

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN GRANULOVIRUS ENCONTRADO EN *TECIA SOLANIVORA* (POVOLNY) (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) PARA SU USO COMO PESTICIDA BIOLÓGICO

CARLOS RUIZ A.¹, ANDRÉ POLLET²,
IVÁN AVEIGA³, Y ÁLVARO R. BARRAGÁN³

¹Fundación Numashir, Iberia y Mariano Ortiz Esquina
Departamento B1, Aptdo. 17-01-9149, Quito, Ecuador;
e-mail, cruiz@numashir.org

²Chemin d'Auzouville, 76590 Bertreville Saint Ouen, France

³Escuela de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador,
Av. 12 de Octubre y Roca, Aptdo. 17-01-2184, Quito, Ecuador

RESUMEN

Como parte del proyecto “Estudio de la biología de la polilla de la papa *Tecia solanivora*” (PUCE-IRD), se caracterizó un granulovirus (GV *Baculoviridae*) aislado de *T. solanivora*, la cual afecta a cultivos de papa.

Para la caracterización del granulovirus encontrado en la plaga se utilizaron cuatro enzimas de restricción. Con *Bam* HI el genoma total presentó 107 697 pb (pares de bases). Con *Eco* RI fue de 110 041 pb. Para *Hind* III de 105 998 pb. Por último, *Pst* I dio un total de 107 114 pb. El peso molecular total estimado del genoma fue de 107 712 ± 1 704 pb.

Además, se realizó la comparación con un granulovirus de *Phthorimaea operculella* (PhopGV), comercializado con el nombre de MATAPOL[®], el cual también afecta a *Tecia solanivora*. Se comprobó que los dos virus tenían los mismos patrones de restricción al ser digeridos con las enzimas *Bam* HI, *Eco* RI y *Hind* III.

Esto demuestra que el PhopGV no es específico para *Phthorimaea operculella*, sino que infecta a especies relacionadas por su alimentación y sus ciclos de vida, como es el caso de *Tecia solanivora*.

Palabras claves: Caracterización molecular; Granulovirus de *Phthorimaea operculella*; *Tecia solanivora*

ABSTRACT

Within the project "Study of the biology of the potato tuber moth, *Tecia solanivora*", (PUCE-IRD), a granulovirus (GV *Baculoviridae*) was characterized. This granulovirus had been isolated from *T. solanivora*, a pest affecting potato crops.

For characterization of the granulovirus found on the pest, four restriction enzymes were used. With *Bam* HI the total genome size obtained was 107,697 bp (base pairs); with *Eco* RI, it was 110,041 bp; with *Hind* III, it was 105,998 bp; and with *Pst* I, it was 107,114 bp. The molecular weight of the granulovirus found in the pest is $107,712 \pm 1704$ bp.

Besides, a granulovirus was compared to *Phthorimaea operculella* granulovirus (PhopGV) marketed under the name of MATAPOL[®], which also affects *Tecia solanivora*. It was shown that both viruses yielded the same patterns when digested with the three aforementioned restriction enzymes *Bam* HI, *Eco* RI and *Hind* III.

Such findings have demonstrated that PhopGV is not specific for *Phthorimaea operculella*, on the contrary, it infects species related to each other in terms of feeding habits and life cycles, as in this case.

Key words: Molecular characterization; *Phthorimaea operculella* granulovirus; *Tecia solanivora*

INTRODUCCIÓN

La papa, *Solanum tuberosum* L., se cultiva en altitudes entre 2 700 y 3 400 msnm (Carpio et al., 1999). Se estima que en el Ecuador existen aproximadamente 41 550 productores (MAG y PRSA, 1993). Respecto a la generación de empleo, la actividad absorbe nueve millones de jornales al mes y es uno de los cultivos con mayor demanda de mano de obra (Carpio et al., 1999).

En los últimos años, en el Ecuador se han establecido nuevas amenazas para este cultivo; una de ellas es *Tecia solanivora*, la polilla guatemalteca. Fue reportada por primera vez en el país en 1996 como la causante de graves daños en las zonas donde se cultivan papas en la provincia de Carchi (Gallegos y Suquillo, 1997).

La polilla de la papa, *Tecia solanivora*, tiene un ciclo de vida completo, pasa por cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto (Herrera, 1997). Este lepidóptero de la familia Gelechiidae es oriundo de Guatemala, donde fue descrito en 1973 como *Scrobipalposis solanivora* Povolny, 1973 y causó graves daños. Luego emigró hacia los países vecinos de América Central (Barroso, 1974).

La plaga siguió avanzando hasta que en 1983 se la reportó en el área andina (Salas et al., 1992). En 1996 se la reporta en el Ecuador, provincia de Carchi, y debido al intenso comercio de papa para semilla y consumo, la plaga emigró desde esa provincia a otras provincias de los Andes ecuatorianos (Barragán et al., 2000).

Los pesticidas químicos, a pesar de que son efectivos para la protección de la planta, causan graves daños al ADN de las personas en contacto; así se ha observado una alta frecuencia de aberraciones cromosomales en poblaciones expuestas directamente a estos productos (Paz y Miño et al., 2000).

También causan muchos problemas ecológicos por la bioacumulación y baja tasa de dispersión por composición hidrofóbica. Bajo estas circunstancias sería lógico que alternativas biológicas y sistemas de control integrado fueran favorecidas y estimuladas, dado que los peligros ecológicos serían reducidos y tales procedimientos probarían ser más baratos que el control químico convencional para las plagas de insectos. En este contexto, el uso de virus patógenos de insectos que son plagas de cultivos agrícolas debe ser considerado (Tinsley, 1979).

Los virus patógenos de insectos frecuentemente causan epizootias naturales en poblaciones de insectos que han sido bien documentados en la literatura (O'Reilly et al., 1992). La mayoría de ejemplos de epizootias naturales que causan un control exitoso en el campo son provistos por un grupo de virus de insectos. Estos virus son el NPV (virus de la nucleopolihedrosis) y el GV (virus de la granulosis) colectivamente clasificados como baculovirus (Tinsley, 1979).

Se conoce que los baculovirus son efectivos controlando poblaciones de insectos y son específicos para cada huésped dentro del orden Artropoda (O'Reilly et al., 1992). Los baculovirus se caracterizan por la forma de varilla de la cápside, y ésta usualmente varía entre 40-50 nm (nanómetros) en diámetro y 200-400 nm en longitud. La longitud puede variar dependiendo del largo del ADN viral (O'Reilly et al., 1992), el cual está entre 80-200 kb (kilobases) (Burgess, 1977).

La larva ingiere los baculovirus presentes como contaminantes en su comida (O'Reilly et al., 1992). Los signos y síntomas causados por el baculovirus, usualmente no se aprecian sino luego de varios días de haber ingerido el virus.

Los primeros signos de que la larva está enferma son el cambio de color y la decoloración, que indican que existe un mal funcionamiento metabólico (Granados y Williams, 1986).

En general las larvas infectadas con GVs crecen más despacio que las larvas sanas y, usualmente, llegan al tamaño máximo al tiempo en que las larvas sanas están empupando.

En los estadios tardíos de la infección con GV, la larva presenta una apariencia hinchada y tiene un color uniforme que va desde blanco hasta crema. Con la muerte de la larva, frecuentemente, existe la ruptura de la frágil epidermis, liberando cuerpos de occlusión virales (OVs) (Granados y Williams, 1986).

Actualmente, en Bolivia existe un pesticida biológico que sirve para el control de *Phthorimaea operculella*. El producto es comercializado bajo el nombre de MATAPOL®, y contiene baculovirus en cantidad suficiente para el control de esa plaga. Este baculovirus fue encontrado infectando larvas de la *P. operculella* en el CIP (Centro Internacional de la Papa) en Lima (Perú). Aunque antes fue reportado en Sri Lanka, Sudáfrica, India y Australia, en donde fue estudiado de forma exhaustiva.

El objetivo de este estudio es aislar e identificar un baculovirus que infecte a *Tecia solanivora*, con el propósito a futuro, de reducir el número de insectos, minimizar el impacto causado por agentes químicos y aliviar las pérdidas económicas de los agricultores en este cultivo de alto riesgo. Adicionalmente, se multiplicará el PhopGV en larvas de *T. solanivora*, con el fin de comparar el virus encontrado en el Ecuador y el comercializado bajo el nombre de MATAPOL®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los tubérculos de papa fueron cosechados en la provincia de Carchi y analizados posteriormente en el laboratorio de Bioquímica de la PUCE (Pontificia Universidad Católica del Ecuador). Las larvas de *Tecia solanivora* que presentaron una coloración blanquecina, hinchazón en sus segmentos y cambio de comportamiento fueron consideradas como larvas enfermas y recolectadas para estudios posteriores.

Para la multiplicación del baculovirus (virus X) se procedió a macerar las larvas en un mortero con agua destilada y Tween 20 (modificado de Angeles et al., 1996). Con la solución de 60 El (El = Equivalentes larvales, 1El = una larva enferma macerada en 1 lt de agua) se inocularon los tubérculos de papa. Posteriormente, se secaron a la sombra, y se los puso en una caja de plástico de 23 x 23 x 12 cm con malla de organza en la tapa (modificado de Angeles et al., 1995).

Los huevos de la plaga fueron trasladados a cajas de plástico que contenían las papas inoculadas. Luego de 30 días, cuando las larvas se encontraron en el IV estadio, la sintomatología fue evidente. En este momento se procedió a la recolección de estas larvas y se las refrigeró para preservarlas y posteriormente hacer la extracción del ADN viral.

Para la extracción del ADN viral se maceró las larvas enfermas congeladas en 200 ml de buffer de homogenización (0.1M NaCl, 0.2M Sucrosa, 0.2M EDTA,

0.02M Tris, pH 8.0), 50 ml de buffer de lisis (0.2M EDTA, 0.07M SDS, 0.5M Tris, pH 9.2) y 50 ml 0.5M Na₂CO₃, y se dejó reposar por 20 min (modificado Hamelin et al., 1989; A. Pollet, com. pers., 2000; modificado Yang et al., 1997)

Este lisado se incubó con 50 ml de proteinasa K (10mg/ml, PROMEGA V302B) por 45 min a 68°C en baño maría, utilizando un reverbero RET BSI-IKA Labortechnik (modificado Hamelin et al., 1989; A. Pollet com. pers, 2000; modificado Yang et al., 1997).

Se añadieron 50 ml de acetato de potasio (3M) y se incubaron en hielo por una hora. La muestra fue extraída mediante lavadas con fenol-cloroformo alcohol isoamílico por 5 min a 8 000 rpm (revoluciones por minuto) en una microcentrifuga Labnet Spectrafuge I6M (modificado Hamelin et al., 1989; A. Pollet com. pers., 2000; modificado Yang et al., 1997).

El ADN viral fue precipitado mediante la adición de 2.5 volúmenes de etanol al 100% y mantenidos a -70°C por 20 min, para luego ser centrifugado a 13 000 rpm por 30 min a temperatura ambiente. El pellet final fue lavado con etanol 70%, centrifugado y secado a temperatura ambiente por 30 min, para luego resuspenderlo en 50 ml de buffer Tris-Cl pH 8.0. Esta muestra fue guardada a -20°C (modificado Hamelin et al., 1989; Pollet com. pers, 2000; modificado Yang et al., 1997).

Alicuotas que contenían 4 ug de GV de ADN fueron digeridas con las enzimas *Bam* HI (Sigma R-0260), *Eco* RI (Sigma R-4640), *Hind* III (Sigma R-1137) y *Pst* I (Sigma 7002), por una hora a 37°C en baño maría. Las muestras fueron guardadas por 10 min a -20 °C.

Se preparó un gel de agarosa al 0.5% con tampón TBE (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA) que contenía bromuro de etidio (1 mg/ml) (Sambrook et al., 1989).

En este gel se pusieron las muestras almacenadas. Se adicionó marcador de frente (0.25% azul de bromofenol y 40% sucrosa, según Sambrook et al., 1989). Se utilizaron pesos moleculares estándares ADN de Lambda digerida con *Bste* II (Sigma D-9793).

Para el registro de estos datos se utilizó una cámara Polaroid Fotodine con rollo Polaroid 665 Positivo/Negativo B/N. Para revelar el negativo se utilizó una solución de sulfito de sodio al 18%.

Para determinar el tamaño del ADN viral se utilizó una curva de calibración entre log₁₀ de los pesos moleculares estándares para ADN y las distancias migradas. Se determinó el tamaño de todas las bandas obtenidas al hacer los cortes con las enzimas de restricción.

Para la comparación entre el virus encontrado en la provincia de Carchi y el PhopGV se realizó la multiplicación de este último. El PhopGV que se comercializa bajo el nombre de MATAPOL® fue aplicado sobre los tubérculos

de papa como se lo indicaba en la presentación: 200 gr de la formulación para 22 kg de papa. Luego de 30 días, cuando las larvas se encontraban en el IV estadio, se procedió a la recolección de las larvas enfermas de *Tecia solanivora*. Éstas fueron almacenadas a -20°C.

Para la comparación del PhopGV y el encontrado en *Tecia solanivora* se realizaron geles de agarosa al 0.5%, en donde se corrieron muestras de ambos virus cortados con la misma enzima.

RESULTADOS

Las larvas enfermas de *Tecia solanivora* infectadas presentaron síntomas como el cambio de la coloración de la cutícula. Las larvas sanas del III estadio son verdes, mientras que las que están infectadas con baculovirus son de color blanco-lechoso. Este cambio de color se observó a partir del II estadio larval, siendo más evidente en el III y IV estadios. Las larvas enfermas son más lentas y no reaccionan rápidamente, como lo hacen las sanas frente a estímulos externos.

Al llegar al final del IV estadio, las larvas no seguían su desarrollo normal (empupar) y morían. Las larvas muertas eran muy frágiles y fácilmente rompibles, y se observó la excreción de un líquido lechoso, el cual contenía virus suspendidos en los tejidos licuados. Estos mismos síntomas se observaron en larvas de *Tecia solanivora* infectadas con el PhopGV.

Tratamiento del ADN Viral con Enzimas de Restricción

Para la digestión del ADN viral con las enzimas de restricción se utilizó la suspensión del ADN extraído. El ADN viral al ser digerido con las enzimas de restricción *Bam* HI, *Eco* RI, *Hind* III y *Pst* I dio como resultado varias bandas que se observan en la Tabla 1.

Para *Bam* HI se obtuvieron 10 fragmentos, con un tamaño total de 107 697 pb (Tabla 1). Con la enzima de restricción *Eco* RI se observaron 13 fragmentos. El ADN viral tenía 110 041 pb (Tabla 1). La digestión del ADN viral con *Hind* III dio como resultado un genoma de 105 998 pb. Se observaron 17 fragmentos (Tabla 1). Al digerir el ADN viral con la enzima *Pst* I se observó un total de nueve fragmentos con un ADN viral de 107 114 pb (Tabla 1).

TABLA I.—Tamaño de los fragmentos del baculovirus que se encontró en *Tecia solanivora* producidos mediante la digestión con las enzimas de restricción, expresado en pb.

Banda	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI	<i>Pst</i> I
A	23 011	21 168	18 258	22 683
B	21 350	16 355	14 614	19 687
C	16 122	12 287	12 941	14 920
D	11 578	9 839	11 773	13 685
E	10 017	7 713	9 520	11 637
F	8 412	6 314	8 852	10 177
G	7 488	5 643	7 776	6 608
H	6 055	4 390	7 034	4 660
I	2 704	3 831	6 362	3 056
J	961	3 501	5 937	
K		3 182	3 100	
L		2 868	2 490	
M		2 514	1 384	
N		2 194		
O		1 788		
P		1 274		
Q		1 136		
Total	107 697	105 998	110 041	107 114

Tamaño medio 107 712 pb \pm 1 704 pb

Para la determinación del tamaño total del ADN del baculovirus que se encontró infectando a larvas de *Tecia solanivora* se realizó la digestión del ADN viral, con enzimas de restricción y el cálculo de las curvas de calibración. Se obtuvo una media de 107 712 pb (Tabla I), con una desviación estándar de 1 704 pb.

Adicionalmente, al realizar la comparación entre el PhopGV y el granulovirus encontrado en *Tecia solanivora* (Virus X), mediante cortes con las enzimas de restricción y geles de agarosa al 0.5%, se observó que los dos virus mostraban los mismos patrones de banda. Se usaron las enzimas de restricción *Bam* HI, *Eco* RI y *Hind* III. Ambos virus migran a la misma distancia y presentan los mismos pesos moleculares.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una ventaja con la que se cuenta al momento de identificar las larvas de *Tecia solanivora* enfermas con virosis, es que los síntomas son fácilmente identificables a simple vista.

El cambio de coloración y comportamiento de las larvas es evidente. Además, éstas no llegan a empupar al tiempo en que lo hacen las larvas sanas sino que mueren antes.

El método utilizado en esta investigación es efectivo para extraer los baculovirus de los hospederos. Esto se demuestra en los resultados obtenidos.

Antes de realizar la extracción de baculovirus, las larvas contaminadas deben ser almacenadas a -20°C . Ello evita la necrosis de las mismas, lo cual provoca una contaminación bacteriana y degradación del ADN viral, dificultando la extracción del mismo e imposibilitando su digestión con las enzimas de restricción. Aunque esto no significa que estas larvas necrosadas no puedan ser utilizadas para la multiplicación del virus, de la misma manera como se realiza con las larvas enfermas no necrosadas.

La purificación óptima del ADN del baculovirus encontrado en *Tecia solanivora* se obtiene gracias a la velocidad empleada durante la centrifugación arriba mencionada, la cual es de 8 000 rpm. Ésta es específica para el tamaño de cada ADN, aunque esta velocidad también podría ser empleada para la extracción de otros granulovirus pero no para los NPV.

El análisis del ADN viral mediante la utilización de enzimas de restricción es el método más usado para la identificación y clasificación de los baculovirus (Allaway et al., 1982; Kelly et al., 1980; Smith et al., 1982; Vlak et al., 1980; en Hamelin et al., 1989).

Los cálculos de las curvas de calibración muestran que el virus analizado tiene un tamaño medio igual de $107\ 712 \pm 1\ 704$ pb, lo cual es una clara muestra de que se trata de un GV, ya que según la literatura, generalmente estos virus alcanzan tamaños desde 104 000 hasta 179 000 pb. Esto a su vez descarta que sea un NPV, ya que estos últimos son de mayor tamaño, oscilando entre 140 000 y 200 000 pb.

Aunque el valor obtenido en este estudio ha sido el resultado de varios meses de comprobación, no se puede descartar la posibilidad de que algunos fragmentos menores a 500 pb hayan eluido de los geles al momento de la electroforesis. Lo mencionado causaría un pequeño error en la estimación del tamaño del ADN viral. Así, se explicaría que existan diferencias menores entre las estimaciones de tamaño determinadas de los cortes con cada una de las enzimas.

El uso de cuatro enzimas de restricción diferentes permite reducir la incidencia de errores en la estimación del tamaño del ADN del baculovirus y da mayor confiabilidad a los datos obtenidos.

En un trabajo anterior (T. Ahmed, com. pers., 1999) señala que el tamaño del genoma del baculovirus de *Phthorimaea operculella* es de 120 415 pb, con una desviación estándar de 545 pb. Esta diferencia con tales resultados se podría atribuir a que el trabajo citado se realizó mediante un análisis de toda la secuencia del ADN del virus para realizar un mapa físico. Este análisis da un resultado más fino, pero los valores no dejan de ser muy aproximados a los obtenidos en este estudio.

Al iniciar esta investigación se postulaba que el virus de *Tecia solanivora* era uno diferente al de *Phthorimaea operculella*; pero se trata del mismo virus. Los patrones de restricción idénticos e iguales pesos moleculares, demuestran que este virus no es específico para una especie de lepidóptero, sino que podría infectar a otras especies de polillas relacionadas por su tipo de alimentación y sus ciclos de vida.

A pesar de que se han realizado varias salidas de campo para recolectar larvas en los sitios de cosecha y almacenaje de la papa a lo largo del país, cabe recalcar que se encontraron larvas con virosis solamente en San Gabriel (provincia de Carchi).

Desde 1999, técnicos del INIAP (Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias) se encuentran realizando ensayos comparativos entre el NPV reportado por J. L. Zeddám (com. pers., 1999) y el PhopGV, para determinar la efectividad de cada uno como controlador biológico. Sin embargo, en el presente estudio no se pudo encontrar NPVs en ninguna de las extracciones realizadas, sino solamente el GV mencionado en los resultados de este trabajo. Existe la posibilidad de que debido a los trabajos que se han estado realizando, el granulovirus constituyente del MATAPOL® (PhopGV) haya contaminado los tubérculos almacenados en el laboratorio, y que el NPV encontrado en 1999 haya sido el perteneciente a una cepa que se perdió.

Además, como parte del proyecto PUCE-IRD se están realizando ensayos en el laboratorio, cuyos resultados aún no han sido publicados. Se trata de determinar el potencial de este granulovirus como biopesticida, ya que todavía no está claro en qué cantidades, ni en qué condiciones debe aplicarse. Aunque ya existen reportes de que en Venezuela (Niño de Gualdrón y Notz, 2000) se han hecho pruebas exitosas de la patogenicidad de un granulovirus de *Tecia solanivora*, aún no se ha determinado exactamente de qué virus se trata, por lo que no sabemos si es el mismo que hemos caracterizado o se trata de otro.

LITERATURA CITADA

- ANGELES, I., Y J. ALCAZAR. 1995. Susceptibilidad de la polilla *Symmetrischema tangolias* al virus de la granulosis de *Phthorimaea operculella* (PhopGV). Revista Peruana de Entomología 39:7-10.
- BARRAGÁN, A. R., A. POLLET, G. ONORE, I. AVEIGA, J. M. PRADO, P. D. GALLEGOS, Y C. RUIZ. 2000. Distribución de la polilla guatemalteca en el Ecuador. Pg 105 En A. Mafla, L. A. Coloma, C. Quintana, y V. Rafael (Eds.), Memorias de las XXIV Jornadas Ecuatorianas de Biología. PUCE. Quito. Ecuador.

- BARROSO, P. 1974. Ciclo biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Scrobipalposis solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). Nueva grave plaga de *Solanum tuberosum*. Tesis de Ingeniería Agronómica, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- BURGESS, S. 1977. Molecular weights of Lepidopteran baculovirus ADNs: derivation by electron microscopy. *Journal of General Virology* 37:501- 510.
- CARPIO, H., G. CHÁVEZ, Y M. HERRERA. 1999. Estudio sobre el subfactor de la papa en el Ecuador. Programa Nacional de Raíces y Tubérculos. INIAP, Quito, Ecuador.
- GALLEGOS, P. D., Y J. P. SUQUILLO. 1997. Monitoreo de la polilla de la papa *Tecia solanivora*. Pg. 14. En FORTIPAPA-INIAP (Eds.), del I Taller Internacional "Manejo integrado de *Tecia solanivora*." Julio 31 Agosto 4. INIAP-CIP, Ibarra, Ecuador.
- GRANADOS, R., Y K. WILLIAMS. 1986. *In vivo* infection and replication of baculoviruses. Pp. 89-108. En R. Granados y B. Federici (Eds.), *The Biology of Baculoviruses*. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A.
- HAMMELIN, C., C. LAVALLÉE, Y S. BELLONCIK. 1989. A simplified method for the characterization of nuclear polyhedrosis virus genomes. *Microbiology Letters* 60:233—238.
- HERRERA, F. 1997. La polilla guatemalteca de la papa. Biología, comportamiento y prácticas de manejo integrado. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. CORPOICA, Bogotá, Colombia.
- MAG-PRSA. 1993. Situación, perspectivas y alternativas de la papa en el Ecuador. Boletín Informativo. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Quito, Ecuador.
- NIÑO DE GUALDRÓN, L., Y A. NOTZ. 2000. Patogenicidad de un virus de la granulosis de la polilla de la papa *Tecia solanivora* (Povolny) 1973 (Lepidoptera: Gelechiidae) en el estado de Mérida, Venezuela. *Boletín Entomológico Venezolano* 15(1):39—48.
- O'REILLY, D. R., L. K. MILLER, Y V. A. LUCKOW. 1992. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. W. H. Freeman and Company, New York, U.S.A.

- PAZ Y MIÑO, C., G. BUSTAMANTE, M. V. DÁVALOS, R. BURGOS, J. C. PÉREZ, M. E. SÁNCHEZ, Y P. E. LEONE. 2000. Monitoreo citogenético en población ecuatoriana expuesta ocupacionalmente a pesticidas. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas* 25:15–21.
- POVOLNY, D. 1973. *Scrobipalopsis solanivora* sp.n.-a new pest of potato (*Solanum tuberosum*) from Central america. *Acta Universitatis Agriculturae, facultas Agronomica, Brno* 21:133–146.
- SALAS, J., C. ÁLVAREZ, Y O. MENDOZA. 1992. Manejo Integrado de insectos. Plagas del cultivo de la papa en el Estado de Lara. PRACIPA-FONAIAP, Barquisimeto, Venezuela.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, Y T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, U.S.A.
- TINSLEY, T. W. 1979. The potencial of insect pathogenic viruses as pesticidal agents. *Annual Review Entomology* 24:63–87.
- YANG, F., W. WANG, R. Z. CHEN, Y X. XU. 1997. A simple and efficient method for purification of prawn baculovirus ADN. *Journal of Virology Methods* 67:1–4.