marcados con la letra “A” incluye inmersión de larvas y el tópico, presentan un mayor nivel de eficiencia expresado en porcentaje de larvas muertas que varían de 52 a 42 % respectivamente, le sigue en eficiencia el tratamiento de inmersión de tubérculos que se encuentra marcado con la letra “B” con 34 % de mortalidad. El siguiente tratamiento reportó un 16 % de mortalidad, el cual está marcado con la letra “C” y por último el testigo con 0 % de mortalidad marcado con la letra “D”.

En la 2ª evaluación, el análisis estadístico presenta tres grupos diferentes marcados con la letra “A”, “B” y “C”. Los tratamientos marcados con la letra “A” incluye inmersión de larvas con un 71 % de mortalidad, tópico con 62 % de mortalidad, inmersión de tubérculos con 56 % de mortalidad; le sigue en eficiencia el tratamiento de asperjado de larvas con 36 % de mortalidad marcado con la letra “B”. Por último el testigo marcado con la letra “C” con un 0 % de mortalidad.

En la última evaluación que corresponde a la tercera toma de datos el análisis evidenció tres grupos estadísticos, al igual que la anterior evaluación los tratamientos registraron la misma distribución con respecto al porcentaje de mortalidad. Los tratamientos marcados con letra “A” incluyen inmersión de larvas con 81 % de mortalidad, tópico con 72 % de mortalidad, inmersión de tubérculos con 71 % de mortalidad; el tratamiento de asperjado de larvas les sigue en eficiencia con 48 % de mortalidad marcado con la letra “B”. Por último el testigo marcado con la letra “C” con 0 % de mortalidad.

A lo largo de las tres evaluaciones, el tratamiento de inmersión de larvas en donde se exponía a la larva al contacto directo con la solución viral presentó los mejores niveles de mortalidad.

Cuadro 4. Porcentaje promedio de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) en las evaluaciones.

Tratamientos	Evaluaciones		
	5 dda*	10 dda*	15 dda*
Inmersión de tubérculos	34 B **	56 A **	71 A **
Tópica	42 AB	62 A	72 A
Asperjado de larvas (atomizador)	16 C	36 B	48 B
Inmersión de larvas	52 A	71 A	81 A
Testigo absoluto	0 D	0 C	0 C
C. V.	15.97	17.53	12.31

* dda: días después de la aplicación.

** Los valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo a Tukey al 0.05.

DISCUSIÓN

En la figura 1 se muestra el porcentaje de mortalidad de los diferentes métodos de inoculación del virus de la granulosis sobre larvas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) en sus diferentes evaluaciones de post-aplicación, donde el tratamiento más efectivo fue el de inmersión de larvas en la solución viral; ya que a los primeros 5 días después de la aplicación nos aportó un 52 % de mortalidad, a los 10 días a un 71 % y a los 15 días registró un 81 % de mortalidad.

El tratamiento que le sigue en efectividad es el tópico; a los 5 días después de la aplicación proporciona un 42 % de mortalidad, a los 10 días aumentó a 62 % de mortalidad y finalmente a los 15 días proporcionó un 72 % de eficiencia.

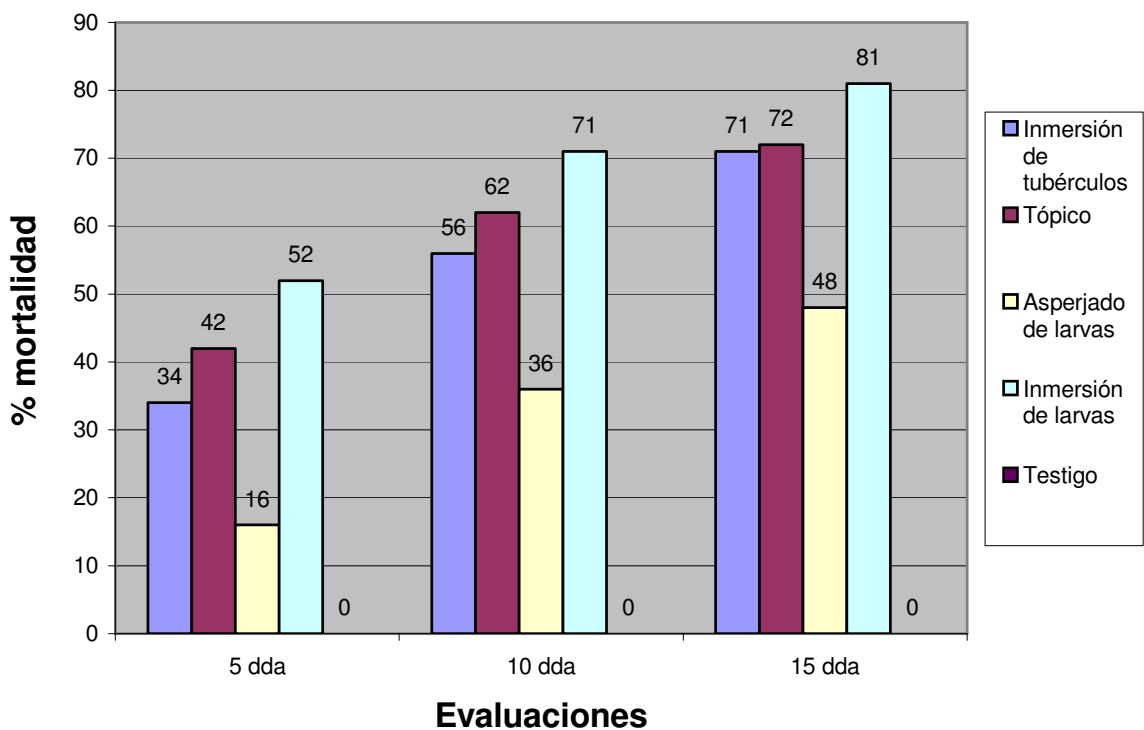


Figura 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) a los 5, 10 y 15 días después de la aplicación.

El tratamiento de inmersión de tubérculos a los 5 días proporcionó un porcentaje de eficiencia de mortalidad de un 34 %, a los 10 días un 56 % y por último registro un 71 % de eficiencia de mortalidad.

El método de asperjado de larvas fue el menos efectivo ya que a los 5 días proporcionó 16%, a los 10 días un 36 % y finalmente a los 15 días a un 48 % de eficiencia de mortalidad.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en las que se realizó el presente estudio se concluye lo siguiente:

1. El tratamiento de inmersión de larvas registró el mejor índice de mortalidad desde la primera evaluación (5 días después de la aplicación) con un 52% de mortalidad de larvas de palomilla de la papa.
2. No existe diferencia significativa en eficiencia de mortalidad entre los métodos inmersión de tubérculos, tópico y el de Inmersión de larvas ya que va de 71 a 81%.
3. El tratamiento de asperjado de larvas registró el índice más bajo de mortalidad.

LITERATURA CITADA

- Adams, J.R. 1991. Introduction and classification of viruses of invertebrates. In: J.R. Adams y J.R. Bonami (eds.). Atlas of invertebrate viruses. CRC Press. Boca Ratón, Florida. Pp 1-8.
- Bacon, O. G. 1960. Control of the potato tuberworm in potatoes. J. Econ. Entomol. 53:págs. 868- 871.
- Badii M.H., Flores E.A. y Galán W.L.J. 2000. Fundamentos y perspectivas de control biológico. 1^a edición. Editorial Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey NL, México. 447p.
- Batiste, W.C. and A. Berlowitz. 1973. Codling moth and pear psylla: evaluation of insecticides for control on pears in California. J. Econ. Entomol. 66(5): 1139-1142.
- Bonning, B. y Hammock, B. 1992. Development of Recombinant Baculoviruses for Insect Control. Annual Review of Entomology 4: 191-210.
- Cisneros, H. 1986. Control biológico de las plagas con especial referencia al cultivo de la papa, L. Valencia (ed.), Centro Internacional de la Papa-Instituto Colombiano Agropecuario, Colombia, pág. 55.
- Caballero, P; H.K. Aldebis; E. Vargas Osuna y C. Santiago Alvarez. 1992. Epizootic caused by a nuclear polyhedrosis virus in populations of *Spodoptera exigua* in southern Spain. Biocontrol Science and Technology, 2(1):35-38.
- Callan, E. M. 1967. Weeds as alternate host for potato moth. In relation to biological control, Aust. Potato. Agron. Conf. Healesville, 8 p.
- Champ, B. R. 1986. insects and mites associated with stored products in Queensland: 2. Lepidoptera. Qld. J. Agric. & Anim., S ci. 23, págs.1965-75.
- Crook, N. E., R. A. Spencer, C. C. Payne, y D. J. Leisy. 1985. Variation in *Cydia pomonella* granulosis virus isolates and physical maps of the DNA from three variants. J. Gen. Virol. 66:2423-2430.
- Crook, N. E. 1991. Baculoviridae: subgroup B: comparative aspects of granulosis viruses, p. 73-110. En: E. Kurstak (ed.), Viruses of invertebrates. Marcel Dekker Inc., New York
- Cruz, T. R., Evaluación de insecticidas por grupos toxicológicos en el control de la palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller), tesis de licenciatura,

- Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 1990, pág. 47.
- Davidson, R. H. 1992. Plagas de insectos agrícolas y de jardín. Ed. Limusa. México. pág. 350.
- Davison, R.H. and W.F. Lyon. 1979. Insect pest of farm, garden and orchard. John Wiley and Sons. New York. Pp.393-396.
- Del Ángel, D. A. M. A. 1985. Monitoreo de adultos y larvas con feromonas de *Phthorimaea operculella* (Zeller). Lepidoptera – Gelechiidae, para el pronóstico de aplicación de insecticidas en la región de Navidad, N. L.
- Delorit, R. J. y H. L. Ahlgren. 1983, Producción agrícola, 7ª reimp., Editorial Continental, México, pág.275 – 325.
- Domínguez, R. R. Ayala, J. L. Rodríguez, H. C. y Domínguez, R. B. 1998. Plagas agrícolas. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 356 pp.
- DeBach. 1981. Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. 9^a impresión. Editorial Continental. México. 929 p.
- Escribano, A., T. Williams, D. Goulson, R. D. Cave, J. W. Chapman, y P. Caballero. 1999. Selection of a nucleopolyhedrovirus for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): structural, genetic, and biological comparison of fuor isolates from the Americas. J. Ecom. Entomol. 92:1072-1085.
- Evans, H. F. y P. Entwistle. 1987. Viral diseases. In: J.R. Fuxa y Tanada (eds.). Epizootiology of Insect Diseases. Wiley and Sons, N.Y. Pp 257-322.
- Falcon, L., 1980. Alternative methods for controlling Codling moth: The use of Granulosis virus. Presentation at Organic farm field day and transition conference. Committee for sustainable Agriculture. Linden, CA.
- Faulkener, P. 1981. Baculovirus. In: E.W. Davidson (ed.). Patogénesis of invertebrate microbial diseases. Allanheld, Osmun Company publishers. Totowa, New Jersey. Pp 3-37.
- Federici, B. A. 1997. Baculovirus pathogenesis, p. 33-59. En: L. K. Miller (ed.), The baculoviruses. Plenum Press, New York.
- Foot, M. A. 1976. Laboratory asseament of several insecticidas against the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller). (Lepidoptera – Gelenchiidae), en New Zeland J. of Agricultural Research, 19 (1), págs. 117 – 125.

- Gálvez, S. S. 1989. Evaluación de insecticidas en varios estados biológicos de *Phthorimaea operculella* (Zeller) en condiciones de campo y de invernadero, tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 1989, pág. 52.
- García, G. C. y Medrano, R. H. 2001. Estrategias para el control de plagas de hortalizas. Consejo de Ciencia y Tecnología de Durango. Durango, México. 198 pp.
- Granados, R. y Federici, B. 1986. The Biology of baculoviruses: Biological Properties and Molecular Biology. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida. 275 p.
- Granados, R.R. 1980. Infectivity and mode of action of baculoviruses. Biotech. and Bioengineering. 22:1377-1405.
- Granados, R. y Williams, K.A. 1986. *In vivo* Infection and Replication of Baculoviruses. In: The Biology of Baculoviruses: Biological Properties and Molecular Biology. Vol. 1. R. Granados y B. Federici (eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida. 275 p.
- Grôner, A. 1986. Specificity and safety of Baculoviruses. P.177-202. En: R. R. Granados y B. A. Federici (ed.), The biology of Baculoviruses: biological properties and molecular biology, Vol. 1. Academic Press, San Diego.
- Hathaway, D. O., L.V. Lydin, B.A. Butt and L. J. Morton 1973. Monitoring mass rearing of the codling moth. J. Econ. Entomol. 64(5):1088-1090.
- Hostetter, D.L. y M.R. Bell. 1985. Natural dispersal of baculovirus in the environment. In: K. Maramorosch y K.E. Sherman. (eds.). Viral insecticides for biological control. Academic Press. Orlando, Florida. Pp. 249-284.
- Jaques, RP. 1990. Effectiveness of the granulosis virus of the codling moth in orchard trials in Canada. Agriculture Canada, Research Branch, Research Station Harrow, Ontario NOR 1 GO, Canada. Vth Congress International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. 428-430.
- Lagunes, T. A. 1987. Combate químico de plagas, Colegio de Post – Graduados, UACH, Texcoco, México, págs. 77- 85.
- Langford, G. S. and Cory, E. N. 1932. Observations on the potato tuber moth. J. Econ. Entomol. 25: págs. 625 – 634.
- Llanderal, C. C., Nieto, H. R. y Rocha, R. R. 1984. La palmilla del tubérculo de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) 2ª Mesa Redonda sobre Plagas del Suelo. Chapingo, México. p 53 – 54.

- Maramorosch and K.E. Sherman. 1985. Viral insecticides for biological control. Edition published by Academic Press. USA. 799 p.
- Mazzone, H.M. 1985. Pathology associated with baculovirus infection. In: K: Maramorosh y K.E.Sherman (eds.). Viral Insecticides for Biological Control. Academic Press. Orlando, Florida. Pp. 81-120.
- Metcalf, C.L., y W. P. Flint 1982. Insectos destructivos e insectos útiles sus costumbres y su control, 4^a Edición, 15^a. Impresión, Ed. CECSA., México. 1208 p.
- Metcalf F.R. and Luckman H.W., 1992. Introducción al manejo de plagas. Ed. Limusa. México, D.F.
- Nabi, M. N. 1983. "Field cage trials with thiotepa sterilized males of the potato moth *Phthorimaea operculella* (Zeller). (Lepidoptera – Gelechiidae)", Bulletin Entomology Research, 73, págs. 405 – 409.
- Nieto, H. R. 1989. Parasitismo larvario sobre *Phthorimaea operculella* (Zeller). (Lepidoptera – Gelechiidae), en el Municipio de León Gto., XXIV Congreso Nacional de Entomología (resúmenes), pág 198.
- Padilla, A. R. y Ortega, C. A. 1963. Algunas observaciones sobre biología y combate de la palomilla de la papa *Gnorimostchema operculella* en el bajío. Agricultura Técnica de México. 2 (3): págs. 126 – 132.
- Poinar, G.O. Jr. y G. M. Thomas. 1984. Laboratory guide to insect pathogens and parasites. Plenum Press. NewYork.
- Rocha, R. R., Byerly M. K., Bujanos M. R. y Villareal G. M. 1990. Manejo integrado de la palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae) en el Bajío, México. SARCH – INIFAP – CIFAP. Celaya, Guanajuato, México. pág. 52.
- Ross, H. H. 1973. Introducción a la entomología general y aplicada 3a ed. Ed. Omega. España. págs. 376 – 378.
- Sánchez, V. V. M. 1989. Ciclo de vida de la palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) expresado en tiempo fisiológico. Informe de Investigación 1988. Campo Agrícola Experimental Sierra de Arteaga.
- Santiago-Álvarez, C. y Vargas-Osuna, E. 1988. Reduction of reproductive capacity of *Spodoptera littoralis* males by a nuclear polyhedrosis virus (NPV). Journal of Invertebrate Pathology 52: 142-146.

- Santoro, R. 1960. Entomología agrícola Dominicana. Ed. La Nación. República Dominicana. págs. 315 – 319.
- Shapiro, M. 1986. *In vivo* Production of Baculoviruses. In: The Biology of Baculoviruses: Practical Application for Insect Control. R. Granados y B. Federici (eds.). Vol. 2. CRC Press, Boca Raton, Florida. 275 p.
- Shapiro, D. I., J. R. Fuxa, H. D. Braymer, y D. P. Pashley. 1991. DNA restriction polymorphism in wild type isolates of *Spodoptera frugiperda* nuclear polyhedrosis virus. J. Invertebr. Pathol. 58: 96-105.
- Shelton, A .M. y J. A. Wyman.1979. "Seasonal paterns of potato tuberworm moth abundante as determined by traping", en Environ. Entomol., **8(3)**, págs. 541–543.
- Sherman, K. 1985. Considerations in the Large-Scale and Commercial Productions of Viral Insecticides. In: Viral Insecticides for Biological Control. K. Maramorosch y K.E. Sherman (eds.). Academic Press, Orlando, Florida.
- Tinsley, T.W. y D.C. Kelly. 1985. Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. In:K. Maramorosh y K.E. Sherman (eds.). Viral insecticides for biological control. Academic Press. Orlando, Florida. p. 3-25.
- Thomas, D.E., C.F. Reichelderfer y A.M. Heimpel. 1972. Accumulation and persistence of a nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper in the field. J. Invert. Pathol. 20:157-164.
- Triplehorn, C. H. and Johnson N. F. 2005. Borror and DeLong's introduction to the study of insects. Seventh edition. Thomson books/cole. Pág. 571-647.
- Valencia, L 1986. Las palomillas de la papa (Lepidoptera: Gelechiidae) identificación y control. Memorias del curso sobre Control Integrado de Plagas. Centro Internacional de la Papa – Instituto Colombiano Agropecuario. Bogotá, Colombia. pág. 25.
- Vaughn, J.L. 1992. Virus and rickettsia diseases. Pp. 49-85. En: G.E. Cantwell (ed.). Insect diseases. Ann. Arbo. Michigan. Vol. 1.
- Zenner, P. I., 1986.Control integrado de plagas de papa, L. Valencia, Centro Internacional de la papa, Instituto Colombiano Agropecuario, Bogotá, Colombia, págs. 48 – 54.

APÉNDICE

Cuadro 5. Registro de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) tomados a los 5 días después de la aplicación del 1^{er}, 2^o y 3^{er} método de propagación *in vivo*.

Tratamientos	Repeticiones				Σ	
	I	II	III	IV		
1	5	3	4	3	15	3.75
2	5	3	5	5	18	4.5
3	2	2	2	2	8	2
Testigo	0	0	1	1	2	0.5

Cuadro 6. Registro de larvas de muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) tomado a los 5 días después de la aplicación del cuarto método.

Tratamiento	Repeticiones				Σ	
	I	II	III	IV		
4	5	6	5	6	22	5.5
Testigo	1	1	0	0	2	0.5

Cuadro 7. Porcentaje de mortalidad de *Phthorimaea operculella* (Zeller) corregida por Abbott a los 5 días después de la aplicación de los 4 métodos y el testigo.

Tratamientos	Repeticiones				
	I	II	III	IV	
1	50	30	33.3	22.2	34
2	50	30	44.4	44.4	42
3	20	20	11.1	11.1	16
4	44.4	55.6	50	60	52
Testigo	0	0	0	0	0

Cuadro 8. Porcentaje de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) a los 5 días después de la aplicación transformada con la función arco seno $\sqrt{\%/100}$.

Tratamientos	Repeticiones			
	I	II	III	IV
Inmersión de tubérculos	45	33.2	35.3	28.1
Tópico	45	33.2	41.8	41.8
Asperjado de larvas	26.6	26.6	19.5	19.5
Inmersión de larvas	41.8	48.2	45	50.8
Testigo	0	0	0	0

Cuadro 9. Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas a los 5 días después de la aplicación transformadas.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	4	5411.777344	1352.944336	62.7665	0.000
ERROR	15	323.328125	21.555208		
TOTAL	19	5735.105469			

C.V. = 15.97 %

Cuadro 10. Comparación de medias por Tukey al 0.05 de significancia a los 5 días después de la aplicación.

TRATAMIENTO	MEDIA
4	46.4500 A
2	40.4500 AB
1	35.4000 B
3	23.0500 C
5	0.0000 D

Cuadro 11. Registro de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) tomada a los 10 días después de la aplicación del 1^{er}, 2^o y 3^{er} método de propagación *in vivo*.

Tratamientos	Repeticiones				Σ	
	I	II	III	IV		
1	1	1	3	4	9	2.25
2	2	3	2	1	8	2
3	2	3	3	0	8	2
Testigo	0	0	0	0	0	0

Cuadro 12. Registro de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) tomadas a los 10 días después de la aplicación del cuarto método de propagación *in vivo*.

Tratamiento	Repeticiones				Σ	
	I	II	III	IV		
4	3	3	2	1	9	2.25
Testigo	1	0	1	0	2	0.5

Cuadro 13. Porcentaje de mortalidad de *Phthorimaea operculella* (Zeller) corregida por Abbott a los 10 días después de la aplicación de los 4 métodos y el testigo.

Tratamientos	Repeticiones				
	I	II	III	IV	
1	10	10	30	40	23
2	20	30	20	10	20
3	20	30	30	0	20
4	22.2	30	11.1	10	18
Testigo	0	0	0	0	0

Cuadro 14. Porcentaje de mortalidad de *Phthorimaea operculella* (Zeller) acumulada a los 10 días después de la aplicación.

Tratamientos	Repeticiones				
	I	II	III	IV	
1	60	40	63.3	62.2	58
2	70	60	64.4	54.4	62
3	40	50	41.1	11.1	36
4	66.7	85.6	61.1	70	71
Testigo	0	0	0	0	0

Cuadro 15. Porcentaje de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) a los 10 días después de la aplicación transformadas con la función arco seno $\sqrt{\%/100}$.

Tratamientos	Repeticiones			
	I	II	III	IV
Inmersión de tubérculos	50.8	39.2	52.7	52.1
Tópico	56.8	50.8	53.4	47.5
Asperjado de larvas	39.2	45	39.9	19.5
Inmersión de larvas	54.7	67.7	51.4	56.8
Testigo	0	0	0	0

Cuadro 16. Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas a los 10 días después de la aplicación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	4	8578.832031	2144.708008	46.1558	0.000
ERROR	15	697.000000	46.466667		
TOTAL	19	9275.832031			

C.V. = 17.53 %

Cuadro 17. Comparación de medias por Tukey al 0.05 de significancia a los 10 días después de la aplicación.

TRATAMIENTO	MEDIA
4	57.6500 A
2	52.1250 A
1	48.7000 A
3	35.9000 B
5	0.0000 C

Cuadro 18. Registro de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) tomada a los 15 días después de la aplicación del 1^{er}, 2^o y 3^{er} método de propagación *in vivo*.

Tratamientos	Repeticiones				Σ	
	I	II	III	IV		
1	1	2	2	1	6	1.5
2	1	0	1	2	4	1
3	1	0	1	3	5	1.25
Testigo	0	0	0	0	0	0

Cuadro 19. Registro de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) tomado a los 15 días después de la aplicación del cuarto método de propagación *in vivo*.

Tratamiento	Repeticiones				Σ	
	I	II	III	IV		
4	1	1	1	1	4	1
Testigo	0	0	0	0	0	0

Cuadro 20. Porcentaje de mortalidad de *Phthorimaea operculella* (Zeller) acumulada a los 15 días después de la aplicación.

Tratamientos	Repeticiones				
	I	II	III	IV	
1	70	60	83.3	72.2	71
2	80	60	74.4	74.4	72
3	50	50	51.1	41.1	48
4	76.7	95.6	71.1	80	81
Testigo	0	0	0	0	0

Cuadro 21. Porcentaje de larvas muertas de *Phthorimaea operculella* (Zeller) a los 15 días después de la aplicación transformados con la función arco seno $\sqrt{\%/100}$.

Tratamientos	Repeticiones			
	I	II	III	IV
Inmersión de tubérculos	56.8	50.8	65.9	58.2
Tópico	63.4	50.8	59.6	59.6
Asperjado de larvas	45	45	45.6	39.9
Inmersión de larvas	61.1	77.8	57.5	63.4
Testigo	0	0	0	0

Cuadro 22. Análisis de varianza del porcentaje de larvas muertas a los 15 días después de la aplicación.

FV	GL	SC	CM	F	P>F
TRATAMIENTOS	4	11078.175781	2769.543945	90.2124	0.000
ERROR	15	460.503906	30.700260		
TOTAL	19	11538.679688			

C.V. = 12.31 %

Cuadro 23. Comparación de medias por Tukey al 0.05 de significancia a los 15 días después de la aplicación.

TRATAMIENTO	MEDIA
4	64.9500 A
2	58.3500 A
1	57.9250 A
3	43.8750 B
5	0.0000 C