

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Escuela Profesional de Agronomía



TESIS

Para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

SINTOMATOLOGÍA Y EFICIENCIA DE *Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis* SOBRE ADULTOS DE *Diabrotica* Chevrolat (Coleoptera: Chrysomelidae) Y SU VIABILIDAD EN FORMULACIONES COMERCIALES IN VITRO.

PRESENTADO POR

BACHILLER: Roger Christian Torres Aliaga.

ASESORES: Ing. Agr. Alonso Vela Ahumada.

Ing. Agr. Mg. Sc. Jhon Anthony Vergara Copacondori

CAJAMARCA - PERÚ

-2025-

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. **Investigador:** Roger Christian Torres Aliaga
DNI: 25745060
Escuela Profesional/Unidad UNC: Agronomía
2. **Asesor:** Ing. Alonso Vela Ahumada
3. **Facultad/Unidad UNC:** Ciencias Agrarias
4. **Grado académico o título profesional:**
 Bachiller Título profesional Segunda especialidad
 Maestro Doctor
5. **Tipo de Investigación:**
 Tesis Trabajo de investigación Trabajo de suficiencia profesional
 Trabajo académico
6. **Título de Trabajo de Investigación:** "SINTOMATOLOGÍA Y EFICIENCIA DE *Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis* SOBRE ADULTOS DE *Diabrotica* Chevrolat (Coleoptera: Chrysomelidae) Y SU VIABILIDAD EN FORMULACIONES COMERCIALES IN VITRO"
7. **Fecha de evaluación:** 28/05/2025
8. **Software antiplagio:** TURNITIN URKUND (OURIGINAL) (*)
9. **Porcentaje de Informe de Similitud:** 17%
10. **Código Documento:** oid:3117:462833709
11. **Resultado de la Evaluación de Similitud:** 17%
 APROBADO PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO

Fecha Emisión: 28/05/2025

<i>Firma y/o Sello Emisor Constancia</i>
 _____ Dr. Alonso Vela Ahumada 26604965

* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA"

Fundada por Ley N° 14015, del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Secretaría Académica



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Cajamarca, a los veintisiete días del mes de mayo del año dos mil veinticinco, se reunieron en el ambiente 2C - 202 de la Facultad de Ciencias Agrarias, los miembros del Jurado, designados según **Resolución de Consejo de Facultad N° 234-2025-FCA-UNC, de fecha 12 de mayo del 2025**, con la finalidad de evaluar la sustentación de la TESIS titulada: "**SINTOMATOLOGÍA Y EFICIENCIA DE *Beauveria bassiana* Y *Bacillus thuringiensis* SOBRE ADULTOS DE *Diabrotica* Chevrolat (Coleoptera: Chrysomelidae) Y SU VIABILIDAD EN FORMULACIONES COMERCIALES IN VITRO**", realizada por el Bachiller **ROGER CHRISTIAN TORRES ALIAGA** para optar el Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

A las diecisiete horas y cero minutos, de acuerdo a lo establecido en el **Reglamento Interno para la Obtención de Título Profesional de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca**, el Presidente del Jurado dio por iniciado el Acto de Sustentación, luego de concluida la exposición, los miembros del Jurado procedieron a la formulación de preguntas y posterior deliberación. Acto seguido, el Presidente del Jurado anunció la aprobación por unanimidad, con el calificativo de dieciséis (16); por tanto, el Bachiller queda expedito para proceder con los trámites que conlleven a la obtención del Título Profesional de **INGENIERO AGRÓNOMO**.

A las dieciocho horas y cuarenta minutos del mismo día, el Presidente del Jurado dio por concluido el Acto de Sustentación.

Dr. Isidro Rimarachín Cabrera
PRESIDENTE

MBA. Ing. Santiago Demetrio Medina Miranda
SECRETARIO

Ing. José Lizandro Silva Mego
VOCAL

Ing. Alonso Vela Ahumada
ASESOR

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a Sarita, Elmer y Sabina, mi esposa e hijos por ser mi soporte emocional y la razón de mis días. A Rosa y Elmer, mis padres, por su infinito amor y apoyo, construyeron aquello que soy hoy en día. A Nely y Evelyn mis hermanas, por su cariño y apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

AGRADECIMIENTO

Al Ing. Mg Sc. Jhon Vergara Copacondori, por su asesoramiento y orientación durante la realización del presente trabajo de investigación.

Al Ing. Alonso Vela Ahumada por sus consejos claros, puntuales y su opinión siempre optimista, producto de su experiencia y conocimiento, fue un aporte valioso en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Al Ing. Jhonatan Huaman, por sus consejos y tiempo durante el cual tuvimos oportunidad de dialogar y discutir aspectos relacionados no solo al trabajo de tesis sino también de lo amplio, interesante e importante que resulta nuestra profesión.

A Ricardo y Eder, estudiantes de pre grado por su ayuda y momentos gratos de interesantes conversaciones durante el tiempo que duro el presente trabajo.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
CAPITULO I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
CAPITULO II REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Antecedentes de la investigación	4
2.2 Bases teóricas	5
2.2.1 <i>Diabrotica</i> spp., (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)	5
A. Taxonomía.	5
B. Morfología.	6
B.1 Huevo.	6
B.2 Larva.	6
B.3 Pupa.	7
B.4 Adulto.	7
C. Biología.	8
C.1 Huevos.	9
C.2 Larvas.	10
C.3 Pupas.	10
C.4 Adultos.	10
D. Daños.	11
2.2.2 <i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill.	13
A. Taxonomía.	13
B. Características.	13
C. Modo de acción.	14
2.2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner, 1911	15
A. Taxonomía.	15
B. Características.	15
C. Modo de acción.	16
2.2.4 Control biológico de <i>Diabrotica</i> spp. (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae).	18
2.2.5 Definición de términos básicos	19

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Ubicación.	20
3.2 Materiales.	20
3.2.1 Material de campo	20
3.2.2 Material biológico	21
3.2.3 Productos biológicos comerciales	21
3.3 Materiales y equipo de laboratorio	21
3.4 Metodología	22
3.4.1 Trabajo de campo	22
3.4.2 Trabajo de laboratorio	22
A. Viabilidad de los aislados de <i>B. bassiana</i> y recuperación de <i>B. thuringiensis</i> , en formulaciones comerciales de biocontroladores.	22
A.1 Preparación de adultos colectados de <i>Diabrotica</i> spp.	22
A.2 Viabilidad de los aislados de <i>B. bassiana</i> en formulaciones comerciales de biocontroladores.	22
A.3 Recuperación de <i>B. thuringiensis</i> , en formulaciones comerciales de biocontroladores.	23
B. Sintomatología.	23
B.1 Optimización del protocolo de inoculación con <i>B. bassiana</i> .	23
B.2 Sintomatología en <i>Diabrotica</i> spp, inoculadas con <i>B. bassiana</i> .	24
B.3 Sintomatología en <i>Diabrotica</i> spp, inoculadas con <i>B. thuringiensis</i> .	25
C. Eficiencia en el control de adultos de <i>Diabrotica</i> spp., con suspensiones de <i>B. bassiana</i> .	25
C.1 Diseño estadístico.	26
D. Eficiencia en el control de adultos de <i>Diabrotica</i> spp., con suspensiones de <i>B. thuringiensis</i> .	28
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Viabilidad de los aislados de <i>B. bassiana</i> y recuperación de <i>B. thuringiensis</i> , en formulaciones comerciales de biocontroladores.	29
4.1.1 Viabilidad de los aislados de <i>B. bassiana</i>	29
4.1.2 Recuperación de u.f.c de <i>B. thuringiensis</i>	33
4.2 Sintomatología.	36
4.2.1 Manejo de adultos de <i>Diabrotica</i> spp., en el laboratorio.	36
4.2.2 Optimización del protocolo de inoculación con <i>B. bassiana</i> .	37
A. Inoculación directa de una suspensión de conidios en el abdomen del insecto.	37

B. Inoculación por inmersión en suspensión de conidios con control de humedad	38
4.2.3 Sintomatología causada por <i>B. <u>bassiana</u></i>	41
4.2.4 Sintomatología causada por <i>B. thuringiensis</i>	43
4.3 Eficiencia en el control de adultos de <i>Diabrotica spp.</i> con inoculaciones de <i>B. bassiana</i> y <i>B. thuringiensis</i> en formulaciones comerciales.	45
4.3.1 <i>B. bassiana</i>	45
4.3.2 <i>B. thuringiensis</i>	50
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
5.1 Conclusiones	55
5.2 Recomendaciones.	56
CAPÍTULO VI REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	57
ANEXOS	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Productos utilizados en la presente investigación	21
Tabla 2 Concentración de conidios en los productos comerciales y cantidad de conidios por mL de suspensión	26
Tabla 3 Tabla de Análisis de varianza ANOVA para el efecto de 03 dosis de dos formulaciones comerciales de <i>B. bassiana</i> sobre adultos de <i>Diabrotica</i> spp.	27
Tabla 4 Concentración de conidios viables ajustada a partir de la siembra de diluciones seriadas de <i>B. bassiana</i> de dos formulaciones comerciales, en medio SDA.	30
Tabla 5 Concentración de u.f.c de <i>B. thuringiensis</i> obtenidas a partir de la siembra de diluciones seriadas de. de dos formulaciones comerciales, en medio YDA.	34
Tabla 6 Influencia de la humedad en la eficiencia de la infección de adultos de <i>Diabrotica</i> spp., con conidios de <i>B. bassiana</i> (Beauvesol)	39
Tabla 7 Análisis de Varianza (ANOVA) de la eficiencia de <i>B. bassiana</i> en la mortandad de <i>Diabrotica</i> spp.	46
Tabla 8 Comparación de medias (método de Fisher – LSD) a un nivel de confianza de 95 %	46
Tabla 9 Análisis Probit de la relación de la mortalidad de adultos de <i>Diabrotica</i> spp y la concentración de conidios de <i>B. bassiana</i> (Beauvesol)	49
Tabla 10 Eficiencia de la infección de adultos de <i>Diabrotica</i> spp., con <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> .	52
Tabla 11 Eficiencia de la infección de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> , con aplicación de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Ubicación del experimento	20
Figura 2 Colonias típicas de <i>B. bassiana</i> en medio SDA	29
Figura 3 Colonias típicas de <i>B. thuringiensis</i> en medio YDA	33
Figura 4 Adultos de <i>Diabrotica</i> spp., muertos mostrando desarrollo de micelio fungoso de <i>B. bassiana</i> bajo condiciones de alta humedad en cámara húmeda.	41
Figura 5 Adulto de <i>Diabrotica</i> spp., mostrando la esporulación externa de <i>B. bassiana</i>	42
Figura 6 Vista ventral de <i>Diabrotica</i> spp., muerto por acción de <i>B. thuringiensis</i> .	44
Figura 7 Eficiencia en el control de adultos de <i>Diabrotica</i> spp., con diferentes concentraciones de dos formulaciones comerciales de <i>B. bassiana</i> .	47
Figura 8 Adultos de <i>Diabrotica</i> spp., muertos por acción de <i>B. thuringiensis</i> después de 96 horas de ingestión de alimento envenenado.	51
Figura 9 Adultos de <i>Diabrotica</i> spp. alimentadas con hojas de papa tratadas con Biospore (<i>B. thuringiensis</i> var Kurstaki).	53

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Medio de Cultivo Agar Saboraud (SDA) modificado	70
Anexo 2 Medio (YDA) modificado	70

RESUMEN

El género *Diabrotica* spp., agrupa especies de plagas que ocasionan pérdidas en cultivos agrícolas. Este trabajo se planteó como objetivo; determinar la viabilidad, sintomatología y eficiencia de formulaciones comerciales de *Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis in vitro*, en el control de *Diabrotica* spp. La viabilidad se obtuvo mediante la técnica de siembra de diluciones seriadas, la sintomatología se registró por observación directa de síntomas y la eficiencia se determinó mediante inoculaciones de diluciones seriadas. La viabilidad fue del orden de 10^{-1} conidios por mL para Beauvesol y Yurak (*B. bassiana*) en relación a la información de la etiqueta y de un 10^{-1} (Beauvesol) y 10^{-2} (Yurak) evaluados 5 meses después, la recuperación de unidades formadoras de colonias de *B. thuringiensis* de Laojita y Bio Spore (*B. thuringiensis*) fue 10^{-6} y 10^{-5} respectivamente. Los síntomas observados en adultos infectados con *B. bassiana* fueron; aletargamiento, descoordinación de apéndices, parálisis y muerte, mientras que la inoculación con *B. thuringiensis*, causó cese de alimentación, falta de coordinación motora y muerte. La eficiencia del Beauvesol 10^{-6} (94,99 %) fue significativamente mayor, en relación al Beauvesol 10^{-5} (59,99 %) y 10^{-4} (29,99 %), Yurak 10^{-6} (24,99 %) y Yurak 10^{-4} , 10^{-3} (>6 %). Laojita causó el 100 % de mortandad, mientras que el Bio Spore no tuvo efecto sobre *Diabrotica* spp. Las formulaciones de biocontroladores, son efectivas para controlar especies de *Diabrotica* spp., pero no son uniformes en su eficiencia.

Palabras clave: *Diabrotica* spp., *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, formulación comercial

ABSTRACT

The genus *Diabrotica spp.* groups pest species that cause losses in agricultural crops. The objective of this work was to determine the viability, symptomatology and efficiency of commercial formulations of *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* in vitro, in the control of *Diabrotica spp.* Viability was obtained by means of the serial dilution seeding technique, symptomatology was recorded by direct observation of symptoms and efficiency was determined by serial dilution inoculations. Viability was in the order of 10^{-1} conidia per mL for Beauvesol and Yurak (*B. bassiana*) in relation to label information and 10^{-1} (Beauvesol) and 10^{-2} (Yurak) evaluated 5 months later, recovery of *B. thuringiensis* colony forming units from Laojita and Bio Spore (*B. thuringiensis*) was 10^{-6} and 10^{-5} respectively. The symptoms observed in adults infected with *B. bassiana* were; lethargy, uncoordinated appendages, paralysis and death, while inoculation with *B. thuringiensis*, caused cessation of feeding, lack of motor coordination and death. The efficiency of Beauvesol 10^{-6} (94.99 %) was significantly higher, relative to Beauvesol 10^{-5} (59.99 %) and 10^{-4} (29.99 %), Yurak 10^{-6} (24.99 %) and Yurak 10^{-4} , 10^{-3} (>6 %). Laojita caused 100 % mortality, while Bio Spore had no effect on *Diabrotica spp.* The biocontrol formulations are effective in the control of *Diabrotica* species.

Key words: *Diabrotica spp.*, *Beauveria bassiana*, *Bacillus thuringiensis*, **commercial formulation**

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Las plagas como amenaza de una especie (s) es la combinación de la probabilidad de su introducción en un nuevo lugar y la probabilidad de establecimiento exitoso después de haber sido introducido (Paini et al., 2016), asimismo, mientras que la probabilidad de llegada está estrechamente relacionada con el comercio internacional (Paini et al., 2016; Levine & D'Antonio, 2003, Westphal et al., 2008), la probabilidad de establecimiento de una especie plaga está determinada por la presión de inóculo (número de individuos de una especie plaga) y las limitaciones abióticas y bióticas (la disponibilidad de hospedadores, y enemigos naturales), que debe superar la plaga (Perkins et al., 2011; Bacon et al., 2013), Cuando una especie plaga es endémica en un lugar determinado, entonces su dinámica poblacional y daño solo estarán determinados por la interacción con la biota y las características medioambientales de su entorno.

Las diabroticas se alimentan de flores, hojas y raíces de una amplia variedad de plantas herbáceas, incluidos cultivos agrícolas, hortalizas, frutas y plantas ornamentales, y son vectores de enfermedades virales (Rojas-Sandoval, 2022). Se ha determinado que *D. virgifera* LeConte, ocasiona pérdidas de aproximadamente mil millones de dólares al año en E.E.U.U. (Burchett 2001). En América del Sur, se ha reportado reducciones del rendimiento del maíz en el orden del 13 % cuando hay altas infestaciones de estadios larvales de *D. speciosa* (Rojas-Sandoval, 2022).

El control de adultos y larvas de *D. speciosa*, plaga de importancia económica en América del Sur se basa en el uso de insecticidas químicos. La determinación del umbral de daño de esta plaga, no ha sido establecido en detalle y faltan más estudios que lo soporten, algunas aproximaciones para establecer este parámetro mencionan la relación con la defoliación del frijol y los daños radiculares causados por las larvas en el maíz. Debido a su hábito migratorio y la facilidad de moverse entre cultivos, causa

frecuentes reinfestaciones, por lo que el control de adultos demanda varias aplicaciones de insecticidas, sobre todo cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la plaga, aunque esto está determinado por la respuesta del hospedero al daño en función de su tolerancia, fenología, entre otros, (los daños en papa son significativos en plantas jóvenes y son más tolerables en plantas adultas). El control químico presenta además un impacto ambiental y social negativo si no hay un uso racional de insecticidas, ya que la mayoría de los ingredientes activos utilizados en el control de diabroticas son altamente tóxicos y presentan riesgo de contaminación ambiental (Ávila & Santana, 2013). Por otro lado, el impacto negativo en la salud ha hecho que muchos insecticidas, que aun siendo eficientes en el control de plagas hayan sido prohibidos por la legislación vigente en muchos países o regiones (ej., Clorpirifos en la U.E., EE.UU., Perú, entre otros).

El uso de microorganismos para el control biológico de larvas de *D. speciosa*, como el uso de hongos entomopatógenos presenta un gran potencial, debido a que el suelo es un entorno estable referido a temperatura y humedad relativa, especialmente en sistemas de siembra directa (Ávila & Santana, 2013). Varios aislamientos de *B. bassiana* han sido eficaces contra diferentes estadios de desarrollo de plagas de insectos de importancia económica en condiciones de laboratorio, invernadero y campo. Los hongos suelen infectar al hospedador por contacto directo (infección primaria) o mediante la germinación de los nuevos propágulos a partir de cadáveres infectados (infección secundaria) (Zimmermann, 2007). Del mismo modo, *B. thuringiensis* (Berliner) es una bacteria entomopatógena que sintetiza diferentes endotoxinas y proteínas insecticidas *que* han demostrado su potencial como agentes de biocontrol y su bioseguridad sostenible frente a los enemigos naturales (Palma et al., 2014).

Siendo en la región Cajamarca, la agricultura la actividad económica principal de las familias sobre todo en la zona rural, la cual está sometido a factores que impactan directamente en la producción, los problemas fitosanitarios limitan la producción y por

ende afectan directamente la dieta de las familias que utilizan los productos y los ingresos de la comercialización de sus cultivos y sus derivados de manera recurrente. En Cajamarca los campos de cultivo de papa, maíz, alfalfa, cucurbitáceas, entre otros, suelen estar infestados por Diabroticas, provocando perdidas en la cantidad y calidad de cosecha por los daños que ocasiona.

No existen en la región alternativas de control eficientes al control químico y que sean amigables con el medio ambiente, relacionadas con el uso de biocontroladores o sus subproductos, estos estudios contribuirían a optimizar el uso de entomopatógenos para reducir la densidad poblacional de este insecto plaga, como parte del manejo agronómico dentro de la producción agrícola sustentable del cultivo.

¿Cuál es la sintomatología y eficiencia de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill y *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 sobre adultos de *Diabrotica* Chevrolat (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) y su viabilidad en formulaciones comerciales in vitro?, son las interrogantes que nos planteamos resolver con el objetivo de contribuir al conocimiento del comportamiento de agentes de biocontrol en el control *in vitro* de adultos de *Diabrotica spp.*

1.1 Objetivo general

Determinar la sintomatología y eficiencia de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. y *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911 sobre adultos de *Diabrotica spp.*, (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae) y su viabilidad in vitro.

1.2 Objetivos específicos

Determinar la viabilidad de los conidios de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill en formulaciones comerciales.

Determinar la sintomatología que ocasionan *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill, y *Bacillus thuringiensis* (Zimm) en adultos de *Diabrotica spp.*

Evaluar la eficiencia de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill, y *Bacillus thuringiensis* (Zimm), en el control de adultos de *Diabrotica spp.*

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes de la investigación

Bustamante (2024), realizó un trabajo de investigación en el cultivo de alfalfa de instalado con la variedad SW 8210, en el C.P. Agopampa Baja, ubicado en el distrito de Cajamarca, provincia y región Cajamarca, el objetivo planteado fue determinar el efecto de los hongos entomopatógenos, *B. bassiana* y *Lecanicillium lecanii* sobre *Diabrotica spp.*, obteniendo como resultado que, *B. bassiana* a una concentración de 4.8×10^{11} conidios/L) ocasionó mayor mortalidad de adultos de *D. undecimpunctata* (47,3 %), 7 días después de la aplicación, siendo más efectivo que *L. lecanii* (36,8 %). Los principales síntomas mostrados en *D. undecimpunctata* infectadas por *B. bassiana* y *L. lecanii* fueron movimientos involuntarios y descoordinados, parálisis, decoloración, deshidratación, muerte del insecto y posterior presencia de micelio sobre los cadáveres.

Nussenbaum (2014), se planteó como objetivo general seleccionar aislamientos nativos los entomopatógenos; *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) que fuesen patogénicos al picudo del algodón. Obtuvieron aislamientos de muestras de suelo e insectos infectados y cepas de la micoteca del Laboratorio de Hongos Entomopatógenos (IMYZA, INTA). Evaluó tanto patogenicidad como virulencia de aislamientos de *M. anisopliae* (28) y de *B. bassiana* (66), así como, los efectos sobre la alimentación y oviposición de adultos de *Antonomus grandis*. Adicionalmente, evaluó otras características de los entomopatógenos considerados en su investigación; compatibilidad con insecticidas químicos y su efecto conjunto sobre la plaga además de la tolerancia a altas temperaturas de los entomopatógenos. Finalmente, evaluó algunas características de producción masiva de conidios, realizando evaluaciones en campo utilizando los hongos biocontroladores, obteniendo que *M. anisopliae* (aislamientos Ma50 y Ma20) resultaron más virulentos a una CL_{50} de $1,13 \times 10^7$ y $1,20 \times 10^7$ conidios/mL, respectivamente. Observó además disminución en

la alimentación de hembras infectadas con los aislamientos Ma20 y Bb23 y disminución en la oviposición (Ma20). Los aislamientos seleccionados de *M. anisopliae* resultaron compatibles con los insecticidas piretroides, siendo más tolerantes a T° altas.

Oyediran et al., (2015) determinaron en un estudio la susceptibilidad de *D. barberi* a las proteínas mCry3A y eCry3.1Ab de *B. thuringiensis*, mediante un ensayo de alimento envenenado. Se expuso a larvas *D. barberi* a distintas concentraciones de mCry3A y eCry3.1Ab, en una dieta artificial. La mortalidad de las larvas se evaluó después de 7 días. mCry3A y eCry3.1Ab resultaron tóxicas para *D. barberi*. Los valores LC₅₀ y LC₉₉ para mCry3A fueron de 5.13 y 2482.31 µg/mL, respectivamente, Para eCry3.1Ab, los valores LC₅₀ y LC₉₉ fueron de 0,49 y 213,01 µg/mL. Concluyendo que la proteína eCry3.1Ab fue más letal en larvas *D. barberi* que mCry3A.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Diabrotica spp.*, (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae)

A. **Taxonomía.** Según Flowers (2004); Thomas (2008) & Ruggiero et al., (2015), la clasificación taxonómica de *Diabrotica spp.*, es la siguiente:

Super reino: Eukaryota.
 Reino: Animalia (Metazoa)
 Sub reino: Bilateria.
 Infra reino: Protostomia.
 Super filo: Ecdysozoa
 Filo: Arthropoda
 Sub filo: Hexapoda (Uniramia)
 Clase: Insecta
 Sub Clase: Pterygota
 Infra clase: Neoptera
 Super Orden: Holometabola
 Orden: Coleoptera.

Sub Orden: Polyphaga
Series: Cucujiformia.
Super familia: Chrysomeloidea.
Familia: Chrysomelidae.
Subfamilia: Galerucinae.
Tribu: Luperini.
Subtribu: Diabroticina.
Género: *Diabrotica* Chevrolat.

B. Morfología. La descripción corresponde a las especies más frecuentes en nuestro medio, *D. speciosa*, *D. undecimpunctata undecimpunctata* y *D. undecimpunctata howardi*.

B.1 Huevo. En *D. speciosa* son ovoides de 0,74 x 0,36 mm, de color blanco claro a amarillo pálido, se observa una fina reticulación que aparece como un patrón de crestas poligonales que encierran un número variable (12 – 30) de punteaduras (Rojas-Sandoval, 2022). *D. undecimpunctata undecimpunctata* y *D. undecimpunctata howardi* presentan similares características, huevos generalmente ovalados, de 0,7 x 0,5 mm, de color amarillo claro al inicio, variando a amarillo oscuro a medida que envejecen, la superficie está cubierta de polígonos primarios y a veces, de crestas secundarias (siempre presentes en *D. undecimpunctata howardi*), útiles para la identificación específica vistas al microscopio electrónico de barrido (SEM). Las subespecies de *D. undecimpunctata* son indistinguibles (EPPO, 2001a, EPPO, 2021b).

B.2 Larva. En *D. speciosa* el primer instar mide aproximadamente 1,2 mm de longitud y el tercer instar maduro unos 8,5 mm, las larvas son subcilíndricas; de color blanco calcáreo; cápsula cefálica varia de amarillo opaco a marrón claro, con suturas epicraneales y frontales más claras, setas largas marrón claro, mandíbulas marrón rojizo, antenas y palpos de color amarillo pálido, el cuerpo está cubierto de cortas y escasas setas oscuras, la placa pro - torácica es irregular de color marrón claro, la placa

anal es marrón oscura en el noveno segmento con un par de pequeños cuernos (urogomphi), el décimo segmento forma un pigópodo, que sirve de órgano de locomoción y adherencia (Rojas-Sandoval, 2022). Las larvas de *D. undecimpunctata undecimpunctata* y *D. undecimpunctata howardi* no son distinguibles en la fase larvaria, tienen el cuerpo blanco amarillento, arrugado, de 12-19 mm de longitud, con seis patas muy pequeñas, y la cabeza marrón grisácea (EPPO, 2021a; EPPO, 2021b).

B.3 Pupa. La pupas de *D. speciosa* miden de 5,8 a 7,1 mm de longitud, son de color blanco. Las hembras tienen un par de tubérculos cerca del ápice (Rojas-Sandoval, 2022). Las pupas de *D. undecimpunctata undecimpunctata* y *D. undecimpunctata howardi* tienen características similares, de 6,3 mm X 3 mm de ancho, de color blanco al inicio y luego amarillo, la punta del abdomen lleva un par de espinas robustas y espinas más pequeñas en la parte dorsal de los segmentos abdominales restantes, existe dimorfismo sexual; las hembras tienen un par de papilas en el vientre, cerca del ápice del abdomen, ausentes en machos (EPPO, 2021a; EPPO, 2021b).

B.4 Adulto. Los adultos de *D. speciosa* miden 5,5 – 7,3 mm de longitud; las antenas de 4 – 5 mm; son de color verde, con manchas amarillas; antenas filiformes y oscuras (marrón rojizo a negro) de longitud casi igual a la del cuerpo, más largas en los machos, los tres primeros segmentos basales más claros; cabeza marrón rojiza a negro; labro, escutelo, meta tórax, tibia y tarsos negros; cada élitro presenta tres manchas transversales ovales grandes, manchas basales más grandes y generalmente rojizas hacia el callo humeral, el resto amarillas; ventralmente, la cabeza y el metatórax son de color marrón oscuro, protórax verde, mesotórax y abdomen marrón claro o amarillo verdoso. Pronoto bifoveado, convexo, liso, brillante, una cuarta parte más ancho que largo; Los machos tienen un esclerito extra en el ápice del abdomen que lo hace parecer romo, comparado con el ápice bastante puntiagudo de las hembras (EPPO, 2005, Rojas-Sandoval 2022).

Los adultos de *D. undecimpunctata undecimpunctata* tienen una longitud de 4.8 – 6.9 mm; los élitros son verdes, amarillos o marrón rojizo, maculados con 12 máculas negras redondas, cabeza negra con antenas filiformes; pronoto amarillo, sub cuadrado, bifoveado; escutelo negro. *D. undecimpunctata undecimpunctata* puede separarse de otras subespecies por las siguientes características: patas y abdomen totalmente negros, parcialmente pálidos en otras subespecies (EPPO, 2021a).

D. undecimpunctata howardi tiene una longitud de 5.2 – 7.5 mm; élitros verdes, amarillos o rojizos, maculados con 12 manchas redondas negras, cabeza negra con antenas filiformes bicolors o tricolors, pronoto amarillo, subcuadrado, bifoveado, escutelo negro, abdomen completamente amarillo, tibias y fémures bicolors; amarillo, de la mitad a los dos tercios oscurecido (negro o marrón), *D. undecimpunctata* subsp. *howardi* puede separarse de *D. undecimpunctata* subsp. *undecimpunctata* y *D. undecimpunctata* subsp. *duodecimnotata* por el color del abdomen y por manchas en los élitros, en *D. undecimpunctata* subsp. *howardi* son más pequeñas que en *D. undecimpunctata* subsp. *undecimpunctata*, pero más grandes que en *D. undecimpunctata* subsp. *duodecimnotata* y *D. undecimpunctata* subsp. *tenella*. El adulto de *D. undecimpunctata* subsp. *howardi* es más grande y robusto que el de *D. undecimpunctata* subsp. *Tenella* (CABI, 2021b).

C. Biología. Las especies del género *Diabrotica* se alimentan como adultos de las hojas y el polen de sus plantas hospedadoras; una hembra puede depositar entre 300 y 400 huevos en el suelo a una profundidad de unos 5-15 cm cerca de las raíces de las plantas hospedadoras, y las larvas se desarrollan mientras se alimentan y hacen túneles en las raíces de las plantas hospedadoras. El desarrollo larvario abarca tres estadios y las larvas maduras empupan en una cámara del suelo construida por la larva del tercer estadio tardío. El estado de pupa dura entre 7 y 10 días (Branson & Krysan, 1981). Los adultos recién eclosionados son de cuerpo blando y color claro, con patrones elitrales apenas visibles (Eben, 2022).

El ciclo vital completo de las especies multivoltinas se completa en unos 30 días. Además, las especies univoltinas pasan el invierno en forma de huevos, y las multivoltinas pasan la estación seca y fría a menudo como adultos diapáusicos (Branson & Krysan, 1981; Krysan, 1986). Los estudios realizados en Norteamérica revelan que en el género prevalecen dos ciclos de vida básicamente diferentes: las especies del grupo fucata son multivoltinas e invernan como adultos, mientras que las del grupo virgífera tienen un ciclo de vida univoltino e invernan como huevos. Cabe destacar que los huevos de *D. viridula* (del grupo virgífera) de Perú eclosionaron sin diapausa aparente. En Argentina, *D. speciosa* tiene el ciclo vital típico del grupo fucata. La naturaleza univoltina del complejo *D. virgífera zeae* - *D. virgífera virgífera* prevalece en aquellas áreas geográficas donde se ha demostrado que los representantes del grupo fucata tienen hasta seis generaciones por año. En esas zonas tropicales, las especies del grupo virgífera parecen estar adaptadas a la alternancia de estaciones húmedas y secas. Además, existen pruebas de que algunos huevos de la *D. barbieri* permanecen en diapausa durante dos años. Se ha caracterizado la resistencia al frío de los huevos invernantes en climas septentrionales, los huevos de *D. virgífera virgífera* son aparentemente menos resistentes al frío que los de *D. Barbieri* (Krysan, 1986).

C.1 Huevos. *D. speciosa* deposita los huevos en el suelo, cerca de la base de la planta hospedera, en racimos ligeramente aglutinados por una secreción incolora. (Rojas-Sandoval, 2022). En *D. undecimpunctata undecimpunctata* el número de huevos producidos es bastante variable, disminuyendo a medida que los escarabajos pasan de la generación 1 a la 2 y a la 3^{era}. La oviposición se realiza preferentemente, sobre terrones o en grietas a suelos franco arcillosos; prefieren la tierra húmeda a la seca (EPPO, 2021a). Las hembras *D. undecimpunctata howardi* ponen de 200 a 1.200 huevos individuales en el suelo, cerca de las base de las plantas hospedadoras, aparentemente prefieren en sustrato húmedo. La oviposición aumenta con el incremento de la humedad relativa (HR), la supervivencia de los huevos depende de

que haya suficiente humedad en el suelo en las primeras 24 a 72 h. Los huevos no eclosionan cuando la HR está por debajo del 75 %, mejora cuando la HR es mayor al 85 %. La temperatura óptima para la oviposición es de 29°C. dependiendo de la temperatura, los huevos eclosionan entre 7 y 10 días (EPPO, 2021b).

C.2 Larvas. Los huevos de *D. speciosa* eclosionan aproximadamente en 8 días y pasan por tres instares; estos estadios tardan en desarrollar aproximadamente 25 días, las larvas del primer estadio se alimentan en el sistema radicular del hospedante, conforme las larvas van desarrollando se alimentan en los 10 cm debajo del cuello de la planta (EPPO, 2005). Las larvas jóvenes de *D. undecimpunctata undecimpunctata* penetran en las raíces, alimentándose de ellas, al final del tercer estadio abandonan la planta, penetran en el suelo y entran en la fase prepupal (EPPO, 2021a). Las larvas de *D. undecimpunctata howardi* se alimentan durante 2-4 semanas, al final del tercer estadio, las larvas excavan en el suelo, empezando la fase prepupal que suele durar entre 6 y 8 días (EPPO, 2021b).

C.3 Pupas. Los últimos estadios larvales maduros construyen celdas ovaladas en el suelo, de 8 x 4 mm en la que empupan los teneralis (individuos recién emergidos, pálidos y de cuerpo blando, antes de completar la melanización y la esclerotización.), el periodo cura de 3 a 6 días. (EPPO 2005; Rojas-Sandoval, 2022).

C.4 Adultos. Los adultos de *D. speciosa* recién emergidos, pasan de 3-5 días en la celda pupal, presumiblemente hasta que la cutícula se oscurezca y endure, cuando jóvenes tienen un color amarillento o marrón pálido, que se vuelve verde con manchas amarillas brillantes en unos 3 días si hay alimento disponible (Rojas-Sandoval, 2022). El apareamiento ocurre de 4 – 6 días después de la emergencia, y cada hembra pone más de 1000 huevos, la mayoría en los días 16 – 56. El número de generaciones superpuestas depende de la latitud y el clima.

En las zonas tropicales, *D. speciosa* se multiplica continuamente. En el norte de Argentina, hay tres generaciones al año. Los adultos se alimentan de polen de

cucurbitáceas, girasol, entre otros. Al igual que otras *Diabrotica spp*, se asocian especialmente a las cucurbitáceas, siendo tolerantes a las cucurbitacinas. Cuando escasean las flores, pueden alimentarse de los tejidos tiernos de alfalfa, papa, maíz, frijol, entre otros, (CABI, 2005).

Las subespecies *undecimpunctata* y *howardi*, tienen una biología muy similar, los adultos de la subsp *undecimpunctata* se esconden bajo las hojas y la hojarasca y sólo son activos con una temperatura de 15-20°C. Por lo general pasan el invierno en zonas con inviernos suaves, tras pasar el invierno, los adultos se activan en primavera y se alimentan de una amplia gama de malezas en flor y plantas de cultivo y se desplazan con facilidad entre estas, se menciona migraciones entre frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), que proporciona una dieta rica en proteínas para el desarrollo de los huevos de las hembras adultas y el maíz dulce, el hospedante preferido de las larvas. Las hembras ponen de 200 a 1.200 huevos individuales en el suelo, cerca de la base de las plantas (CABI, 2021a).

D. undecimpunctata subsp. *howardi* pasa el invierno en estado adulto cerca de campos agrícolas y no hiberna. se encuentran bajo las hojas y la paja, en la hierba cercana a la base de las plantas o bajo terrones de suelo, los adultos se vuelven más activos en primavera, cuando las temperaturas alcanzan los 21° C., comienzan a alimentarse de las flores y el follaje de diversas plantas hospedadoras, Las hembras ovipositan desde inicios de primavera a inicios de junio en maíz recién emergido y en otros hospederos y prefieren ovipositar en un sustrato húmedo, suelos orgánicos o arcillosos. La oviposición aumenta con alta humedad relativa (HR), la temperatura óptima para la oviposición es de 29°C. Las hembras ponen de 200 a 1200 huevos aislados en el suelo, cerca de las bases de las plantas hospedadoras de larvas (CABI 2021b).

D. Daños. Los daños causados por *D. speciosa* pueden provocar clorosis, defoliación y retraso del crecimiento en plantas grandes (debido a una reducción de la

absorción de nutrientes), llegando a causar la muerte de plantas pequeñas. En el maíz, el ataque de larvas en plantas jóvenes produce la curvatura de los primeros entrenudos “cuello de cisne”, en ocasiones la planta se tumba en el suelo (Rojas-Sandoval, 2022).

En maní y papa, las vainas o tubérculos presentan daños externos o perforaciones. Los adultos causan daños en hojas, flores y frutos. En maíz se alimentan de las espigas, limitando la polinización y afectando el graneado (CABI, 2005). Los adultos de *D. undecimpunctata undecimpunctata* son polífagas, en cucurbitáceas hacen agujeros en cotiledones, hojas y a veces en frutos blandos y perforaciones y cicatrices en estolones y frutos, pero no son específicos de esta especie; altas densidades de adultos pueden inducir una defoliación severa, las larvas se alimentan de raíces y perforan la base de tallos del maíz, frijol, cereales (*Hordeum sp.*, *Triticum sp.*), pero no de cucurbitáceas, plantas de maíz infestadas muestran el efecto del daño en la raíz cuando tienen entre 20 y 50 cm; crecen mal, presentan clorosis y atrofia en el tallo atacado, la perforación produce la marchitez del cogollo pudiendo causar la muerte de la planta. Las plántulas de cereales son atacadas por las larvas, plantas viejas son menos susceptibles al daño de raíz (CABI, 2021a).

Los adultos la subsp., *howardi* son polífagas; las cucurbitáceas presentan perforaciones en las hojas, cicatrices en estolones y frutos tiernos, provocando el marchitamiento y reducción de la producción. Las cicatrices en la corona de la planta son típicas de los daños causados por los adultos, estos dañan los cultivos al causar cicatrices en los frutos, disminuyendo su valor de mercado. Los frutos de los melones de piel lisa son más susceptibles a los daños de los adultos antes de que la piel se vuelva demasiado dura para penetrarla. Las larvas se alimentan de las raíces y hacen túneles a través de los tallos. Pueden causar lesiones ocasionales en la superficie o la corteza de los frutos de cucurbitáceas que entran en contacto con el suelo. La alimentación de las larvas puede aumentar la incidencia de la marchitez por *Fusarium*. Las plantas de maíz suelen mostrar el efecto de la infestación larvaria de las raíces

cuando tienen una altura de 20-50 cm; las plantas crecen mal, se atrofian y amarillean, pero pueden sobrevivir y afectando el rendimiento. Si el tallo es atacado, el daño interno hace que se marchite y muera (CABI, 2021b).

2.2.2 *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill.

A. Taxonomía. Según Kirk et al., (2008); Ruggiero et al., (2015) & Imoulan (2017), la clasificación taxonómica de *B. bassiana* es la siguiente:

Super reino: Eukaryota
 Reino: Fungi.
 Sub Reino: Dykaria (Neomycota)
 Filo: Ascomycota.
 Sub filo: Pezizomycotina.
 Clase: Sordariomycetes.
 Subclase: Hypocreomycetidae.
 Orden: Hypocreales.
 Familia: Cordycipitaceae.
 Género: *Beauveria*.
 Especie: *Beauveria bassiana* (Bals) Vuillemin.

Neotipo of *Botrytis bassiana*, aislado de una pupa de *Hyphantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae),

B. Características. Las colonias típicas son similares tanto en agar Sabouraud como en papa, dextrosa y agar (PDA), tienen de 15 - 32 mm de diámetro a los 10 días a 23 °C, de aspecto denso lanudo a poco compacto, fuertemente adherido a la superficie del medio o en forma de cojín de hasta 5 mm de grosor, al principio son blancas, a menudo se vuelven blanco amarillento. Conidios agregados en forma de racimos esféricos de 0,1 mm, entre las hifas aéreas, en masas de color blanco. El reverso de la colonia es incoloro a blanco amarillento o teñido por un pigmento soluble rojo mate difuso a intenso que decolora el medio. Inodoro. Micelio no cenocítico o

septado, ramificado, hialino, de pared lisa, de 1 - 2 mm de ancho. Células conidiogénicas solitarias, pero usualmente en grupos densos de cinco o más, de base subesférica a ampulosa de 3 - 6 mm de ancho, ápice con un raquis indeterminado geniculado y denticulado, de 1 mm de ancho, producido lateralmente en las hifas aéreas o a partir de células subyacentes, en su mayoría de 2,5 - 6 x 3 - 6 mm, conidios de 2 - 3 x 2 - 3 mm, globosos, subglobosos o elipsoides anchos, raramente elipsoides, a veces con hilio inconspicuo en la base, hialinos, sin septos, de paredes delgadas y lisas. (Rehner et al., 2016).

C. Modo de acción. Al igual que otros hongos entomopatógenos, las especies de *Beauveria* penetran a través de la cutícula de sus hospedadores. La vía de infección consta de los siguientes pasos; adhesión de la espora a la cutícula del insecto, germinación de la espora en la cutícula, penetración a través de la cutícula del insecto, vencimiento de la respuesta inmunitaria del hospedador, proliferación dentro del hospedador, crecimiento saprofítico sobre el hospedante muerto y producción de nuevos conidios. La germinación de las esporas y el éxito de la infección por *B. bassiana* dependen de varios factores, como el hospedante susceptible, el estadio del mismo y ciertos factores ambientales, como la temperatura y la humedad. *B. bassiana* es un habitante del suelo el cual proporciona un entorno adecuado para los hongos entomopatógenos al protegerlos de la luz ultravioleta y de otros factores biológicos y no biológicos que pueden limitar su distribución (Keller & Zimmerman, 1989; Meyling y Eilenberg, 2006).

Por lo general, la germinación de los conidios de *B. bassiana* comienza al cabo de unas 10 horas y se completa en 20 horas a 25 °C. Posteriormente, la espora germinada penetra en zonas no esclerotizadas de la cutícula como las articulaciones, y entre los segmentos produciendo proteasas extracelulares y quitinasas, la bassiacridina participa activamente en la actividad de la β -glucosidasa, la β -galactosidasa y la N-acetilglucosaminidasa que degradan los componentes quitinosos, permitiendo la

penetración hifal. Tras penetrar con éxito, el hongo invade otros tejidos del insecto mediante un crecimiento vegetativo extensivo y la producción de metabolitos secundarios tóxicos como brassianólidos (depsipeptido ciclo oligomérico), que causan inhibición de la acetilcolinesterasa, y beauvericina (ionóforo hexadepsipéptido ciclo oligomérico) relacionada con la liberación de enzimas hidrolíticas que permiten la penetración hifal a través del integumento del insecto y factores de virulencia que vencen el sistema inmunitario del hospedante, en última instancia, provocan la muerte del hospedante. La actividad de la beauvericina pura en la entomopatogénesis sigue siendo controvertida (Keswani et al., 2013)

2.2.3 *Bacillus thuringiensis* Berliner, 1911

A. Taxonomía. Según Maughan (2011) & Ruggiero et al., (2015), la clasificación taxonómica de *B. thuringiensis* Berliner, 1911 es la siguiente:

Super reino: Prokaryota.
 Reino: Bacteria (Eubacteria)
 Sub reino: Posibacteria
 Filo: Firmicutes o bacillota
 Clase: Bacilli
 Orden: Bacillales
 Familia: Bacillaceae
 Género: *Bacillus*
 Especie: *Bacillus thuringiensis* Berliner (1911).

B. Características. Es una bacteria aeróbica, grampositiva baciliforme, de 1,0 - 1,2 μm de ancho y 3,0 - 5,0 μm de longitud, normalmente móvil con flagelación peritrica, no numerosa. El flagelo puede unirse a células de insectos y es importante en la virulencia. Las esporas tienen forma elipsoidal, pero en su mayoría son cilíndricas y se localizan en la región central o paracentral cuando está dentro de la célula madre. Es aerobia facultativa con un rango de temperatura de crecimiento entre 5-10 °C y 40-

45 °C. La principal característica que distingue a esta especie de las demás del mismo género es la presencia intracelular de un cristal proteico. Las células cultivadas en agar nutritivo glucosado producen gran cantidad de material de almacenamiento, dando un aspecto vacuolado o espumoso. Al igual que *B. cereus*, *B. thuringiensis* da reacción positiva a la yema de huevo. La mayoría de las cepas son catalasa positiva, oxidasa negativa, hidrolizan la caseína, gelatina y almidón. Test de Voges-Proskauer positivo y utiliza el citrato como única fuente de carbono. Reduce nitratos y descompone la tirosina, no se produce desaminación de la fenilalanina. La mayoría de las cepas utilizan sacarosa y otros azúcares, pero *B. thuringiensis* serovar israelensis no fermenta este disacárido. En ocasiones, algunos investigadores agrupan especies de *Bacillus* que presentan características fenotípicas y genotípicas muy similares. Es el caso de *B. cereus* y especies estrechamente relacionadas como *B. mycoides*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cytotoxicus* y el psicrotolerante, *B. weihenstephanensis*. Otro factor importante es la anchura de las células. Para el gran grupo *Bacillus*, la anchura de la célula debe ser $\geq 1\mu\text{m}$, como mínimo. *B. thuringiensis* pertenece a este grupo. Hay una gama muy amplia de morfología de las colonias, tanto dentro como entre especies, y por supuesto la composición del medio y otras condiciones de incubación tienen fuerte influencia. Efectos negativos sobre la longevidad de los adultos o incluso bajas tasas de mortalidad son observables, (Rabinovitch, 2017).

C. Modo de acción. Las cepas de *B. thuringiensis* sintetizan toxinas cristalinas (Cry) y citolíticas (Cyt), (también conocidas como δ -endotoxinas), al inicio de la esporulación y durante la fase estacionaria de crecimiento en forma de inclusiones cristalinas parasporales de Maagd et al., 2001). Los insectos tienen defensas contra las bacterias que incluyen bactericidas llamados atacinas y cecropinas. *B. thuringiensis* destruye hasta cierto punto este sistema excretando una metaloproteinasa (Sidén et al., 1979; Lövgren et al., 1990).

Al ser una bacteria de suelo es de esperar que las toxinas secretadas por la bacteria sean más efectivas contra larvas de insectos, así mismo, el desarrollo del sistema inmunitario de la larva depende del instar, la toxicidad dependerá de la especie de insecto y el instar larvario, como vemos la toxicidad es un proceso complejo y no depende simplemente de la concentración de la δ -endotoxina.

Una vez ingeridas por los insectos y vencida la resistencia del hospedero, estos cristales se solubilizan en el intestino medio, las toxinas son activadas proteolíticamente por las proteasas del intestino medio y se unen a receptores específicos localizados en la membrana celular del insecto, provocando la disrupción celular y la muerte del insecto. En las últimas décadas, se han identificado más de 700 secuencias de genes Cry que codifican proteínas cristalinas (Cry), ubicados generalmente en plásmidos de gran tamaño. Mientras que muchas proteínas Cry tienen propiedades pesticidas útiles y pueden aprovecharse para el control de plagas de insectos en la agricultura, otras proteínas producidas como cristales parasporales no tienen un objetivo conocido sobre los insectos y se han denominado parasporinas. Además, los aislados de *B. thuringiensis* también pueden sintetizar otras proteínas insecticidas durante la fase de crecimiento vegetativo; éstas se secretan posteriormente en el medio de cultivo y se han designado como proteínas insecticidas vegetativas (Vip) y proteína insecticida secretada (Sip). Las proteínas Vip se clasifican en cuatro familias Vip1, Vip2, Vip3 y Vip4 según su grado de similitud en aminoácidos. La toxina binaria que comprende las proteínas Vip1 y Vip2 y la toxina Sip presentan actividad insecticida contra algunos coleópteros, mientras que las toxinas Vip3 son tóxicas contra los lepidópteros. Hasta la fecha se desconoce el espectro de hospedadores de la toxina Vip4Aa1 (Palma et al., 2014).

2.2.4 Control biológico de *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae: Galerucinae).

Los entomopatógenos, que incluyen hongos, virus, nematodos, protozoos y bacterias, se consideran agentes reguladores de las infestaciones de plagas. Los entomopatógenos que aparecen de forma natural son importantes agentes de control de las poblaciones de insectos. La palabra entomopatógeno fue acuñada por Tanzini et al. (2001) para describir los microorganismos que mantienen las poblaciones de insectos, en niveles que no causan daños económicos a los cultivos. El uso de microorganismos entomopatógenos (ME) como agentes de control de plagas no sólo es eficaz contra las plagas de insectos, sino que también es respetuoso con el medio ambiente (menos residuos de plaguicidas), tanto para los seres humanos como para los organismos a los que no va dirigido. Los biocontroladores en un agroecosistema desempeñan un papel importante a la hora de evitar que las plagas alcancen niveles peligrosos. Los agentes de control biológico (BCAs) se utilizan de diferentes maneras en función del tipo de plaga y de las características biológicas del agente de control, presentan varias características favorables, como la especificidad de hospedador, ausencia de residuos tóxicos, ausencia de efectos fitotóxicos, seguridad para el ser humano y la posibilidad de control sostenible de la plaga, entre otras. Sin embargo, para utilizarlos con éxito es necesario un conocimiento profundo tanto del enemigo natural como de la ecología de la plaga. Los entomopatógenos (hongos, bacterias, virus y nematodos) deben desarrollarse como agentes eficaces de control biológico, lo que exige un conocimiento profundo de los procedimientos de los bioensayos, así como de las estrategias de fabricación, formulación y aplicación (Deka et al., 2021).

Aunque se está investigando el uso de parasitoides (brachónidos y taquínidos) y patógenos (*Beauveria* spp. y *M. anisopliae*) para combatir esta plaga, no se han aplicado con éxito programas de control biológico (Cabrera-Walsh et al., 2020) (CABI, 2022).

2.2.5 Definición de términos básicos

Agente de control biológico: Enemigo natural, antagonista o competidor u otro organismo, utilizado para el control de plagas.

Bacterias entomopatógenas: Patógenos que pueden controlar insectos plaga

Control biológico: Utilización de agentes bióticos, como insectos, nematodos, hongos y virus para luchar contra las malezas y otras plagas forestales.

Ecosistema: Complejo dinámico de comunidades de plantas, animales y microorganismos y su ambiente abiótico, que interactúa como unidad funcional.

Eficiencia (control biológico) se refiere a la capacidad de los enemigos naturales (depredadores, parasitoides, Entomopatógenos, entre otros) para reducir o controlar las poblaciones de plagas o enfermedades en un ecosistema.

Formulación comercial (productos de control biológico): Productos que aprovechan los beneficios de organismos vivos para combatir plagas y enfermedades. Esta formulación implica la producción masiva de biocontroladores.

Hábitat: Parte de un ecosistema con condiciones en las cuales un organismo está presente naturalmente o puede establecerse.

Hongos entomopatógenos: microorganismos del reino fungi que pueden controlar el crecimiento de plagas en plantas. Incidencia (de una plaga)

Inoculante o inóculo: propágulos o partes microbianas (como conidios, micelio, u.f.c, entre otros).

Plaga: Cualquier especie, raza o biotipo vegetal o animal o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales.

Patógeno (entomopatógeno): Organismo que causa enfermedades en otros organismos, como bacterias, hongos o virus.

Principio activo: Es el agente de control biológico, como un hongo, bacteria, virus, insecto o nemátodo, que se utiliza para combatir la plaga.

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación.

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de entomología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, localizado a 7° 10' 03" de latitud sur, 78° 29' 35" de longitud oeste y a una altitud de 2 536 msnm y en el distrito de Cajamarca, provincia y región de Cajamarca

Figura 1

Ubicación del experimento



3.2 Materiales.

3.2.1 Material de campo

Cámara fotográfica.

Libreta de apuntes y lápiz.

Recipientes de plástico de 1 litro de capacidad.

3.2.2 Material biológico

Adultos de *Diabrotica* spp.

Conidios de *B. bassiana*

U.f.c. de *B. thuringiensis*

3.2.3 Productos biológicos comerciales

Tabla 1

Productos utilizados en la presente investigación

Nombre comercial	Ingrediente activo (i.a)	Concentración de i.a	Dosis comercial*	Fabricante
Bio Spore 6.4 % (PM)	<i>B. thuringiensis</i> var Kurstaki.	32 000 UI / mg **	400 gr / 200 litros de agua	Farmagro
Laojita SC	<i>B. thuringiensis</i> var Kurstaki.	4 000 UI / µl	700 cc / 200 litros de agua	NovoAgro- AG
Beauvesol	<i>B. bassiana</i>	1.0 x 10 ⁹ conidios / gr	3 kg / 200 litros de agua	Solagro
Yurak WP	<i>B. bassiana</i>	1.5 x 10 ¹⁰ conidios / gr	200 g / 200 litros de agua	PBA Perú

* Dosis indicada en la etiqueta para controlar una plaga / cultivo relacionado (indicado en la etiqueta).

** Unidades internacionales de potencia por mg

3.3 Materiales y equipo de laboratorio

Matraces 250cc.

Mechero de alcohol.

Pipetas de 5 y 10 mL.

Racket de 96 hoyos.

Pipetores de 20, 200 µl.

Tubos eppendorf de 1.5 mL.

Tips de 20 y 200 µL.

Recipientes de plástico de 4 y 6 onzas.

Placas de Petri de 10 x 90 mm.

Autoclave vertical

3.4 Metodología

3.4.1 Trabajo de campo

Adultos de *Diabrotica spp.*, fueron colectados de plantas con daños foliares en parcelas de papa, ubicadas en el campus de la ciudad universitaria, luego de ser confinadas en recipientes de plástico se trasladaron al laboratorio de entomología de la Universidad Nacional de Cajamarca, para disponer de material biológico.

3.4.2 Trabajo de laboratorio

A. Viabilidad de los aislados de *B. bassiana* y recuperación de *B. thuringiensis*, en formulaciones comerciales de biocontroladores. Al provenir los aislamientos de *B. Bassiana* y *B. thuringiensis* utilizados en el presente estudio, de formulaciones comerciales, se asume que la composición (ingrediente activo) es el que corresponde al indicado en la etiqueta, se utilizó el medio SDA modificado (Anexo 1) para determinar la viabilidad de *B. bassiana* y YDA modificado (Anexo 2) para la recuperación de *B. thuringiensis*.

A.1 Preparación de adultos colectados de *Diabrotica spp.* Los insectos colectados fueron sometidos a un golpe de frío (4-6 °C por 20 min), para inmovilizarlos y poder separarlos en recipientes de 6 onzas. Los adultos a inocular, fueron tratados con lejía al 0.5 % durante 30 segundos seguido de tres lavados con agua destilada estéril, luego de secados fueron confinados en recipientes de plástico y provistos de alimento fresco (tejido foliar de papa) hasta la realización de los ensayos.

A.2 Viabilidad de los aislados de *B. bassiana* en formulaciones comerciales de biocontroladores. Se prepararon diluciones seriadas de 10^{-6} y 10^{-8} conidios por mL de las formulaciones comerciales de *B. bassiana* en tween 20 al 0.01 %; 50 μ l de cada dilución se sembró en placas con medio SDA con ampicilina, la siembra se realizó por triplicado. Los resultados de los promedios de los conteos obtenidos de las tres placas sembradas por el factor de dilución, nos dieron el número de conidios viables en la suspensión original, estos resultados fueron comparadas

con la información indicada en las etiquetas de cada formulación comercial de *B. bassiana*. Las condiciones de incubación fueron a temperatura ambiente.

A.3 Recuperación de *B. thuringiensis*, en formulaciones comerciales de biocontroladores. En el caso de *B. thuringiensis*, se sembraron en medio de cultivo YDA, 50 μ L de las diluciones 10^{-7} a 10^{-9} , de las formulaciones comerciales, la siembra se realizó por triplicado, Los resultados de los promedios de los conteos obtenidos de las tres placas sembradas por el factor de dilución, nos dieron el número de unidades formadoras de colonias u.f.c viables en la suspensión original, estos resultados fueron comparadas con la información indicada en las etiquetas de cada formulación comercial de *B. thuringiensis*. Las condiciones de incubación de las placas fueron a temperatura ambiente.

B. Sintomatología. Para determinar el síndrome de la enfermedad, tanto de adultos inoculados con *B. bassiana*, como con *B. thuringiensis*, se procedió a inocular 8 adultos de *Diabrotica spp.*, con una suspensión de cada formulación comercial, procediéndose a registrar los síntomas observados, hasta la muerte de los adultos y posterior aparición del signo como evidencia confirmatoria.

B.1 Optimización del protocolo de inoculación con *B. bassiana*. Este entomopatógeno es un microorganismo habitante del suelo, donde las condiciones referidas a T° y Humedad son más uniformes que en el medio externo, varias aproximaciones fueron ensayadas para ajustar un protocolo óptimo para la inoculación efectiva de adultos de *Diabrotica spp.*, bajo condiciones de laboratorio.

Inoculación directa de una suspensión de conidios en el abdomen del insecto. Se preparó una suspensión de conidios de 1.5×10^6 /mL en tween al 0.01 %, 1 μ L (1 500 conidios) de esta suspensión fue inoculada en la parte ventral del insecto, previamente inmovilizado por exposición a baja temperatura, 8 adultos fueron inoculados y confinados en una placa de Petri e incubados a T° ambiente durante 14 días, como control, adultos fueron inoculados con una solución de tween al 0.01 %.

Inoculación por inmersión en suspensión de conidios. Se preparó una dilución de 10^6 conidios por mL de Tween al 0.01 %, 8 adultos de *Diabrotica spp.*, fueron inoculados por inmersión en la suspensión de conidios y luego colocados en depósitos de 06 onzas, después del primer día de inoculación se les empezó a suministrar hojas de papa como alimento, cada 2 días se les suministraba nuevamente más alimento. Las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 12 a 14 días, los adultos muertos fueron separados y tratados de acuerdo a lo indicado anteriormente hasta la aparición del signo del hongo. Se contabilizó el número de insectos muertos debido a la infección por *B. bassiana*. Como testigo se consideró adultos inoculados con tween al 0.01 %.

Inoculación por inmersión en suspensión de conidios con control de humedad. Se procedió de la misma manera que en el punto anterior, con el añadido de que en el fondo del depósito se colocó papel toalla humedecido con agua destilada estéril, sobre el cual fueron colocados los adultos de *Diabrotica spp.*, inoculados, el papel humedecido se mantuvo por 48 horas, siendo retirado el papel para evitar la contaminación y pudrición del alimento por el exceso de humedad, la alimentación de los adultos inoculados comenzó un día después de la inoculación. Las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 12 a 14 días, los adultos muertos fueron separados y tratados de acuerdo a lo indicado anteriormente hasta la aparición del signo del hongo. Se contabilizó el número de insectos muertos debido a la infección por *B. bassiana*. Como testigo se consideró adultos inoculados con tween al 0.01 %.

B.2 Sintomatología en *Diabrotica spp*, inoculadas con *B. bassiana*.

Los adultos de *Diabrotica spp*, colectados recientemente fueron desinfectados como se indicó anteriormente; debido a su alta movilidad los adultos fueron sometidos previamente a una temperatura de 6 °C durante 15 minutos para inmovilizarlos, antes de ser separados en depósitos de plástico de 10 onzas, previo a ser inoculados. La inoculación se realizó por inmersión en una suspensión de conidios de *B. bassiana*,

a la concentración recomendada por el fabricante, después de inoculados fueron colocados en depósitos de plástico de 6 onzas, se consideró un control que consistió en la inmersión de adultos en tween al 0.01 %. Se continuó proporcionándoles alimento fresco. Los depósitos con los adultos inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la muerte del último insecto. Las evaluaciones comenzaron 24 horas después de la inoculación, anotándose observaciones como; la aparición de cambios en el comportamiento, pigmentación, pérdida de apetito, parálisis, muerte, días hasta la muerte del último insecto (DMUI) y aparición de micelio sobre los insectos muertos en el grupo problema en comparación con el grupo control.

B.3 Sintomatología en *Diabrotica spp*, inoculadas con *B. thuringiensis*. Los adultos colectados recientemente fueron desinfectados de acuerdo al protocolo previamente descrito, posteriormente se colocaron en depósitos de plástico de 6 onzas, se les suministró alimento envenenado que consistió en foliolos de papa previamente inmersos en una suspensión de *B. thuringiensis* a la concentración recomendada por el fabricante; 2 mg / mL (Bio Spore) y 3.5 µL / mL (Laojita) respectivamente, el control consistió en adultos alimentados con hojas de papa tratados con tween al 0.01 %. Se continuó proporcionándoles alimento fresco. Los depósitos con los adultos inoculados se mantuvieron a temperatura ambiente hasta la muerte del último insecto. Las evaluaciones comenzaron 24 horas después de la inoculación, anotándose observaciones como; la aparición de cambios en el comportamiento, pigmentación, pérdida de apetito, parálisis, muerte, días hasta la muerte del último insecto (DMUI).

C. Eficiencia en el control de adultos de *Diabrotica spp.*, con suspensiones de *B. bassiana*. Tomando en consideración los valores obtenidos del cálculo de la viabilidad de los entomopatógenos en las formulaciones comerciales, (subtítulo 3.4.2, sección A.2), se realizó el ajuste de las dosis (tabla 2); procediéndose posteriormente a inocular 8 adultos de *Diabrotica spp.*, con cada una de las diluciones

de *B. bassiana* de cada formulación comercial (tratamientos), de acuerdo al protocolo establecido, manteniéndose a temperatura ambiente hasta la muerte del último insecto (DMUI). Se consideraron tres repeticiones por cada tratamiento. Las diluciones seriadas están indicadas en la tabla 2.

Tabla 2

Concentración de conidios en los productos comerciales y cantidad de conidios por mL de suspensión

Producto Comercial		Cantidad de conidios viables en suspensión por mL
Beauvesol	Yurak	
1.5 X 10 ⁶	1.5 X 10 ⁶	1 500 000
1.5 X 10 ⁵	1.5 X 10 ⁵	150 000
1.5 X 10 ⁴	1.5 X 10 ⁴	15 000

Como control se consideró una solución de Tween 20 al 0.001 % en agua destilada estéril; a los adultos inoculados se les suministro alimento fresco (hojas de papa) de forma continua hasta el final del experimento, registrándose la mortandad de insectos en cada tratamiento. Se consideró la formulación comercial más eficiente aquella que presento la mayor mortandad a la concentración más baja de conidios de *B. bassiana*, en suspensión.

C.1 Diseño estadístico. La información obtenida en laboratorio fue sistematizada, para la redacción del informe del trabajo de investigación, haciendo uso de la estadística inferencial y descriptiva. La viabilidad y el cuadro clínico de la enfermedad se analizaron de manera descriptiva. En tanto la eficiencia de *B. bassiana*, en el control de adultos de *Diabrotica spp.*, fue evaluada mediante un ensayo de diseño completamente aleatorio DCA. La mortalidad de adultos se expresó como proporción, los datos fueron transforma al arcoseno de la raíz, para cumplir los supuestos de normalidad y homogeneidad de la varianzas. Posteriormente se realizó el análisis de varianza ANOVA (Fernández, 2010). La mortandad fue previamente corregida mediante la fórmula de Schneider-Orrelli: Mortalidad (%) = ((Mortalidad en el tratamiento - Mortalidad en el control) / (1- Mortalidad en el control)) * 100.

El modelo lineal aditivo es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} es la observación en la unidad experimental j (repetición), a la que se le ha aplicado el tratamiento i , μ es la media general del experimento, α es el efecto del tratamiento i y ε_{ij} es el efecto del error de la observación, un elemento aleatorio de una población normal de media cero y desviación típica σ . El análisis de varianza está representado por:

Tabla 3

Tabla de Análisis de varianza ANOVA para el efecto de 03 dosis de dos formulaciones comerciales de B. bassiana sobre adultos de Diabrotica spp.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	Valor de F calculado
Tratamientos (Tr)	t-1	SCTr	CMTr	CMTr/CME
Error (E)	t(r-1)	SCE	CME	
Total	tr-1	SCT		

Donde: t = número de tratamientos, r = número de repeticiones

El método de comparación múltiple de Fisher-LSD fue utilizado para establecer diferencias significativas entre los tratamientos.

En el bioensayo de eficiencia que midió la mortandad de los insectos frente a la concentración de conidios del producto, los datos de mortandad observados en proporción transformados a un valor obtenido de la tabla probit (valor probit) vs el logaritmo de la concentración, fueron utilizados para obtener líneas rectas fácilmente comparables, seguido se hizo la regresión de ambos conjuntos de datos y se obtuvo los valores del intercepto y la tasa, permitiendo calcular los valores probit esperados de mortandad y las concentraciones letales, CL_{50} y CL_{95} . Se realizó una prueba de χ^2 para evaluar la interdependencia de las variables dependiente e independiente y validar los valores de CL_{50} y CL_{95} (Finney, 1978).

D. Eficiencia en el control de adultos de *Diabrotica spp.*, con suspensiones de *B. thuringiensis*. Se procedió a inocular mediante el suministro de alimento envenenado con cada una de los productos de *B. thuringiensis* (Laojita & Bio Spore) a 8 adultos de *Diabrotica spp.*, a la dosis recomendada por el fabricante, de acuerdo al protocolo establecido en el subtítulo 3.4.2, sección B.3, los insectos inoculados fueron colocados en placas de Petri de 10 x 90 mm y mantenidos a temperatura ambiente hasta la muerte del último insecto (DMUI). Se consideraron dos repeticiones por cada tratamiento, procediéndose posteriormente a realizar un análisis descriptivo del mismo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Viabilidad de los aislados de *B. bassiana* y recuperación de *B. thuringiensis*, en formulaciones comerciales de biocontroladores.

4.1.1 Viabilidad de los aislados de *B. bassiana*

Después de 1 semana de incubación de las placas sembradas con las diluciones seriadas realizadas a partir del stock de cada formulación comercial de *B. bassiana* (Beauvesol y Yurak), se procedió a contar las colonias típicas de *B. bassiana* (figura 2), en las tres placas sembradas con la dilución 10^{-7} obteniendo el promedio de los conteos, a partir de esta información se determinó la concentración ajustada en conidios por gramo, los resultados son mostrados en la tabla 4.

Figura 2

Colonias típicas de *B. bassiana* en medio SDA



Tabla 4

Concentración de conidios viables ajustada a partir de la siembra de diluciones seriadas de B. bassiana de dos formulaciones comerciales, en medio SDA.

	Formulación comercial	
	Beauvesol	Yurak
Concentración (conidios / gramo) ajustada 03/2024	$10^8 (1.1 \times 10^8)^a$	$10^9 (1.1 \times 10^9)$
Concentración (conidios / gramo) ajustada 08/2024	10^7	10^7
Concentración (conidios / gramo) indicada en la etiqueta.	$1 * 10^9$	$1.5 * 10^{10}$

^a Concentración estimada de conidios totales en la formulación, asumiendo una viabilidad del 90 % (valor mínimo asumido para ser considerada una adecuada preparación comercial).

Como se observa en la tabla 4 La concentración de conidios viables calculada a partir las diluciones seriadas no se ajusta a la concentración indicada en la etiqueta, en la lectura realizada en el mes de marzo en el orden de 10^{-1} , para ambos productos. Asimismo, se observa que hay una disminución en el orden de 10^{-1} en el Beauvesol, y de 10^{-2} , en el caso del YURAK con respecto a la lectura anterior (5 meses después) referido a la cantidad de conidios viables. Esta disminución en la viabilidad en la primera evaluación (marzo) puede ser atribuida a diversos factores (momento de la cosecha de cada lote, composición del medio de multiplicación del inóculo, inerte, temperatura de almacenamiento, entre otros), la disminución en la cantidad de conidios viables en el Beauvesol puede ser atribuible al tiempo transcurrido, teniendo en consideración el ingrediente utilizado para mantener al inóculo (granos de maíz). En el caso del YURAK, este presentó una viabilidad ajustada del orden de 10^7 conidios por gramo en la segunda evaluación, observándose una baja solubilidad de las suspensiones preparadas (el periodo de vigencia del producto se encontraba dentro de lo señalado en la etiqueta y almacenado conforme las condiciones indicadas (oscuridad y refrigeración), pudiendo atribuirse esto a la estabilidad de la

formulación del inóculo o a la composición de la sustancia utilizada como inerte, tanto en el primer como en el segundo ensayo de viabilidad la calidad del agua (destilada) y de los agentes dispersantes (aceite agrícola y Tween 20) utilizados fue la misma. Está reportado una relación inversa entre temperatura, tiempo de almacenamiento transcurrido y el porcentaje de viabilidad y virulencia, a mayor temperatura de almacenamiento se registra una menor viabilidad y virulencia en relación al tiempo (Kim, 2019). Hay que considerar además el manejo de una formulación o inóculo, antes de su empleo, después de un almacenamiento por un tiempo prolongado, el cual influye en la viabilidad del entomopatógeno (Faria, 2010). Por otro lado, los hongos entomopatógenos son sensibles a la radiación UV, existiendo gran variabilidad entre e intra especies en su susceptibilidad, para el almacenamiento *in vitro* o en almacén, se recomienda condiciones de oscuridad. Fernandes, (2015) indica que esta variabilidad puede reflejar adaptaciones naturales de los distintos aislamientos a sus diferentes nichos, de ahí que, la selección de aislamientos con alta tolerancia a la radiación UV sea una consideración importante para seleccionar agentes putativos prometedores de control biológico.

Independientemente de cómo o por que se toma la decisión de almacenar las formulaciones comerciales o los cultivos propios, las técnicas de conservación tienden en aumentar en menor o mayor medida el tiempo en el que se mantiene un nivel de viabilidad y virulencia adecuado en el caso de formulaciones comerciales, o el tiempo entre transferencias del inóculo en el caso de cultivos manejados *in vitro*. Humber, (1997) menciona periodos que van desde varias semanas o meses hasta varios años, con una pérdida mínima de viabilidad u otras propiedades clave del organismo durante el almacenamiento.

Lingg & Donaldson, (1981) mencionan que los conidios de *B. bassiana* almacenados en suelo estéril y no estéril bajo diversos regímenes de temperatura, humedad relativa, contenido de agua del suelo y pH, muestran una supervivencia de

dependiente principalmente de la temperatura y de la humedad del suelo. La viabilidad promedio varió entre 14 días a 25°C y 7,5 % de saturación de agua y 276 días a 10°C y 25 % de saturación de agua, los conidios mantenidos a - 15°C No mostraron un efecto aparente en su viabilidad, sin considerar; contenido de agua, humedad relativa o pH. La pérdida de viabilidad se verificó después de 10 días en suelo mantenido a 55°C.

En todo caso si se observa un nivel aceptable de germinación de conidios en un lote de entomopatógeno almacenado por un tiempo que puede variar en de meses a años, se hace necesario una prueba *in vivo*, inoculando larvas o adultos de un insecto de interés agrícola, con una dilución dada y determinar su eficiencia (virulencia) definida como la cantidad de insectos muertos con la más baja concentración del inóculo. Para el caso de productos comerciales como se puede observar en los resultados del ensayo sería poco práctico tomar la decisión de adquirir los productos y almacenarlos por tiempos prolongados.

La técnica de siembra de diluciones seriadas es una técnica usualmente utilizada en microbiología para cuantificar la cantidad de propágulos viables; conidios, u.f.c, entre otros, pero no contabiliza la cantidad de propágulos totales (Goettel & Inglis, 1997), es decir no se puede conocer el % de viabilidad inicial. Sin embargo puede ser adaptada para determinar la viabilidad de una preparación, si previamente se conoce la concentración de propágulos por unidad de medida de la formulación comercial (indicada en la etiqueta); si preparamos una cantidad X (conocida) de conidios en una dilución de una suspensión y la sembramos en placas con medio de cultivo, obtenemos el número *n* promedio de colonias en la dilución conocida, entonces la viabilidad estará dada por el número promedio de colonias observadas en las placas por el factor de dilución y lo comparamos con la concentración indicada (etiqueta informativa) de conidios en el volumen de la suspensión sembrado, obteniendo así el porcentaje de viabilidad. El método de dilución seriada presenta la

ventaja adicional de contabilizar la viabilidad absoluta; aún si no se conoce la concentración inicial del inóculo; podemos así a partir del resultado obtenido preparar diluciones seriadas del inóculo (basados en conidios viables, independientemente de la concentración indicada en la etiqueta), cabe señalar que muchas etiquetas no indican la viabilidad del entomopatógeno en la formulación, esto resultaría particularmente útil con preparaciones de productos biológicos después de un razonable periodo de almacenamiento aunque la de viabilidad de los conidios depende además del aislamiento del entomopatógeno, las condiciones de almacenamiento, el medio utilizado, entre otros.

4.1.2 Recuperación de u.f.c de *B. thuringiensis*

Figura 3

Colonias típicas de *B. thuringiensis* en medio YDA



A partir del conteo promedio de colonias típicas de *B. thuringiensis* var. Kurstaki (figura 3) en las tres placas sembradas con la dilución 10^{-5} de, de los productos comerciales en medio YDA, se obtuvo la cantidad de (u.f.c) bacterias viables en cada formulación.

Bajo condiciones estándar en la producción comercial de formulaciones de *B. thuringiensis*, se suelen obtener concentraciones de 10^8 a 10^{10} u.f.c / mL, (Yezza *et al.*, 2005). Se obtuvo una recuperación de 10^5 y 10^6 u.f.c de *B. thuringiensis* (tabla 5), en las formulaciones; Biospore PM y Laojita SC respectivamente, resultado de la germinación de las endosporas presentes en ambos productos. La diferencia entre la concentración estándar y la observada, probablemente esté asociada al hecho de que no todas las u.f.c., forman endosporas durante la fase final del cultivo bacteriano o a las condiciones del proceso de producción de las formulaciones.

En la fase de crecimiento estacional, las bacteria presentes en el cultivo comienzan a secretar en el caldo de cultivo cantidades variables de endotoxinas, posteriormente continua el proceso de formación de endosporas que es la fase final del proceso de obtención del producto comercial (Lachhab *etal.*, 2001; Yezza *et al.*, 2005). De esta manera se espera tener una preparación óptima por su contenido en endotoxinas y endosporas, para formular productos comerciales que tengan una alta eficiencia en el control de plagas.

Tabla 5

Concentración de u.f.c de *B. thuringiensis* obtenidas a partir de la siembra de diluciones seriadas de. de dos formulaciones comerciales, en medio YDA.

	Formulación comercial	
	Laojita	Bio Spore
Concentración (u.f.c / mL)	10^6	10^5
Concentración (u.f.c / mL) ^b .	10^8 a 10^{10}	10^8 a 10^{10}

^b Se asume una concentración de 10^8 a 10^{10} u.f.c / mL, (Yezza *et al.*, 2005)

En la descripción de las formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* se indica como componentes de la formulación tanto a los cristales de la δ -endotoxina

como a las endosporas de la bacteria, no expresan la concentración del producto comercial en unidades formadoras de colonias ni en concentración de toxina, pero si en unidades internacionales de potencia (U.I.P) o unidades internacionales tóxicas (UIT). La relación entre los valores de la CL_{50} (ppm) del estándar y del producto por el título estándar (UIT/mg) determina la potencia del producto, expresada en UIT letales al insecto de referencia utilizado (*Aedes aegypti*, entre otros) / mg o μ L de producto (Skovmand *et al*, 2000).

La sinergia entre las endosporas y las δ -endotoxinas has sido documentada, y se ha observado un mayor efecto combinado, que cuando se sutilizan esporas y toxinas por separado (Moar *et al.*, 1989), está información de recuperación de u.f.c. a partir de endosporas es además útil en estudios de dinámica poblacional de *B. thuringiensis* e insectos plaga infectados en la naturaleza, en el suelo de campos de cultivo que hayan sido sometidos a tratamientos de control de plagas con productos cuyo ingrediente activo sea *B. thuringiensis*. Las epizootias en la naturaleza son raras (Garczynski & Siegel, 2007), quizás porque serían necesarias altas poblaciones de insectos plaga para mantener densidades elevadas de *B. thuringiensis* y que estas tengan una alta probabilidad de infectarlas naturalmente, o por el hecho que no se conoce del todo el comportamiento entre la bacteria y sus distintos hospedantes en su hábitat natural (Ruan *et al.*, 2015). Diversas investigaciones han sido realizadas para determinar la dinámica de *B. thuringiensis* en la naturaleza; esté es un agente de biocontrol ubicuo, persistente en el suelo y en muchos hábitats.

Las primeras investigaciones se centraron en su persistencia en el suelo, en la década de los 90 del siglo pasado se descubrió que *B. thuringiensis* era habitante del filoplano (Smith & Couche, 1991; Garczynski & Siegel, 2007). Numerosas subespecies y variantes de la bacteria han sido aislado de larvas de insectos infectadas, recuperándose altas concentraciones de u.f.c de cadáveres de insectos, al desintegrarse los cadáveres, las endosporas y las proteínas cristalinas insecticidas

(ICP) se liberan al medio ambiente (Prasertphon et al., 1973). Las larvas infectadas pueden excretar endosporas en sus excretas, así como, han sido encontrados asociados a huevos de insectos *in vitro* y en campo (Lynch et al., 1976; Burges & Hurst, 1977; Siegel et al., 2000). La multiplicación de la bacteria es baja en insectos vivos infectados y es abundante en cadáveres de insectos, *B. thuringiensis* ha sido aislado de granos almacenados y se han observado epizootias en silos de grano (Burges y Hurst, 1977; Vankova y Purrini, 1979).

4.2 Sintomatología.

En los ensayos conducidos para determinar el síndrome de la enfermedad en adultos de *Diabrotica spp.*, inoculados con *B. bassiana* y *B. thuringiensis* respectivamente, estos mostraron síntomas variables, algunos distinguibles. Previamente al desarrollo de los ensayos de sintomatología y eficiencia fue necesario optimizar el manejo de adultos de *Diabrotica spp.*, colectados del campo, así como, definir un protocolo de inoculación con conidios de *B. bassiana*, que garantizara la obtención de resultados más homogéneos en la infección y posterior mortandad de los insectos infectados.

4.2.1 Manejo de adultos de Diabrotica spp., en el laboratorio.

Los adultos fueron trasladados en envases de plástico de 12 onzas al laboratorio de entomología, sometidos a un proceso de enfriamiento (golpe de frío) a 6 °C durante 15 minutos para inmovilizarlos y permitir su posterior manipulación en los ensayos realizados. Los insectos son poiquiloterms (carecen de un sistema de regulación interna de temperatura) por lo que su temperatura corporal cambia a medida que varía la temperatura del medio ambiente (Capinera, 2008), a bajas temperaturas sus movimientos se ralentizan e incluso aparentan estar muertos, el golpe de frío se utiliza rutinariamente en el trabajo con áfidos transmisores de virus en plantas. El tiempo de exposición a bajas temperaturas es variable y depende de la especie. El mismo comportamiento se observa en campo, en Sur América, *D.*

speciosa es la especie de mayor distribución y mejor adaptada a climas templado fríos, sobreviviendo en zonas con rangos de temperaturas; invernales, estivales, y anuales de entre -3.4 a 11 °C, 24 a 33.4 °C, y 12 a 21.2 °C respectivamente (Cabrera, 2005). Coats, (1986) recomienda el uso de CO₂ para anestésiar e inmovilizar especímenes de diabroticas y así facilitar su manipulación por un tiempo más prolongado, siendo más efectivo aparentemente esta metodología.

Los adultos de *Diabrotica spp.*, fueron colectados en un tiempo máximo de 24 horas antes de efectuar los ensayos, correspondieron a las especies, *D. speciosa* y *D. undecimpunctata*.

4.2.2 Optimización del protocolo de inoculación con *B. bassiana*.

A. Inoculación directa de una suspensión de conidios en el abdomen del insecto. De los 8 adultos de *Diabrotica spp.*, inoculados mediante la aplicación ventral de 1 µL de una suspensión de 10⁶ conidios por mL (10³ conidios por µL), 7 insectos murieron 14 días después de iniciado el ensayo y desarrollaron el signo de *B. bassiana* cuando fueron colocados en cámara húmeda. Los insectos previamente inmovilizados por un golpe de frío fueron relativamente fáciles de inocular, aunque recuperan su movilidad rápidamente dificultando así el proceso de inoculación.

Cuando se tratan de un gran número de individuos por tratamiento, el tamaño de muestra sería uno de los limitantes principales de esta técnica o cuando se trata de insectos pequeños y con alta movilidad. Este tipo de bioensayo ha sido ampliamente utilizado en el tamizado de insecticidas, donde se utiliza como solvente la acetona y como agente inmovilizante CO₂ (Coats, 1986).

La virulencia de un entomopatógeno se mide en bioensayos en el laboratorio para calcular la DL₅₀, CL₅₀ y LT₅₀, considerando la dosis-respuesta, es decir, la dosis letal media, concentración letal media y el tiempo medio, respectivamente, para matar al 50 % de los insectos en el ensayo (Jones, 2000). La diferencia entre dosis y concentración radica en que la dosis es más exacta e implica una cantidad de

propágulos (conidios por insecto), mientras que la concentración implica un número relativo (cantidad de conidios por unidad de suspensión) (Tanada & Fuxa, 1987).

La técnica de inoculación ventral provee una aproximación mucho más exacta de la cantidad de conidios mínimo necesarios para infectar a un insecto y ocasionarle la muerte, este es un aspecto importante en la formulación de insecticidas biológicos, pues permite seleccionar aislamientos más virulentos, la eficiencia del biocontrolador está dada entonces; por la mayor virulencia del aislamiento a una menor concentración de inóculo, la velocidad de aparición e intensidad de síntomas, el tiempo transcurrido a la muerte del insecto, entre otros, consideraciones que también deben ser tomados en cuenta, siendo la determinación de la dosis letal DL_{100} el punto de partida en la selección de un biocontrolador promisorio. posteriormente la dosis debe ser ajustada para encontrar la DL_{50} y finalmente la concentración efectiva para el control de insectos plaga. Lingg & Donaldson, (1981) mencionan que en la naturaleza; las poblaciones de entomopatógenos son usualmente bajas, en equilibrio con otros microorganismos que componen el ecosistema, así la selección de un biocontrolador ideal se basaría principalmente en su virulencia y su estabilidad; mayor persistencia, tolerancia a la radiación UV, a bajos niveles de humedad ambiental, extremos de temperatura, condiciones del suelo, competencia microbiana, entre otros.

B. Inoculación por inmersión en suspensión de conidios con control de humedad Los adultos de *Diabrotica spp.* inoculados por inmersión en una suspensión de conidios de *B. bassiana* de 10^6 (Beauvesol) conidios por mL, fueron incubados a T° ambiente por un tiempo de 14 días con control de humedad, este protocolo de inoculación – incubación mostró resultados más homogéneos en los porcentajes de infección y mortandad de los insectos inoculados (tabla 6) cuando se controló las condiciones de humedad inmediatamente realizado el proceso de inoculación.

Tabla 6

Influencia de la humedad en la eficiencia de la infección de adultos de Diabrotica spp., con conidios de B. bassiana (Beauvesol)

Tiempo (días)	Número promedio de insectos muertos por infección con <i>B. bassiana</i>		
	Testigo	Sin control de humedad	Con Control de humedad
5	0	0	0
7	0	0	2
9	0	0	4
11	0	1	6
14	0	2	8
Total	0	3	8

En el tratamiento sin control de humedad, los primeros síntomas se empezaron a observar en los insectos inoculados a partir del 11vo día, sin embargo, los resultados de mortandad fueron bajos (3/8) por la infección con *B. bassiana* (tabla 6). En el tratamiento con control de humedad en el cuál, se procedió a colocar un disco de papel humedecido en el fondo del recipiente, para mantener una alta humedad relativa en el entorno, condición necesaria para que se produzca el proceso de germinación y penetración de la hifa infectiva y por ende se de inicio al proceso de infección. El control de la humedad fue muy importante, los resultados del porcentaje de insectos infectados traducido en la mortandad de los adultos inoculados fue mayor (8/8). Se verificó la muerte por *B. bassiana*, mediante la incubación de los cadáveres en cámara húmeda y la presencia posterior del signo del hongo sobre los mismos (figura 4).

La humedad en la superficie del exoesqueleto del insecto no es uniforme y es de esperar que exista cierta variación en el contenido de humedad; regiones debajo de los élitros, el abdomen, los espacios entre las articulaciones, entre otras, se encuentran mejor protegidas de la desecación. Al respecto existe evidencia que no todas las zonas de la cutícula de los insectos son igualmente vulnerables a la

penetración de propágulos de hongos entomopatógenos. Las membranas Inter segmentarias (Wraight et al., 1990), las zonas bajo los élitros (Butt et al., 1995) y la cavidad bucal (Schabel, 1976) pueden ser lugares preferentes de infección, aunque a diferencia de *B. thuringiensis* cuyo principal posibilidad de infección es la vial oral, *B. bassiana* tiene limitada eficiencia cuando el insecto ingiere los propágulos. Por lo tanto, el lugar donde el inóculo se deposita en la cutícula también puede influir en la probabilidad de infección y en la velocidad de muerte. En consecuencia, la región del insecto en contacto con el inóculo, es una consideración importante en el desarrollo de protocolos de bioensayo *in vitro*.

Inglis *et al.*, (2001), mencionan que, aunque se produzca la germinación, es posible que el hongo no pueda penetrar en la cutícula, debido a una serie de factores, como un entorno inadecuado (por ejemplo, condiciones de humedad) y/o la presencia de factores inhibidores, como ácidos grasos o melanina, en el interior de la cutícula.

Las condiciones de humedad, temperatura y luz pueden influir en los resultados del bioensayo. Se hace necesario, tras la inoculación, que los insectos deban someterse a condiciones de incubación controladas, estas deben ser favorables además para la supervivencia de los insectos control. En el caso de algunos hongos, debe mantenerse una alta humedad incluso cercana a la saturación para una infección exitosa, sobre todo en las horas posteriores a la inoculación (Butt & Goettel, 2000). Aunque una alta humedad ambiental es importante para la conidiogénesis externa, existen evidencias que *B. bassiana* pueden formar conidios dentro del hemocele de cadáveres en condiciones de baja humedad externa (Inglis et al., 2001).

Los resultados obtenidos permitieron ajustar las condiciones del ensayo, previamente a la realización de las prueba de eficiencia *in vitro*

Figura 4

Adultos de *Diabrotica* spp., muertos mostrando desarrollo de micelio fungoso de *B. bassiana* bajo condiciones de alta humedad en cámara húmeda.

**4.2.3 Sintomatología causada por *B. bassiana***

Pasadas 48 horas después de la inoculación no fueron observables ningún tipo de síntomas en los adultos de *Diabrotica* spp., inoculadas con *B. bassiana*, al 5to día de inoculación se pueden observar algunos individuos muertos (extremadamente susceptibles), los síntomas iniciales visibles fueron movimientos más lentos a partir del 5to día, en relación al testigo inoculado con tween al 0.001 %, movimientos descoordinados de patas y antenas, parálisis y muerte de manera gradual de insectos aparentemente infectados, en los días siguientes hasta la muerte del último insecto 14 días posterior a la inoculación. Finalmente, cuando fueron colocados en cámara húmeda se produce la conidio génesis externa de manera abundante (figura 5).

Figura 5

Adulto de *Diabrotica* spp., mostrando la esporulación externa de *B. bassiana*



B. bassiana presenta un modo de acción en los insectos que se caracteriza; primero por la adhesión de los conidios a la superficie del insecto, aparentemente involucra mecanismos no específicos facilitado por la hidrofobicidad de la pared celular del conidio y su interacción con la epicutícula (Boucias et al., 1988, 1991), seguidamente los conidios germinan y producen estructuras que facilitan la penetración; como ensanchamiento del tubo germinal, formación de apresorios o una vaina extracelular, estas estructuras forman hifas de penetración que le permiten atravesar el exoesqueleto mediante una combinación de mecanismos enzimáticos

(endo proteasas, esterases, lipasas, quitinasas y quitobiasas, entre otras) y mecánicos, una vez en el hemocele, se forman cuerpos hifales (estructuras uni o pluricelulares que carecen de una verdadera pared celular, que poseen una fina capa fibrilar en la membrana plasmática (e.g. blastosporas). Antes de colonizar el hemocele, el hongo debe vencer la respuesta de defensa del insecto mediante la secreción de toxinas (Boucias & Pendland, 1998). El agotamiento de nutrientes, la invasión somática de órganos y la secreción de toxinas (beauvericina, brassianólidos y la oosporeína, entre otras), varias de las cuales inducen parálisis, ocasionan los síntomas característicos del proceso infeccioso que termina en la muerte del insecto (Inglis *et al.*, 2001), finalmente cuando las condiciones de humedad y temperatura son óptimas se produce la esporulación externa del entomopatógeno.

4.2.4 Sintomatología causada por *B. thuringiensis*

En el bioensayo para determinar los síntomas observados ocasionados por *B. thuringiensis* en adultos de *Diabrotica spp.*, se utilizó la formulación comercial Laojita SC. En los insectos inoculados, los síntomas iniciales fueron observados a las pocas horas de la ingestión del alimento envenenado; el comportamiento inicial observado en los adultos, fue la detención de la alimentación, movimiento aletargado, seguido de falta de coordinación de las extremidades 48 horas después de la ingestión del inóculo y detención casi total del movimiento a las 72 horas que se manifestó como movimientos ocasionales aparentemente involuntarios de las patas y antenas. A las 96 horas de iniciado el ensayo todos los insectos habían muerto. El proceso de desarrollo de síntomas y muerte del insecto ocurrió rápidamente después de la ingestión del alimento envenenado por parte de los insectos, una deshidratación leve de la zona ventral pudo ser observada (figura 6), este síntoma probablemente esté asociado a la pérdida de fluidos, resultado del proceso de desorganización y ruptura de las membranas celulares en los tejidos internos de la región del intestino medio del insecto.

Figura 6

Vista ventral de *Diabrotica* spp., muerto por acción de *B. thuringiensis*.



Los modelos más aceptados de la acción de las δ -endotoxinas asumen que la acción principal de las toxinas Cry es lisar las células epiteliales del intestino medio del insecto mediante la formación de poros líticos en la membrana apical de las microvellosidades de las células (Gill et al., 1992; Schnepf et al., 1998; Aronson y Shai, 2001; de Maagd et al., 2001). La activación del efecto tóxico de las protoxinas Cry de las inclusiones cristalinas se presenta cuando se insertan como oligómeros en la membrana afectando el transporte de iones y provocando la ruptura celular. Los

para cristales ingeridos por las larvas son disueltos en el intestino, las protoxinas inactivas solubilizadas son cortadas proteolíticamente en el intestino medio, resultando en proteínas resistentes a las proteasas de 60 a 70 kDa (Choma et al., 1990). La eliminación de una región N-terminal de 25-30, 58 y 49 aminoácidos en las toxinas Cry1, Cry3A y Cry2Aa respectivamente y alrededor de la mitad de la de la región restante C-terminal en las protoxinas Cry largas (130 kDa), permite la activación de la toxina. Una vez que la toxina es activa, está se une a receptores específicos del borde en cepillo apical de las microvellosidades del intestino medio de insectos susceptibles (Schnepf et al., 1998; de Maagd et al., 2001) antes de insertarse en la membrana, la inserción de la toxina conduce a la formación de poros líticos en las membranas apicales de las microvellosidades (Schnepf et al., 1998; Aronson y Shai, 2001). El colapso celular y la pérdida de la integridad del epitelio del intestino medio liberan el contenido celular, proporcionando condiciones adecuadas para la germinación de las endosporas, provocando una septicemia grave y la muerte del insecto (Schnepf et al., 1998; de Maagd et al., 2001; Bravo et al., 2007; Vachon et al., 2012). Estos eventos serían los responsables del síndrome mostrado por los adultos de *Diabrotica spp.*, infectados con *B. thuringiensis*.

4.3 Eficiencia en el control de adultos de *Diabrotica spp.* con inoculaciones de *B. bassiana* y *B. thuringiensis* en formulaciones comerciales.

4.3.1 *B. bassiana*

El ensayo de eficiencia del uso de *B. bassiana* base de las formulaciones comerciales de *B. bassiana* (*Beauvesol & Yurak*), sobre adultos de *Diabrotica spp.*, se realizó mediante el protocolo de inoculación por inmersión en 3 soluciones de conidios (10^{-6} , 10^{-5} & 10^{-4}) con control de humedad, al ser esta metodología la que mejor resultado mostró, en los ensayos previos en la mortandad de insectos. La mortandad en los distintos tratamientos fue corregida mediante la fórmula de Schneider-Orelli, previo al análisis de datos.

Tabla 7

Análisis de Varianza (ANOVA) de la eficiencia de B. bassiana en la mortandad de Diabrotica spp.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrado medio (CM)	Valor de F calculado	Valor de F tabular	Valor de P
Tratamientos (Tr)	6	4.1912	0.69853	28.71**	2.60, 3.87 ^a	0.000
Error (E)	14	0.3406	0.02433			
Total	20	4.5317				

C.V. = 6.25 %, ^a valores de F tabular para 6/20 G.L al 0.05 y 0.01.

El anova (tabla 7) muestra que el valor de F calculado es mayor que los valores de F tabular al 0.05 y 0.01, entonces rechazamos la hipótesis nula (no existe diferencia entre tratamientos) y aceptamos la hipótesis alternativa (existen diferencias entre los tratamientos ensayados) con un alto nivel de significancia, la misma tendencia se obtiene al observar que el P-valor es menor de 0.05. El valor del coeficiente de variabilidad indica una alta precisión en la dispersión de los datos observados con relación a la media (baja variabilidad en el ensayo), el C.V. obtenido (6.25 %) es bajo y corresponde a lo aceptado para experimentos *in vitro*.

Tabla 8

Comparación de medias (método de Fisher – LSD) a un nivel de confianza de 95 %

Tratamiento	Nº Rep	Mortandad (%)	Agrupamiento*
Beauvesol 10 ⁶	3	94.99	A
Beauvesol 10 ⁵	3	59.99	B
Beauvesol 10 ⁴	3	29.99	C
Yurak 10 ⁶	3	24.99	C
Yurak 10 ⁵	3	3.33	D
Yurak 10 ⁴	3	6.66	D
Testigo	3	3.33	D

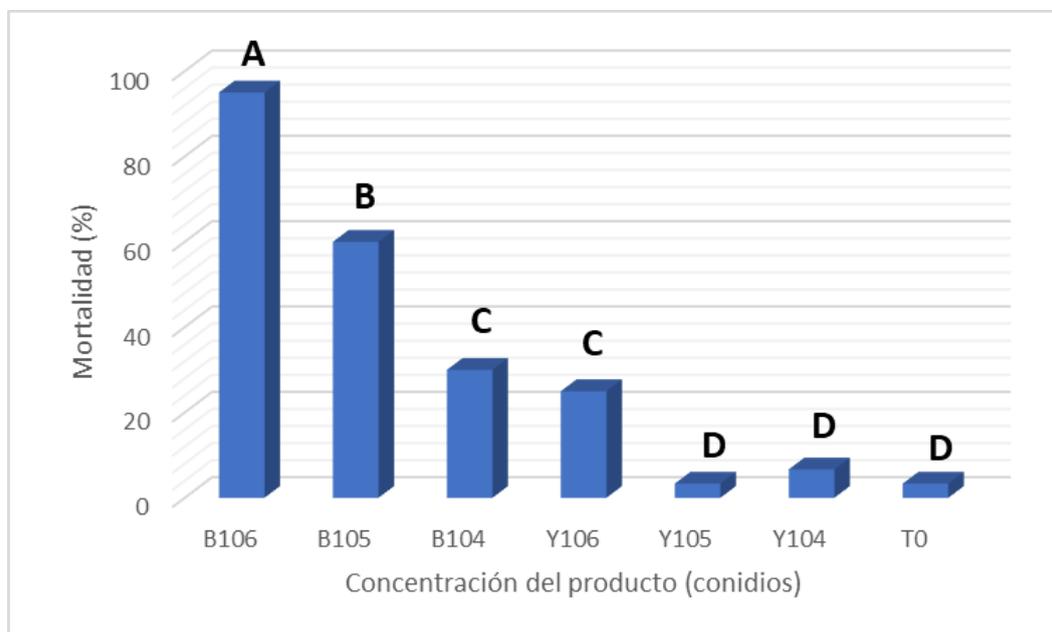
* Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Habiendo determinado que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos, necesitamos encontrar la diferencia significativa entre estas

medias. Analizando los agrupamientos generados por la prueba de Fisher – LSD (tabla 8, figura 7), podemos observar que los tratamientos con Beauvesol (10^6 , 10^5 y 10^4 conidios por mL) y Yurak (10^6) son diferentes con respecto al testigo. Beauvesol (10^6) ocasionó la más alta mortandad (94.99 %) siendo significativamente mayor que los demás tratamientos, seguido del tratamiento Beauvesol (10^5) el cual ocasionó un 59.99 % de mortandad y siendo diferente significativamente de los tratamientos Beauvesol (10^4) y Yurak (10^6), los cuales causaron un 29.99 y 24.99 % de mortandad respectivamente. Los tratamientos Yurak (10^5 y 10^4) no fueron significativamente diferentes del testigo con valores de 3.33, 6.66 y 3.33 respectivamente. El tiempo transcurrido para que empezaran a observarse los primeros adultos muertos de *Diabrotica spp.*, por la infección causada por *B. bassiana* fueron similares a los observados en la tabla 6.

Figura 7

Eficiencia en el control de adultos de *Diabrotica spp.*, con diferentes concentraciones de dos formulaciones comerciales de *B. bassiana*.



Vistos los resultados de viabilidad obtenidos no podemos asumir que haya una disminución en la virulencia de los aislamientos, pues solo se conoce su eficiencia

indicada en la etiqueta basada en su concentración, siendo un concepto relativo, por un lado, normalmente las concentraciones recomendadas son lo suficientemente altas para matar a todos los insectos en los ensayos de control de calidad y por otro lado la virulencia no está medida en relación a poblaciones de insectos, sino a una muestra de una población única (población de ensayo del fabricante), por lo que puede darse la circunstancia de un efecto distinto en su virulencia *in vitro* frente a una muestra de insectos, procedente de una población diferente de insectos aunque sea de la misma especie o bajo condiciones de campo en el control de una población particular de insectos-plaga.

La eficiencia de los cultivos o productos comerciales depende en gran medida de las condiciones bajo las cuales se desarrolla el ensayo, así como, de las condiciones ambientales en el momento de la aplicación en campo, además de la concentración de conidios en la formulación, entre otros. Al respecto Butt & Goettel, (2000) recomiendan Especial cuidado en el diseño de los bioensayos por ser crucial en la selección de entomopatógenos que sean eficientes, además de identificar parámetros importantes; rango de hospedantes, virulencia, competencia ecológica (eficiencia en campo), condiciones que influyen en el desarrollo de las epizootias y condicionantes del proceso de infección, por lo que se requiere conocimientos del entomopatógeno y del insecto plaga, para minimizar entre otros, una alta mortalidad en el testigo y la evaluación sesgada de la virulencia.

La formulación Yurak (polvo mojable) mostró problemas de disolución en las suspensiones preparadas, que pudo afectar la eficiencia del producto, mostrando resultados erráticos en la mortalidad de adultos de *Diabrotica spp.*, por lo que se optó por no incluirlo en el análisis probit , este se realizó solamente con las diluciones de Beauvesol (tabla 9).

Tabla 9

Análisis Probit de la relación de la mortalidad de adultos de Diabrotica spp y la concentración de conidios de B. bassiana (Beauvesol)

Tratamiento	Concentración (Conidios)	Mortandad (%)	Probit O	Probit E	χ^2 calc	χ^2 tab
B106	10 ⁶	95.24	6.64	6.54	0.0000139	--
B105	10 ⁵	61.90	5.31	5.50	0.0001231	--
B104	10 ⁴	33.33	4.56	4.46	0.0000002	--
T0	0.00	0.00				
					0.0001372 ^a	--
					0.0004116 ^b	3.8415 ^c

^a Corresponde al valor de χ^2 calculado para las distintas concentraciones de conidios, ^b es el valor de χ^2 ajustado al multiplicarse por el número de insectos por repetición, ^c es el valor de χ^2 tabular. La mortandad fue corregida mediante la fórmula de Schneider-Orelli.

Del análisis de regresión log - probit (concentración - mortandad) se obtuvieron los valores de los parámetros; intercepto (concentración mínima para ocasionar la muerte del primer insecto, $a=0.303333$) y de la pendiente o tasa (incremento de la mortandad a medida que se incrementa la dosis, $b=1.04$), que nos permitió determinar los valores probit esperados, con los que se calculó el valor de χ^2 , además de obtener los valores de $CL_{50} = 3.2 \times 10^4$ y $CL_{95} = 1.25 \times 10^6$ (Beauvesol). Es de notar que los valores de CL_{50} y CL_{95} , obtenidos en el presente trabajo son parecidos a los obtenidos por Chuquibala-Checan *et al.*, 2023 en dos ensayos utilizando distintos aislamientos de *B. bassiana* y *B. peruvianses*, los tratamientos con *B. bassiana* resultaron en valores de $CL_{50} = 9.2 \times 10^2$ y 1.6×10^3 y $CL_{90} = 2.4 \times 10^5$ y 1.9×10^7 conidios por mL respectivamente en el control de *Hypothenemus hampei*. Además, estos valores fueron menores que los obtenidos por Malpartida *et al.*, (2013) que reportaron valores de CL_{50} y CL_{95} de 9.39×10^6 y 1.42×10^8 conidios por mL, respectivamente, en el control del 3er instar de *Dione Juno* (Lepidóptera) utilizando el aislamiento *B. bassiana*-SENASA. La variabilidad observada en los resultados mostrados en el control de coleópteros vs lepidópteros puede ser atribuible a la

diferente virulencia de los aislamientos utilizados, así como, a el estado de desarrollo de los insectos testados o a la resistencia a nivel de especie.

Observamos que el valor de χ^2 es menor que el χ^2 tabular por lo que se rechaza la H_0 y se acepta la H_a , por el que se determina que existe relación entre las variables dependiente e independiente y por tanto las estimaciones de las CL_{50} y CL_{95} son válidas.

4.3.2 *B. thuringiensis*

Si bien fue posible recuperar colonias de *B. thuringiensis* a partir de productos comerciales (4.4.2), su importancia en la muerte del insecto es relativa, sí bien este muere producto de la acción de las δ -endotoxinas presentes en la formulación comercial, antes de que las endosporas germinen, existe un efecto potenciador de las esporas y toxinas presentes en la formulación (Li *et al.*, 1987; Moar *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Dubovskiy *et al.*, 2021;). Se ha demostrado que este efecto sinérgico se debe a la producción de varios factores de virulencia, como α -exotoxinas, β -exotoxinas, quitinasas, fosfolipasas y enterotoxinas (Dubois & Dean, 1995; Agaisse *et al.*, 1999; Guttman y Ellar, 2000), independiente del proceso de germinación de las endosporas las cuales continúan con el proceso multiplicación de las bacterias, las cuales durante la fase estacionaria nuevamente secretan toxinas. La concentración de δ -endotoxinas se expresan en UIT / mg (CL_{50}), que viene a ser la concentración comercial del producto (CL_{50}) a partir se calcula la concentración (indicada en la etiqueta) para matar al total de insectos considerados en un ensayo.

La formulación comercial Laojita fue la más eficiente con un 100 % de mortandad en adultos de *Diabrotica spp.*, pasadas 96 horas de la inoculación (tabla 10, figura 8), mientras que la formulación Bio Spore no tuvo ningún efecto sobre los adultos tratados (tabla 10, figura 9).

Figura 8

Adultos de *Diabrotica spp.*, muertos por acción de *B. thuringiensis* después de 96 horas de ingestión de alimento envenenado.



Las aplicaciones continuas de *B. thuringiensis*, tienen mayor impacto en el control de plagas en una campaña agrícola, aunque su eficiencia está por debajo del uso de especies vegetales que lleven incorporado el (los) gen (es) que codifican para la producción de toxinas biocidas (Jenkins, 1999). La posibilidad de establecer una población bacteriana en un ecosistema agrícola es poco probable debido a la interacción microbiana *in situ* y el equilibrio de la biota del mismo, así como, a la intervención humana. En la naturaleza las epizootias producidas por *B. thuringiensis* son raras y se constituye en un mecanismo adicional de regulación poblacional más no el principal (Vaňková, & Purrini, 1979).

Tabla 10

Eficiencia de la infección de adultos de Diabrotica spp., con B. thuringiensis var. Kurstaki.

Tiempo (días)	Número promedio de insectos muertos por infección con <i>B. thuringiensis</i>		
	Testigo	Laojita	Bio Spore
1	0	0	0
2	0	1	0
3	0	5	0
5	0	7	0
6	0	8	0
Total	0	8	0

Se ha observado que la subespecie *kurstaki* principio activo de las formulación comercial Laojita, utilizada en el presente ensayo, presenta alto nivel de efecto biocida sobre adultos de *Diabrotica* spp., mientras que el alimento envenenado con la formulación Bio Spore PM (subespecie *kurstaki*) no produjo la muerte de ningún adulto de *Diabrotica* spp. Se ha reportado alta especificidad de las subespecies de *B. thuringiensis* frente a diferentes ordenes de insectos; los bioinsecticidas contra lepidópteros tienen como base a la subespecie *kurstaki* y *aizawai*, para coleópteros, *san diego*, *tenebrionis* y *galleriae*, y para dípteros, *israelensis* (Soberón *et al.*, 2009; Bravo *et al.*, 2011; Blackburn *et al.*, 2013), sin embargo, la composición de δ -endotoxinas secretadas por la especie *kurstaki*, es compleja, así Hassan *et al.*, (2014), encontraron que en 12 variantes de la subespecie *kurstaki*, el 100 % producía la Cry1, 54 % Cry2, 62 % Cry3, 85 % Cry4 y 54 % (Cry7 & Cry8). La clasificación de las δ -endotoxinas está en continuo perfeccionamiento, agrupamientos en base a la similitud de secuencias agrupan a diferentes toxinas en grupos Cry, Cyt (Crickmore, 2000; Crickmore *et al.*, 2021), VIP, (Estruch *et al.*, 1996), SIP efectivo contra coleópteros (Donovan *et al.*, 2006), entre otras, así podemos observar que en el grupo Cry tenemos la Cry1A-K, Cry7B, Cry8D, entre otras específicas contra

lepidópteros, mientras que, Cry1B, Cry1I, Cry3A-C, Cry7, Cry8A-G, entre otras, específicas contra coleópteros (Palma *et al.*, 2014), por lo que la alta efectividad observada de la subespecie *kurstaki* en el presente ensayo (todos los individuos – prueba murieron), se puede atribuir a la presencia de δ -endotoxinas pertenecientes a grupos letales a coleópteros. Por otro lado, la presencia en el mercado de formulaciones con base a la subespecie *kurstaki* transconjugada, comercializado bajo el nombre de Foil y *kurstaki* recombinante con el nombre Lepinox comercializados por la compañía Ecogen (Baum *et al.*, 1999), con actividad biocida contra coleópteros y lepidópteros, podría explicar la efectividad mostrada, la etiqueta del producto comercial Laojita no precisa ninguna indicación al respecto.

Figura 9

Adultos de *Diabrotica* spp. alimentadas con hojas de papa tratadas con Biospore (*B. thuringiensis* var *Kurstaki*).



Considerando que el strain *Kurstaki*, es base de ambas formulaciones, se realizó un bioensayo utilizando como insectos prueba, larvas del cuarto estadio larval de *S. frugiperda* (Noctuidae: Lepidoptera), para determinar si el producto Bio Spore había perdido su eficiencia o los resultados observados dependían de su especificidad. Los resultados son mostrados en la tabla 11.

Tabla 11

Eficiencia de la infección de larvas de Spodoptera frugiperda, con aplicación de B. thuringiensis var. Kurstaki

Tiempo (días)	Número promedio de larvas muertas por infección con <i>B. thuringiensis</i>		
	Testigo	Laojita	Bio Spore
1	0	0	0
2	0	1	0
3	0	5	0
5	0	7	0
6	0	7	0
Total	0	7	0

En la tabla 11 se observa que la formulación Bio Spore PM, no tenía ningún efecto sobre las larvas de *S. frugiperda*, esta misma formulación si tuvo un efecto letal contra larvas de *Helicoverpa zea* (Datos no publicados), 5 meses antes de realizado el ensayo con larvas de cogollero, asumimos por lo tanto que el producto había perdido su eficiencia pese a estar en el intervalo de su periodo de vigencia y haber sido almacenado en oscuridad y a la temperatura indicada para su conservación. Al respecto Booth *et al.* (2007), menciona el control efectivo de Crisomélidos utilizando la subespecie *kurstaki*. Es probable que la subespecie *kurstaki*, secrete además de las δ -endotoxinas específicas para el control lepidópteros, δ -endotoxinas como la Cry- 3, Cry-7 y Cry-8 con actividad contra coleópteros.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

La viabilidad de los aislamientos de *B. bassiana* tiende a disminuir con el tiempo, es variable y depende de la formulación. Aparentemente no hay disminución en la virulencia en el caso del Beauvesol, la baja solubilidad del Yurak podría ser la causa de la baja efectividad del producto. En el caso de *B. thuringiensis*, fue posible recuperar u.f.c. a partir de las endosporas del medio, estas son importantes por la sinergia reportada con las δ -endotoxinas en la actividad del biocontrolador.

La sintomatología causada por *B. bassiana* (Zimm.) en adultos de *Diabrotica spp.* se caracterizó por movimientos más lentos a partir del 5to día después de la inoculación, movimientos descoordinados de apéndices, parálisis y muerte de adultos infectados. La infección por *B. thuringiensis* mostró una detención inicial de la alimentación, movimiento aletargado, seguido de falta de coordinación de las extremidades y detención casi total del movimiento a las 72 horas observable como movimientos ocasionales e involuntarios de patas y antenas. A las 96 horas todos los insectos habían muerto.

La eficiencia del uso de *B. bassiana* se manifestó en una alta mortandad 94.99 % con el Beauvesol a una concentración de 10^6 conidios por mL, en relación a las otras concentraciones de beauvesol 10^5 (59.99 %), 10^4 (29.99 %). La baja mortandad causada por la formulación Yurak 10^6 (24.99 %), 10^5 y 10^4 (<6 %) pudo deberse a problemas de solubilidad del producto, asociado a las características de la formulación. La formulación Laojita (*B. thuringiensis*) mostró una alta efectividad a la dosis comercial, no se conoce la naturaleza del aislamiento base de la formulación, pero podríamos asumir que se trate de un aislamiento mejorado. La formulación Bio Spore tuvo aparentemente problemas de estabilidad y perdió su efectividad después de 5 meses de adquirido el producto, la posible especificidad del aislamiento en esta

última formulación fue descartada por inoculación de larvas de *S. frugiperda* con las formulaciones Laojita y Bio Spore, confirmándose que había perdido su efectividad.

El manejo de los adultos de *Diabrotica ssp* y la optimización de las condiciones de inoculación e incubación son importantes para reducir la variabilidad en la evaluación de la viabilidad de los entomopatógenos en las formulaciones y así obtener resultados más precisos y confiables en la realización posterior de bioensayos. La estimación de la dosis letal (DL) en las primeras fases de la investigación con entomopatógenos es muy importante para determinar su virulencia y la posterior determinación de la Concentración letal (CL) de utilidad práctica en ensayos y aplicaciones en el campo.

5.2 Recomendaciones.

Optimizar los protocolos de manejo de poblaciones de insectos plaga y biocontroladores para la realización de los ensayos de inoculación para los diferentes patosistemas (insectos – entomopatógeno), que permitan obtener resultados más precisos, exactos y con altos niveles de confiabilidad y repetibilidad.

Considerar la colecta de aislamientos locales de entomopatógenos y su caracterización morfológica y patogénica, que permitan resultados putativamente más eficientes y sostenibles derivados de su adaptabilidad *in situ* y sus interrelaciones con las poblaciones de insectos plaga de la región.

Optimizar el cálculo de los valores de la dosis letal y la concentración letal en cada caso particular de interacción plaga – biocontrolador con el fin de aprovechar la máxima eficiencia del entomopatógeno en el control de plagas.

Recalcar el rol de la Universidad Nacional de Cajamarca como institución involucrada en la generación y transferencia de investigación básica y aplicada, en la investigación de entomopatógenos como base en el diseño de estrategias de manejo integrado de plagas en los principales cultivos de la región, beneficiando a los agricultores de la región.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agaisse, H., Gominet, M., Økstad, O.A., Kolstø, A., & Lereclus, D. (1999). PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology*, 32.
- Aronson, A. I., & Shai, Y. (2001). Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS microbiology letters*, 195(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10489.x>
- Ávila, C. J., & Santana, A. G. (2013). *Diabrotica speciosa*: an important soil pest in South America. In *Potential invasive pests of agricultural crops* (pp. 75-85). Wallingford UK: CABI.
- Bacon, S.J., Aebi, A., Calanca, P., & Bacher, S. (2014). Quarantine arthropod invasions in Europe: the role of climate, hosts and propagule pressure. *Diversity and Distributions*, 20.
- Baum, J.A.; Johnson, T.B. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. In *Methods in Biotechnology, Vol5: Biopesticides: Use and Deliver*, Humana Press Inc.: Totowa, NJ, USA, 1999; pp. 189–209
- Blackburn MB, Martin PAW, Kuhar D, Farrar RR Jr, Gundersen-Rindal DE (2013) Phylogenetic Distribution of Phenotypic Traits in *Bacillus thuringiensis* Determined by Multilocus Sequence Analysis. *PLOS ONE* 8(6): e66061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066061>
- Boucias, D. G., Pendland, J. C., & Latge, J. P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and environmental microbiology*, 54(7), 1795–1805. <https://doi.org/10.1128/aem.54.7.1795-1805.1988>
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. (1991). Attachment of Mycopathogens to Cuticle. In: Cole, G.T., Hoch, H.C. (eds) *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants*

and Animals (pp. 101–128). Springer, Boston, MA.

https://doi.org/10.1007/978-1-4899-2635-7_5

Boucias, D.G. and Pendland, J.C. (1998) Principles of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts.

Branson, T.F., & Krysan, J.L. (1981). Feeding and Oviposition Behavior and Life Cycle Strategies of *Diabrotica* : An Evolutionary View with Implications for Pest Management. *Environmental Entomology*, 10, 826-831.

Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. 2010. *Bacillus thuringiensis*: Mechanisms and use. In Insect Control Biological and Synthetic Agents (pp. 247-277) G. Lawrence and G. Sarjeet (eds.). Academic Press, London, USA

Bravo, A., Gill, S. S., & Soberón, M. (2007). Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 49(4), 423–435.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>

Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(7), 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>

Booth, S.R., Drummond, F.A., Groden, E. (2007). Small fruits. In: Lacey, L.A., Kaya, H.K. (eds) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (pp 583-598). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9_28

Burchett, A. (2001) Operation rootworm: Can biotechnology beat the one-billion dollar bug? *Farm Journal*, 125(11), 16–18.

Burges, H.D., & Hurst, J.A. (1977). Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30, 131-139.

Bustamante, R: (2024). Efecto bioplaguicida de *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecanii* sobre *Diabrotica* spp. en el cultivo de alfalfa (*Medicago sativa* L.) en

Cajamarca. (Tesis para optar el título de ingeniero agrónomo). Universidad Nacional de Cajamarca.

<https://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14074/6781/TESIS%20ROBERTH%20BUSTAMANTE%20G..pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Butt, T.M., Ibrahim, L., Clark, S.J., & Beckett, A.H. (1995). The germination behaviour of *Metarhizium anisopliae* on the surface of aphid and flea beetle cuticles. *Fungal Biology*, 99, 945-950.

Butt, T. & Goettel, M. (2000) Bioassays of Entomogenous Fungi. In: Navon, A. & Ascher, K.R.S (eds). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* (pp. 141-195). CAB International, Wallingford, UK

Cabrera Walsh, G. (2005). "Diabroticina (Coleóptera : Chrysomelidae: Galerucinae) de la Argentina y el Cono Sur: una visión biogeográfica y evolutiva de su biología y la de sus enemigos naturales, en relación con la factibilidad del control biológico de las especies plagas" . (Tesis para obtener el grado de Doctor). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cabrera Walsh, G., Ávila, C.J., Cabrera, N., Nava, D.E., de Sene Pinto, A., & Weber, D.C. (2020). Biology and Management of Pest Diabrotica Species in South America. *Insects*, 11.

Capinera, J.L. (2008). Poikilothermic. En *Encyclopedia of Entomology*. (pp. 2959). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_268.

Chuquibala-Checan, B., Torres-de la Cruz, M., Leiva, S., Hernandez-Diaz, E., Rubio, K.B., Goñas, M., Arce-Inga, M., & Oliva-Cruz, M. (2023). In Vitro Biological Activity of *Beauveria bassiana*, *Beauveria peruviana*, and *Metarhizium sp.* against *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Agronomy*.

- Coats, J. R. (1986). Toxicological methods and laboratory testing of insecticides. In *Methods for the Study of Pest Diabrotica - Springer Series in Experimental Entomology* (pp. 205–226). Springer New York.
- Crickmore, N. (2000). The diversity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins. In: Charles, J.F., Delécluse, A., Roux, C.N.L. (eds) *Entomopathogenic Bacteria: from Laboratory to Field Application*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1429-7_4
- Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R., & Bonning, B. C. (2021). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 186, 107438. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2020.107438>
- Deka, B., Baruah, C. & Babu, A. (2021). Entomopathogenic microorganisms: their role in insect pest management. *Egypt J Biol Pest Control* 31, 121 <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00466-7>.
- de Maagd, R. A., Bravo, A., & Crickmore, N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in genetics : TIG*, 17(4), 193–199. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02237-5)
- Dhooria, M. S. (2008). *Ane's encyclopedic dictionary of general & applied entomology* (2008a ed.). Springer.
- Donovan, W.P., Engleman, J.T., Donovan, J.C., Baum, J.A., Bunkers, G.J., Chi, D., Clinton, W.P., English, L.H., Heck, G.R., Ilagan, O.M., Krasomil-Osterfeld, K.C., Pitkin, J.W., Roberts, J.K., & Walters, M.R. (2006). Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 713-719.
- Dubois, N.R., & Dean, D.H. (1995). Synergism between CryIA insecticidal crystal proteins and spores of *Bacillus thuringiensis*, other bacterial spores, and

vegetative cells against *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae. *Environmental Entomology*, 24, 1741-1747.

- Dubovskiy, I. M., Grizanova, E. V., Tereshchenko, D., Krytsyna, T. I., Alikina, T., Kalmykova, G., Kabilov, M., & Coates, C. J. (2021). *Bacillus thuringiensis* Spores and Cry3A Toxins Act Synergistically to Expedite Colorado Potato Beetle Mortality. *Toxins*, 13(11), 746. <https://doi.org/10.3390/toxins13110746>
- Eben, A. (2022). Ecology and Evolutionary History of Diabrotica Beetles—Overview and Update. *Insects*, 13.
- Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5389–5394. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5389>
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2005). *Diabrotica speciosa*. https://gd.eppo.int/download/doc/846_ds_DIABSC_en.pdf
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2021a-04-26). *Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata*. https://gd.eppo.int/taxon/DIABUN/download/datasheet_pdf
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. (2021b-09-09). *Diabrotica undecimpunctata howardi*. https://gd.eppo.int/taxon/DIABUH/download/datasheet_pdf.
- Faria, M., Hotchkiss, J. H., Hajek, A. E., & Wraight, S. P. (2010). Debilitation in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and implication with respect to viability determinations and mycopesticide quality assessments. *Journal of invertebrate pathology*, 105(1), 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.05.011>

- Fernandes, É. K., Rangel, D. E., Braga, G. U., & Roberts, D. W. (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current genetics*, 61(3), 427–440. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0492-z>
- Fernández, R., Trapero, A. & Domínguez., J. (2010). Experimentación en agricultura. Sevilla Consejería de Agricultura y Pesca, Servicio de Publicaciones y Divulgación.
- Finney D.J. (1978) Statistical method in biological assay, 3rd ed. Charles Griffin & Co., London. <https://doi.org/10.1002/bimj.4710210714>
- Flowers, R.W. (2004). Leaf Beetles (Coleoptera: Chrysomelidae). In: Encyclopedia of Entomology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-48380-7_2346.
- Garczynski, S.F., Siegel, J.P. (2007). Bacteria. In: Lacey, L.A., Kaya, H.K. (eds) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9_8
- Gill, S. S., Cowles, E. A., & Pietrantonio, P. V. (1992). The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual review of entomology*, 37, 615–636. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003151>
- Goettel, M. & Inglis, D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In: L.A. Lacey (ed.). Manual of Techniques in Insect Pathology (pp. 213–249). Acad. Press.
- Gómez-Zurita, J., Hunt, T., & Vogler, A.P. (2008). Multilocus ribosomal RNA phylogeny of the leaf beetles (Chrysomelidae). *Cladistics*, 24.
- Gómez-Zurita, J., Hunt, T., Koplíku, F., & Vogler, A.P. (2007). Recalibrated Tree of Leaf Beetles (Chrysomelidae) Indicates Independent Diversification of Angiosperms and Their Insect Herbivores. *PLoS ONE*, 2. e360.

- Guttman, D., & Ellar, D.J. (2000). Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS microbiology letters*, 188 1, 7-13.
- Humber, R. (1997). Fungi: preservation of cultures. In: L.A. Lacey (ed.). *Manual of Techniques in Insect Pathology* (pp. 269–279). Acad. Press.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkaničová, Z., Papadopoulou, A., John, O.S., Wild, R., Hammond, P.M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M.S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T.G., Bocakova, M., Bocak, L., & Vogler, A.P. (2007). A Comprehensive Phylogeny of Beetles Reveals the Evolutionary Origins of a Superradiation. *Science*, 318, 1913 - 1916.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M. and Strasser, H. (2001) Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pests. In: Butt, T.M., Jackson, C. and Magan, N., Eds., *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential* (pp. 23-69), CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0023>
- Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P. M., Meziane, A. E., & Yao, Y. (2017). Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal Of Asia-Pacific Entomology*, 20(4), 1204-1212. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.015>.
- Jenkins, J.N. (1999). Transgenic Plants Expressing Toxins from *Bacillus thuringiensis*. In: Hall, F.R., Menn, J.J. (eds) *Biopesticides: Use and Delivery. Methods in Biotechnology*, vol 5. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-515-8:211>.
- Jones K. A. (2000). Bioassays of Entomopathogenic Viruses. In A. Navon & K. R. S. Ascher (Eds.), *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes* (pp. 95-140). Wallingford: CAB Publishing

- Keller, S., Zimmerman, G., 1989. Mycopathogens of soil insects. In: Wilding, N., Collins, N.M., Hammond, P.M., Webber, J.F. (Eds.), *Insect-Fungus Interactions*. Academic Press, London, UK, pp. 240-270.
- Keswani, C., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2013). *Beauveria bassiana*: Status, Mode of action, Applications and Safety issues. *Biotech Today*, 3(1), 16-19. <https://doi.org/10.5958/j.2322-0996.3.1.002>.
- Kim, J.C., Lee, M.R., Kim, S., Lee, S.J., Park, S.E., Baek, S., Gasmi, L., Shin, T.Y., & Kim, J.S. (2019). Long-term storage stability of *Beauveria bassiana* ERL836 granules as fungal biopesticide. *Journal of Asia-Pacific Entomology*.
- Kirk, P., Cannon, P., Minter, D. & Stalpers, J.A., 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed. CABI Publisher, Wallingford, UK.
- Krysan, J.L. (1986). Introduction: Biology, Distribution, and Identification of Pest *Diabrotica*. In: Krysan, J.L., Miller, T.A. (eds) *Methods for the Study of Pest Diabrotica*. Springer Series in Experimental Entomology. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4868-2_1.
- Krysan, J.L., Jackson, J.J., & Lew, A.C. (1984). Field Termination of Egg Diapause in *Diabrotica* with New Evidence of Extended Diapause in *D. barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology*, 13, 1237-1240.
- Lachhab, K., Tyagi, R.D., & Valéro, J.R. (2001). Production of *Bacillus thuringiensis* biopesticides using wastewater sludge as a raw material: effect of inoculum and sludge solids concentration. *Process Biochemistry*, 37, 197-208.
- Levine, J.M., & D'Antonio, C.M. (2003). Forecasting Biological Invasions with Increasing International Trade. *Conservation Biology*, 17.
- Li, R. S., Jarrett, P., & Burges, H. D. (1987). Importance of spores, crystals, and δ -endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50(3), 277-284.

- Lingg, A.J., & Donaldson, M. (1981). Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38, 191-200.
- Liu, Y. B., Tabashnik, B. E., Moar, W. J., & Smith, R. A. (1998). Synergism between *Bacillus thuringiensis* Spores and Toxins against Resistant and Susceptible Diamondback Moths (*Plutella xylostella*). *Applied and environmental microbiology*, 64(4), 1385–1389. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.4.1385-1389.1998>
- Lynch, R.E., Lewis, L.C., & Brindley, T.A. (1976). Bacteria associated with eggs and first-instar larvae of the european corn borer: Isolation techniques and pathogenicity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 27, 325-331.
- Lövgren, A., Zhang, M., Engström, A., Dalhammar, G., & Landén, R. (1990). Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Molecular microbiology*, 4(12), 2137–2146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00575.x>
- Malpartida-Zevallos, Jenny, Narrea-Cango, Mónica, & Dale-Larraburre, William. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2), 75-81. Recuperado en 23 de abril de 2025, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162013000200002&lng=es&tlng=es.
- Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 789–797. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>.
- Meyling, N.V., & Eilenberg, J. (2006). Occurrence and distribution of soil borne entomopathogenic fungi within a single organic agroecosystem. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 113, 336-341.

- Moar WJ, Trumble JT, Federici BA (1989) Comparative toxicity of spores and crystals from the NRD-12 and HD-1 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to neonate beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 82:1593–1603
- Nussenbaum, A.J. (2014). Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodonoero, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). (Tesis para optar el grado de doctor en el área de Ciencias Biológicas). Universidad de Buenos Aires. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5511_Nussenbaum.pdf.
- Oyediran, I. O., Matthews, P., Palekar, N., French, W., Conville, J., & Burd, T. (2016). Susceptibility of northern corn rootworm *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae) to mCry3A and eCry3.1Ab *Bacillus thuringiensis* proteins. *Insect science*, 23(6), 913–917. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12249>.
- Paini, D., Sheppard, A.W., Cook, D.C., De Barro, P.J., Worner, S.P., & Thomas, M.B. (2016). Global threat to agriculture from invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 7575 - 7579.
- Palma, L., Muñoz, D., Berry, C., Murillo, J., & Caballero, P. (2014). *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. *Toxins*, 6(12), 3296-3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>.
- Prasertphon, S., Areekul, P., & Tanada, Y. (1973). Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in host cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 21, 205-207.
- Rabinovitch, L., Vivoni, A. M., Machado, V., Knaak, N., Berlitz, D. L., Polanczyk, R. A., & Fiúza, L. M. (2017). *Bacillus thuringiensis* Characterization: Morphology, Physiology, Biochemistry, Pathotype, Cellular, and Molecular Aspects. In L. Fiuza, R. Polanczyk & N. Crickmore (eds), *Bacillus thuringiensis* and

- Lysinibacillus sphaericus*, Characterization and Use in the Field of Biocontrol (pp. 1–18). Springer eBooks. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_1.
- Rehner, A., Minnis, A. Sung, G., Luangsa-ard, J., Devotto, L., & R. Humber. (2016). “Phylogeny and Systematics of the Anamorphic, Entomopathogenic Genus *Beauveria*.” *Mycologia* 103, no. 5 (2011): 1055–73. <http://www.jstor.org/stable/23055149>.
- Rojas-Sandoval, J. (2022). *Diabrotica speciosa* (cucurbit beetle). CABI Compendium.
- Ruan, L., Crickmore, N., Peng, D., & Sun, M. (2015). Are nematodes a missing link in the confounded ecology of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*? *Trends in microbiology*, 23(6), 341–346. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.02.011>
- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-smith, T., Guiry, M.D., & Kirk, P.M. (2015). A Higher Level Classification of All Living Organisms. *PLoS ONE*, 10.
- Schabel, H.G. (1976) Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 27, 377–383.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(3), 775–806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- Sidén, I., Dalhammar, G., Telander, B., Boman, H. G., & Somerville, H. (1979). Virulence factors in *Bacillus thuringiensis*: purification and properties of a protein inhibitor of immunity in insects. *Journal of general microbiology*, 114(1), 45–52. <https://doi.org/10.1099/00221287-114-1-45>
- Siegel, J. P., Tebbets, J. S., & Vail, P. V. (2000). Prevalence and transovum transmission of *Bacillus thuringiensis* berliner in a navel orangeworm colony. *Journal of invertebrate pathology*, 75(2), 171–173. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4916>

- Smith, R. A., & Couche, G. A. (1991). The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants. *Applied and environmental microbiology*, 57(1), 311–315. <https://doi.org/10.1128/aem.57.1.311-315.1991>
- Soberón, M., Gill, S. S., & Bravo, A. (2009). Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells?. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(8), 1337–1349. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8330-9>
- Tanada, Y., & Fuxa, J. R. (1987). The pathogen population. In J. R. Fuxa & Y. Tanada (Eds.), *Epizootiology of Insect Diseases* (pp. 113-157). New York: Wiley Interscience.
- Tanzini M, Alves S, Setten A, Augusto N (2001) Compatibilidad de agentes estensoactivos con *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Manejo Integrado De Plagas* 59:15–18
- Tang, J. D., Shelton, A. M., Van Rie, J., De Roeck, S., Moar, W. J., Roush, R. T., & Peferoen, M. (1996). Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Spore and Crystal Protein to Resistant Diamondback Moth (*Plutella xylostella*). *Applied and environmental microbiology*, 62(2), 564–569. <https://doi.org/10.1128/aem.62.2.564-569.1996>
- Thomas, M.C. (2008). Beetles (Coleoptera). In: Capinera, J.L. (eds) *Encyclopedia of Entomology*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_268.
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of invertebrate pathology*, 111(1), 1–12.
- Vaňková, J. and Purrini, K. (1979), Natural epizooties caused by bacilli of the species *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 88: 216-221.

- Wraight, S.P., Butt, T.M., Galaini-Wraight, S., Allee, L.L., Soper, R.S., & Roberts, D.W. (1990). Germination and infection processes of the entomophthoralean fungus *Erynia radicans* on the potato leafhopper, *Empoasca fabae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56, 157-174.
- Westphal, M.I., Browne, M., Mackinnon, K., & Noble, I.R. (2008). The link between international trade and the global distribution of invasive alien species. *Biological Invasions*, 10, 391-398.
- Yezza, A., Tyagi, R., Valéro, J., & Surampalli, R.Y. (2005). Production of *Bacillus thuringiensis*-based biopesticides in batch and fed batch cultures using wastewater sludge as a raw material. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80, 502-510.
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science And Technology*, 17(6), 553-596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>.

ANEXOS

Anexo 1

Medio de Cultivo Agar Saboraud (SDA) modificado

20 g/L glucosa.

10 g/L Peptona.

15 g/L Agar.

0,05 g/L Ampicilina

pH 5.6

Autoclavar a 121 °C y 15 PSI

Anexo 2

Medio (YDA) modificado

3 gr/L de extracto de levadura

4 gr/L de glucosa

15 gr/L de agar

Autoclavar a 121 °C y 15 PSI