

DETERMINACION DE UN PATOGENO (VIRUS) Y DESCRIPCION DE SU SINTOMATOLOGIA EN LARVAS DE *Agraulis Vanillae* Linn. (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE). EN EL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA. (*)

Por **Rodrigo Tello Diago** y **Marco Tulio Barona Tascón**

I — INTRODUCCION

A medida que el hombre ha mejorado su técnica tendiente a causar la muerte de insectos plagas, hasta obtener los productos conocidos como insecticidas, ha sido necesario llegar a la clasificación de ellos buscando una mayor efectividad, facilidad de tratamiento, aplicación e inocuidad para los animales y el hombre. Dentro de dicha clasificación encontramos los llamados "insecticidas biológicos".

Empero, no debe creerse, que el solo uso de insecticidas biológicos ha de resolver todos los problemas inherentes al control de los insectos-plagas. Este método formaría parte de su control integrado (cultural, biológico, químico, legal), que necesariamente tendrían que llevarse a efecto sino se quieren sufrir peores consecuencias. Además, nuestro medio ecológico facilita enormemente este control, pues dispone de una gran entomofauna benéfica natural. Actualmente hay anotadas más de 120 especies de insectos benéficos.

Muchos insectos plagas presentan gran dificultad a su control con los productos químicos tradicionalmente empleados, porque han desarrollado resistencia, o porque el uso de esos insecticidas pueden afectar igualmente a insectos dañinos y benéficos o dejar residuos tóxicos indeseables.

Gran cantidad de insectos sucumben ante sus enemigos naturales. El control biológico consiste en reclutar, precisamente a aquellos organismos que atacan el insecto plaga. El moderno concepto de Entomología Económica tiende, con un interés cada vez mayor, al uso de microorganismos en el control, para su mayor efectividad e inocuidad a hombres, animales y plantas.

Entre los insectos plagas que atacan al cultivo del Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deneger), se anotan en forma preferencial ciertos lepidópteros, cuyas larvas comedoras de hojas realizan verdaderas devastaciones dentro de la plantación.

(*) Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo, bajo la presidencia del Dr. Alvaro Figueroa E., I. A., a quien los autores expresan su agradecimiento.

Castellar (8), determina para el Valle del Cauca dichos lepidópteros como el *Agraulis vanillae* Linn. y el *Mechanitis veritabilis* Buttl.

Puesto que en una investigación anterior (Castellar, 8) sobre la biología del *Agraulis vanillae* Linn, se encontró consistentemente una afección de las larvas, la que posteriormente se determinó como ocasionada por un virus, que producía una alta mortalidad de las larvas en estudio, se decidió a estudiar más a fondo el fenómeno, por cuanto conociendo el agente causal, es posible pensar en utilizarlo como centro de los insectos mencionados, aprovechándose así de las ventajas que son propias del Control Biológico.

II.— REVISION DE LITERATURA

El método de combatir enfermedades por medio de microorganismos es uno de los más promisorios para el control biológico de muchos insectos-plagas. (Stelzer, 25).

Las posibilidades de emplear agentes de enfermedades para combatir los insectos plagas, han motivado a los entomólogos y otras gentes periódicamente, ya que los organismos infecciosos productores de las enfermedades de los insectos pertenecen a los mismos grandes grupos que los que causan enfermedades en otros animales: bacterias, hongos, virus, protozoos, nemátodos, etc. (Steinhaus, 23).

En agosto de 1935 Paillot, citado por Steinhaus (22), descubrió una poliedrosis en *Vanessa urticae* (Linn.) Lepidoptera; Nymphalidae) en La Rousses, región de Francia. Esta epizootia fue tan severa, que la larva fue incapaz de empuparse. En los estados tempranos de la enfermedad, Paillot, encontró dificultad en distinguir las larvas enfermas de las sanas. La larva muerta sin embargo licuaba muy rápidamente.

Collier, citado por Steinhaus (22), descubrió en 1934 una infección poliedral en *Argynnis lathonia* Linn. Una bacteria bipolar similar en morfología a aquella del grupo de la *Pasteurella*, es un invasor secundario en la enfermedad observada.

Krassilstschik, citado por Steinhaus (22), en 1896, atribuyó la causa de la poliedrosis a una bacteria *Micrococcus lardarius* que él encontró en el tracto alimenticio de gusanos de seda (*Bombyx mori* Linn.), enfermos.

En los últimos años del siglo XIX la enfermedad "jaundice" del Gusano de Seda (*Bombyx mori* Linn.) se confundía con otras comunes en él. En 1890, sin embargo, muchos sericultores fueron reconociéndola como enfermedad diferente aún cuando no estuvieron de acuerdo en su etiología. Entre los factores que se consideran como causales se cuentan: una deficiente nutrición, descuido de las pos-

turas en el invierno, variaciones de temperatura, aire húmedo, pobre ventilación y excesiva humedad. Hoy en día se sabe que aún cuando estas condiciones no son la causa específica de la enfermedad, influyen y constituyen una importante predisposición a ella. (Steinhaus, 22).

Esta poliedrosis se conoce con una gran variedad de nombres, dependiendo del país. Se llama "jaundice" en América, "grasserie" en Francia, "giallume" en Italia, "gelbsucht" en Alemania, etc. El nombre indica el calor amarillento del insecto enfermo y su temporal dilatación, hinchamiento y apariencia grasosa. Una larva en la última condición está "engraisse", de aquí el nombre francés "grasserie", que es tan común como el de "jaundice".

Otros síntomas del "jaundice" incluyen la disminución del apetito de la larva y su marcada inactividad. Antes de la muerte el integumento comienza a opacarse y asume un brillo amarillo o color pardo. La larva es enteramente flácida y usualmente inodora; el tejido interno presenta un estado de desintegración. Es difícil manipular la larva sin romper la epidermis y liberar el contenido licuado. El tiempo de infección a muerte es en promedio de 6 a 8 días.

La enfermedad era conocida, pero frecuentemente confundida con otras enfermedades de dicho Lepidóptero, y solo se consideró como una enfermedad aislada cuando se conocieron las características de los cuerpos poliédricos. El italiano Vida en 1527, probablemente se refiere a esta enfermedad en su poema "De Bombyce", cuando menciona las aflicciones del gusano de seda. Esta se menciona también en un libro sobre mariposas escrito en 1679 por María Sybilla Merian. Una de las descripciones más antiguas de la enfermedad es la de System en 1808. (Steinhaus, 22).

Steinhaus (22), concluye que el "jaundice" es causada por un virus ultramicroscópico, que es un parásito principalmente del núcleo de ciertas células, y que inicia un proceso mórbido que termina en la elaboración de cuerpos poliédricos.

Prácticamente la nomenclatura de los agentes causales de las enfermedades virales en los insectos fue propuesta por Bolle en 1894 al dar el nombre de *Microsporidium poliedricum*, a la poliedrosis que caracterizaba la enfermedad del gusano de seda (*Bombyx mori*, Linn.) (Steinhaus, 22).

Los virus causan enfermedades principalmente en larvas de los órdenes Lepidóptera, Hymenóptera y Diptera. Varias clases de virus pueden infectar insectos; por lo menos se observan diferentes tipos de reacción en los tejidos que infestan. El grupo mejor conocido es aquel en que se observan en los núcleos de las células infectadas, inclusiones características llamadas "poliedras" las enfermedades causadas por estos virus se llaman "poliedrosis", y los virus mismos han sido incluidos en el género BORRELINA. Vistos al microscopio electrónico los virus se aprecian como bastoncitos de un tamaño de 4 x 300

milimicras agrupados en manojos que constan de varios individuos cada uno. En su mayor parte están situados dentro de las inclusiones poliédricas visibles al microscopio (Steinhaus, 23).

En la mayoría de los insectos que sufren una poliedrosis hay debilitamiento general y el integumento se decolora poco antes de la muerte y después de ella. La larva está flácida y al momento de la muerte los tejidos internos (en particular el cuerpo graso y la hipodermis), se descomponen y los contenidos del cuerpo toman una consistencia fluida.

Otro grupo se caracteriza por la formación de pequeñas inclusiones granulares en las células infectadas del huésped. Dentro de cada gránulo hay una partícula de virus. Las enfermedades causadas por estos virus han sido llamadas provisionalmente "Granulosis", y los agentes se han incluido en el género "BERGOLDIA". La granulosis puede ser menos virulenta y propagada que la poliedrosis, en base a la docena de casos hasta la presente estudiados. El insecto infectado se muestra cada vez más inactivo y pierde el apetito y en algunas especies toma un tono blanquecino anormal. La muerte puede retrasarse pero suele ocurrir antes de que el insecto entre en la fase de pupa (Steinhaus, 23).

Una enfermedad de etiología virosa, del tipo de la poliedrosis nuclear, se ha diagnosticado en 70 ejemplares del gusano rosado del algodón, *Laphygma exigua* Hbn., en México en el año de 1967. El efecto destructor del virus se manifiesta por una acción lisante de tal manera que al cabo de unas cuantas horas, solamente se localizan manchas de aspecto pastoso o seco de color café negruzco (Alcocer Gómez, 1).

Hay evidencias de que los virus que atacan insectos pueden permanecer ocultos y causar infecciones latentes en sus huéspedes. Algunos investigadores creen que un virus puede sobrevivir en su huésped por varias generaciones sin causar síntomas aparentes, pero que bajo la acción de ciertos estimulantes pueden volverse activos y causar infecciones. La existencia de estos virus latentes puede ser la causa de resultados confusos en la experimentación virológica.

Varios factores se han reportado como capaces de transformar un virus latente como un agente infeccioso capaz de causar una aguda enfermedad. Entre estos factores, se cita el calor, el frío, la humedad excesiva, estímulos químicos, rayos ultravioleta y tipo de alimentación (Castaños, 7).

Castaño (7), anuncia la siguiente nomenclatura y clasificación, de los virus que atacan a los insectos, como adoptada por el Comité Internacional de Nomenclatura, agregando el sufijo "virus" a los nombres genéricos:

DORRELINAVIRUS	Paillot	Virus de la poliedrosis nuclear.
SMITHIAVIRUS	Bergold	Virus de la poliedrosis citoplasmática.
BERGOLDIAVIRUS	Steinhaus	Virus de la granulosis.
MORATORVIRUS	Holmes	Virus sin inclusiones.

Weiser citado por Castaños (7), ha designado los géneros BIR-DIA (que es el virus de la poliedrosis nuclear del epitelio del intestino medio), XEROSIA (virus con forma de poliedro algo circular) y STEINHAUSIA (virus de la granulosis nuclear).

Steinhaus (22), determina las siguientes características conocidas acerca de los cuerpos poliédricos:

A.—No necesariamente están presentes al iniciarse la enfermedad.

B.—El virus es infeccioso en ausencia de los poliedros y puede ser separado de ellos por filtrado o por disolución de la poliedra proteínica con alcalis débiles.

C.—El microscopio electrónico ha determinado la identidad del virus diferente de la poliedra. La poliedra nunca se ha considerado completamente aislada del virus, y los conceptos iniciales en este sentido han sido luego refutados. La explicación de esto es muy variable. Algunos creen que los poliedros están compuestos de partículas de virus; otros piensan que las partículas de virus son incorporadas fortuitamente dentro de la estructura cristalina del poliedro, cuando éste se forma y aún otros asumen que es simplemente un caso de una fuerte absorción de partículas de virus sobre el poliedro: Ultimamente se considera que las partículas de virus en número considerable, se encuentran aisladas o en manojos dentro del mismo cuerpo del poliedro. El poliedro varía en tamaño entre 0,5 a 15 micras, mientras que las partículas de virus, se encuentran entre los límites de 200 a 400 milimicras de longitud por 40 a 80 milimicras de ancho.

Sería de gran interés biológico el conocer qué ocurre en los tejidos de los insectos al cambiar de susceptibles a no susceptibles cuando llegan al estado adulto (Steinhaus, 22).

En 1924 Paillot citado por Hughes (14), usando un microscopio de campo oscuro, estudió células de la hemolinfa de un gusano de seda (*Bombyx mori* Linn.) durante un estado intermedio de infección causada por un virus de la poliedrosis. El describe una zona periférica del núcleo infectado en que observaba pequeñas partículas brillantes.

Chapman y Glaser (9), hacen la descripción de un secamiento caracterizado por la formación en el cuerpo de las larvas de insectos infectadas de formas poliédricas altamente refractivas, cuerpos angulares, que han tenido su origen en el núcleo de la tráquea matriz, células hipodérmicas, células grasas y corpúsculos de la hemolinfa. Más tarde algunos de éstas se revientan y la poliedra se encuentra libre en la linfa. Cuando la larva muere se encuentra formando parte de los tejidos saponificados de la misma. La larva se cuelga por sus patas abdominales, se vuelve flácida y su integumento se rompe al más ligero roce. Un examen inmediato después de muerta la larva revela pocas o ninguna bacteria y ausencia de olor. Aparece luego un secamiento estructural en forma crónica y aguda.

Sin embargo, una larva muerta, al examinarla al microscopio, no muestra poliedros si no se ha secado, aún cuando todas las características estén presentes. Un punto en que se debe de hacer énfasis es en que las características externas y de la poliedra son esenciales para el completo diagnóstico en casos aislados o crónicos de secamiento; debido a que existen un número de enfermedades de larvas tales como las causadas por hongos, protozoarios y posiblemente enfermedades bacteriales, con las que se puede fácilmente confundir. Si el secamiento se presenta en forma epidémica, es altamente improbable que se pueda confundir con cualquiera de las enfermedades anotadas.

La hemolinfa de una larva excesivamente enferma, por infección virosa, es lechosa turbia en apariencia y los hemocitos contienen poliedros. La forma de estos cuerpos aparentemente no es regular o bien definida, siendo más o menos cuadrada, triangular, poligonal o angular redondeada. La poliedra aparece sólo en los hemocitos, en las células de la epidermis, tejido graso, matriz traqueal y algunas veces en la cápsula genital. Los virus infectan principalmente los núcleos y destruyen la sustancia cromática y los nucleolos.

La enfermedad es muy contagiosa y experimentalmente puede ser transmitida por el tubo digestivo o por inoculaciones directas en la cavidad corporal. La transmisión transovárica es probable, pero hasta hoy no ha podido ser demostrada con certeza. (Steinhaus, 22).

Las enfermedades causadas por virus son en general muy similares, no obstante algunas características particulares que las diferencian de las demás; en unas ocurre la producción de cuerpos cristalinos llamados "poliedros", en las células de los tejidos afectados por el virus. En otras en vez de producción de poliedros algunos virus se manifiestan con la producción de inclusiones refringentes de diferentes tamaños y formas. Otra manera de manifestarse es en forma de inclusiones granulares o cápsulas que encierran el virus y se mezclan con el citoplasma de las células infectadas, la cual estaba acompañada de una descomposición del contenido celular incluyendo el núcleo. Por último se manifiesta por ausencia total de inclusiones de cualquier tipo.

Las dos primeras de estos grupos y algunas apartes del tercero son llamados por algunos autores "enfermedades nucleares", ya que en el núcleo es donde primero se presenta la infección y porque algunos cambios patológicos tienen lugar en el núcleo (Steinhaus, 22).

En julio de 1960. J. M. Ferris del departamento de Entomología de la Universidad de Purdue, sometió a diagnóstico una larva del orden Lepidóptera, muerta, en el laboratorio. La larva colectada en Indiana, al tiempo de la recepción fue imposible su identificación como resultado del brotamiento del contenido corporal y la decoloración del integumento, pero un examen del contenido corporal indicó una poliedrosis. El *Trichoplusia ni*, también fue colectado en el campo y el examen dio igualmente una poliedrosis nuclear. Gould

en 1960, determinó que una reducción en la densidad de la población de dicho insecto concurreó como resultado de una enfermedad virosa, pero la naturaleza del virus no fue determinada (Pasohkey y Hamur, 15).

Steinhaus en 1957, recuerda una poliedrosis de **Rachiplusia ou** Guenee colectada en Chile, pero enfermedades virósicas específicas no se recuerdan en tal insecto. Es bueno llamar la atención acerca de que ni el **R. ou** ni el **T. ni** en el laboratorio fueron de buen éxito porque ambas especies sucumbieron a la enfermedad. Sin embargo, días más tarde la colección de una hembra de **R. ou** resultó satisfactoria en la iniciación de un cultivo de virus aislado en el laboratorio. Un examen preliminar usando larvas de **R. ou** en el laboratorio indicó que ellas podrían ser experimentalmente infectadas por alimentación con hojas las cuales habían sido depositadas en una suspensión de poliedra a partir de larvas muertas de **R. ou**. Ellas demostraron síntomas típicos de una poliedrosis nuclear: 3 a 5 días después de la ingestión del alimento contaminado, las larvas empiezan a mostrarse perezosas y no responden a estímulos externos como sucede con las larvas sanas, esto es definitivo en cuanto al apetito de la larva con eventual cesación de consumo del alimento. Durante este tiempo la coloración externa gradualmente empieza a cambiar y al acercarse la muerte va tomando un color amarillo-blancuzco, pero pálido comparado con el color oscuro de la larva sana. Antes de la muerte tiende a moverse a posición más alta colgada cabeza-abajo hasta colorearse casi de negro, el integumento se rompe fácilmente en este momento.

El hecho de que el **T. ni** y el **R. ou** estén sujetos a la poliedrosis nuclear presenta el interrogante de que los virus sean diferentes o se trata del mismo virus. Exámenes de cruces de efectividad también como un estudio de la patogénesis de las enfermedades son indicadas para aceptar las relaciones de ambos virus de cada especie (Pashke, y Hamur, 15).

El modo de transmisión o diseminación de virus en insectos fue discutido por Steinhaus 1954. Este puede ser:

- a) Sobre la superficie del cuerpo de agentes comunes, tales como insectos sanos pero susceptibles o sobre escarabajos y otros insectos no susceptibles.
- b) Por insectos parásitos y predadores.
- c) Por canibalismo del insecto hospedante.
- d) Por agentes físicos tales como el viento, lluvia, agua de irrigación y partículas de polvo.
- e) Dentro o sobre la superficie del huevo (transmisión transovárica) (Tanada, 27).

Bird (5), denuncia como de aceptación general que los virus de los insectos son transmitidos a través de los huevos de familias infectadas como contaminantes externos o dentro de ellos.

Yamafuji et al presentaron en los años de 1947 y 1951, la hipótesis de que el virus del insecto puede ser producido de genes o material genético (de origen genético) por la acción de ciertos factores químicos o ambientales (Tanada, 27).

La poliedrosis nuclear del gusano medidor, *Trichoplusia ni*, es probablemente dispersada por medios naturales.

En 1960 surgió la idea de asperjar el virus de portadores. El interés de esta idea fue estimulado por exámenes de laboratorio reportados por C. G. Thompson, de la División de Investigaciones Entomológicas en Beltsville, Maryland. Thompson reporta que el gusano medidor meses atrás había recibido dosis subletales de virus de la poliedrosis produciendo progenies, toda la cual murió de enfermedad virosa dentro de los cuatro días de incubación. Reportó también que iguales resultados se obtuvieron en transmisiones virosas de adultos a progenies por sumersión de los abdómenes en una suspensión de virus.

Los métodos de transmisión de poliedrosis nuclear del gusano de seda (*Bombyx mori* Linn.) y otros insectos fueron discutidos por Bergold 1953 a 1958. El aceptó la idea de una poliedrosis nuclear que ocurrió en forma oculta y persistió a través de varias generaciones. Sin embargo, admitió el que podrían ser necesarias investigaciones posteriores para establecer definitivamente la transmisión del virus dentro del huevo, agrega que el virus podía ser transmitido en esta forma (Elmore y Hawland, 10).

Dos métodos principales de transmisión de virus de insectos fueron sugeridos por Smith 1959, así: (1) Ingestión de alimentos contaminados y (2) patrimonio de infección a progenie. Indicó que había causado mucha confusión el estudio del estado latente por mal uso del vocablo y que sería un mejor término el de "infección no aparente", para aplicarlo al grupo entero de infecciones que exhiben evidencia no patológica de su presencia.

Puntualizó, más tarde que la poliedra podría ser capaz de retener viable el virus dentro de ella misma, por muchos años y que era probable que el material infectivo sobreviviera en invierno con planas contaminadas. El catalogó el segundo método, como el más importante en la diseminación de virus y lo consideró como el pasaje o túnel del virus a través del huevo, pero indicó algún desacuerdo sobre el modo exacto de transmisión transovárica. El no estaba seguro si el virus existe interno en el huevo o si es llevado mecánicamente anexo al exterior de la cáscara.

Otros descubrimientos y puntos de vista relativos a la transmisión de virus de insectos han sido revelados someramente por Tanada en 1963 como conclusiones de algunas de sus investigaciones (Elmore y Hawland, 10).

Hughes (14), por medio de observaciones al microscopio electrónico de diferentes estados en el desarrollo de un virus, **Borrelina campeoles** Steinhaus, que causa la poliedrosis de una larva de la alfalfa, **Colias philodice eurytheme** Bdv., determina la presencia de partículas de virus en forma de bastón que aparecen en un gran número en el núcleo de una célula infectada. Los bastones forman manojos de dos o más miembros, aparentemente rodeados por una membrana. Una sustancia densa aparece dentro de la membrana que vuelve la estructura opaca. Acumulación de proteína poliédrica alrededor y entre un número de manojos resulta en la formación de un pequeño poliedro que contiene manojos de partículas de virus. El poliedro aparentemente crece con la acumulación de proteína poliédrica en su periférica y por el entrapamiento de manojos adyacentes dentro de su masa.

La variabilidad en el tamaño de la poliedra de los insectos se observa usualmente en las células del individuo hospedero. Chapman y Glaser en 1915 reportan un tamaño promedio de poliedrosis nucleares en las larvas de **Pseudaletia unipuncta** (Haworth), de 2,3 micrones y 1,88 micrones y Steinhaus en 1949 reporta un tamaño que varía de 1.2 a 3.5 micrones (Steinhaus, 22).

En pruebas de inoculación inyectando larvas de varias especies de lepidópteros con varios aislamientos de poliedra nuclear, efectuada por Gershenson, encontró que las formas características y el tamaño medio de la poliedra nuclear fue determinado exclusivamente por las propiedades del virus y no por las del hospedero (Ponce y Jong, 16).

El virus de cada insecto tiene un hospedero específico; sin embargo, puede multiplicarse en algunos otros insectos hospederos, particularmente cuando se usa la libre inoculación. Bergold dedujo de sus investigaciones que el virus de la poliedra nuclear del **Bacathra brassicae** (Linn.) se multiplica en **Orthosia incerta** (Hufnagel) o que se induce una poliedrosis nuclear latente (Ponce y Jong, 16).

Wallis (28), de un estudio de la incidencia de la poliedrosis en larvas de **Porthetria dispar** Linn., sugiere que la humedad relativa puede ser un factor de considerable importancia en la epizootología de la poliedrosis de los Lepidópteros.

Smith, citado por Castellar (8), indica que cambios en la coloración del excremento, las alteraciones de comportamiento larval y la flacidez corporal, son los primeros síntomas que se presentan cuando se trata de virosis comprobada, así como la lisis de los tejidos y la ruptura de la epidermis, son los estados finales de la acción de los virus entomolíticos.

De las numerosas investigaciones realizadas durante el año 1951 en insectos que eran infectados por virus, se reportan siete casos en que una sola especie de insecto está sujeta a infección por virus de la granulosis y uno de la poliedrosis nuclear. En el caso del insecto

Nepheleodes emmehnia Cram., una infección por un virus de la poliedrosis apareció naturalmente y simultáneamente con una infección causada por un virus de la granulosis en el mismo espécimen (Steinhaus, 21).

En 1915, Chapman y Glaser publican una lista de insectos que presentan secamiento, posteriormente se presentan adiciones a esta lista mediante trabajos presentados por Sweetman en 1936, Bergold en 1943 y Steinhaus en 1949 quien reporta 100 especies conocidas de insectos que sufren enfermedades virosas. Martignoni reporta en 1954 más de 150 especies de insectos como susceptibles a enfermedades virosas. En el año de 1957 se registra un total de 197 especies de insectos, de diferentes órdenes, que presentan susceptibilidades a enfermedades virosas (Hughes, 13).

Steinhaus y Marsh (24), reportan un total de 148 enfermedades viricasas de un total de 1199 enfermedades encontradas en insectos durante el decenio de 1951 a 1961.

III.— MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Entomología de la Facultad de Agronomía de Palmira (Valle del Cauca) y en terrenos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), en la misma localidad, lugares que presentan una temperatura media de 24°C, precipitación media anual de 1.100 mm. y una altura de 1.085 metros sobre el nivel del mar.

En el desarrollo de esta investigación se siguieron las etapas que a continuación se detallan:

A). Recolección de larvas en cultivos de pasifloráceas, particularmente Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deneger).

La recolección de las larvas se efectuó en cultivos establecidos en terrenos del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Estas larvas se llevaron al laboratorio y se colocaron en las cámaras de cría utilizadas previamente por Castellar (8), buscando con ésto establecer la presencia del patógeno en ellas, bien fuera porque:

1) Este se encontrase infestándolas, ya que previamente y durante el desarrollo de la citada investigación (8) se observó muerte de larvas que presentaban el síndrome de la enfermedad.

2) O bien, por tratar de establecer la contaminación al traer insectos posiblemente infectados ya que provenían de cultivos en los que se habían observado larvas muertas que presentaban síntomas de la enfermedad.

b). Cría del *Agraulis vanillae* Linn.

Se recolectaron posturas de *Agraulis vanillae* Linn. en el campo, para llevarlas al Laboratorio y comenzar con el método de cría recomendado por Poveda y Schwitzer (17), hasta que nacieron las larvas, para continuar con el sistema de cría utilizado por Castellar (8), con una modificación, la cual consistió en introducir en las jaulas plantas jóvenes de Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* De-neger), de aproximadamente 50 centímetros de altura sobre cuyo follaje se colocaban las larvas con el cual se alimentaban durante los diferentes instars hasta empupar y posteriormente emerger los adultos. Las hembras una vez que copularon depositaron sus posturas sobre la planta o bien sobre el anjeo que cubría la cámara, debido posiblemente a la falta de una mayor cantidad de follaje.

El método de Castellar (8), no aseguró una emergencia normal de los adultos, quizá por la condición de baja humedad ambiental; por esta razón se optó por hacer una modificación, la que consistió en colocar en la jaula un frasco de 500 cc., con agua hasta la mitad y cubierto con una tela rala (gasa) que asegurada a la boca de éste con una banda de caucho formaba una concavidad sobre la cual se colocaban las pupas. (Figura 1).

Con el sistema de alimentación de adultos recomendada por Poveda y Schwitzer (17), se presentó una alta contaminación de éste ocasionada posiblemente por un hongo del género *Rhizopus* lo que hacía necesario el cambio de la dieta. Para obviar esta situación se empleó una dieta a base de miel de panela, con la cual el ataque del hongo disminuyó.

Para evitar una posible contaminación en estos materiales, se tuvo en cuenta los cuidados sugeridos por Emsley (11). Al efecto:

- 1.—La jaula se colocó en un sitio diferente a aquel en que se presentó la infección larval.
- 2.—Las cámaras de cría contaminadas no se usaron durante este nuevo período de observación.
- 3.—El material alimenticio de plantas de la misma edad, suministradas por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), estuvo exento de la plaga. Las plantas se podaban inicialmente para obtener brotes jóvenes y sanos en un medio completamente aislado de la enfermedad, como era el invernadero de la Facultad de Agronomía.

Las larvas de esta generación se consideraron no infectadas por el patógeno. Posteriormente éstas se llevaron a las cámaras infectadas en grupos de 2 y 3 de 2º, 3º y 4º y principios del 5º instar. Cada grupo se enumeró y diariamente se llevaron registros en los cuales se hacía una detallada observación de la sintomatología de la enfermedad.

Las larvas que morían en las cámaras se colocaban en tubos de ensayo esterilizados, que contenían una solución de Formaldehído al

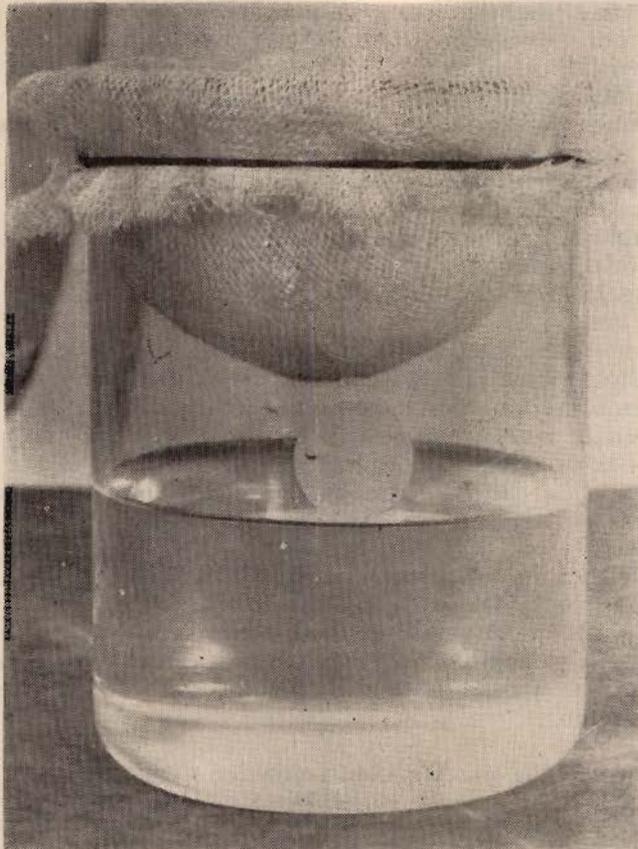


FIGURA 1.—Sistema usado para colocar las pupas con el fin de obtener una emergencia normal de adultos.

(Foto: Oriental, Palmira).

10%. Este material debidamente empacado y con los cuidados del caso se envió para la determinación y clasificación del agente causal a: Agricultural Research Service, Entomology Research Division, Beltsville, Maryland 20705. U.S.A.

Posteriormente a sugerencia de este Centro Investigativo, se hicieron envíos de larvas sin tratamiento alguno.

Para las observaciones se emplearon los materiales de uso frecuente en el laboratorio, indicados por Poveda y Schiwzter (17).

Durante el proceso inicial de cría se presentó la muerte de algunas larvas con sintomatología diferente a la comunmente observada. Dadas las características de ésta, se efectuaron cultivos en La-

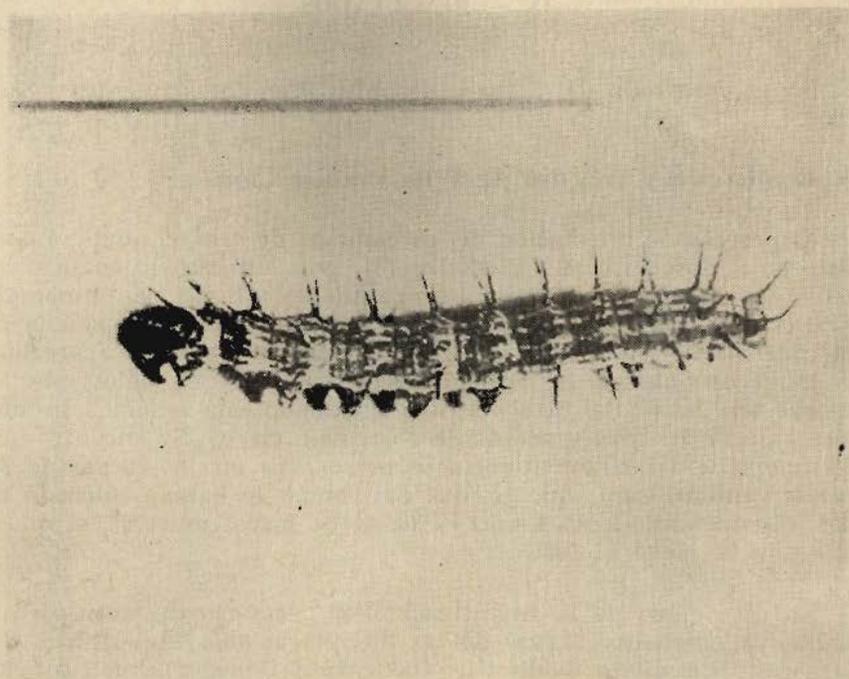


FIGURA 2.— Larva de *Agraulis vanillae* (Linn.) en su estado normal.

(Foto: Oriental. Palmira).

boratorio para la determinación del posible *Bacillus thuringiensis* Berliner, siguiendo las indicaciones de Aragón (2).

C.)— Aplicación de los postulados de Koch.

La aplicación de estos postulados se efectuó de la manera siguiente:

En un frasco de vidrio de 2500 cc., que nunca antes se empleó en desarrollo de programas de Entomología, y esterilizado, se colocaron larvas traídas del campo, de una plantación en la cual se observaron larvas muertas que presentaban síntomas característicos de la enfermedad en estudio. Lo anterior se hizo con el fin de infestar el frasco. Posteriormente se introdujeron larvas no infestadas. Se hicieron observaciones que determinaron la presencia del patógeno por la muerte de éstas, acusando sintomatología típica y completa de la enfermedad.

El sistema de alimentación de este proceso fue utilizado por Poveda y Schwitzer (17).

IV — RESULTADOS

En el desarrollo del trabajo se obtuvieron los siguientes resultados:

A). **Recolección y cría del *Agraulis vanillae* Linn.**

El proceso de infestación de las cámaras de cría, el que se manifiesta en el insecto según Castellar (8), por "un cambio en la coloración del excremento, larvas que se aquietan y dejan paulatinamente de comer, ocurriendo una progresiva decoloración acompañada de una flacidez del cuerpo del insecto. Al cabo de 4 días de aparecidos los primeros síntomas la larva muere al romperse su epidermis. Se observa una lisis total de los tejidos quedando ésta reducida a una masa amorfa, inodora y acuosa de color café claro". Se encontró que efectivamente tal sintomatología se presentaba en las larvas de *Agraulis vanillae* Linn., que traídas del campo se habían colocado en ellas, obteniéndose a los 4 días el 28,5% de larvas muertas, el que a los 9 días se elevó al 100%.

En esta etapa de la investigación es necesario destacar el que aunque se emplearon larvas de las dos plagas más importantes del Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) Deneger) como son los lepidópteros *Agraulis vanillae* Linn. y *Mechanitis veritabilis* Butler., sólo se presentaron los síntomas en *Agraulis vanillae* Linn., ya que el 100% de las larvas de *Mechanitis veritabilis* Butler, llegaron al estado de adulto.

Al recorrer algunos de los cultivos de Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deneger) y de Granadilla (*Passiflora ligularis*) localizados en los predios del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) fue posible observar la presencia de larvas muertas que generalmente pendían de las hojas por las patas abdominales, las que mostraban una coloración oscura y formando una masa amorfa. Era fácil observar en la hoja inferior, sobre la que se encontraba la larva, una mancha de color amarillento formada por el tejido interno desintegrado que se derrama al romperse el integumento. Al llevar a las cámaras de cría larvas aparentemente sanas de estos cultivos se presentaron casos en los que la muerte ocurría en menos de 24 horas, sin que las larvas hubiesen intentado consumir el alimento que se les suministró.

A medida que en las cámaras de cría utilizadas en el ensayo se presentaba la muerte de larvas con la sintomatología característica de la enfermedad, éstas se remplazaban por otras traídas del campo en diferentes instars. Este proceso que se realizó con el fin de incrementar la virulencia del patógeno y a la vez efectuar y registrar observaciones, se mantuvo por más de un mes, al cabo del cual se consideró que el patógeno había quedado establecido por la infestación de dichas cámaras de cría.

En algunas de las cámaras de cría las larvas se desarrollaron normalmente sin mostrar ningún síntoma que indicara la presencia del patógeno. Al colocar en dichas cámaras, hojas que habían permanecido en aquellas en las cuales se había presentado la enfermedad, se obtuvieron buenos resultados al lograr la muerte del insecto con la sintomatología típica. En otros casos, con la ayuda de una espátula, se impregnaron larvas normales con el tejido interno desintegrado que fue derramado al romperse el integumento de aquellos especímenes muertos y el resultado obtenido fue similar al anterior.

En dos ocasiones en aquellas larvas, que una vez muertas permanecían por algún tiempo en las cámaras, se observó que durante el proceso de decoloración adquirirían un color rojo característico que también se presentó en algunas de aquellas depositadas en tubos de ensayo no esterilizados en los que se recogió este material. (*).

De las larvas obtenidas al coleccionar las posturas se presentaron casos de muerte de algunas de ellas pero con variación en la sintomatología:

- 1.—Larvas que al morir presentaban la sintomatología común a aquellas que lo hacían en las cámaras de cría infestadas.
- 2.—Larvas que presentaban una sintomatología común a aquellas muertas por la acción de insecticidas.

Circunstancia ésta que se explica por el uso de un material alimenticio (hojas) obtenido de plantas de Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deneger) que se empleaban en el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en investigación y en las que lleva un estricto control de las plagas a base de insecticidas. Estas hojas antes de suministrarse a los insectos se lavaron con agua, pero en algunas de ellas es posible que un efecto residual letal produjera la muerte de aquellas larvas que la consumieron.

- 3.—Larvas presentando una sintomatología similar a la de las que morían en las cámaras de cría pero sin que su integumento se rompiera.

Presumiendo, por la sintomatología, que algún tipo de bacteria, posiblemente el *Bacillus thuringiensis*, fuese el agente causal (patógeno) en este caso se procedió a su determinación mediante cultivos de laboratorio en ZDA de acuerdo con la metodología señalada por Aragón (2) para tal fin.

En una primera prueba se emplearon 3 y 4 lupadas del tejido interno desintegrado de la larva, en la formación de la suspensión a emplear en el cultivo de ZDA. Cada caso con 5 replicaciones y 1 testigo.

(*) El Dr. Alvaro Figueroa atribuye este fenómeno al proceso de descomposición de los almidones presente en el insecto por acción de bacterias. Información personal.

Para una segunda prueba se tomaron 2, 3 y 4 porciones del tejido interno de la larva para la formación de la suspensión. De cada caso se efectuaron 3 replicaciones y se tuvieron 3 testigos en total.

Las cajas de Petri una vez instaladas en la estufa eran observadas cada 24 horas.

En la primera prueba no se obtuvo ningún resultado y solo fue posible observar al cabo de 48 horas la presencia de algunos hongos contaminantes.

Para la segunda prueba, al cabo de 24 horas de colocadas las cajas de Petri en la estufa, a la temperatura de 35°C se observó que en algunas de ellas, en las que se usaron suspensiones obtenidas con 2, 3 y 4 lupadas del tejido interno desintegrado, presentaban en parte del medio licuado.

De esta segunda prueba se continúan las observaciones de las cámaras de Petri colocadas en la estufa pero, a excepción de la presencia de algunas colonias de hongos contaminantes corrientes, ninguna nueva variación se obtuvo en el cultivo.

De las posturas de los adultos criados en las jaulas se obtuvieron larvas del insecto plaga que se consideraron no contaminadas puesto que se habían obtenido en un medio aislado de la acción del patógeno, fuera esta natural o inducida. El porcentaje de nacimiento fue de 100%.

La continua emergencia de adultos permitió tener posturas de diversa edad con lo cual se mantuvo en buen número de larvas en diferentes instars.

Es necesario anotar que este tipo de larvas consideradas como no infectadas, a pesar de la asepsia que se tenía para evitar una posible infestación del medio, se presentaron algunas muertes con la sintomatología típica de la enfermedad posiblemente virosa.

Del desarrollo de la primera etapa del Programa elaborado para la presente investigación se comprobó que la enfermedad muestra una mayor incidencia, determinada por el porcentaje de larvas muertas, del segundo al quinto instar con presencia más acentuada en los 3 últimos; por lo anterior las larvas no contaminadas que se escogieron para llevar a las cámaras de cría infestadas pertenecían a éstos. (*).

B). Identificación del agente causal (Patógeno).

(*) La determinación del instar en que se encontraba la larva en el momento de ser colocada en la cámara de cría se efectuó con la colaboración del Dr. Nelson Castellar.



FIGURA 3.— Larvas de *Agraalis vanillae* Linn. muertas a causa de la infección. Puede notarse claramente el daño inicial del insecto, representado por las manchas blancas que se observan en la foto sobre la parte posterior de la hoja; el daño final, representado en el festoneado que se observa en la misma; y finalmente la larva muerta que empieza a tomar una coloración oscura se encuentra sobre el contenido corporal desintegrado que se ha derramado sobre la hoja al romperse el integumento.

(Foto: Oriental. Palmira).

En base a los resultados negativos obtenidos en las observaciones de microscopía electrónica debido al desconocimiento de una técnica específica para el aislamiento del posible virus, durante el desarrollo de la investigación de Castellar (8), se optó por el envío de las muestras recolectadas al Agricultural Research Service de los Estados Unidos, para su determinación y clasificación.

Del citado Instituto en una primera comunicación, el doctor J. V. Thompson (*) se determina como agente causal de la infección a un "VIRUS DE LA POLIEDROSIS", a la vez que sugiere el envío

(*) Comunicación personal del Dr. J. V. Thompson.

Agricultural Research Service, Research Entomologist (Julio y Noviembre 12/1/69).

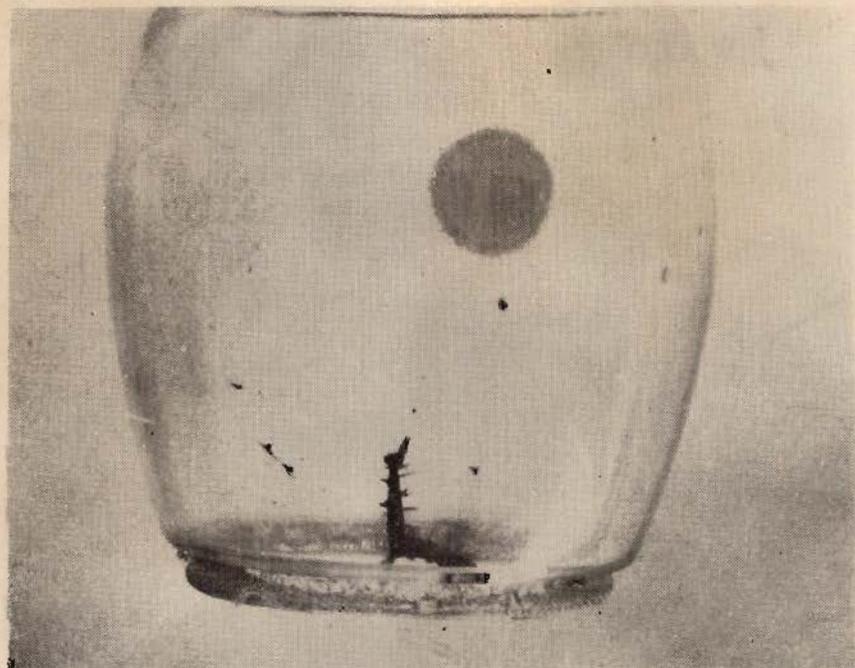


FIGURA 4.— Muerte de las larvas de *Agraulis vanillae* Linn. en las cámaras de cría. Puede observarse como el insecto antes de morir, se ha colocado en la parte superior de la cámara para posteriormente a ésta quedar con la cabeza hacia abajo y pendiente de las patas abdominales.

(Foto: Oriental. Palmira).

de nuevo material, larvas de *Agraulis vanillae* Linn., muertas por la infección, sin ningún tratamiento con el fin de proceder a su estudio debido a que posiblemente el material inicialmente enviado sufrió alteraciones por dilaciones involuntarias e imprevistas en transporte y en aduanas para llegar al destinatario.

En posterior comunicación en Noviembre 12 de 1969 el doctor J.

V. Thompson nos informa:

“Una suspensión del virus parcialmente purificada se preparó del material, larvas de *Agraulis vanillae* Linn., infectadas que ustedes nos enviaron. Con esta suspensión tratamos solamente los insectos de prueba que teníamos disponibles, *Bombyx mori* y *Trichoplusia ni*. ambos fueron expuestos a fuertes dosis del virus, pero no fueron infectados. Evidentemente, el virus es específico sólo de *Agraulis vanillae* o de especies estrechamente relacionadas. Desafortunadamente, no nos fue posible obtener ninguna de tales especies.

Nosotros, por consiguiente, les sugerimos que ustedes prueben el virus en larvas sanas del primero y segundo instar por exposición de estas a varias concentraciones del virus. Esto se puede efectuar por sumersión del follaje que servirá de alimento al insecto en suspensiones de agua que contengan diferente número de poliedros. Los poliedros son visibles a un aumento de 400 x y se pueden contar en un hemocitómetro corriente de sangre. Las suspensiones a inocular pueden llevarse a cualquier concentración deseada de los poliedros por dilución con agua. El follaje sumergido en la suspensión del virus deberá dejarse secar antes de ser suministrado a las larvas jóvenes. Si ustedes crían los insectos con una dieta artificial o semi-artificial, la prueba es aún más fácil. Simplemente trate la superficie de la dieta con la suficiente suspensión como para humedecerla, déjela secar, y expóngala a los insectos. Un testigo podría tratarse de la misma manera pero humedeciendo la superficie solamente con agua destilada estéril.

Si ustedes no tienen a mano cualquier material infectado por el virus, podríamos suministrarle suficiente de este virus que hemos purificado para efectuar las pruebas de infección, coloque varias de las larvas infectadas vivas en un recipiente que contenga el fijador Bouin-Budoceq y envíenoslo. Con especímenes así tratados, podemos efectuar estudios histológicos para determinar si el virus es definitivamente nuclear o citoplasmático y conocer qué tejidos invade".

De invaluable importancia e innegable interés son los datos aportados por la anterior comunicación. Porque si bien es cierto que el programa propuesto inicialmente para la presente investigación solo se cumple parcialmente en virtud al desconocimiento de una técnica específica para tal fin, también lo es el que los resultados de esta y en base a la comunicación adjunta se brinda a futuros investigadores en este campo una metodología antes desconocida en nuestro medio para esta clase de trabajos.

C.) Sintomatología de la enfermedad.

El proceso infectivo del patógeno se manifiesta inicialmente por un cambio gradual en la coloración del excremento, lo que hace posible observar "pellets" normales de color café oscuro y otros cuya coloración varía de un verde claro a un verde oscuro.

Esta coloración se manifiesta de manera gradual a partir del tercero o cuarto día de permanecer las larvas en las cámaras infestadas; sin embargo fue posible observar el caso de larvas no contaminadas (en 4º instars), en cuyo excremento se distinguió al día siguiente de colocadas en ellas "pellets" que presentaban rasgos de este color o eran totalmente verdes. Estas larvas comían de manera corriente aún cuando presentaban una brillantez más anormal en su coloración.

La mayor incidencia de "pellets" verdes en el excremento se manifestó en todas las cámaras a partir del tercer día de permanen-



FIGURA 5.— Larva de *Colias philodice eurytheme* Boisduval, muerta de polidrosis. (Tomado de Steinhaus, 22).

(Foto: Reproducción. Oriental. Palmira).

cia de las larvas no contaminadas en ellas. Esto se determina por la presencia de pintas verdes en el excremento normal o de "pellets" con una coloración que va desde el verde pálido a oscuro.

Simultáneamente la larva exterioriza una quietud manifiesta junto con la disminución paulatina de su apetito; a veces permanece sobre la hoja que le sirve de alimento y otras se instala en las paredes o parte superior de la cámara de cría. Una flacidez total en su cuerpo se observa cuando trata de efectuar movimientos, los cuales son claramente torpes.

Durante este estado del desarrollo de la infección en el insecto fue posible observar larvas que presentaban diarreas y regurgitación anormal; también algunas que tratan de empupar, estado que solo un bajo porcentaje alcanza. Este último hecho fue común en larvas que se encontraban entre el 3º y 5º instar y tuvo su mayor incidencia en la primera etapa de la investigación, caso contrario ocurrió al trabajar con larvas no contaminadas, cuando sólo una de ellas logró empupar.

Generalmente la muerte de las larvas ocurre en los cuatro días subsiguientes a la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad. Comúnmente se encuentran sobre las hojas que les servían de alimento o colgando de éstas o de las paredes de las cámaras, pendiendo de las patas abdominales. En este caso es fácil observar la aglomeración de los tejidos desintegrados en la parte inferior colgante del insecto (ver Figura 5); esos tejidos desintegrados se derraman cuando el frágil integumento se rompe por sí solo o al más mínimo roce. En este estado de larva ha adquirido una coloración café oscura (casi negra) y no presenta olor desagradable (inodora).

Finalmente la larva queda reducida a una masa amorfa acuosa que por último se deseca.

Los tejidos internos desintegrados y posteriormente derramados al romperse el integumento forman una suspensión de color oliva.

El tiempo transcurrido desde el momento en que las larvas no infectadas se introdujeron en las cámaras de cría hasta que se obtuvo un 100% de muertos varió de 6 a 8 días.

D.) Aplicación de los postulados de Koch.

En la primera parte de la aplicación de estos postulados, el alimento procedía del campo de cultivos en los que se hubiese observado la presencia de la enfermedad al encontrar en ellos larvas muertas con síntomas de la infección.

Durante quince días se tuvo un período de infestación del frasco esterilizado usado con base en larvas de *Agraulis vanillae* Linn., que procedían de los mismos cultivos en los cuales se recolectaba el alimento. Estas larvas generalmente morían en un período de 3 a 10 días, presentando la sintomatología típica de la enfermedad.

Posteriormente al período de infestación se colocaron en el frasco larvas de *Agraulis vanillae* Linn., no infectadas en diferentes instars y se procedió a observar su comportamiento. Como resultado se obtuvo la muerte del 100% de ellas en un tiempo no mayor de 10 días, manifestándose la presencia de un agente causal de la enfermedad cuyo síndrome era el ya previsto observado en las cámaras de cría.

El material alimenticio para esta segunda etapa procedía de las plantas de Maracuyá (*Passiflora eduli* var. *flavicarpa* Deneger) que se mantenía en el medio "aislado" del invernadero de la Facultad de Agronomía.

E.) Observaciones referentes al *Agraulis vanillae* Linn., en su estado natural.

Durante la recolección de las posturas en el campo, que coincidió con un período seco, se observó una mayor incidencia de larvas de *Mechanitis veritabilis* Butler. Con la iniciación de las lluvias la

población de los insectos plagas aumentó y el número de larvas de *Agraulis vanillae* Linn. fue mayor, presentándose diferentes generaciones manifiestas por la presencia en el cultivo de todos los estados del insecto.

En las posturas recolectadas se observó:

- 1.—Se presentaban en coloraciones diferentes, que varían de un color blanco a uno oscura (casi negro). Son de forma conoidal truncados en el ápice y con estrias longitudinales.
- 2.—La coloración blanca es típica de las posturas recientes.
- 3.—Las posturas se encuentran generalmente en forma individual sobre las hojas (indistintamente en el haz o en el envés), el tallo o los zarcillos de la planta.
- 4.—Un alto porcentaje de las posturas presentan parasitismo.

Cada postura se colocaba sobre un papel de filtro húmedo y en frascos individuales cubiertos con una tela rala. La postura se dejaba sobre el área que ocupaba en la hoja, recortada del total. Mediante este sistema fue posible obtener especímenes de *Trichogramma minutum* (*) y de otro Microhymenóptero cuya clasificación no fue posible por los pocos individuos que se lograron recolectar.

- 5.—El día siguiente a una lluvia intensa el número de posturas disminuye, debido posiblemente a que son lavadas del follaje por el agua.

En los frascos anteriormente anunciados así como en la aplicación del método de Poveda y Schwitzer (17) usados para obtener la eclosión de las posturas, se presentó un hongo contaminante debido a la excesiva humedad que presentaba el papel de filtro.

La conservación de los insectos parásitos se efectuó en una solución de alcohol al 30%.

V.— DISCUSION

La persistencia de la infestación en las cámaras de cría luego de seis meses de no haberse usado puede explicarse por la presencia de "poliedros" que son capaces de retener viable el virus dentro de ellas por muchos años" (Smith, 26).

Castellar (8), estima la propiedad de los poliedros o cápsulas, de

(*) Determinación y clasificación efectuada en el Laboratorio de la Facultad de Agronomía de Palmira, por el doctor Alvaro Figueroa E., I. A.

ser resistentes a la acción de los desinfectantes comunes y del calor moderado, así como el ser corriente su formación por parte de la mayoría de los virus entomolíticos.

En el caso del uso de los desinfectantes químicos, es necesario tener en cuenta que algunos de estos productos pueden actuar como "stressors" artificiales que activan el virus (Wallis, 28).

Como factor determinante de la infestación inicial en las cámaras de cría podrían tenerse como hechos el que la infección ya se hubiese presentado en el campo y precisamente se hubiere llevado a ellas una larva infestada, o que el patógeno existiese "latente" en las poblaciones de *Agraulis vanillae* Linn. Esta última condición se ha reportado en el gusano de seda (*Bombyx mori*) y se da como método para activar la infección "latente" el sometimiento de las larvas a condiciones adversas (Tanada, 27, Wallis, 28).

La observación en el campo de larvas muertas presentando síntomas característicos de la infección, determina la presencia del patógeno en el medio natural ecológico de Palmira, concepto que previamente emitió Castellar (8), lo que a la vez indica la existencia de agentes de transmisión (vectores) que pueden estar representados por parásitos, predadores, etc., alimento contaminado o patrimonio de infección (Smith, 26; Wallis, 28; Elmore y Hawland, 10).

El hecho de que la infección no se presente en forma muy severa en el campo puede indicar:

- 1.—El brote natural de patógeno en forma epizootica se presenta en un estado inicial, puesto que para su expresión en forma devastadora se requiere que "las poblaciones de plagas hayan existido en niveles epidémicos por varios años consecutivos" (Stelzer, 25).
- 2.—La ausencia de un adecuado agente diseminante de la infección.

Es necesario anotar que los autores tuvieron la oportunidad de observar la presencia de la infección en larvas de *Agraulis vanillae* Linn., en un cultivo de Granadilla (*Passiflora ligularis*) distante aproximadamente 30 kilómetros de la ciudad de Palmira.

La muerte de larvas por ingestión de hojas sobre las que se hubo derramado el contenido interno desintegrado de aquellas muertas por el patógeno, indica la efectividad que podría tener el empleo de un método de control de esta plaga del Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Deneger) por medio de la aspersion del follaje con una solución del virus.

La presencia de parásitos y de algunos predadores de este insecto-plaga había sido anteriormente determinada por Castellar (8).

La muerte de larvas en el medio no contaminada, con la sintomatología típica de la infección, puede indicar la existencia de un

mecanismo de transmisión transovárica del patógeno, lo que concordaría con casos similares de diseminación de enfermedades entomolíticas causadas por virus (Steinhaus, 20; Tanada, 27; Elmore y Hawland, 10).

Uno de los aspectos de las enfermedades causadas por virus entomolíticos en el que se diverge en cuanto a su incidencia es aquel que hace referencia al estado larvario "instars" en el que es más frecuente la infección.

Tanada (27), determinó la presencia de la infección entre el 1º y 4º instar para la mitad de las poblaciones de *Spodoptera* por él estudiadas y entre el 5º y último instar para la otra mitad. Según Aruga et al (3) la mayor virulencia del patógeno se presenta en larvas de *Bombyx mori* en los últimos instars. Stair (18), determina que la susceptibilidad decrece marcadamente en instars avanzados de *Malacosoma* sp.

En el desarrollo de la presente investigación, a pesar de que la infección se presentó en todos los estados de la larva, su mayor incidencia ocurrió a partir del 2º instar alcanzando una mayor virulencia en los tres últimos, lo cual indica que para el caso del *Agraulis vanillae* Linn., la susceptibilidad aumenta marcadamente en instars avanzados.

La descripción de la sintomatología de la enfermedad que se presenta, concuerda con la que expresan varios autores al referirse a la llamada "Polidrosis" de los Lepidópteros. Tipo de infección que tiene como agente causal de los Lepidópteros. Tipo de infección que tienen, 29; Steinhaus, 23; Chapman y Glaser, 9; Castaños Martínez, 7; Emsley, 11).

Smith, citado por Castellar (8), indica que los cambios en la coloración del excremento, las alteraciones del comportamiento larval y la inacididad corporal, son los primeros síntomas que se presentan cuando se trata de una virosis comprobada, así como la lisis de los tejidos internos y la ruptura del integumento, son los estados finales de la acción de los virus entomolíticos.

El que el excremento adquiriera una coloración verde, podría indicar la no digestión del alimento ingerido, proceso que se efectúa en las larvas del insecto en el intestino medio, el cual segrega enzimas digestivas y compuestos "buffer" y absorbe los productos de la digestión (Heimpel, 12). Por lo tanto, esta condición anormal en la coloración del excremento puede indicar la presencia del virus en el intestino medio, causando alteraciones sobre las células epiteliales lo que posteriormente determine una parálisis intestinal manifiesta en la pérdida del apetito y de la función excretora de la larva.

Según Heimpel y Angus, citado por Aragón (2), en el caso de enfermedades causadas por bacterias entomolíticas, se presenta un cese en la función intestinal que es debido a las sustancias que co-

mentan las células entre sí, lo cual las expone a la acción de los jugos intestinales, causando autodigestión de las células provenientes del tejido desorganizado.

La diarrea y regurgitación observadas en algunas de las larvas son síntomas característicos que se presentan cuando ocurren infecciones causadas por bacterias entomolíticas (Aragón, 2; Bucher, 6). Su ocurrencia en el desarrollo del presente trabajo indica la posibilidad de casos de ataque combinado de bacterias y virus en las larvas del *Agraulis vanillae* Linn.

La muerte de una de las larvas en menos de 12 horas podrá explicarse en lo estipulado por Steinhaus (19), quien determina un incremento del porcentaje de muertes en un tiempo menor en las condiciones de ataque combinado de bacterias y virus.

Steinhaus (22), explica que cuando el núcleo de las células del tejido afectado (células de sangre, hipodermis, cuerpos grasos, cápsula genital y tráquea matriz) es completamente destruido, la célula entera se desintegra y la poliedra se libera dentro de la cavidad corporal del insecto. Coincidiendo con la desintegración de las células, pero aparentemente independiente de ellos, ocurre la lisis de todo el tejido afectado. Solo después de que el insecto muere o cuando está moribundo, aparecen cambios significativos en las células de los músculos, tubos de Malpighi, glándulas salivares, nervios y otros tejidos que no albergan la poliedra.

La apariencia final del insecto muerto está representando el tejido desintegrado y gran número de poliedros libres. En algunos casos la poliedra continúa retenida dentro de la célula muerta.

VI.— CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados y las observaciones realizadas durante el desarrollo del presente trabajo es posible establecer las siguientes conclusiones:

- 1.—Existen en el medio ecológico regional de Palmira, (Colombia) un microorganismo patógeno a las larvas del *Agraulis vanillae* Linn., el cual llega a causar una mortalidad del 100% en un tiempo relativamente corto.
- 2.—Tal microorganismo patógeno fue determinado como un "VIRUS DE LA POLIEDROSIS".
- 3.—Las pruebas realizadas por el Dr. J. V. Thompson del Agricultural Research Service Beltsville, Maryland (U.S.A.), comprueban que es un virus específico del *Agraulis vanillae* Linn., o de especies estrechamente relacionadas.
- 4.—Bajo las condiciones en las cuales se desarrolló la presente in-

vestigación, este microorganismo no es patógeno al *Machinitis veritabilis* Butler.

- 5.—Se constata la presencia de parásitos y predadores observados por Castellar (8).
- 6.—Se hacen necesarios estudios tendientes a:
 - a) La clasificación del virus y a la determinación, mediante análisis histológicos de larvas de *Agraulis vanillae* Linn., infectadas, del tipo de poliedrosis (poliedrosis nuclear o citoplasmática).
 - b) Determinar la efectividad del patógeno como un medio de Control Biológico del *Agraulis vanillae* Linn., en el campo mediante el uso de aspersiones del virus en suspensión.
 - c) La determinación de los posibles agentes de diseminación del virus y el papel de los parásitos y predadores observados en ella.
 - d) Comprobar la posible existencia de un mecanismo de transmisión transovárica del virus en las larvas de *Agraulis vanillae* Linn.
 - e) Demostrar la enunciada especificidad del virus en su medio ecológico natural.

VII.— RESUMEN

En este trabajo, referente a la DETERMINACION DE UN PATÓGENO (VIRUS) Y DESCRIPCION DE SU SINTOMATOLOGIA EN LARVAS DE *Agraulis vanillae* Linn. (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) EN EL VALLE DEL CAUCA, COLOMBIA, se presenta un comentario inicial acerca del Control Biológico. Se incluye luego un compendio bibliográfico en lo referente a los virus: clasificación; formas de expresión, etc.

Se efectúa posteriormente, con el empleo de larvas traídas del campo, un incremento en la virulencia del patógeno presente en las cámaras de cría observado por primera vez durante el desarrollo de un trabajo de investigación efectuado por Castellar (8).

De posturas del *Agraulis vanillae* Linn., recolectadas en el campo se obtienen, en un medio que se considera libre de la presencia del patógeno y después de un ciclo de vida completo del insecto, larvas que se consideran no contaminadas, las cuales posteriormente se llevan a las cámaras de cría infectadas con el fin de efectuar la observación y descripción de la infección.

En el transcurso de la etapa anterior se determina la presencia de ciertos Microhimenópteros parásitos de huevos y se observan hechos que indican la posible existencia de un sistema de transmisión transovárica del patógeno.

De la sintomatología observada durante el desarrollo de la infección (cambio en la coloración normal del excremento, cese de toda actividad, muerte de la larva y rompimiento del integumento derramando los tejidos internos desintegrados) se concluye el carácter viroso de ésta.

Del material recolectado de las cámaras de cría larvas de *Agraulis vanillae* Linn., se envió en una solución de Formaldehído al 10% a Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland (U.S.A.), en donde el Dr. J. V. Thompson determinó la presencia de un "VIRUS DE POLIEDROSIS" como agente causal de la infección, comprobando mediante pruebas realizadas que es específico del *Agraulis vanillae* Linn., o de especies estrechamente relacionadas.

La existencia del patógeno (virus) en el medio ecológico de Palmira, Colombia, se determinó por la observación de larvas en el campo que presentaban síntomas típicos de la infección.

VIII.— SUMMARY

In this work, concerning the DETERMINATION OF A PATHOGEN (VIRUS) AND THE DESCRIPTION OF ITS SYMPTOMATOLOGY IN LARVAE OF *Agraulis vanillae* Linn. (LEPIDOPTERA: NIMPHALIDAE), IN THE VALLEY OF CAUCA, COLOMBIA, a cometary on Biological Control is initially presented, and a bibliographical compendium concerning the above virus: classification, forms of expression, etc., is also included.

Subsequently, with larvae brought from the field, an increase in the virulence of the pathogen present in the breeding chambers is effected which are considered uncontaminated, which subsequently are taken to the infested breeding chambers with purpose of effecting the observation of the infection.

In the course of the preceding stage, it was determined the presence of certain Microhymenopteros parasites of eggs and certain facts are observed which indicate the possible existence of a system of transovarian transmission of the pathogen.

From the symptomatology observed during the development of the infection (change in the normal coloration of the excrement, ceasing of all activity, death of the larvae and breaking up of the integument spilling the internal desintegrated tissues) it is concluded the viral character of this.

The collected material from the breeding chambers, larvae of *Agraulis vanillae* Linn., was sent in a solution of Formaldehyde at 10%, to the Agricultural Research Service Beltsville, Maryland (U.S.A.), where Dr. J. V. Thompson determined the presence of a Polyhedral Virus as the causal agent of the infection. It is specific of *Agraulis vanillae* Linn., or to closely species.

The existence of the pathogen (virus) in the ecologic medium of Palmira was determined by the observation of larvae dead in the field which represented typical symptoms of the infection.

IX. —BIBLIOGRAFIA

1. ALCOCER GOMEZ, L.— El combate microbiológico de algunas plagas por medio de agentes patógenos para insectos. Fitófilo. (México). Secretaría de Agricultura y Ganadería. Boletín trimestral No. 60. 1968. pp. 5-23.
2. ARAGON, J. H.— Control microbiológico de plagas (larvas de lepidóptera) en el Algodonero (*Gossypium hirsutum* L.) mediante el uso de la bacteria entomófaga *Bacillus thuringiensis* Berliner. Acta Agronómica Palmira. 14 (1-4): 103-224. 1964.
3. ARUGA, H., YOSHITAKE, N. y WATANAVE, H.— Algunos factores que controlan el tamaño de los poliedros citoplasmáticos de *Bombyx mori* Linn. (En inglés). Journal of Insect Pathology. 5 (1): 72-77. 1963.
4. BERGOLD, G. H.— Estructuras de los virus de los insectos. En inglés). Journal of Insect Pathology. (5) (1): 111-128. 1963.
5. BIRD, F. T.— Transmission of some insect viruses with particular reference to ovarial transmission and its importance in the development of epizootics. Journal of Insect Pathology. 3 (4): 352-380. 1961.
6. BUCHER, G. E.— Disease of the larvae of tent caterpillars caused by a sporeforming bacterium. Can. Jour. Microbiol. No. 3: 695-709. 1957. (Res. en Biological Abs. 32 (2): 575 1958).
7. CASTAÑOS MARTINEZ, G. M.— El diagnóstico de las enfermedades de los insectos. Fitófilo (México). Secretaría de Agricultura y Ganadería. Boletín trimestral No. 58: 39-47. 1968.
8. CASTELLAR, N.— Estudio biológico de las formas de Lepidópteros: *Agraulis vanillae* Linn. y *Mechanitis veritabilis* Butler. en el Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *favicarpa* Denn.) Acta Agronómica Palmira. 19 (1): 16-30. 1969.
9. CHAPMAN, J. G. y GLASER, R. W.— A preliminary list of insects which have wilt with a comparative study of their polyhedra. Journal Economic Entomology No. 8: 140-149. 1915.
10. ELMORE, J. C. y HAWLAND, F.— Diseminación artificial vs. Natural de la Poliedrosis Nuclear por contaminación de adultos del Gusano Medidor con virus (En inglés). Journal of Insect Pathology. 6 (4): 430-438. 1964.

11. EMSLEY, M. G.— The geographical distribution of the color - pattern of *Heliconius* with genetical evidence for the systematic relationship between the species. *Zoológica* 49 (4): 245-286. 1964.
12. HEIMPEL, A. M.— The pH the gut and blood of the larch sawfly *Pristiphora erichsonii* (Htg) and other insects with reference to the pathogenicity of *Bacillus cereus* Fr. *Can. Jour. Zool.* No. 33: 99-106. 1955. (Res. en Biol. Abs. 29: 2480. 1955).
13. HUGHES, K. M.— An annotated list and bibliography of insects reported to have virus diseases. *Hilgardia* 26 (14): 597-629. 1957.
14. ————. — The development of an insects virus within cells of its host. *Hilgardia* 22 (12): 391-406. 1953.
15. PASCHKE, J. D. y HAMUR, J. S.— Una poliedrosis nuclear de *Rachiplusia ou* (Guen.) (En inglés). *Journal of Insect Pathology* 3 (3): 333-334. 1961.
16. POWSEN, M. B. y JONG, D. J. de.— A Nuclear Polyhedrosis of *Orthosia incerta* (Hufnagel) (Lepidóptera Noctuidae). *Journal of Insect Pathology.* 6 (3): 376-378. 1964.
17. POVEDA, D. y SCHWITZER, D.— Estudio biológico del *Prodenia orbithigalli* (Guen.) y del *Prodenia sunia* (Guen.) en tres hospederos. *Acta Agronómica.* Palmira. 14 (1-4): 71-102. 1964.
18. STAIR, G.— Disemination of nuclear polyhedrosis virus against the forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria* (Hübner) (Lepidóptera: Lasiocampidae). *The Canadian Entomology* 96 (7): 1017-1020.. 1964.
19. STEINHAUS, E. A.—Pest control by bacteria alfalfa caterpillar in field reduced to sub-economic levels within two days by *Bacillus* applied as Spray. *Calif. Agriculture.* 5:5. 1951.
20. ————. Efecto de las enfermedades sobre las poblaciones de Insectos. (En Inglés). *Hilgardia.* 23 (9): 197-261. 1954.
21. ————. New records of insect-virus diseases. *Hilgardia.* 26 (7): 417-430. 1957.
22. ————. Principles of Insect Pathology. New York. McGraw-Hill Book Co. Inc. 1949. 757 p.
23. ————. Enfermedades infecciosas de los insectos. *The Yearbook of Agriculture. Insectos. Plagas de la Agricultura y sistemas para combatirlas.* Ed. Herrero S. A. México. 1965. 436 p.
24. ————. y MARSH, C. A.— Report of Diagnosis of Diseased Insects. 1951-1961. *Hilgardia.* 33 (9): 349-490. 1962.
25. STELZER, M. J.— Control de *Malacosoma fragile* incurva, con aplicación aérea de un virus de la poliedrosis nuclear y el *Bacillus thuringiensis Berliner* (En Inglés). *Journal of Economic Entomology.* 60 (1): 38-41. 1967.

26. SMITH, M. K.— The insect viruses. In "The viruses". Vol. 3. pp. 369-392. Academic Press. New York. (F. M. Buernet, ed.).
27. TANADA, Y.— Origen probable y Diseminación de un virus de la poliedrosis del "Gusano Ejército" en Haway. (En Inglés). Journal of Economic Entomology 50 (2): 118-120. 1957.
28. WALLIS, R. C.— Incidence of polyhedrosis of gypsi-moth larvae and the influence of Relative Humidity. Journal of Economic Entomology. 50 (5): 580-583. 1957.
29. WOODALI, K. L. y DITMAN, L. P.— Control of the cabbage looper (*Trichoplusia ni*) and corn earworm with nuclear polyhedrosis viruses. Journal of Economic Entomology. 60 (9): 1558-1561. 1967.