

Los virus entomopatógenos para el control de las polillas de la papa: Nuevas perspectivas en el manejo de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)

Zeddami, Jean-Louis^{1,2}; Carrera, María-Victoria^{2,3}; Barragán, Álvaro²; Pollet, André¹; López-Ferber, Miguel³; Léry, Xavier¹.

¹Institut de Recherche pour le Développement -IRD-, 213, rue La Fayette, Francia

²-Pontificia Universidad Católica del Ecuador- PUCE Av. 12 de Octubre, Apartado 17-01-2184, Quito, Ecuador

³Instituto Nacional de Investigación Agronómica, -INRA- Laboratoire de Pathologie comparée, 30380 Saint-Christol-les-Alès, Francia

Resumen

Los virus entomopatógenos son candidatos particularmente interesantes para ser usados dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP). Al emplear estos virus no se generan problemas relacionados con el uso excesivo de insecticidas químicos. A pesar de que las potencialidades de los virus no han sido plenamente exploradas, existen algunos ejemplos de su exitoso uso en la agricultura, especialmente en los países en desarrollo. Un ejemplo importante es el granulovirus empleado por los campesinos para el control de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. La especie *Tecia solanivora*, emparentada a *P. operculella*, es objeto de diferentes investigaciones que permiten desarrollar una estrategia de control eficaz y sostenible. Importantes esfuerzos son dedicados a la recolección, caracterización y evaluación de virus que afectan a *T. solanivora*. En particular, durante un año, se realizó la búsqueda sistemática de los virus presentes en las poblaciones de esta plaga en Ecuador. Aunque no se observaron fenómenos epizooticos, fue posible encontrar varios aislados del granulovirus de *P. operculella* (PhopGV), un nuevo granulovirus (nombrado SytaGV) y grupos de virus nunca antes registrados en *T. solanivora*. Entre estos últimos, dos virus presentaron características muy diferentes de las que existen en las familias de virus entomopatógenos conocidas, lo que permite concluir que se trata de miembros de nuevos grupos taxonómicos aún no descritos. Estos resultados abren nuevas perspectivas en cuanto a la posibilidad de mejorar el control biológico de la plaga.

Palabras clave: Polilla guatemalteca de la papa. Granulovirus. *Phthorimaea operculella*. Plagas de la papa

Abstract

Entomopathogenic viruses are very promising candidates for use in Integrated Pest Management (IPM) because they allow us to overcome several problems associated with the excessive use of chemical pesticides. Although successful uses of these pathogens in agriculture have already been reported, especially in developing countries, their potential in this realm has not yet been fully explored. Among the viruses currently applied at the farmers level is a granulovirus used for the control of the potato tuber moth (PTM) *Phthorimaea operculella*. *Tecia solanivora*, a species closely related to PTM, is currently the object of various investigations whose final aim is the development of an efficient and sustainable

control strategy against this pest. Important efforts are being devoted to finding, characterizing, and evaluating viruses affecting *T. solanivora*. Thus, a one-year systematic screening of pest populations was carried out in Ecuador. Although no epizootics were observed, it was nevertheless possible to find several isolates of *P. operculella* granulovirus as well as a new granulovirus (named SytaGV) and other viruses belonging to groups not previously reported from *T. solanivora*. Two of these other viruses were found to exhibit characteristics very different from those of known insect virus families and thus are obviously members of as yet undescribed taxonomic groups. These results open promising perspectives for the development of more efficient biological control of the pest.

Key words: Guatemalan potato moth. Granulovirus. *Phthorimaea operculella*. Potato pests

Introducción

Los virus son patógenos intracelulares obligados. Se encuentran en todo tipo de organismos vivientes ya sean procariotes o eucariotes. Actualmente, se conocen unos cuantos millares de virus diferentes; sin embargo, eso sólo representa una fracción mínima de la bio-diversidad viral que existe; de hecho, se estima que cada especie bacteriana, vegetal o animal alberga varios tipos de virus. Epidemias virales fueron reportadas en diferentes grupos de organismos ilustrando el impacto drástico que estos patógenos pueden tener sobre sus hospederos. Otros virus presentan una patogenicidad más leve y matan o debilitan a los hospederos en forma menos espectacular. Los virus también influyen en la dinámica poblacional de sus hospederos; se requieren varios trabajos complementarios para poder tener una visión más precisa de la importancia y de las modalidades de las complejas interacciones virus - hospedero. Mientras tanto, las investigaciones sobre el control microbiano siguen brindando más y más datos sobre como implementar el uso de estos organismos. De hecho, actualmente se usan virus para controlar plagas, en particular a insectos. Un caso bien documentado y cuyo éxito ilustra claramente las potencialidades de esta estrategia es el del granulovirus (GV) usado para controlar a la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae). Los resultados logrados traen mucha esperanza para que una estrategia similar permita el control de otras especies del mismo grupo y en especial de *Tecia solanivora* (Povolny). Con la perspectiva de encontrar nuevos virus entomopatógenos se muestrearon las poblaciones de polillas de la papa presentes en el Ecuador.

Materiales y Métodos

1. Recolecta de material biológico

Se llevó a cabo un muestreo cubriendo diferentes zonas del Ecuador en las cuales se recolectaron todas las larvas de *T. solanivora* encontradas muertas o con síntomas de enfermedad. También se recogieron pupas no emergidas. Los sitios de recolecta fueron tanto en almacenes o campos como dentro crianzas establecidas para el estudio. Las muestras se almacenaron a -20 °C en forma individual en microtubos con sus datos respectivos para su posterior análisis.

2. Observaciones por microscopía óptica y electrónica

Cada muestra fue homogenizada individualmente en 200 microlitros de tampón TE (10 mM Tris-1 mM EDTA) a pH 7,5. Una pequeña gota fue depositada en un portaobjeto para su observación por microscopía óptica (x 400) lo que permitió diagnosticar la presencia o ausencia de cuerpos de inclusión (CI) virales. En caso que no hubiera CI, 5 microlitros de la muestra se depositaron sobre un grid que fue coloreado con ácido fosfotúngstico según el protocolo descrito por Brenner y Horne (1959). El análisis se realizó a x20 000 de ampliación mediante el uso de un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 10 CR.

3. Multiplicación de virus entomopatógenos presentes en las muestras

Los virus entomopatógenos presentes en los homogenizados de larvas fueron multiplicados empleando dos metodologías:

La primera fue usada para los virus no incluidos. En este caso, el homogenizado fue centrifugado a 15 000 revoluciones por minuto (rpm)/15 min, se agregó 10% (w/v) de sulfato de estreptomycin (100 mg/ml) y se inyectó a las larvas sanas (2 microlitros/individuo).

La segunda metodología fue aplicada para los virus ocluidos; el homogenizado fue directamente aplicado con un pincel sobre la superficie de los tubérculos. Luego, las larvas neonatas fueron depositadas sobre la superficie contaminada.

En ambos casos, se recogieron las larvas que se encontraron muertas al final del experimento. Estas fueron procesadas con el propósito de purificar los virus multiplicados.

4. Purificación de virus

El homogenizado de larvas fue depositado sobre un gradiente de glicerol 30-70% y los virus incluidos fueron purificados por centrifugación a 11 000 rpm/20 min (Taha *et al.*, 2000).

Para los virus no ocluidos se utilizó un gradiente de sacarosa 15-45% y luego se realizó la centrifugación a 20.000 rpm/3 horas (Zeddám *et al.*, 1999).

En ambos casos las bandas virales se recuperaron con la ayuda de una pipeta Pasteur y luego fueron dializadas extensivamente contra TE antes de ser almacenadas a -20°C.

5. Análisis de proteínas y de ácidos nucleicos virales

El número y tamaño de las proteínas virales fueron determinados por gel de electroforesis de poliacrilamida (Laemmli, 1970). Los ácidos nucleicos de los virus no ocluidos fueron extraídos de las partículas virales con una mezcla fenol/chloroformo/alcohol isoamílico (12/12/1), precipitados con etanol (70% volumen final) en presencia de 0,3 M de acetato de sodio y resuspendidos en TE antes de ser sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Maniatis *et al.*, 1982). La DNAsa I y la RNAsa A fueron usadas para determinar la naturaleza

del ácido nucleico (ADN o ARN). La extracción de los ADN de los granulovirus y su corte por las enzimas de restricción fueron llevados a cabo según el protocolo descrito por Taha *et al.* (2000)

6. Bio-ensayos

Los conteos de los CI se realizaron a una amplificación de 600x empleando un hematocitómetro (tipo Neubauer) y un microscopio de luz Olympus (modelo BH-2) equipado con un campo oscuro seco. Los CI fueron aplicados en forma homogénea sobre los tubérculos mediante un compresor y un generador de aerosol de tipo médico. El aerosol conteniendo los CI fue propulsado en un tubo de plástico de 125 mm en forma de L. La descripción del sistema (Figura 1) así como el protocolo de realización de los bio-ensayos son detallados en otras publicaciones (Carrera *et al.*, 2002; Carrera *et al.*, 2003; Carrera *et al.* en preparación).

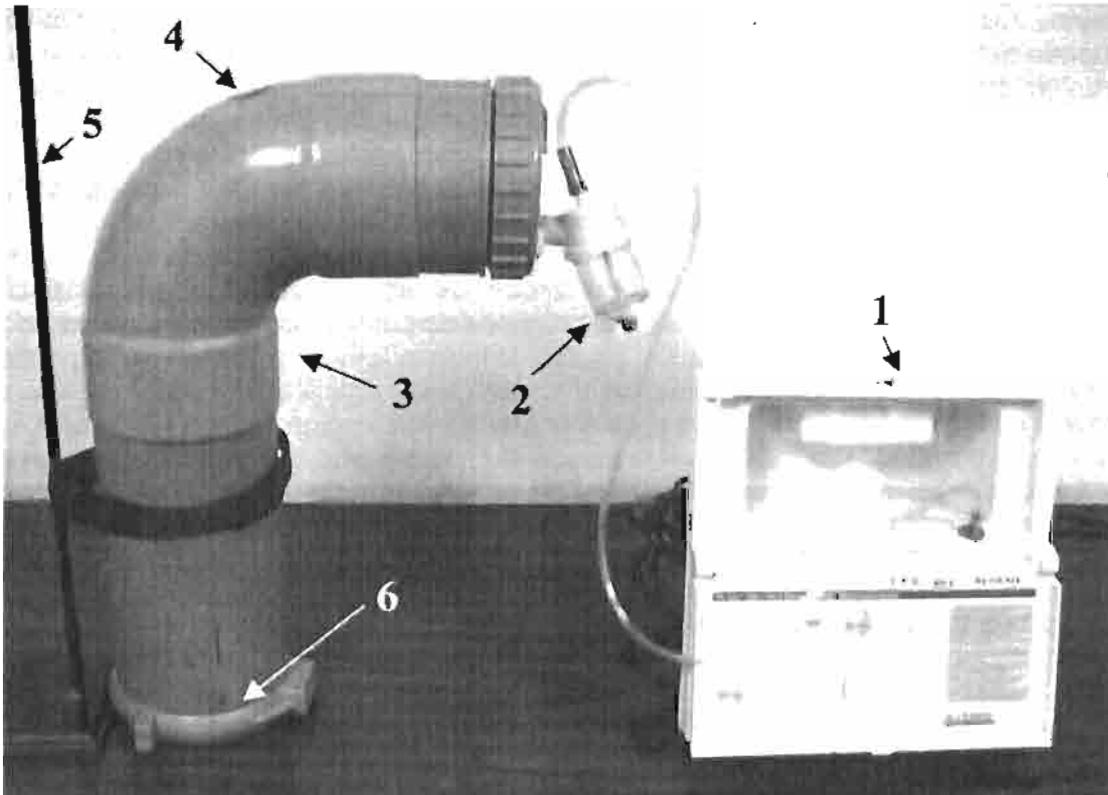


Figura 1. Sistema utilizado para aplicar los virus durante los bio-ensayos: Compresor de aire (1), generador de aerosol (2), tubería de plástico de 125 mm de diámetro (3), agujero de 26 mm de diámetro (4), soporte universal (5), zona de contaminación de los tubérculos (parte interior del tubo; 6)

Resultados y Discusión

Varias larvas y pupas de *T. solanivora* recolectadas enfermas o muertas en el Ecuador durante el estudio epidemiológico revelaron estar infectadas por algún tipo de enfermedad viral. Las caracterizaciones llevadas a cabo a nivel de laboratorio mostraron que los virus encontrados pertenecían esencialmente a 6 grupos taxonómicos distintos (Regenmortel *et al.*, 2000):

1- Las observaciones de microscopía óptica permitieron establecer que 26 de las muestras (11 larvas y 15 pupas) recolectadas enfermas o muertas estaban infectadas con un virus perteneciente al género *Granulovirus* (Familia *Baculoviridae*). Este grupo fue muy evidente, el más representativo en nuestro muestreo. Los granulovirus (GV) se caracterizan por la presencia de un CI ovoide de 0,15 x 0,5 micrómetros (μm) conteniendo un solo virión (partícula infecciosa). El ácido nucleico viral es un ADN de doble cadena circular de aprox. 80-120 kilopares de bases (kpb) (este último valor es el del granulovirus de *Phthorimaea operculella* o PhopGV del cual la totalidad del genoma fue secuenciado).

Análisis con enzimas de restricción permitieron establecer que varias de las muestras contenían el granulovirus PhopGV exitosamente usado para el control de *P. operculella* (Alcazar *et al.* 1982; Ben Salah y Aalbu, 1992; Kroshel, 1995). De acuerdo con estos primeros resultados, es probable que la mayoría de las otras muestras estén también infectadas con el mismo virus. Eso deberá comprobarse con estudios más precisos y con datos sobre el tamaño de la granulina (proteína mayor de los CI). Efectivamente, la granulina de todas las muestras de GV parecía tener un peso molecular (PM) similar, alrededor de 33 kilodaltons (kDa).

Al contrario, un GV inicialmente aislado de una larva de *S. tangolias*, y por eso nombrado SytaGV, fue encontrado en *T. solanivora*, mezclado con el PhopGV. El PM de la granulina del SytaGV es de aproximadamente 26 kDa, lo que individualiza este virus como una nueva especie de GV distinta del PhopGV. De manera muy sorprendente, parece que este patógeno sería igualmente capaz de multiplicarse, aunque a bajo nivel, en larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Todavía queda por investigar si la multiplicación del SytaGV sobre un hospedero alternativo mucho más grande podría permitir bajar significativamente los costos de producción del patógeno. Adicionalmente, están previstos trabajos para determinar si el SytaGV es más patógeno para *T. solanivora* que el PhopGV.

La Dosis Letal 50 (DL50) del PhopGV hacia su hospedero *P. operculella* fue determinada usando un sistema de generación de aerosol que permitió contaminar de manera homogénea y estandarizada la superficie de los tubérculos con una suspensión de CI. Se determinó que para las larvas neonatas de esta especie, la DL50 de una cepa del PhopGV procedente de Tunisia era 9 CI/mm² (Carrera *et al.*; 2002). La comparación de la actividad biológica de 3 cepas del mismo virus mostraron variaciones muy importantes, en una escala de 10 entre la más y la menos virulentas (Carrera *et al.*, 2003). El hecho de que existen diferencias en las propiedades biológicas exhibidas por varias cepas de PhopGV constituye un factor muy importante si se considera el uso de éste virus como agente de control biológico.

2 - Una larva recolectada en Chimborazo contenía un virus del género *Alphanodavirus* (Familia *Nodaviridae*), grupo que se caracteriza por tener una partícula viral de 30 nanómetros (nm) de diámetro constituida de 2 proteínas, la más pesada de un PM de aprox. 40 kDa. Cada

partícula contiene 2 moléculas de ARN de cadena simple con polaridad positiva y un tamaño aprox. 3 y 1.4 kilobases (kb) respectivamente.

3 - Una larva, procedente de Chimborazo, mostró la presencia de un patrón protéico relacionado con la presencia de un virus no ocluido del género "Cricket Paralysis-like Viruses" (Familia *Picornaviridae*). Los virus de este grupo presentan una cápside icosaédrica de 30 nm de diámetro conformada por 3 o 4 proteínas de aprox. 30 kDa y con un solo ARN de cadena simple de 9 a 10 kb.

4- Dos larvas muertas, una procedente del Cañar y la otra de Monteverde, se encontraron llenas de CI poliédricos cuando se observaron en microscopía óptica. El tamaño y la forma de los CI fueron diferentes en cada caso por lo que se presume que se trata de virus diferentes pero ambos del género *Nucleopoliedrovirus* (Familia *Baculoviridae*). Estos patógenos, respectivamente nombrados TesoNPV1 y TesoNPV2, no han sido objeto de investigaciones más detalladas hasta el momento.

5- Un virus, nombrado Tuta, fue purificado de larvas muertas de *T. solanivora*. Por microscopía electrónica, las partículas virales isométricas no son ocluidas y tienen un diámetro de 40 nm. Parecen asociadas a numerosas vesículas vacías (Figura 2).

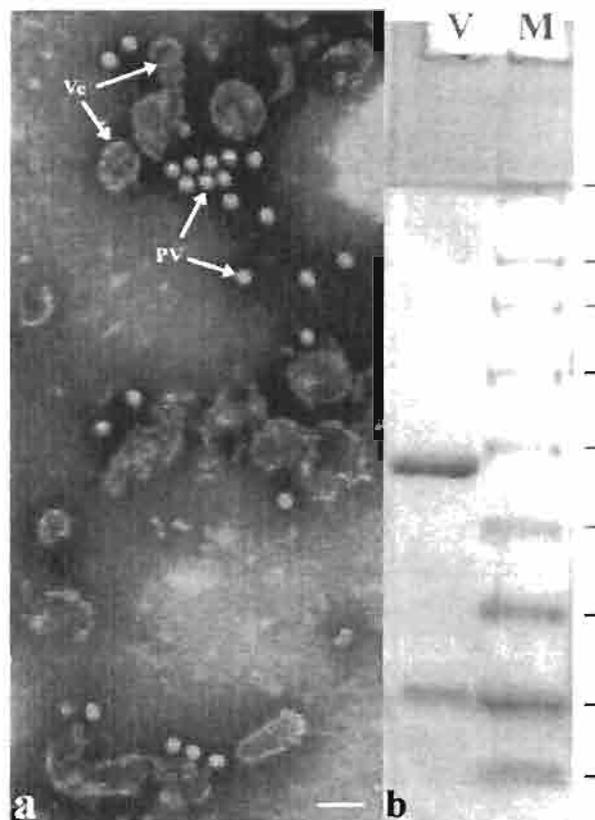


Figura 2. Virus Tuta a) PV= partículas virales observadas por microscopía electrónica de transmisión (barra = 100 nm); Ve= vesículas; b) proteínas del virus (V) después de

electroforesis en gel de poliacrilamida (M: marcador de peso molecular con bandas proteicas de 188, 62, 49, 38, 28, 18, 14, 6 y 3 kDa, respectivamente)

Los PM de las proteínas (= proteínas de cápside) son de aprox. 25 y 6.5 kDa, respectivamente. Datos preliminares apuntan a un genoma constituido de ARN de cadena simple. Ningún grupo conocido de virus de insecto exhibe tales características lo que justifica llevar a cabo estudios complementarios para determinar las otras propiedades de este patógeno.

6 - La gran mayoría (93%) de las pupas no emergidas en la crianza mantenida en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Quito) y 2 larvas recolectadas muertas en el campo (Chimborazo y el Carchi) se encontraron infectadas con un virus (nombrado Chiripa) cuyas características no coinciden con las reportadas en la literatura. Se trata sin duda de un miembro de una nueva familia de virus. Durante la purificación del virus Chiripa (Chi-V) mediante centrifugación sobre gradiente de sacarosa, aparecieron 2 bandas anchas. La banda de densidad más liviana se quedaba al nivel de 30% de concentración en sucrosa y la más densa, se localizaba en la parte inferior de la zona del gradiente correspondiente a 45% de sucrosa. Los análisis de microscopía electrónica, de contenido de ácido nucleico y de proteínas no lograron mostrar diferencias entre estas 2 bandas por lo que se desconoce la causa de la diferencia de densidad entre ellas.

En microscopía electrónica, las partículas del Chi-V aparecen icosaédricas con un diámetro de 32 nm (Figura 3). No son envueltas ni tampoco incluidas. Ciertas partículas exhiben un "core" (centro) blanco. Las microfotografías revelaron que una fracción significativa del virus fue degradada durante el proceso de purificación (tal vez por una sensibilidad a las presiones osmóticas altas encontradas en el gradiente). Eso se traduce por la presencia de una proporción significativa de partículas hinchadas y la existencia de numerosos capsómeros sueltos (unidades elementares que conforman la cápside). Por otra parte, se encontró que unas partículas virales tenían proyecciones ("spikes").

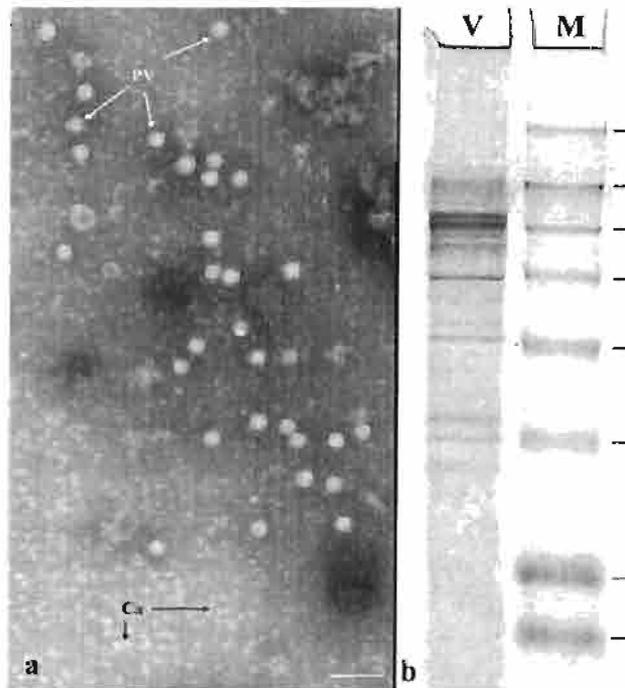


Figura 3. Virus Chiripa a) PV= partículas virales observadas por microscopía electrónica de transmisión (barra = 100 nm); (Ca= capsómeros provenientes de la degradación de las partículas virales; b) proteínas del virus (V) después de electroforesis en gel de poliacrilamida (M: marcador de peso molecular con bandas proteicas de 188, 98, 62, 49, 38, 28, 17 y 14 kDa, respectivamente).

El análisis proteico del Chi-V muestra un patrón muy complejo constituido por 10 bandas cuyas proporciones no son equimolares. Las dos proteínas de mayor PM (aprox. 70 kDa) son las más abundantes y constituyen sin duda la cápside. Una parte de los polipéptidos menores podrían corresponder a contaminantes del hospedero y/o a productos de degradación de las proteínas de más alto PM.

El genoma viral extraído de los viriones fue analizado por electroforesis sobre gel de agarosa que reveló la presencia de una banda única. Esto establece que las partículas virales contienen un solo tipo de molécula, es decir, que el genoma viral no es distribuido entre diferentes fragmentos como es el caso de varias familias de virus. Análisis enzimáticos permitieron establecer el tipo de ácido nucleico presente en el Chi-V. Se determinó que el genoma viral era constituido de ADN debido a la resistencia a la ARNasa A y a la sensibilidad a la ADNasa I. Varias enzimas de restricción fueron usadas para intentar cortar el ADN viral purificado según diferentes protocolos pero no se tuvo éxito, por lo que se piensa que se trata de ADN de cadena simple. De acuerdo a esta particularidad no se pudo establecer el tamaño exacto del ácido nucleico pero se observó que éste migra en geles de agarosa a una velocidad que corresponde a un PM aparente de 23,6 kpb.

Por lo que a las propiedades biológicas se refieren, el Chi-V también se reveló muy particular. De hecho, infecciones experimentales permitieron establecer que se puede multiplicar en *T. solanivora* por inyección o por contaminación oral. Se comprobó que el virus estaba presente en varios estadios: larva, pupa, adulto, un hecho que no es muy común. Por ello, pensamos que además de la transmisión horizontal existiría también una transmisión vertical (es decir entre generaciones diferentes) del patógeno. Otro aspecto esencial de Chi-V es su capacidad de infectar a las 3 principales especies de polillas de la papa, es decir, no solamente a *T. solanivora* sino también a *P. operculella* y *S. tangolias*.

Es a la vez muy interesante y inusual encontrar a un virus con las características antes mencionadas. Varios trabajos complementarios deberán ser llevados a cabo para determinar si el Chi-V representa un candidato serio para ser usado como controlador biológico, al menos en almacén. Existen buenas probabilidades porque los datos ya conseguidos muestran que tiene un impacto importante sobre las poblaciones mantenidas en crianza visto que se le puede imputar la casi totalidad de la mortalidad observada en el estadio pupal.

El resultado más inesperado del estudio fue la diversidad de virus presentes en las poblaciones de *T. solanivora*. Hasta ahora, para esta especie, sólo se había reportado a un granulovirus, nombrado PhopGV, el mismo que fue inicialmente aislado de *P. operculella* (Steinaus y Marsh, 1967). Los datos obtenidos muestran que existen varios otros virus que pertenecen a diferentes grupos taxonómicos. Basándose en estos primeros resultados, es probable que nuevos virus queden por descubrir en esta especie. Para encontrarlos se debe prospectar más detalladamente a las poblaciones de la plaga.

El segundo aspecto importante de este estudio es que nos mostró que la existencia de fenómenos epizooticos no es un requisito para encontrar virus en *T. solanivora*. Un cribado sistemático permite también encontrar patógenos que pasan generalmente desapercibidos porque sólo afectan a un número reducido de individuos.

En tercer lugar, es obvio el interés de una estrategia de búsqueda de patógenos más global, es decir, tomando en cuenta las diferentes especies de polillas de la papa. De hecho, no solamente comparten un recurso alimenticio idéntico y parte de sus áreas de distribución, sino que también una fracción de los patógenos que las infectan son comunes. Eso ya fue establecido para el PhopGV (Zeddám *et al.*, 1994) y se confirma ahora en el caso del SytaGV y el virus Chiripa (este estudio). El hecho se debe a que las diferentes especies de polillas son taxonómicamente cercanas. Así, ciertos patógenos encuentran condiciones favorables para multiplicarse en varias de ellas. Una ventaja de ampliar el cribado a especies emparentadas es que se incrementan las probabilidades de aislar virus diferentes. Por ejemplo, un estudio análogo llevado a cabo sobre *P. operculella* en el Perú no permitió detectar el virus Chiripa que sin embargo es capaz de infectar a esta especie (Zeddám *et al.*, no publicado). De igual manera, durante el mismo estudio, ninguna de las numerosas muestras de *S. tangolias* provenientes de Perú y Bolivia estaban infectadas por el SytaGV.

En relación con la especificidad viral y el rango de hospederos, hay que subrayar que no se puede determinar si los virus encontrados en *T. solanivora* son originarios de esta especie y entraron en Ecuador con la plaga o si estos patógenos fueron el objeto de una "captura" a partir de especies relacionadas (*P. operculella*, *S. tangolias* u otros *Gelechiidae*) o que no se encuentran en las mismas zonas. De hecho, se conoce que puede ocurrir este modo de

adquisición de virus. Por esta razón, es posible que una población de la plaga localizada en una área dada pueda albergar virus no encontrados en las poblaciones de otras regiones.

Finalmente, los resultados conseguidos mostraron que la bio-diversidad no solamente se nota por la variedad de tipos de virus que afectan a *T. solanivora*, sino que también se manifiesta a nivel de una misma especie viral (el PhopGV) de la que existen diferentes cepas teniendo características biológicas distintas.

Aplicaciones o impacto de la tecnología:

El estudio demostró que al usar técnicas de detección sencillas y bien establecidas se puede encontrar fácilmente nuevos virus en las poblaciones de la plaga. Los resultados obtenidos respaldan la organización de un esfuerzo regional orientado a coleccionar más material biológico susceptible al descubrimiento de nuevos virus. Este esfuerzo debería no solamente ampliarse espacialmente sino también temporalmente (se conoce que la incidencia de las enfermedades se modifica en relación con la temporada) y filogenéticamente (teniendo en cuenta las diferentes especies de polillas de la papa) para maximizar las probabilidades de encontrar nuevos virus.

Los análisis necesarios para diagnosticar la presencia de virus podrían ser llevados a cabo en diferentes países de la región, por lo que sólo se necesita una inversión limitada tanto en equipos como en capacitación del personal. Una opción sería que los análisis se centralicen en una sola localidad para una mayor eficiencia y la posibilidad de comparar más fácilmente los diferentes aislados virales provenientes de varios sitios.

Por otra parte, con respecto a la colección e identificación de virus se debe, desde ahora, desarrollar esfuerzos significativos en la evaluación de virus según métodos estandarizados para que se puedan determinar los mejores candidatos para el uso como controladores biológicos. Hasta ahora, este aspecto no había sido realmente considerado porque sólo se conocía que el granulovirus de *P. operculella* afectaba a *T. solanivora*; pero ya se comprobó la existencia de otros virus aislados de esta última especie y también se estableció que existen variaciones importantes de patogenicidad entre cepas del mismo virus (como el caso del PhopGV, pero probablemente esta misma situación se encuentra para otros virus). El sistema de aplicación con nebulizador que fue desarrollado representa un método sencillo, poco costoso y reproducible para determinar las DL50 y permitir una comparación precisa de las actividades biológicas de diferentes virus o de variantes del mismo virus.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Ing. G. Mongredien y al Dr M. Ravallec por su valiosa contribución técnica y a las Srtas Verónica Chevasco, Tatiana Romero y Melany Ruiz por las correcciones del manuscrito. La mayoría de los resultados presentados fueron obtenidos dentro del marco del proyecto PROMSA 103 (MAG, Ecuador).

Bibliografía

- Alcazar, J.; Cervantes, M.; Raman, K V. 1992. Caracterización y patogenicidad de un virus granulosis de la polilla de la papa *Phthorimaea operculella*. Revista peruana de Entomología, 35: 107-111.
- 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.
- Brenner, S.; Horne, W. 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochimica and Biophysica Acta, 34, 103-110.
- Carrera, M. V. ; Zeddám, J-L.; Léry, X. ; Pollet, A. ; López-Ferber, M. 2002. Evaluation of the biological activity of *Phthorimaea operculella* granulovirus, Tunisian 95 strain. Abstracts of AFP's Sixth International Conference on Pests in Agriculture, Montpellier, 4-6 December, pp. 447-452
- Carrera, M. V. ; Zeddám, J-L.; Léry, X. ; Pollet, A. ; López-Ferber, M. 2003. Determination of PhopGV activity by a precise surface contamination method. Abstract XXXVIth Society of Invertebrate Pathology Annual Congress, p. 83, 26-30 Jul., Burlington, USA.
- Regenmortel, M. H. V. ; Fauquet, C. M. ; Bishop, D. H. L. ; Carstens, E. B. ; Estes, M. K. ; Lemon. S. M.; Maniloff, J.; Mayo, M. A.; McGeoch, D. J.; Pringle, C. R.; Wickner, R. B.. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. pp. 1162. Academic Press, San Diego.
- Kroshel, J. 1995. Integrated pest management in potato production in the Republic of Yemen, with special reference to the integrated biological control of the potato tuber moth (*Phthorimaea operculella* Zeller). Tropical Agriculture, 8, Margraf Verlag, Weikersheim, 232 p.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. F.; Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, New York, 545 p.
- Steinhaus, E. A.; Marsh, G. A. 1967. Previously unreported accessions for diagnosis and new records. Journal of Invertebrate Pathology, 9: 436-438.
- Taha, A.; Nour-el-Din, A.; Croizier, L.; López-Ferber, M.; Croizier, G. 2000. Comparative analysis of the granulin regions of the *Phthorimaea operculella* and *Spodoptera littoralis* granuloviruses. Virus Genes, 21 (3): 147-155.
- Zeddám, J.L.; Léry, X.; Giannotti, J.; Niño, L.; Angeles, I.; Alcazar, J. 1994. Viral pathology of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Lep.; Gelechiidae). VIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Montpellier, France, 28th August-2nd September, p. 239-240.

Zeddani, J-L.; Luna, J.; Ravallec, M. ; Lagnaoui, A. 2000. A nodavirus-like virus isolated from the sweetpotato pest *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lep., Noctuidae). Journal of Invertebrate Pathology, 74, 267-274.