

**Evaluar la susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) a dos cepas locales posibles
Bacillus thuringiensis en comparación con producto comercial bajo condiciones *in vitro*.**

Jhony Paul Cabrera Morales

1081595684

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Agrarias

Departamento de Agronomía

Programa de Ingeniería Agronómica

2021

Trabajo de Grado desarrollado en la modalidad de investigación, presentado como
requisito para optar por el título de Ingeniero Agrónomo.

Director: I.A. Dr. Humberto Giraldo Vanegas

Co-directora: Microbióloga. Magister. Angela Maritza Cajiao Pedraza

Agradecimientos

Primeramente, a DIOS por darme la vida, salud y la oportunidad de completar uno de mis más grandes sueños. Seguidamente a mis padres Omar Cabrera y Eva Morales, quienes desde siempre han sido mi más grande inspiración y apoyo para salir adelante.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias, por haber sido parte de mí proceso de formación.

A mí tutor de tesis, I.A. Dr. Humberto Giraldo Vanegas, por confiar en mis capacidades, aportarme sus conocimientos y experiencia en la ejecución de esta investigación.

A mí Co-directora, Microbióloga. Magister. Angela Maritza Cajiao Pedraza y Jhordan Derley Rojas Bastos, por guiarme en este proceso.

A mi hermana y amigos, que han estado a mi lado.

Jhony Paul Cabrera Morales

Tabla de contenido

Resumen.....	9
Abstract.....	10
Glosario.....	11
1. Introducción.....	14
2. Problema y descripción	15
3. Justificación.....	16
4. Delimitación	17
5. Objetivos.....	18
5.1. Objetivo General	18
5.2. Objetivos específicos.....	18
6. Marco de referencia	19
6.1. Antecedentes regionales.....	19
6.2. Antecedentes nacionales	21
6.3. Antecedentes internacionales	22
7. Marco contextual	23
8. Marco teórico.....	24
8.1. <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
8.1.1. Origen y distribución	24
8.1.2. Descripción	25
8.1.3. Clasificación taxonómica.....	26
8.1.4. Morfología y biología	27
8.1.5. Ciclo de vida de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	29
8.2. <i>Plutella xylostella</i> (L.).....	30
8.2.1. Origen y distribución	30
8.2.2. Descripción morfológica.....	31
8.2.3. Clasificación Taxonómica	32
8.2.4. Ciclo de vida	32
9. Marco legal	34
9.1. Acuerdo No. 186	34
9.2. Resoluciones del Instituto Colombiano Agropecuario.....	35
9.2.1. Ley 9 de 1979: de las sustancias peligrosas -plaguicidas- artículos pirotécnicos... 35	

9.2.2.	Ministerio de salud decreto 775 del 16 de abril de 1990	36
9.2.3.	Resolución No. 0857 del 16 de mayo de 2018.	36
10.	Metodología	37
10.1.	Tipo de Investigación	37
10.2.	Diseño Metodológico	37
10.2.1.	Hipótesis	37
10.2.2.	Sistema de Variables.....	38
10.2.3.	Diseño de la investigación.	38
10.2.4.	Diseño Experimental.....	39
10.2.5.	Colecta y Cría masiva de <i>P. xylostella</i>	40
10.2.6.	Técnica de Cría de <i>P. xylostella</i>	41
10.2.7.	Descripción de las Actividades.....	42
11.	Resultados y análisis	50
11.1.	Caracterización fenotípicamente dos cepas locales de <i>B. thuringiensis</i>	50
11.1.1.	Porcentaje de identificación.....	50
11.1.2.	Porcentaje de identificación posiblemente <i>Bacillus thuringiensis</i>	52
11.2.	Comprobación de la mortalidad que causan diferentes concentraciones de las cepas <i>B. thuringiensis</i>	56
11.2.1.	Mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> L.	56
11.3.	Determinación del DL ₅₀ y TL ₅₀ de las cepas de <i>B. thuringiensis</i>	62
11.3.1.	Determinación del DL ₅₀	62
11.3.2.	Determinación del TL ₅₀	66
12.	Conclusiones	73
13.	Recomendaciones	74
14.	Referencias bibliográficas.....	74
15.	Anexos	82

Lista de figuras

Figura 1 Laboratorio de Sanidad Vegetal	24
Figura 2 Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. Kurstaki en microscopio electrónico de transmisión. C: cristal proteínico bipiramida (L.) E: espora.....	26
Figura 3 Ciclo de reproducción del género <i>Bacillus</i> sp.....	30
Figura 4 Ciclo biológico en días de la palomilla dorso de diamante	33
Figura 5 Jameo para la recolección de adultos	41
Figura 6 Distribución de los tratamientos y repeticiones.	46
Figura 7 Discos de repollo en cada tratamiento / disposición de los discos en su respectivo recipiente.....	47
Figura 8 Observación a través del estereoscopio	48
Figura 9 Aislamientos de posibles cepas locales de <i>Bacillus thuringiensis</i> , de suelo agrícola (a) y de suelo de bosque (b).....	50
Figura 10 Observación en el microscopio óptico Zeiss Primo Star 100 X podemos observar las estructuras internas, tinción simple con azul de metileno.....	53
Figura 11 Observación en el microscopio óptico Zeiss Primo Star 100 X células vegetativas 18 horas de crecimiento, tinción de Gram	54
Figura 12 Cristales en campos oculares aumento 1000x cepas locales 1 y 2 respectivamente...	55
Figura 13 Respuesta en las mortalidades de larvas de <i>P. xylostella</i> , sometidas a los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa comercial Dipel, bajo condiciones <i>in vitro</i>	57
Figura 14 Respuesta en las mortalidades de larvas de <i>P. xylostella</i> , sometidas a los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa local proveniente de suelos agrícolas, bajo condiciones <i>in vitro</i>	60

Figura 15 Respuesta en las mortalidades de larvas de <i>P. xylostella</i> , sometidas a los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa local proveniente de suelos de bosque, bajo condiciones <i>in vitro</i>	62
Figura 16 Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a cinco concentraciones de la cepa comercial de <i>B. thuringiensis</i>	64
Figura 17 Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo agrícola de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	64
Figura 18 Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo de bosque de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	65
Figura 19 Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a cinco concentraciones de la cepa comercial de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	70
Figura 20 Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo agrícola de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	¡Error! Marcador no definido.
Figura 21 Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo de bosque de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	71
Figura 22 Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a cinco concentraciones de la cepa comercial de <i>B. thuringiensis</i>	72

Lista de tablas

Tabla 1 Taxonomía <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	26
Tabla 2 Taxonomía <i>Plutella xylostella</i>	32
Tabla 3 Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a las 3 muestras teniendo como patrón referente a los testigos positivos HD1 y NA118.....	52
Tabla 4 Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> , en los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa comercial Dipel, bajo condiciones <i>in vitro</i>	57
Tabla 5 Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> , en los diferentes tratamientos (dosis) de la cepa de <i>B. thuringiensis</i> proveniente de suelos agrícolas, bajo condiciones <i>in vitro</i>	59
Tabla 6 Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> , en los diferentes tratamientos (dosis) de la cepa de <i>B. thuringiensis</i> proveniente de suelos de bosque, bajo condiciones <i>in vitro</i>	61
Tabla 7 Dosis letales DL ₅₀ y DL ₉₀ , de las tres cepas de <i>B. thuringiensis</i> para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , en condiciones de laboratorio.....	63
Tabla 8 Tiempo Letal Medio (TL ₅₀), en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a cinco concentraciones de la cepa comercial (Dipel), en condiciones <i>in vitro</i>	67
Tabla 9 Tiempo Letal Medio (TL ₅₀), en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo agrícola, en condiciones <i>in vitro</i>	68
Tabla 10 Tiempo Letal Medio (TL ₅₀), en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo de bosque, en condiciones <i>in vitro</i>	69

Lista de anexos

Anexo 1 Formato para la toma de datos de Mortalidad de larvas.	82
Anexo 2 Anova Mortalidades de las tres cepas, la comercial, de suelo agrícola y suelo de bosque.	83
Anexo 3 Comparación de medias Tukey cepa comercial Dipel.	84
Anexo 4 Comparación de medias Tukey proveniente de suelo agrícola.	85
Anexo 5 Comparación de medias Tukey cepa proveniente de suelo de bosque.	85
Anexo 6 Resumen del Modelo para la Regresión de cepa comercial (DL50).	86
Anexo 7 Resumen del Modelo para la Regresión de cepa de suelo agrícola.	86
Anexo 8 Resumen del Modelo para la Regresión de suelo de bosque.	87
Anexo 9 Depositando <i>Plutella xylostella</i> en bolsas en campo. Fuente: Cabrera, 2021.	88
Anexo 10 Nevera de icopor para trasladar muestras desde el campo a laboratorio. Fuente: Cabrera, 2021.	88
Anexo 11 cámaras de reproducción y crianza de <i>P. xylostella</i> . Fuente: Cabrera, 2021.	89

Resumen

Susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) a dos cepas locales posibles *Bacillus thuringiensis* en comparación con producto comercial bajo condiciones *in vitro*.

La polilla *Plutella xylostella* (L.) es una plaga primaria causante de grandes daños y pérdidas económicas a los productores de hortalizas Brassicaceae del mundo. Su plasticidad genética y ser multivoltina le ha permitido desarrollar rápida resistencia a los diferentes insecticidas de síntesis. Los objetivos del bioensayo fueron caracterizar fenotípicamente las cepas estudiadas; evaluar la mortalidad, DL_{50} y TL_{50} *in vitro* de tres cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner); una comercial y dos locales. Las tres cepas se estudiaron dosis de 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^8 , 1×10^{10} , 1×10^{12} UFC/ml y un testigo absoluto probándose sobre larvas de segundo instar en condiciones *in vitro*. Se utilizó un Diseño al azar con seis tratamientos, cinco repeticiones, repetición con cinco larvas para cada una de las tres cepas. La mortalidad evaluó cada 12 horas hasta la muerte total de las larvas o la emergencia de adultos. Los datos se analizaron con SPSS, usando Pruebas Probit para calcular DL_{50} . Las dos cepas locales presentaron colonias características del género *Bacillus* sp. La cepa de suelos de bosque provocó mortalidades de 100% a dosis más bajas que las otras dos cepas, la concentración 1×10^4 causó el 84% de mortalidad, no así para las otras dos cepas donde las mortalidades estuvieron por debajo del 76%. Aunque las DL_{50} fueron muy similares a 1×10^8 entre las tres cepas; el TL_{50} si fueron diferentes, donde la cepa de suelo de bosque causó la mortalidad del 50% de la población a las 19 horas; mientras que la cepa comercial el DL_{50} fue de 52 horas y para la cepa de suelos agrícolas fue de 48 horas. La cepa de suelo de bosque se considera un buen candidato como bioinsecticida, debido que demostró ser más letal que la cepa comercial.

Palabras clave: *Plutella xylostella*, *Bacillus thuringiensis*, mortalidad.

Abstract

Susceptibility of *Plutella xylostella* (L.) to two possible local strains *Bacillus thuringiensis* in compared to commercial product under *in vitro* conditions

The *Plutella xylostella* (L.) moth is a primary pest that causes great damage and economic loss to Brassicaceae vegetable growers around the world. Its genetic plasticity and being multivoltine has allowed it to develop rapid resistance to different synthetic insecticides. The objectives of the bioassay were to characterize the studied strains phenotypically; evaluate the mortality, DL₅₀ and TL₅₀ *in vitro* of three strains of *Bacillus thuringiensis* (Berliner); one commercial and two local. The three strains were studied at doses of 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^8 , 1×10^{10} , 1×10^{12} CFU / ml and an absolute control was tested on second instar larvae under *in vitro* conditions. A randomized design with six treatments, five replications, and repetition with five larvae was used for each of the three strains. Mortality evaluated every 12 hours until the total death of the larvae or the emergence of adults. Data was analyzed with SPSS, using Probit Tests to calculate DL₅₀. The two local strains presented characteristic colonies of the genus *Bacillus* sp. The forest soil strain caused mortalities of 100% at lower doses than the other two strains, the 1×10^4 concentration caused 84% mortality, not so for the other two strains where the mortalities were below 76%. Although the DL₅₀ were very similar to 1×10^8 among the three strains; the TL₅₀ if they were different, where the forest floor strain caused the mortality of 50% of the population at 19 hours; while the commercial strain the DL₅₀ was 52 hours and for the agricultural soil strain it was 48 hours. The forest floor strain is considered a good candidate as a bioinsecticide, as it has been shown to be more lethal than the commercial strain.

Key words: *Plutella xylostella*, *Bacillus thuringiensis*, mortality.

Glosario

Agente de Control Biológico: son organismos macro y microbiológicos que interactúan con otros organismos causando la regulación de sus poblaciones en sistemas naturales y artificiales.

Agroquímico: es una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas y patógenos; o ser utilizadas como regulador de plantas o defoliante.

***Bacillus thuringiensis*:** es una bacteria Gram positiva que habita en el suelo, y que se utiliza comúnmente como una alternativa biológica al plaguicida

Brassicaceae: es una familia de plantas que agrupa a numerosas especies de variados usos para el hombre, como alimento fresco e industrializado, y como plantas forrajeras, medicinales y ornamentales.

Cepa comercial: cepas suministradas por casas comerciales diferentes de las colecciones de cultivo o Centros de Recursos Biológicos, y que pueden o no proceder de una colección de cultivos

Cepa nativa: Población de una especie natural que descende de una sola célula.

Control Biológico Aplicado (CBA): Este método consiste en la preservación y conservación de los insectos benéficos, para mantener el equilibrio natural de agroecosistemas principalmente.

Control Biológico: es un componente de MIP, se define como la reducción de las poblaciones de plagas mediante enemigos naturales y por lo general implica un papel humano.

DL₅₀: dosis letal media, es la cantidad de la dosis de una sustancia, radiación o patógeno necesaria para matar a la mitad de un conjunto de animales de prueba después de un tiempo determinado

Manejo Integrado de Plagas: estrategia que usa una gran variedad de métodos complementarios: físicos, mecánicos, químicos, biológicos, genéticos, legales y culturales para el control de plagas

***Plutella xylostella*:** es una especie de insecto lepidóptero de la familia Plutellidae, cosmopolita y multivoltina con una distribución global

Serotipo: es un tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presentan en su superficie celular. Los serotipos permiten diferenciar organismos a nivel de subespecie, algo de gran importancia en epidemiología

Susceptibilidad: es una condición de un organismo que aumenta la probabilidad de que el individuo desarrolle una enfermedad en particular. La susceptibilidad está influenciada por una combinación de factores genéticos y ambientales.

TL₅₀: es el valor medio del intervalo de tiempo, durante el cual se espera que muera el 50% de una población dada, durante la exposición a esta misma.

Toxicidad: describe el grado en el cual una sustancia es venenosa o puede causar una lesión. La toxicidad depende de diferentes factores: dosis, duración y ruta de exposición

Toxinas Cry y Cyt: son proteínas perforadoras de membranas celulares, aunque no relacionadas estructuralmente y difieren en sus requerimientos de componentes esenciales de membrana. Las

proteínas *Cry* se unen a receptores de membrana, mientras que las *Cyt* se unen con alta afinidad a fosfolípidos insaturados

1. Introducción

El repollo *Brassica oleracea* subsp. *capitata* (L.) Schübler & G. Martens (1.834), es una planta herbácea, dicotiledónea y bianual, originaria de la región mediterránea de Europa, la cual ha sido cultivada por miles de años, como planta domesticada no se sabe exactamente, pero existen evidencias de su uso en la provincia Shensi en China, aproximadamente 4000 a.C. (Fornaris, 2014).

Es una hortaliza cultivada para consumo humano, la cual puede ser consumida sin procesos de transformación, su importancia radica debido a su valor nutricional, formando parte de las dietas al tener buena cantidad de vitaminas, fibras y minerales que son fundamentales para la salud humana (DANE, 2014).

Los problemas fitosanitarios son la principal limitación en el cultivo de repollo, ya que afecta directamente su rendimiento. *Plutella xylostella* (L.), es un insecto lepidóptero de la familia Plutellidae, siendo una plaga cosmopolita, causante de daños económicos en las diferentes hortalizas del mundo, principalmente en cultivos de crucíferas (Brassicaceae), como las diferentes variedades de *Brassica oleracea*, las cuales son *B. oleracea* var. *Capitata* (repollo), *B. oleracea* var. *Itálica* (brócoli) y *B. oleracea* var. *Botrytis* (coliflor) (Curis et al., 2019).

Con el incremento de las áreas cultivadas, las exigencias de calidad de los productos, los agricultores se han visto en la necesidad de implementar productos químicos (insecticidas) para controlar a la polilla dorso de diamante, los cuales han aplicado de manera indiscriminada, provocado que desarrollaren resistencia, dejando a un lado otros métodos de control, siendo el control biológico, un componente fundamental del manejo integrado de plagas (Rojas, 2019).

Bacillus thuringiensis (Berliner) es el entomopatógeno más utilizado para control biológico, formadora de cristales romboides del esporangio, actúa por ingestión causando daño en el tracto digestivo lo cual provoca la muerte por toxemia, ocasionando parálisis intestinal al producirse la acción de los cristales y esporas que se reproducen dentro de los lepidópteros (Sauka, & Benintende, 2008).

El objetivo del presente trabajo pretende encontrar la patogenicidad de dos cepas locales y una cepa comercial de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), sobre *Plutella xylostella* (L.), en condiciones controladas *in vitro*; información básica para iniciar estudios sobre su posible incorporación en Programas de Manejo Integrado de la polilla dorso de diamante.

2. Problema y descripción

Las hortalizas son un renglón importante en la economía de varias regiones productoras en el país, las áreas sembradas se caracterizan con los volúmenes de producción que se encuentran asociadas con el consumo de este producto, son importantes debido a su valor nutricional formando parte de la dieta balanceada de las personas, siendo utilizadas en el campo culinario. Presenta grandes problemas en el control fitosanitario de plagas y enfermedades, debido al uso indiscriminado de moléculas químicas causando problemas al medio ambiente, disminuyendo las poblaciones de enemigos naturales y polinizadores presentes en el medio, no obstante, afectando la inocuidad de los productos comercializables.

Plutella xylostella (L.), es una de las principales plagas que afecta los cultivos de las crucíferas, provocando limitaciones en el rendimiento y calidad, su capacidad de resistencia a numerosos insecticidas de origen químico convencionales (Mena & Hernández, 2017).

Teniendo presente que este insecto plaga es capaz de adaptarse a diferentes condiciones climáticas en un corto periodo de tiempo, posee una alta variabilidad genética, lo cual permite lograr una rápida resistencia a diferentes insecticidas comerciales.

3. Justificación

En el Manejo Integrado de Plagas (MIP), el control biológico forma parte fundamental, el cual se caracteriza por utilizar enemigos naturales para el manejo de plagas en los cultivos agrícolas, *P. xylostella* es una grave amenaza en los cultivos de crucíferas, por lo que se busca incrementar nuevas estrategias amigables con el medio ambiente y la salud humana, para ello se ha fomentado el uso de bioinsecticidas, principalmente fórmulas que contienen la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner), compuestas principalmente de mezclas de esporas y cristales derivados de la actividad biológica específica de variedades *B. thuringiensis* (Mena & Hernández, 2017).

En los cultivos transgénicos *Bt* se encuentran los cristales dentro de la planta, dando la capacidad de producir toxinas *Cry* en sus tejidos, causando la muerte a la plaga cuando se alimentan del cultivo, siendo únicamente aprovechables durante su ciclo de vida, al incorporar la materia orgánica al suelo, los cristales no se van a unir debido a que se encuentran dentro de la bacteria. Al aplicar *Bacillus thuringiensis*, ella vuelve a su hábitat natural, que es el suelo, integrándose nuevamente al ciclo, de esta manera estará interactuando con organismos donde se va a multiplicar y puede potencializar su patogenicidad.

El uso intensivo de cultivos *Bt*, han causado una alta presión en la selección de poblaciones de plagas objetivo, provocando una rápida evolución de resistencia, menor susceptibilidad de las larvas en estadios avanzados, ocasionando que las larvas grandes pasen de una planta no *Bt* a una *Bt* sean sometidas a dosis subletales, aumentando el riesgo potencial de desarrollo de resistencia (Szwarc & Trumper, 2018).

Esta investigación pretendió comprobar la toxicidad de tres cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner); una cepa comercial, dos cepas locales adquiridas en campo, sobre larvas *P. xylostella*, en repollo, con el fin de determinar la mortalidad de esta plaga bajo condiciones *in vitro*. Actualmente, el control se basa en la aplicación de productos de origen químico, los cuales no son adecuados para el cultivo ya que el uso excesivo de estos disminuye la calidad del producto, afectando su cadena de comercialización al no poder entrar a los distintos mercados.

4. Delimitación

La investigación se realizó en el municipio de Pamplona, Norte de Santander en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica (Facultad de Ciencias Agrarias) y en el Cepario del Programa de Microbiología de la Facultad de Ciencias Básicas, los cuales se encuentran dentro de las instalaciones de la Universidad de Pamplona. Para llevar a cabo dicha investigación se recolectaron muestras en campo de *Plutella xylostella* (L.), en el cultivo de repollo, se estableció la cría bajo laboratorio para luego comparar la toxicidad de tres cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner); dos cepas locales y una cepa comercial. *Plutella xylostella* (L.), es considerada una plaga primaria en los cultivos de la familia Brassicaceae como coliflor, brócoli, repollo y rábano, entre otras.

Una vez obtenidos los resultados, se evaluó la mortalidad total de las larvas o la emergencia de los adultos *P. xylostella*, con el propósito de comprobar la efectividad del uso de las dos cepas locales y la cepa comercial de *B. thuringiensis*.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

Evaluar la mortalidad, el DL_{50} de dos cepas locales y una cepa comercial de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre *Plutella xylostella* (L.), bajo condiciones *in vitro*

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente dos cepas locales de *B. thuringiensis*, aisladas de muestras de un suelo agrícola y un suelo de bosque de pino, en el municipio de Pamplona
- Comprobar la mortalidad que causan diferentes concentraciones de dos cepas locales y una cepa comercial de *B. thuringiensis* sobre *P. xylostella* en condiciones *in vitro*.
- Determinar los DL_{50} y TL_{50} de dos cepas locales y una cepa comercial de *B. thuringiensis* en *P. xylostella*, bajo condiciones *in vitro*.

6. Marco de referencia

6.1. Antecedentes regionales

- Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas (2018) realizaron la biología de *Plutella xylostella* (L.), conocida como la polilla dorso diamante o polilla del repollo, en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioensayos (CISVEB) y Laboratorio de Sanidad Vegetal, de la Universidad de Pamplona. La colecta de las muestras de los estados inmaduros, adultos de *P. xylostella* y sus enemigos naturales, lo llevaron a cabo en los huertos hortícolas experimentales (CISVEB); la parte experimental en el Laboratorio de Sanidad Vegetal, perteneciente al programa de ingeniería agronómica, bajo temperatura de 16,9°C a 18,9°C, Humedad Relativa promedio de 73,8 %, donde se inició la cría masiva de *Plutella* sp., realizando las observaciones y su respectiva toma de datos sobre el ciclo biológico del insecto. El promedio del ciclo de vida fue de 57,06 días, pasando por huevo con duración de $9,11 \pm 1,242$ días; estado larval de $19,54 \pm 2,620$ días, y el estado de pupa de $9,93 \pm 1,698$ días. Determinaron cuatro instares larvales aplicando la Ley de Dyar (1.980); la anchura promedio de las cápsulas cefálicas de: 0,144 mm larva I; 0,253 mm larva II; 0,405mm larva III; 0,599 mm larva IV. La oviposición de las hembras fue de 43,66 huevos con una duración de $28 \pm 8,08$ días; la longevidad promedio de los adultos fue de $18,48 \pm 5,124$ días. Se determinaron los parasitoides de huevos *Trichogramma* sp., el parasitoide de larvas *Diadegma insulare* (Cresson) y los depredadores *Harmonia axyridis* (Pallas), *Hippodamia convergens*, *Guérin-Méneville* y *Chrysoperla* sp.

- Mondragón-Sánchez, Triana – Marroquin, & Giraldo- Vanegas (2020) evaluaron los efectos de extractos acuosos de Neem *Azadirachta indica* A. Juss, para el control de *Plutella xylostella* (L.), en laboratorio. El diseño experimental consistió en siete tratamientos: Semillas 33%, Semillas 66%, Semillas 100%, Hojas 33%, Hojas 66%, Hojas 100% y un Control, cada una con 5 repeticiones y 5 larvas en cada repetición. Los extractos fueron realizados a partir de una solución alta preparada con 100 gramos de semillas machacadas en un litro de agua y una solución alta formada por 100 gramos de hojas maceradas en un litro de agua. A partir de estas soluciones altas se obtuvieron las disoluciones al 33% y 66% de hojas y semillas. De la misma manera se realizó la recolección de adultos, sexaje y crianza de las larvas de la plaga, los extractos se aplicaron en discos de hojas de repollo de 3cm de diámetro, cuando las larvas se encontraban en el estado larval II para dar inicio al montaje del experimento. Determinando que de los tratamientos con extracto de semilla 100%, 66% y 33% obtuvieron el 96%, 84% y 68% de mortalidad de las larvas, en comparación al tratamiento con extracto de hoja 100%, 66% y 33%, donde se adquirieron el 84%, 64% y 36% respectivamente en cuanto a la mortalidad en comparación con el control que fue del 0% . en el caso del DL_{50} , los tratamientos con extracto de semilla fueron de 37.000 mg/L y de los tratamientos con extracto de hoja fueron de 57.250 mg/L.; por otra parte el TL_{50} , se determinó que la dosis de 100% de extractos de semillas causó la muerte al 50% de la población en 22 horas, la dosis 66% en 36 horas y la dosis 33% en 57 horas. los extractos de hoja, se determinó la dosis 100% provocó la muerte al 50% de la población en 39 horas, la dosis 66% en 55 horas y la dosis 33% causó la muerte a la mitad de la población en 114 horas. se puede concluir que semilla al 100% es más efectiva para el

control de *Plutella xylostella* bajo condiciones de laboratorio, debido a su alto contenido de terpenoides.

6.2. Antecedentes nacionales

- Beltrán et al., (1998). realizaron estudios sobre un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus thuringiensis* en la producción de un ingrediente activo como biopesticida, en la cual emplearon cepas nativas de dicha bacteria. Realizaron las fermentaciones empleado un matraz de 1000 mL de volumen total con 100 mL de volumen de fermentación, utilizando 10 mL de inóculo bacteriano, una temperatura de 29 °C, utilizando una velocidad de agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). El estudio lo llevaron a cabo utilizando un modelo de diseño experimental con glucosa como fuente de carbono, evaluando la concentración de las fuentes de minerales en el medio de cultivo para la cepa HD1. De la misma manera evaluaron la relación óptima del nitrógeno orgánico y del nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo, para la producción de proteína asociada al cristal en la cepa nativa en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional.
- Ramírez et al., (2010). En esta investigación estandarizaron un bioensayo y evaluaron tres formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick). la polilla del tomate *Tuta absoluta* (Meyrick), Bogotá- Colombia. Es una de las plagas más destructoras de tomate en Colombia y países suramericanos, causando pérdidas totales en cultivos sin protección. En el año 2009, fue detectada en España, Portugal y en países del mediterráneo, de la misma manera se encontró en Inglaterra, Bulgaria y

Alemania. Para su control emplean insecticidas de origen químico, los cuales generan resistencia e impacto ambiental y de salud, debido a esto buscan implementar nuevas estrategias amigables, optando por los biopesticidas para el control de esta plaga. Evaluaron cinco métodos de bioensayo para medir apropiadamente la toxicidad sobre larvas de *T. absoluta* de tres productos comerciales: Dipel®, XenTary® y Turilav®, formulaciones a base de *Bacillus thuringiensis* (Bt). El producto Dipel®, provocó el 100% de mortalidad de larvas y 96% de supervivencia del testigo; este método presentó diferencias significativas al segundo y cuarto días después de la aplicación (DDA). El método de Aspersión foliar por aerógrafo produjo 100% de mortalidad de larvas con Dipel® al segundo DDA y ocasionó diferencias significativas al cuarto DDA. Los métodos Foliolos inmersos y Medio de cultivo indujeron una alta mortalidad en el control siendo rechazados. El uso de Dipel®, XenTari® y Turilav® en concentración de 1,25 g/L produjo entre 80-100% de mortalidad entre el segundo y octavo DDA en tres métodos evaluados válidos (1, 2, 3), corroborando la actividad biológica de *B. thuringiensis* sobre este insecto plaga.

6.3. Antecedentes internacionales

- García et al., (2018). En esta investigación realizaron aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* del sureste de México. Tuvieron como objetivo principal encontrar aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, a partir de diferentes materiales obtenidos del sureste de México, entre los años 2014 - 2015. Eligieron colonias bacterianas con base a la presencia de cristales parasporales, gen *cry*, gen *hag*, perfil de proteínas y actividad insecticida del género *Bacillus*. Lograron un aislado de muestras de suelo (ITCBT34) y

dos muestras de larvas *Chlosyne lacinia* (ITCBT61) y (ITCBT62), presentando amplificación de los genes *cry* y *hag*. El aislado de muestra de suelo, se identificó cristales de morfología oval, mientras que los aislados de larva de *Chlosyne lacinia* se identificaron cristales bipiramidales. Se notaron diferencias en el tamaño del fragmento en la amplificación del gen *hag* y en el perfil de proteínas de los diferentes aislados. Determinaron la actividad insecticida mediante bioensayo burdo a una concentración de 10 µg cm⁻². Las larvas de *Manduca sexta* presentaron mortalidad total en los tres aislados a las 96 h de exposición. Mostraron similitudes en su tamaño y características morfológicas los aislado de larva *Chlosyne lacinia* en referencia a la cepa de referencia *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* HD1, el aislado de muestra de suelo no presentó similitud alguna, por lo cual este aislado no se relaciona al serovar *kurstaki* HD1.

7. Marco contextual

Este trabajo se realizó en el municipio de Pamplona, departamento de Norte de Santander, situado en las coordenadas de 7° 22' 34" de latitud Norte y a 72°38' 54" de longitud al Oeste de Greenwich. El municipio de Pamplona limita al Norte con los municipios Pamplonita y Cucutilla, al sur con los municipios de Cácuta y Mutiscua, al oriente con Labateca y al occidente con el municipio Cucutilla, se encuentra a 2.430 metros sobre el nivel del mar. Su temperatura promedio de 14 a 16°C, con una extensión territorial total de 456 Km², con 76. 983 habitantes aproximadamente. La economía del municipio se basa en su gastronomía, agricultura, turismo y educación.

La investigación se implementó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal ubicado en el campus de la Universidad de Pamplona, a 7° 23' 14" de latitud Norte y a -72°39' 1" de longitud

al Oeste de Greenwich, a una altura de 2480 metros sobre el nivel del mar, con una temperatura promedio de 17 °C y 65% de humedad relativa (Figura 1).

Figura 1

Laboratorio de Sanidad Vegetal



Nota: vista aérea del laboratorio de sanidad vegetal de la Universidad de Pamplona. Tomada de *Google Earth* (2021).

8. Marco teórico

8.1. *Bacillus thuringiensis*

8.1.1. Origen y distribución

El género *Bacillus* spp., lo reporta por primera vez Cohn, en 1872, quien describió a este género como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor. En la actualidad el género

incluye más de 336 especies, las cuales pueden clasificarse en distintos grupos debido a su similitud genética Villarreal et al. (2018)

La especie *B. thuringiensis* fue descubierta en 1902 por Shigetane Ishiwatari, biólogo japonés, en el año de 1915, la bacteria fue redescubierta en Alemania por Ernst Berliner, quien la aisló de la polilla mediterránea de la harina *Anagasta kuehniella* (Zeller), por primera vez le realizaron descripción formal, llamándola *Bacillus thuringiensis* (Bt), nombre derivado de Thuringia, región de Alemania donde fue aislado (Guevara, 2016).

La literatura científica dice que esta bacteria es un habitante normal del suelo, existen reportes como nativa del follaje de las plantas, otros estudios las han encontrado en los criaderos de las larvas de los mosquitos y han sido aislados a partir de muestras de agua y suelo. La distribución *B. thuringiensis* en suelo ha sido reportado en diferentes trabajos científicos, Keshavarzi en el 2008 encontró 127 aislamientos correspondiente a *B. thuringiensis* a partir de 514 muestras de suelo de diferentes provincias de Irán. En el 2004 en diferentes lugares de Europa, tomaron 493 muestras de suelo, de las cuales obtuvieron 3716 aislamientos del género *Bacillus* y de estos solo 273 correspondían a *B. thuringiensis* (González, 2018).

8.1.2. Descripción

En la Figura 2, se observa una Micrografía de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bacilo gran positivo, posee un tamaño de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho, se movilizan debido a la presencia de flagelos, los cuales recubren casi o completamente la superficie de la bacteria, es una bacteria anaerobia facultativa, quimioorganótrofa y con actividad catalasa, el tamaño del genoma es de 2400 a 5700 Kpb, además presenta la capacidad de desarrollar esporas elipsoidales de resistencia, no causando hinchamiento ni la deformación bacilar (Guevara, 2016).

Figura 2

Micrografía de Bacillus thuringiensis var. Kurstaki en microscopio electrónico de transmisión. C: cristal proteínico bipiramida (L.) E: espora.



Fuente: de Torres et al., (2006).

8.1.3. Clasificación taxonómica

En la Tabla 1, se puede observar la clasificación taxonómica de Bacillus thuringiensis (Berliner).

Tabla 1

Taxonomía Bacillus thuringiensis (Berliner)

Dominio	Bacterias
---------	-----------

Filo	Firmicutes
Clase	Bacilos
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus thuringiensis</i>

Fuente: (CABI, 2019).

8.1.4. Morfología y biología

Bacillus thuringiensis (Berliner) crece y prolifera bajo condiciones aerobias, la temperatura óptima para su crecimiento se encuentra entre los 26 a 30 °C, con un pH de rango óptimo de 6,5 a 7,5. Las cepas de este microorganismo presentan características bioquímicas las cuales le permiten fermentar compuestos como lo son: La glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, además presenta la capacidad de hidrolizar el almidón, gelatina, esculina, glucógeno y N-acetil-glucosamina. *B. thuringiensis* se caracteriza por la capacidad de producir cristales paraesporales de naturaleza proteica durante la esporulación, según la nomenclatura las proteínas *Cry* se clasifican según sus actividades insecticidas, por ser tóxicas para los insectos, siendo las proteínas *CryI* para lepidópteros, las *CryII* para lepidópteros y dípteros, las *CryIII* para los coleópteros y las *CryIV* solo para dípteros. Estas proteínas al ser liberadas en la fase vegetativa de crecimiento se relaciona con otros factores de virulencia, inducen a dicha toxicidad que se presenta en diferentes especies de invertebrados, especialmente en larvas de insectos Crickmore et al. (2020) y (Pérez, 2016).

8.1.4.1. Resistencia de insectos a cultivos *Bt*

La variación de concentración en una toxina ocurre de manera natural, la cual puede constituir un criterio de selección de eventos *Bt* en la etapa de desarrollo. La concentración de la toxina puede variar en los tejidos de la planta transgénica a través de su desarrollo fenológico, bajo condiciones ambientales y dominancia, por lo cual la selección de la plaga objetivo, son condiciones dinámicas. Además pueden adquirir resistencia a través de mutaciones en los insectos, influyendo en el modo de acción de las toxinas, existen diversos mecanismos que la desarrollan, entre ellos se encuentran la retención de las toxinas *Cry* por esterases o lipoforinas, debido a una fuerte respuesta inmune y la alteración en la activación de las toxinas *Cry* como de los receptores de estas, lo que induce una menor cantidad de uniones en la membrana epitelial del intestino medio de los insectos (Jiménez, 2019).

8.1.4.2. Las ventajas del uso de *Bt* frente a las plantas transgénicas con *Bt*

El *Bacillus thuringiensis* es el agente de control biológico con mayor éxito, las principales ventajas es la inocuidad con otros insectos benéficos que no son afectados por la acción patogénica de esta bacteria, siendo solamente toxicas para plagas específicas, inofensiva para los humanos y otros mamíferos además es una ventaja ecológica, al no tener amplio espectro insecticida, permitiéndole ser compatible con el uso de enemigo naturales (Guadalupe, 2011)

En los cultivos transgénicos con *Bt*, presentan un impacto con los insectos que no son plaga, convirtiéndose en un problema medioambiental, al afectar parasitoides, mariposas y crisopas que se pueden alimentar del cultivo o que sus presas son afectadas por la toxina, de esta manera alterando el equilibrio normal de los ecosistemas y fomenta la aparición de plagas

secundarias. En los cultivos *Bt*, las posibilidades de desarrollar resistencia de las plagas son más alta, en la primera generación solo expresan un tipo de toxina por lo cual el desarrollo de resistencia es más fácil en comparación a la segunda, aunque en esta última existen reportes de resistencia (Sanahuja, et al., 2011).

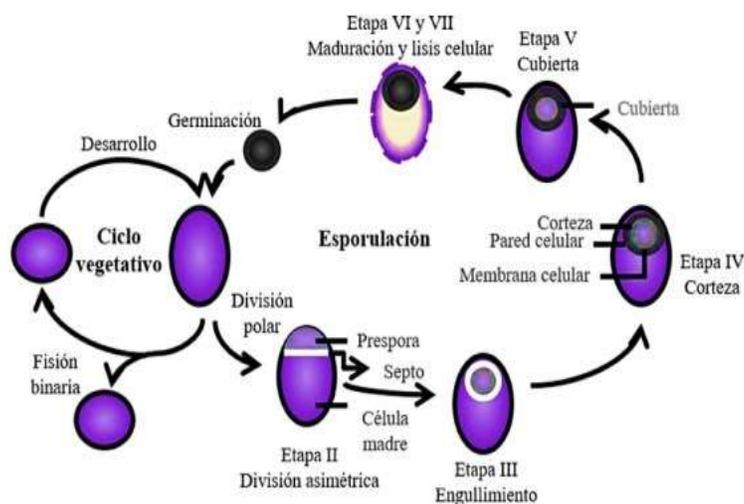
8.1.5. Ciclo de vida de Bacillus thuringiensis (Berliner)

El ciclo de vida de *Bt*, se divide en dos fases, comienza con la germinación de esporas, luego aparece la célula vegetativa rica en nutrientes, posee forma de bastón y se divide por fisión binaria en dos células hijas uniformes por la formación de un tabique de división (Pérez, 2016).

El ciclo de reproducción de *Bacillus* sp., se puede observar en la Figura 3, la esporulación implica la división celular asimétrica, se caracteriza por siete etapas que incluye la filamento axial (etapa I), preespora y formación de tabique (etapa II), aparición de cristales parasporales y formación de la preespora (etapa III), formación de exosporium, pared celular primordial, corteza y abrigos de esporas acompañado de transformación del nucleoide y esporas (etapas IV a VI), y la maduración de las esporas y lisis del esporangio (etapa VII) (Guevara, 2016)

Figura 3

Ciclo de reproducción del género Bacillus sp



Fuente: Villarreal (2018).

8.2. *Plutella xylostella* (L.)

8.2.1. Origen y distribución

Plutella xylostella (L.) conocida como la palomilla dorso de diamante, es un insecto del orden Lepidoptera, se conoce que su origen se encuentra en Europa, partiendo de su comportamiento y de las plantas hospederas, su origen podría haber partido desde Sudáfrica y luego dispersarse hacia Europa. Este lepidóptero se caracteriza por presentar una amplia distribución universal, por lo cual es considerada cosmopolita, es especialista en hospedar plantas de crucíferas, el grado de infestación varía entre años y lugares, debido a factores del entorno como lo son las condiciones ambientales, enemigos naturales, las poblaciones que

hibernan y las migraciones. Su distribución es alrededor del mundo como lo es América del Norte, Europa, Asia, Oceanía, Sudamérica y África (CABI, 2019).

8.2.2. Descripción morfológica

En condiciones naturales en el cultivo de repollo *Brassica oleracea*, en Valparaíso (Chile), *P. xylostella* presenta un periodo de desarrollo de sus huevos entre 3 a 10 días, las larvas de 10 a 21 días y las pupas de 7 a 14 días, la duración de todo su ciclo varia de 17 a 51 días, en relación con los cambios de temperatura (Rojas, 2019).

Este insecto plaga, presenta metamorfosis completa, es decir corresponden a los estadios de huevo, larva, pupa y adulto. Sus huevos son pequeños en forma de escamas con una coloración blanca verdosa un poco amarillenta, siendo a simple vista difíciles de observar. Son ovipositados de manera individual o grupal, comúnmente en el envés de las hojas cerca de la vena central. Las larvas cuando nacen presentan una coloración amarilla clara, cuando se desarrollan se tornan de un color verde oscuro, poseen un tamaño 8 a 12 mm, su cuerpo es alargado el cual tiende angostarse en sus dos extremos. La pupa tiene un tamaño de 0,5 a 6 cm de longitud, se diferencia en tres tipos de tonalidades amarillo claro, amarillo verdoso y verde claro; con bandas longitudinales de color verde oscuro. Los adultos miden 10 mm de longitud, tiene entre 12 a 15 mm de envergadura alar, su cuerpo esbelto de color grisáceo a café (Rojas, 2019).

8.2.3. Clasificación Taxonómica

La ubicación taxonómica de *Plutella xylostella* (L.), se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2

Taxonomía de Plutella xylostella

Dominio	Eukaryota
Reino	Metazoa
Filo	Arthropoda
Subfilo	Uniramia
Clase	Insecta
Orden	Lepidóptera
Familia	Plutellidae
Subfamilia	Plutellinae
Género	<i>Plutella</i>
Especie	<i>Plutella xylostella</i>

Fuente: (CABI, 2019).

8.2.4. Ciclo de vida

El potencial reproductivo está determinado por el entorno ambiental, en el cual *P. xylostella* es capaz de desarrollar su ciclo de vida en 32 días, iniciando desde el estadio de huevo, pasando por larva, pupa hasta llegar adulto. Para elegir los sitios de ovoposición más adecuados, las hembras buscan condiciones favorables de temperatura, humedad y estímulos químicos y físicos provenientes de las plantas (Mena & Hernández, 2017).

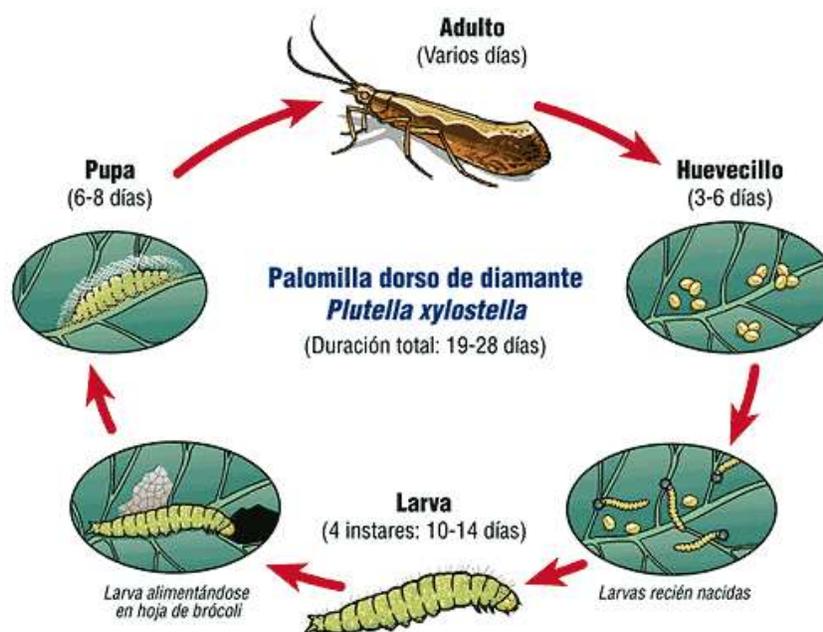
Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas (2018), determinaron que el ciclo de vida de *P. xylostella* en las condiciones de Pamplona (Colombia) tiene una duración, desde la etapa de huevo hasta la emergencia de los adultos, de 57,06 días, pasando por huevo con duración de $9,11 \pm 1,242$ días; estado larval de $19,54 \pm 2,620$ días, y la duración del estado de pupa de $9,93 \pm 1,698$ días.

Entre las etapas del ciclo de vida, en el primer estadio larval, las larvas penetran y se alimentan del tejido de las hojas, mientras que en estadios posteriores las larvas se alimentan en la superficie de las hojas, brotes, flores y vainas (Mena & Hernández, 2017).

El ciclo de vida de *P. xylostella* se presenta en la Figura 4.

Figura 4

Ciclo biológico en días de la palomilla dorso de diamante



Fuente: Chávez (2017).

9. Marco legal

9.1. Acuerdo No. 186

El presente anteproyecto se rige bajo la normatividad establecida por la Universidad de Pamplona en el reglamento estudiantil, según el acuerdo número 186 de 02 de diciembre 2005.

Capítulo VI. Trabajo de Grado

Artículo 35. La Universidad de Pamplona establece en el plan de estudio de los programas un requisito para la obtención del título profesional, se debe presentar un trabajo especial por parte del estudiante denominado “TRABAJO DE GRADO”, en el cual se consolida al estudiante su información integral, lo cual permite: Diagnosticar problemas y necesidades, a partir, de los conocimientos adquiridos en la etapa académica, acopiar y analizar la información para establecer soluciones a problemas y necesidades específicas, además de; desarrollar planes y ejecutar proyectos, que le permitan demostrar su capacidad en la toma de decisiones.

PARÁGRAFO PRIMERO. Según las características del trabajo de grado se puede realizar de manera individual o en grupo. Corresponde al comité que se integren para realizar uno solo. En todos los casos, se presentará un sólo informe.

PARÁGRAFO SEGUNDO. “El Trabajo de Grado se podrá matricular a partir del 8°. Semestre, dependiendo de la modalidad que se emplee, hasta con máximo dos (2) asignaturas. El Trabajo de Grado deberá ser sustentado ante un Jurado, que está compuesto por tres (3) personas conocedoras del tema y decidir la calificación: “Aprobado”, “Excelente” o “Incompleto”, en llegado caso de que no se cumpla con los objetivos propuestos en la modalidad en la cual se

adelanta dicho trabajo, en tal caso, el estudiante tendrá que matricularlo nuevamente en el siguiente semestre académico.

Artículo 36. Modalidades de Trabajo de Grado: para este trabajo, se desarrolla bajo la modalidad de investigación, el cual comprende diseños y ejecución de proyectos que ayuden a aportar soluciones a los problemas teóricos o prácticos, adecuar y apropiar tecnologías y validar conocimientos producidos en otros contextos (Universidad de Pamplona, 2005).

9.2. Resoluciones del Instituto Colombiano Agropecuario

9.2.1. Ley 9 de 1979: de las sustancias peligrosas -plaguicidas- artículos pirotécnicos.

Artículo 130°.- En la importación, fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, manejo o disposición de sustancias peligrosas deberán tomarse todas las medidas y precauciones necesarias para prevenir daños a la salud humana, animal o al ambiente, de acuerdo con la reglamentación del Ministerio de Salud.

Plaguicidas.

Artículo 136°.- El Ministerio de Salud establecerá las normas para la protección de la salud y la seguridad de las personas contra los riesgos que se deriven de la fabricación, almacenamiento, transporte, comercio, uso o disposición de plaguicidas.

Artículo 138°.- El registro que aprobare el Ministerio de Salud para plaguicidas destinados a uso agropecuario no exime a los interesados del cumplimiento de las disposiciones que para tales productos tengan establecidas las autoridades de agricultura.

Artículo 139°.- El Ministerio de Salud podrá Cabrerar la importación o fabricación de muestras de plaguicidas para fines de investigación, experimentación o registro. Cuando la

experimentación con estos productos pueda causar daño a la salud de los trabajadores, de la población o del ambiente tal actividad debe someterse a la vigilancia de las autoridades de salud, las cuales exigirán la adopción de las medidas necesarias para prevenir o remediar tales daños.

Artículo 144°.- Los residuos procedentes de establecimientos donde se fabriquen, formulen, envasen o manipulen plaguicidas, así como los procedentes de operaciones de aplicación no deberán ser vertidos directamente a cursos o reservorios de agua, al suelo o al aire.

9.2.2. Ministerio de salud decreto 775 del 16 de abril de 1990

Por el cual se reglamentan parcialmente los Títulos III, V, VI, VII y XI de la Ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas.

Artículo 1° Del objeto del control y vigilancia epidemiológica. El control y la vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, deberá efectuarse con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro del ambiente.

Artículo 2° Régimen aplicable al uso y manejo de plaguicidas. El uso y manejo de plaguicidas estarán sujetos a las disposiciones contenidas en la Ley 09 de 1979, el Decreto 2811 de 1974, Reglamento Sanitario Internacional, las demás normas complementarias previstas en el presente Decreto y las que dicten los Ministerios de Salud y de Agricultura o sus institutos adscritos.

9.2.3. Resolución No. 0857 del 16 de mayo de 2018.

Por el cual otorga el acceso a recursos genéticos y productos derivados para el proyecto denominado: “Búsqueda y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* activas contra insectos plaga de cultivos económicamente importante”

Artículo 2. El objeto del proyecto de investigación de acuerdo con lo establecido en la cláusula primera del contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados No. 191 de 2018, es determinar la actividad biológica de proteínas *Cry* producidas por cepas locales de *Bacillus thuringiensis* sobre el nivel de sobrevivencia de larvas de primer instar de insectos plaga que afectan cultivos de importancia económica.

10. Metodología

10.1. Tipo de Investigación

La presente Investigación se enmarca como de tipo Investigación cuantitativa descriptiva, debido a que se pretendió obtener resultados a partir de la toma sistemática de datos para analizarlos estadísticamente y determinar diferencias significativas entre los tratamientos y el componente descriptivo se debe a la caracterización de las cepas en estudio.

10.2. Diseño Metodológico

10.2.1. Hipótesis

En condiciones naturales es posible encontrar bacterias entomopatógenas, las cuales pueden ser identificadas y evaluadas a nivel de laboratorio como posibles agentes de control biológico de *P. xylostella*.

Hipótesis Nula: Todos los Tratamientos tienen un efecto igual.

Hipótesis Alternativa: Hay al menos un Tratamiento con un efecto diferente a los demás

10.2.2. Sistema de Variables

10.2.2.1. Variables Cuantitativas Continuas

VARIABLES DEPENDIENTES

- a. Porcentajes de Mortalidad.
- b. Concentración Letal Media (DL₅₀).
- c. Tiempo Letal Medio (TL₅₀).

VARIABLES INDEPENDIENTES

- a. Dosis de las tres cepas de *B. thuringiensis*.

10.2.2.2. Variables Cualitativas

- a. Características morfológicas y bioquímicas distintivas entre las tres cepas de *B. thuringiensis*.

10.2.3. Diseño de la investigación.

10.2.3.1. Localización del ensayo

En el Cepario del Programa de Microbiología de la Facultad de Ciencias Básicas, se realizó el aislamiento, el protocolo para lograr la purificación y la preparación de las concentraciones de las cepas recuperadas en campo de suelo agrícola y la muestra de suelo obtenida de un área sin intervención agrícola: mientras que, la cría masiva de *P. xylostella* y la pruebas *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería

Agronómica, Universidad de Pamplona, localizados a 2.586 msnm, en el municipio de Pamplona Norte de Santander. El estudio se realizó, bajo condiciones *in vitro*.

10.2.4. Diseño Experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, cada cepa con seis tratamientos (concentraciones) y cada tratamiento con 5 repeticiones y cada repetición con cinco larvas. Cada Unidad Experimental estuvo constituida por una larva; de tal manera fueron 150 unidades experimentales en cada cepa, para un total de 450 larvas de segundo instar (L₂). Cada unidad experimental consistió en una caja plástica de 5 cm de diámetro a las cuales en su tapa se les hizo un orificio circular de 2,50 cm de diámetro e internamente se le adhirió tela tul, para conseguir condiciones similares al exterior. Cada una de las cajas contenía un disco de papel filtro de 5 cm de diámetro y un disco de hoja de repollo de 3 cm de diámetro. Los discos de hojas de repollo se sumergieron en las diferentes concentraciones de las tres cepas, por espacio de 5 segundos antes de introducirlos a la caja de cada disco con su respectiva L₂ de *P. xylostella*.

Los tratamientos fueron a partir de una concentración inicial alta, de cada una cepas de *B. thuringiensis*, se les realizó cuatro diluciones seriadas, que se evaluaron como tratamientos. En cada bioensayo se incluyó un testigo absoluto (hojas sumergidas en agua estéril).

Cada uno de los diseños para cada una de las tres cepas de *B. thuringiensis* tuvo cinco Tratamientos (dosis), las cuales fueron:

1. 1×10^{12} UFC/ml
2. 1×10^{10} UFC/ml
3. 1×10^8 UFC/ml

4. 1×10^6 UFC/ml
5. 1×10^4 UFC/ml
6. Testigo absoluto

La selección de estas dosis está fundamentada sobre la concentración de la cepa comercial Dipel®, y otras marcas comerciales que formulan sus productos con 1×10^8 UFC/ml, esto con la finalidad de uniformizar las concentraciones de las cepas locales, con la cepa comercial.

10.2.5. Colecta y Cría masiva de *P. xylostella*.

Para iniciar la cría de *P. xylostella*, se colectaron huevos, larvas, pupas y adultos en los cultivos de Brassicaceae, cultivadas en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB) y en el Colegio La Normal (Pamplona) en horarios diurnos, recolectando en forma directa los huevos, larvas y pupas que se localizan en el envés de las hojas de repollo, coliflor y brócoli, utilizando una lupa entomológica de 30x de aumento para su mejor búsqueda. Las larvas se buscaron principalmente en el envés ya que son sensible a la luz solar, siendo colectadas con un pincel doble cero (00), depositándolas en frascos de vidrio transparentes cubierta como tapa, una malla o toldillo para su oxigenación, adicionándoles hojas frescas como alimento. La recolección de los adultos se realizaron mediante jameos en los cultivos (Figura 5), depositándolos en frascos plásticos con la misma característica de los recipientes anteriores en la tapa, los cuales se transportaron al laboratorio para empezar su cría masiva (Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas 2018) y (Mondragón-Sánchez et al., 2020).

Figura 5

Jameo para la recolección de adultos



Fuente: Cabrera, 2021.

10.2.6. Técnica de Cría de *P. xylostella*.

Los huevos y larvas obtenidos en campo se llevaron al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica, de la Universidad de Pamplona, donde se estableció el pie de cría, hasta lograr una generación de adultos de *P. xylostella*, los cuales se sexaban y se colocaban por parejas en frascos de vidrio de cuatro litros con hojas de repollo, previamente sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% para eliminar posibles entomopatógenos y luego lavados en agua destilada, para que los adultos realizaran las oviposturas, colocándole a los frascos una tela tul asegurada con una banda de goma para evitar la condensación de agua dentro del frasco. Para esto se realizó observaciones cada 12 horas, con

la ayuda de un estereoscopio (ocular de 40x) para hacer un seguimiento a su desarrollo biológico. Los huevos recién puestos se individualizaron, recortando el pedazo de hoja que contenía el huevo, y colocándolos en cajas plásticas de 5 cm de diámetro a las cuales en su tapa tienen un orificio circular de 2,50 cm de diámetro e internamente se le pegó tela tul, para lograr conseguir condiciones similares con el exterior (Mondragón-Sánchez et al., 2020).

El pie de cría a nivel de laboratorio se mantuvo hasta que se logró una producción de huevos de la misma edad, para lograr mínimo 500 larvas y poder iniciar el experimento.

10.2.7. Descripción de las Actividades

10.2.7.1. Caracterización de dos cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), aisladas de muestras de suelo agrícola y suelo de bosque.

Primer objetivo

Aislamiento de las cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

Se recolectaron dos muestras de suelo, una de suelo agrícola de la vereda Monte dentro Latitud 7.3426754 y Longitud 72.6629528, piso altitudinal 2618.94msnm; otra de suelo de bosque de pino en la Pamplona-Bucaramanga con Latitud 7.3879636 y Longitud 72.661056, piso altitudinal 2678.7msnm; ambos sitios pertenecientes al municipio de Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

Se procedió a la toma de muestras de los suelos; una de estas cepas de suelo agrícola, recogiendo la muestra sin superar los 5 cm de profundidad, colocándola en frascos de vidrio estéril, tapándolas, y transportándolas hasta el grupo de investigación GIMBIO y cepario del

programa de Microbiología. Para obtener la segunda cepa, se recogieron muestras de suelo en sistemas no disturbados por la actividad agropecuaria (bosque), descartándose la capa superficial del suelo, sin superar los 5 cm de profundidad, se tomó muestra bajo condiciones estériles, colocándola en frascos plásticos estériles y transportándolas al grupo de investigación GIMBIO y al cepario.

Un gramo de suelo se mezcló con 10 mL de agua destilada estéril y se pasteurizó a baño maría a 65°C por 30 min. Luego, se dejó en hielo por igual tiempo y de éstos sólo 10 mL se aforaron con agua destilada estéril a un volumen final de 200 mL. Esta suspensión se depositó en placas con agar LB (Luria Bertani) (10 g tripton, 5 g extracto levadura, 10 g NaCl, por litro) y se dejaron crecer en una cámara a 28°C.

Las cepas que crecieron en el medio LB con características morfológicas similares a *B. thuringiensis* se cultivaron aisladamente en un agar nutritivo hasta su autólisis a una temperatura de 28°C. Con el cultivo autolisado se preparó un frotis delgado sobre un portaobjeto. El material fijado se cubrió con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% en 50% de etanol y 7% de ácido acético durante 10 min. Se lavó el exceso de colorante con agua y se dejó secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paraesporales se observaron con microscopio óptico con 1250X de aumento (Hernández *et al.*, 2012).

Selección de cepas y microscopia

La selección de las colonias cultivadas en LB se basó en las características macroscópicas de las mismas, teniendo en cuenta que las colonias típicas de *B. thuringiensis* son grandes, irregulares, blancas, cremosas y opacas. Una vez seleccionadas las colonias que por sus

características podrían corresponder al microorganismo de interés, se realizó una siembra por agotamiento en agar LB y se incuban a 30°C por 24 horas. Se realizaron pruebas bioquímicas respectivas para cada cepa, prueba agar almidón, caldo nitrato, citrato simons, caldo ureasa, hidrólisis de gelatina, reducción indol, manitol, fermentación fructuosa, fermentación manosa, fermentación maltosa, catalasa y esculina teniendo en cuenta las cepas de control (Rutte et al., 2020) y (Carreras et al., 2007).

Caracterización microscópica de aislamientos nativos

Se realizaron caracterizaciones microscópicas, inicialmente con una coloración de Gram de un cultivo de 24 horas de incubación en medio LB, con el fin de confirmar las características morfológicas y la clasificación de cada uno de los aislamientos en estudio. Posteriormente, se realizó una tinción diferencial (safranina-verde de malaquita) de las colonias aisladas, que se incubaron en agar LB durante siete días a 30°C, para evidenciar la presencia de esporas y cristales, los cuales se cuantificarán en tres campos ópticos mediante observación en microscopio óptico (100X), asignando:

(+): 1-10 cristales y esporas por campo óptico.

(++): 10-20 cristales y esporas por campo óptico.

(+++): Más de 20 cristales y esporas por campo óptico.

Los aislamientos locales que presentaron más de 20 cristales por campo óptico, se les realizaron un segundo análisis mediante observación y registro fotográfico con otra técnica (Hernández *et al*, 2012).

10.2.7.2. Determinación de la mortalidad de *P. xylostella*, causada por dos cepas locales y una cepa comercial de *B. thuringiensis*, bajo condiciones *in vitro*.

Segundo objetivo

Una vez emergidas las larvas, se registraron con un número y fecha, individualizándolas en cajas plásticas de 5 cm de diámetro y colocándolas en discos de hoja de repollo de 3 cm de diámetro, los cuales previamente han sido sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% para eliminar posibles entomopatógenos y luego fueron lavados en agua destilada, dejándolos secar por media hora en una malla de plástico. Los discos de hojas de repollo se colocaron sobre un disco de papel absorbente de 5 cm de diámetro dentro de las cajas plásticas, con el fin mantener a la larva en un solo sitio y hacer un mejor manejo al momento de la observación. Tanto los discos de hoja de repollo como los del papel absorbente se cambiaron cada tres días, aunque observaciones previas al montaje del experimento se pudo comprobar que los discos de repollo en las condiciones de laboratorio duraban hasta los cinco días, palatables a las larvas (Mondragón-Sánchez et al., 2020). Cuando las larvas llegaron al segundo instar de desarrollo larval, aproximadamente a los nueve días de edad (Silva-Lizarazo & Giraldo-Vanegas, 2018), se procedió a realizar el montaje del ensayo.

7. Las larvas para el bioensayo tuvieron un ayuno de tres horas, al término del cual fueron colocadas en discos de hojas de repollo de 3 cm de diámetro, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5%, para evitar mortalidades causadas por factores como entomopatógenos. Los discos de hoja de repollo fueron sumergidos durante cinco

segundos en cada uno de los tratamientos dosis a diferentes concentraciones (1×10^{12} UFC/ml, 1×10^{10} UFC/ml, 1×10^8 UFC/ml, 1×10^6 UFC/ml y 1×10^4 UFC/ml).

Una vez retirados los discos, se pusieron a secar a temperatura ambiente por dos horas. Cada disco se colocó individualizado en cajas plásticas de 5 cm de diámetro, sobre discos de papel filtro del mismo diámetro y, sobre cada disco se colocó una larva de *P. xylostella* de nueve días de edad (L2). Es importante hacer la anotación que todas las larvas utilizadas en este ensayo tenían nueve días de edad, para uniformizar esta variable, ya que la tolerancia a los tóxicos aumenta con la edad de las larvas de lepidópteros. Cada caja plástica fue identificada con tratamiento, repetición, número de larva y fecha de iniciación del ensayo (Figura 6 y 7).

Figura 6

Distribución de los tratamientos y repeticiones.



Nota: distribución de los tratamientos y sus repeticiones. Fuente: Cabrera, 2021.

Figura 7

Discos de repollo en cada tratamiento / disposición de los discos en su respectivo recipiente



Nota: discos de repollo de 3 cm de diámetro posteriormente sumergidos en las diferentes concentraciones. Fuente: Cabrera, 2021.

La mortalidad de una larva se comprobó con la observación directa a través de una lupa estereoscópica y con la ayuda de un pelo de pincel, la larva fue molestada para comprobar si responde a estos estímulos, de todas maneras, estas larvas se mantenían aparte y se hacía un seguimiento para estar seguros de su muerte. Además, la sintomatología presentada por las larvas afectadas, la apariencia inicial de color café claro y acortamiento del cuerpo, hasta aparentar una sequedad intensa, también serán los signos indicadores sobre la muerte de las larvas. La mortalidad se evaluó cada doce horas, hasta la muerte total de las larvas o la emergencia de los adultos de *P. xylostella*.

Las larvas permanecieron cuatro días con los discos tratados en sus diferentes concentraciones, para cumplir con el tiempo determinado de cuatro días de exposición a los tratamientos. Al quinto día y cada tres días los discos de repollo fueron cambiados por discos de 3 cm de diámetro de hoja de repollo, desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5% y lavados en agua destilada, para que las larvas continúen su desarrollo hasta el estado adulto o mueran en el transcurso de los días (Figura 8).

Figura 8

Observación a través del estereoscopio



Nota: observación directa a través del estereoscopio para comprobar la mortalidad de las larvas.

Fuente: Cabrera, 2021

10.2.7.3. Cálculo del DL_{50} y el TL_{50} de dos cepas locales y una cepa comercial de *B. thuringiensis* en *P. xylostella*, bajo condiciones *in vitro*.

Tercer objetivo

Para determinar la DL_{50} y el TL_{50} , las mortalidades se tomaron hasta las 96 horas de exposición de las larvas, sin cambiar los discos tratados; ya que, dentro del concepto de la DL_{50} , que es la dosis de un material determinado, administrado una sola vez, que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba. Al quinto día se cambiaron el disco tratado por un disco de repollo desinfectado, pero no tratado, los cuales se renovaron cada tres días hasta la formación de pupas y adultos de *P. xylostella*, que sobrevivieron a las diferentes concentraciones de las tres cepas de *B. thuringiensis*. Al comprobarse la mortalidad de una larva, se anotaron en el instrumento diseñado (Anexo 1), el tratamiento, la repetición, el número de larva en esa repetición y hora de observación de su muerte.

Los porcentajes de mortalidad se corrigieron con la fórmula de Abbott (1925), para identificar que la muerte fue ocasionada por el tratamiento y no por otras causas, los valores de DL_{50} se determinaron con un Análisis Probit, transformando las cinco concentraciones de cada cepa a logaritmo y las mortalidades se transformaron a Probit; utilizando el Software SPSS Statistics 26.0, con el cual se realizó un Análisis de Varianza, previa comparación de la normalidad de datos y homogeneidad de varianzas, seguido del test de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia $p \leq 0,05$. Se realizó análisis de regresión para determinar la relación entre la mortalidad y la concentración de las diferentes dosis, lo que permitió construir la respuesta concentración-efecto. Para cada dosis, en cada una de las tres cepas, que es la base para la determinación de la DL_{50} . Con los datos de mortalidad acumulados cada doce horas (desde la hora doce de montado el bioensayo hasta la hora 96), se determinó el tiempo al cual murió el 50% de la población (TL_{50}) para cada cepa y dosis evaluada.

11. Resultados y análisis

PRIMER OBJETIVO

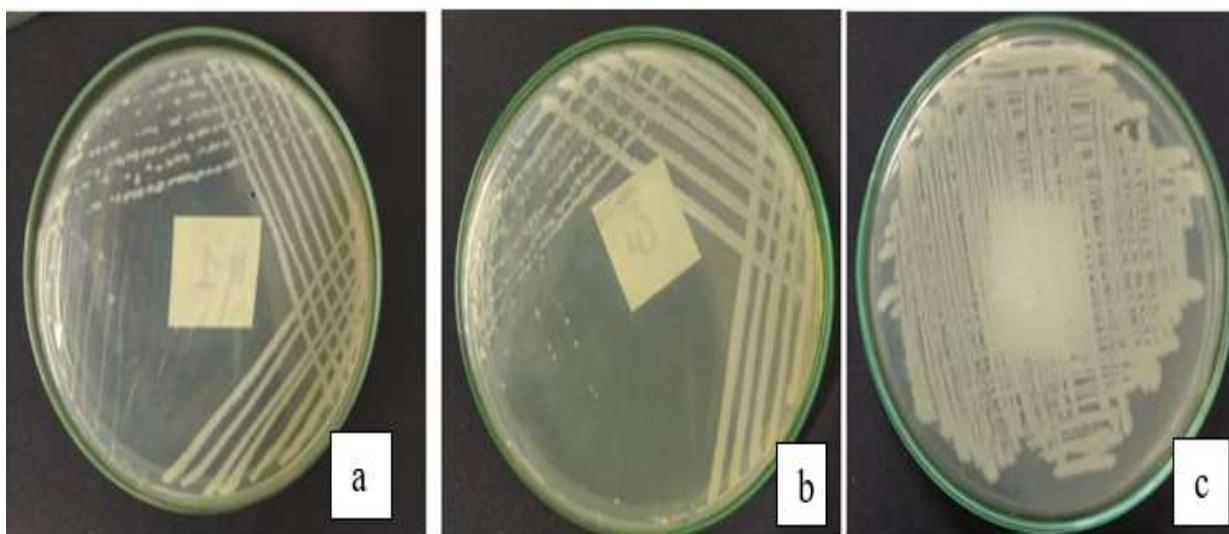
11.1. Caracterización fenotípica de dos cepas locales de *B. thuringiensis*.

11.1.1. Porcentaje de identificación

Las dos cepas locales aisladas presentaron colonias características del género *Bacillus* sp.; las colonias presentaron color crema, borde irregular y redondeado (Figura 9), indicando la diversidad de este microorganismo en el ambiente Schnepf y Whiteley (1985), argumentan que la amplia distribución de *B. thuringiensis* en el ambiente no solo se debe a factores abióticos, sino también a que los insectos que ingieren esporas de *B. thuringiensis* y mueren a causa de la infección, liberan al medio ambiente la forma vegetativa de estas bacterias que posteriormente esporulan, permaneciendo en este estado vegetativo hasta que puedan encontrar condiciones apropiadas para su multiplicación.

Figura 9

Aislamientos de posibles cepas locales de Bacillus thuringiensis, de suelo agrícola (a) y de suelo de bosque (b).



Nota: **a.** Cepa local de suelo agrícola; **b.** Cepa local de suelo de bosque & **c.** Cepa comercial (Control). Fuente: Cabrera & Rojas, 2021.

Rafael-Rutte, et al., (2020), estudiaron 600 colonias del género *Bacillus*, encontrando 37 cepas nativas que presentaron características morfológicas similares a las cepas estándares comerciales de Bt (HD1 y NA118). La caracterización morfológica y bioquímica de esas cepas nativas presentaron el cristal paraesporal de forma bipiramidal de acción tóxica contra lepidópteros, y características bioquímicas similares a las cepas estándares comerciales de *Bt*.

Las características morfológicas coinciden con las observadas por Theunis *et al.*, (1998), Iriarte et al. (1998), Schnepf et al., (1998), Salehi et al., (2008), Muniady et al., (2011), y Galvis y Moreno (2018), los cuales describen colonias circulares de color blanco, cremosas, con bordes

irregulares y textura mucosa, en las diferentes investigaciones en donde aislaron colonias con características morfológicas pertenecientes a la especie *B. thuringiensis*.

11.1.2. Porcentaje de identificación posiblemente *Bacillus thuringiensis*

En la Tabla 3, se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las tres cepas del presente bioensayo, teniendo como patrón referente a los testigos positivos HD1 y NA118 (Sauka et al 2008; Vitelli-Flores et al., (2010); Romero Bozzetta, J. L., 2017; Rafael-Rutte et al., 2020).

Tabla 3

Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a las tres cepas del bioensayo.

	TSI		GLUCOSA		RAMNOSA		ARABINOSA		MANITOL		ALMIDÓN		GELATINA		UREA		SIM		Tinción de Gram	
	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT	EXP	LIT
Muestra 1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Muestra 2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Muestra 3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Nota: resultados de las pruebas bioquímicas. Fuente: Cabrera & Rojas, 2021.

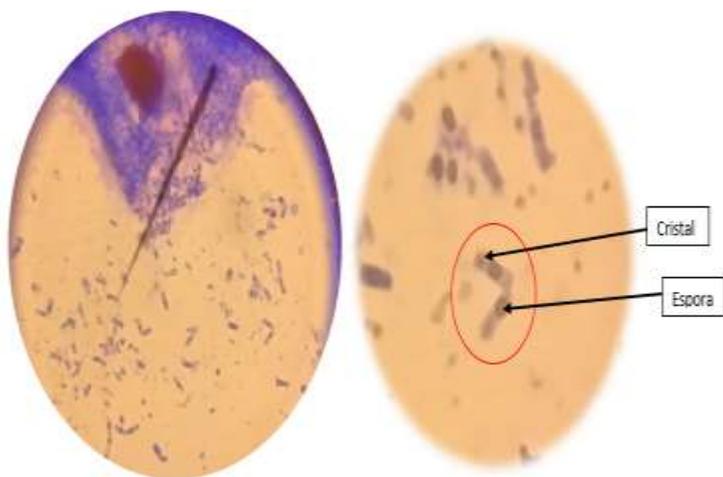
$$\% \text{de identificación} = \frac{\text{número de pruebas positivas} \times 100}{\text{número de pruebas realizadas}} \quad \% \text{de identificación} = \frac{8 \times 100}{10} = 80\%$$

Los resultados son similares a las investigaciones realizadas por varios autores en cuanto a las pruebas bioquímicas para *B. thuringiensis*, en las que demuestran que este bacilo es un microorganismo con actividad de catalasa (Schnepf et al., 1998; Álvarez et al., 2011) y que las distintas cepas de *B. thuringiensis* poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y Nacetil-glucosamina (Sauka y Benintende, 2008; Vitelli-Flores *et al.*, (2010); Blackburn et al., 2013).

La caracterización bioquímica de las tres cepas locales seleccionadas se hizo considerando las características bioquímicas comunes de *B. thuringiensis*. Agar almidón, hidrolisis de gelatina, TSI, SIM, urea, fermentación de glucosa, ramnosa, arabinosa y manitol.

Figura 10

Observación en el microscopio óptico Zeiss Primo Star 1000X podemos observar las estructuras internas, tinción simple con azul de metileno



Fuente: Cabrera & Rojas, 2021

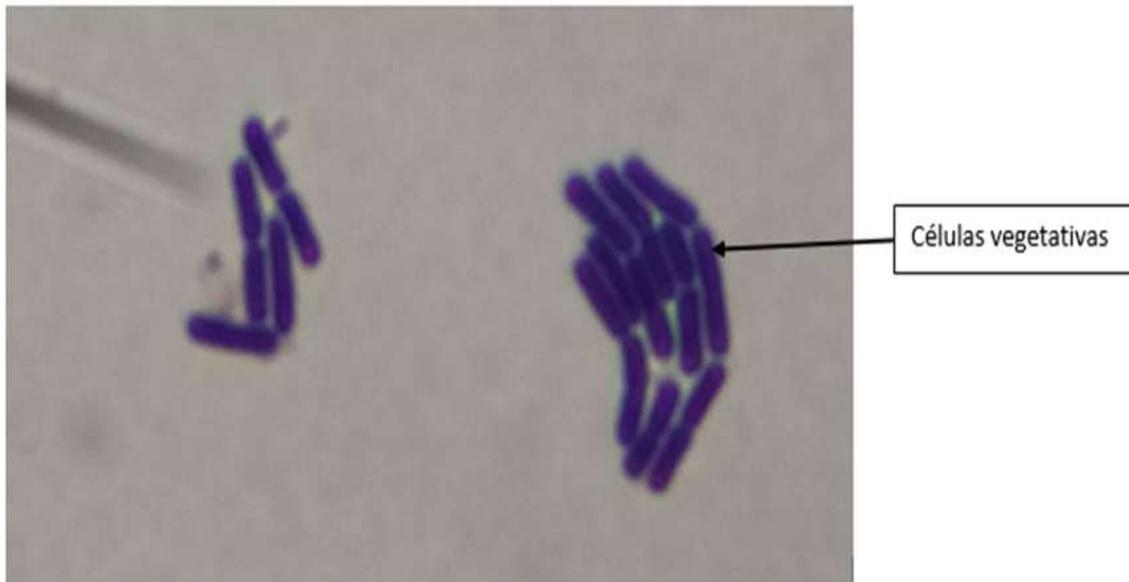


Figura 1. Cultivo de *B. thuringiensis* (CVCM 1813), en fase estacionaria de crecimiento, visto en microscopio de contraste de fases a 1.000X.

Fuente: Viteli-Flores et al., 2010

Figura 11

Observación en el microscopio óptico Zeiss Primo Star 100 X células vegetativas 18 horas de crecimiento, tinción de Gram

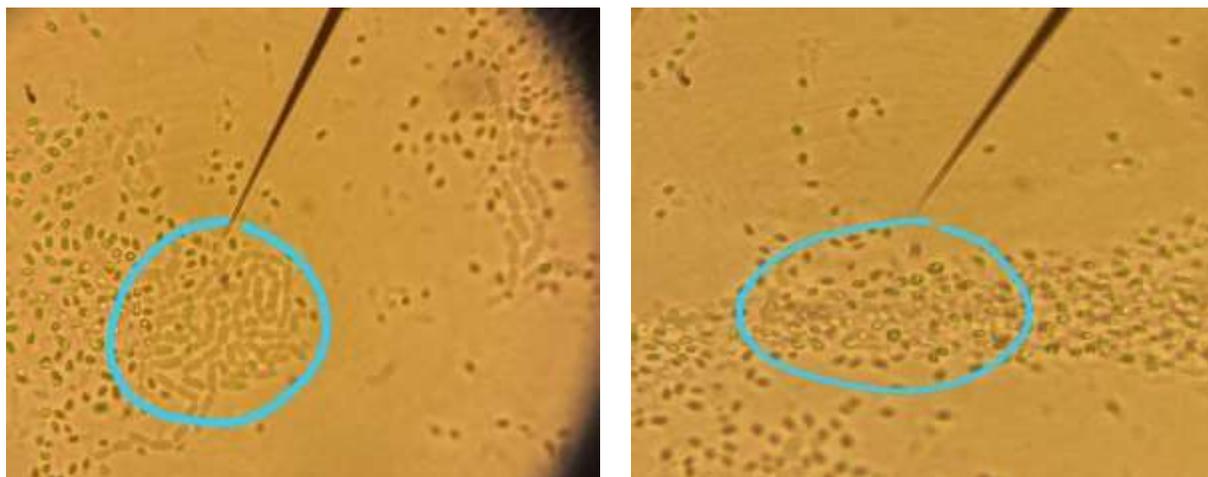


Nota: Células vegetativas en tinción Gram. Fuente: Cabrera & Rojas, 2021.

La codificación de *Bacillus thuringiensis* se realizó basándose en la existencia y la morfología de la inclusión cristalina al lado de las esporas de cada una de las cepas aisladas, por ser uno de los criterios más utilizados en la caracterización de cepas de *B. thuringiensis* (Carreras, 2008).

Figura 12

Cristales en objetivos 100x cepas locales 1 y 2 respectivamente



Nota: cristales observados a 100x de cepas de suelo agrícola y bosque. Fuente: Cabrera & Rojas, 2021.

(+++): Más de 20 cristales y esporas por campo óptico.

Con la cuantificación de cristales realizada se encontró que el 100% de los bacilos locales esporulados presentaron más de 20 cristales y esporas por campo óptico (Carreras, et al., 2008).

De la misma manera los resultados concuerdan con otros autores como Ramírez *et al.*, (2010); Vitelli-Flores et al., (2010); Azizoglu et al., (2011); Vázquez-Ramírez et al., (2015) y Rabinovich et al., (2017) quienes al caracterizar cepas nativas observaron los cristales bipiramidales típicos de la mayoría de las cepas pertenecientes a *B. thuringiensis*.

SEGUNDO OBJETIVO

11.2. Comprobación de la mortalidad que causan diferentes concentraciones de las cepas *B. thuringiensis*

11.2.1. Mortalidad de larvas de *Plutella xylostella* L.

El análisis estadístico de los datos demostró resultados contundentes en cuanto a la mortalidad causada por las diferentes dosis a que fueron sometidas las larvas de segundo instar de *P. xylostella*. Son resultados robustos, obteniéndose los siguientes resultados.

11.2.1.1. Cepa comercial de *B. thuringiensis* (DIPEL®)

La mortalidad de larvas de *P. xylostella*, causadas por las diferentes concentraciones de la cepa comercial (Dipel) *B. thuringiensis*, presentadas en la Tabla 4; en donde se puede apreciar que al aumentar las dosis hay una respuesta en el aumento de las mortalidades. Realizados los Anova simples y la Comparación de Medias con la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) (Anexos 2, 3,4 y 5), se detectaron diferencias significativas, generándose cinco grupos; así, un primer grupo conformado con los tratamientos 1×10^8 con una mortalidad de 96%; mientras que 1×10^{10} y 1×10^{12} , las mortalidades fueron de 100%; un segundo grupo con el tratamiento 1×10^6 con 88% de mortalidad; el tercer grupo integrado con el tratamiento 1×10^4 con 76% y el cuarto grupo con el Testigo absoluto con 5,26% de mortalidad.

Tabla 4

Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de P. xylostella, en los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa comercial Dipel, bajo condiciones in vitro.

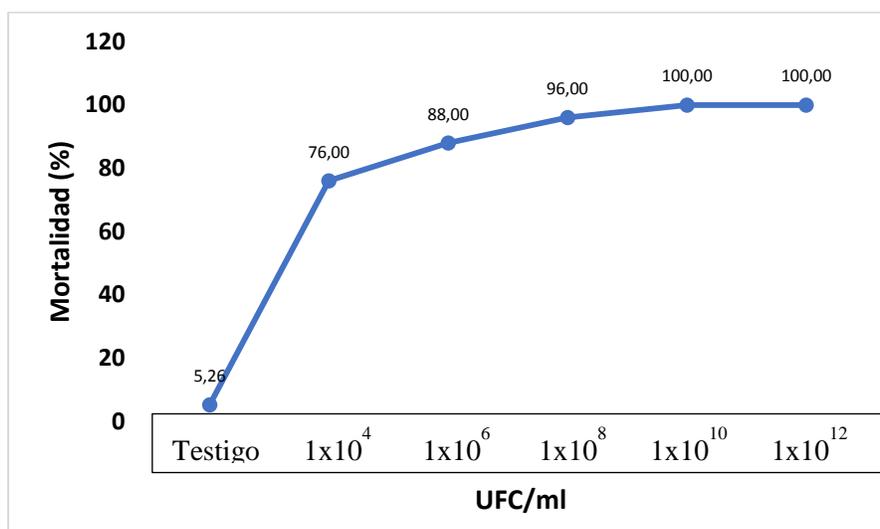
Tratamiento	Concentración (UFC/ml)	N	Mortalidad (%)
Testigo	0	5	5,26 a
1x10 ⁴	10.000	5	76,00 b
1x10 ⁶	1.000.000	5	88,00 bc
1x10 ⁸	100.000.000	5	96,00 c
1x10 ¹⁰	10.000.000.000	5	100,00 c
1x10 ¹²	1.000.000.000.000	5	100,00 c

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Fuente: Propia, 2021.

En la Figura 13, se ve la respuesta en las mortalidades de larvas de segundo instar larval de *P. xylostella* sometida a cinco tratamientos con la cepa comercial de *B. thuringiensis*.

Figura 13

Respuesta en las mortalidades de larvas de P. xylostella, sometidas a los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa comercial Dipel, bajo condiciones in vitro.



Fuente: Cabrera (2021).

11.2.1.2. Cepa de *B. thuringiensis* proveniente de suelo agrícola.

En la Tabla 5, se presentan las diferencias significativas ($p \leq 0,05$), entre los porcentajes de mortalidad causados por las diferentes dosis (concentraciones) de la cepa local de *B. thuringiensis* aislada de suelos intervenidos por actividades agrícolas en la Vereda Monteadentro del municipio de Pamplona. Se detectaron cuatro grupos con diferencias significativas; las concentraciones 1×10^{10} y 1×10^{12} con 100% de mortalidad; el segundo grupo con las concentraciones 1×10^6 con 92% y 1×10^8 con 80% de mortalidad; el tercer grupo conformado por

la concentración 1×10^4 con 72% de mortalidad; mientras que en el Testigo absoluto la mortalidad fue de 5,26%.

Tabla 5

*Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *P. xylostella*, en los diferentes tratamientos (dosis) de la cepa de *B. thuringiensis* proveniente de suelos agrícolas, bajo condiciones in vitro.*

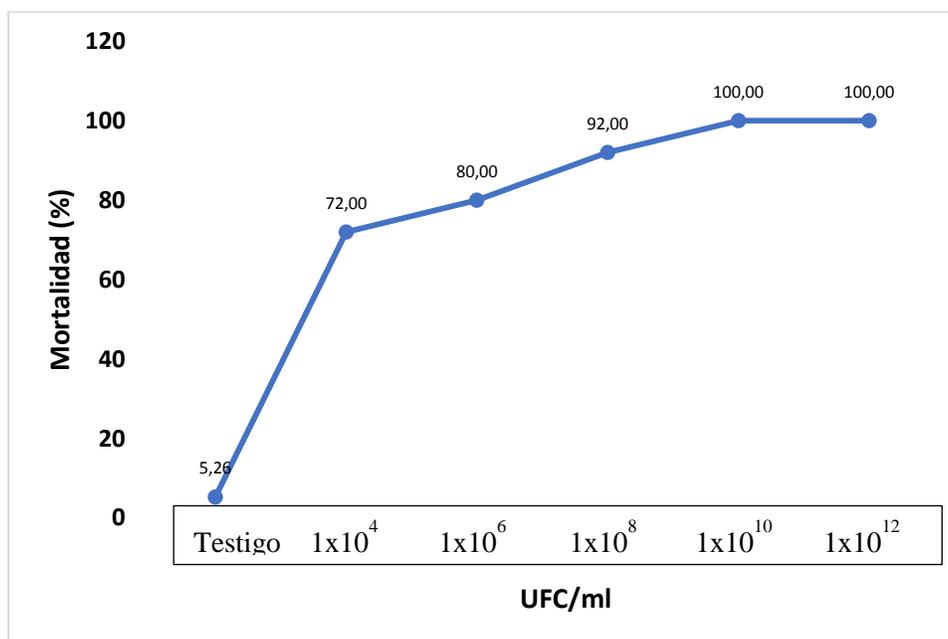
Tratamiento	Concentración (UFC/ml)	N	Mortalidad (%)
Testigo	0	5	5,26 a
1×10^4	10.000	5	72,00 b
1×10^6	1.000.000	5	80,00 bc
1×10^8	100.000.000	5	92,00 bc
1×10^{10}	10.000.000.000	5	100,00 c
1×10^{12}	1.000.000.000.000	5	100,00 c

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Fuente: Propia, 2021.

La dinámica de la comparación entre las cinco concentraciones de la cepa aislada de *B. thuringiensis* de suelos agrícolas y mortalidad causada a larvas de segundo instar de *P. xylostella* se puede apreciar en la Figura 14.

Figura 14

*Respuesta en las mortalidades de larvas de *P. xylostella*, sometidas a los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa local proveniente de suelos agrícolas, bajo condiciones in vitro.*



Fuente: Propia, 2021.

11.2.1.3. Cepa de *B. thuringiensis* proveniente de suelo de bosque.

La cepa aislada de suelos de un bosque de pino en el municipio de Pamplona causa porcentajes de mortalidad bastante interesantes, muy altos a dosis muy bajas; de esta manera las mortalidades van de 84% en la concentración más baja probada (1×10^4), hasta el 100% en las tres concentraciones más altas probadas, con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre estas (Tabla 6).

Tabla 6

*Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *P. xylostella*, en los diferentes tratamientos (dosis) de la cepa de *B. thuringiensis* proveniente de suelos de bosque, bajo condiciones in vitro.*

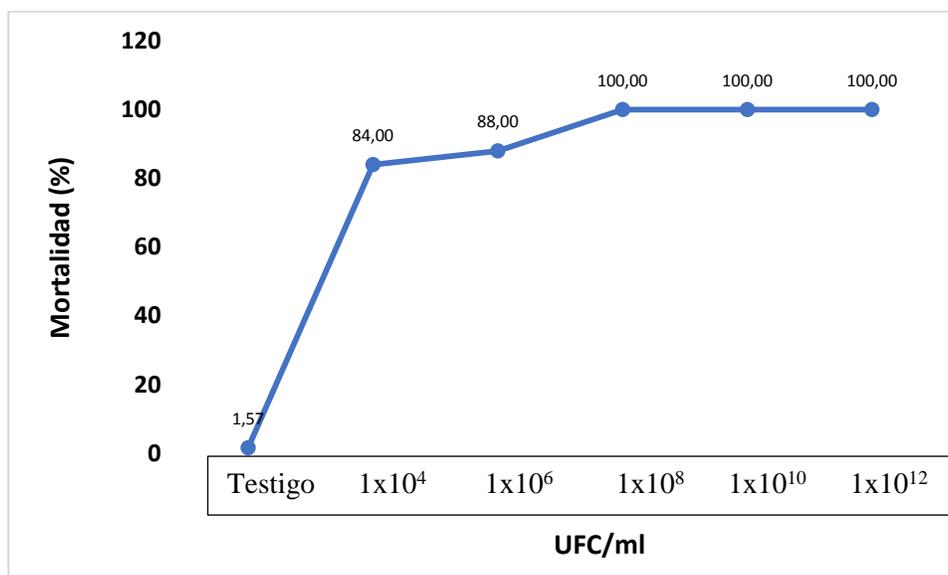
Tratamiento	Concentración (UFC/ml)	N	Suelo bosque
Testigo	0	5	1,57 a
1x10 ⁴	10.000	5	84,00 b
1x10 ⁶	1.000.000	5	88,00 bc
1x10 ⁸	100.000.000	5	100,00 c
1x10 ¹⁰	10.000.000.000	5	100,00 c
1x10 ¹²	1.000.000.000.000	5	100,00 c

Nota: Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Fuente: Propia, 2021.

En la Figura 15, se observa como la concentración 1x10⁴, la más baja utilizada en el bioensayo, ocasiona la muerte del 84% de las larvas de segundo instar de *P. xylostella*.

Figura 15

*Respuesta en las mortalidades de larvas de *P. xylostella*, sometidas a los diferentes tratamientos (dosis) con la cepa local proveniente de suelos de bosque, bajo condiciones in vitro.*



Fuente: Propia, 2021.

TERCER OBJETIVO

11.3. Determinación del DL₅₀ y TL₅₀ de las cepas de *B. thuringiensis*

11.3.1. Determinación del DL₅₀

LD son las siglas de "Dosis letal", así el DL₅₀ es la dosis de un material determinado, administrado una sola vez, que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba. El DL₅₀ es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo (toxicidad aguda) de un material. Cabe destacar que el DL₅₀ mide la dosis letal, pero no otros efectos secundarios graves, pero no letales.

Los resultados obtenidos en las pruebas para encontrar el DL_{50} , demostraron que la DL_{50} para la cepa comercial de Dipel fue de 130.943 UFC/ml, la DL_{50} de la cepa aislada de suelos intervenidos por la agricultura fue de 128.083 UFC/ml; mientras que, la cepa aislada de suelos de bosque fue de 150.533 UFC/ml, UFC/ml, produciendo la letalidad de la mitad de la población de *P. xylostella* con concentraciones por debajo de la concentración 1×10^6 UFC/ml, para las tres cepas; ubicándose esta concentración muy por debajo a 1×10^8 UFC/ml, que es la concentración de las cepas comerciales de este entomopatógeno. El DL_{90} calculado para las tres cepas probadas en el presente experimento fue de 245.228 UFC/ml, para la cepa del producto comercial; de 239.194 UFC/ml, para la cepa aislada de suelo agrícola y de 283.866 UFC/ml, para la cepa de *B. thuringiensis* proveniente de suelo no intervenido de un bosque de pino (Tabla 7).

Tabla 7

*Dosis letales DL_{50} y DL_{90} , de las tres cepas de *B. thuringiensis* para larvas de segundo instar de *P. xylostella*, en condiciones de laboratorio.*

Cepa	Ecuación regresión	R ²	DL ₅₀ (UFC/ml)	DL ₉₀ (UFC/ml)
Dipel	$y=0,35x+4,17$	0,94	130.943	245.228
Suelo agrícola	$y=0,36x+3,89$	0,90	128.083	239.194
Suelo bosque	$y=0,3x+4,84$	0,77	150.533	283.866

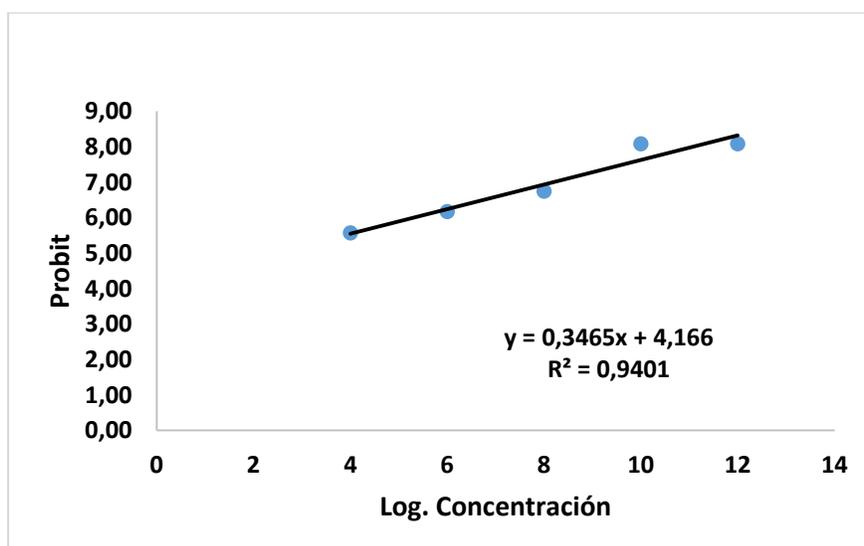
Nota: Dosis letales DL_{50} y DL_{90} en UFC/ml, de las tres cepas de *B. thuringiensis*. Fuente: Propia, 2021.

En las Figuras 16, 17 y 18, se presentan las regresiones resultantes de las relaciones dosis y porcentajes de mortalidad causados por las cepas de *B. thuringiensis* de producto comercial, cepa

de suelo agrícola y cepa de suelo de bosque respectivamente, generándose la ecuación de regresión y el R^2 , para la cepa comercial $y=0,35x+4,17$ y un $R^2=0,94$; para la cepa de suelo agrícola $y=0,36x+3,89$ y un $R^2=0,90$; mientras que para la cepa de suelo de bosque fue $y=0,3x+4,84$ y un $R^2=0,77$.

Figura 16

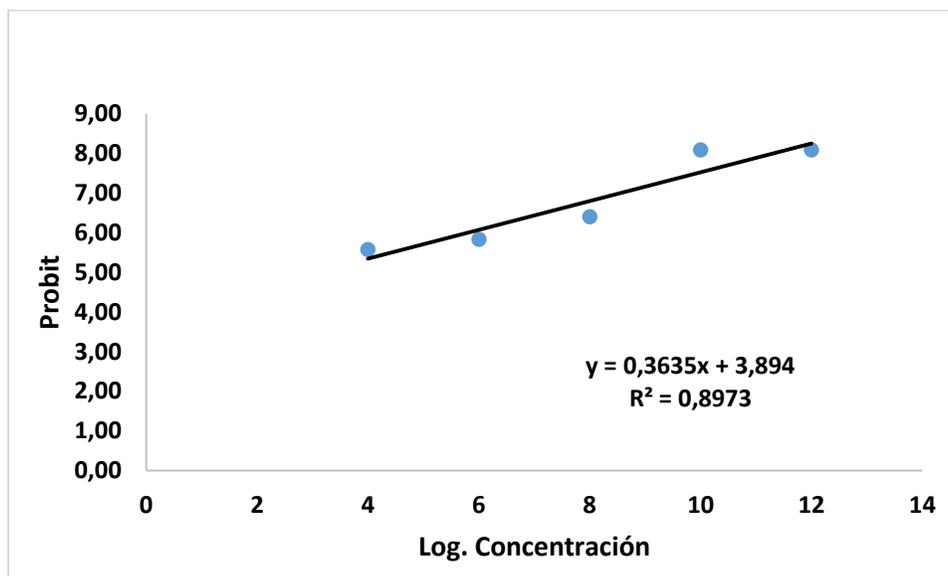
*Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de *P. xylostella* sometidas a cinco concentraciones de la cepa comercial de *B. thuringiensis*.*



Nota: Mortalidad transformada a Probit y dosis transformadas a Log. Fuente: Propia, 2021.

Figura 17

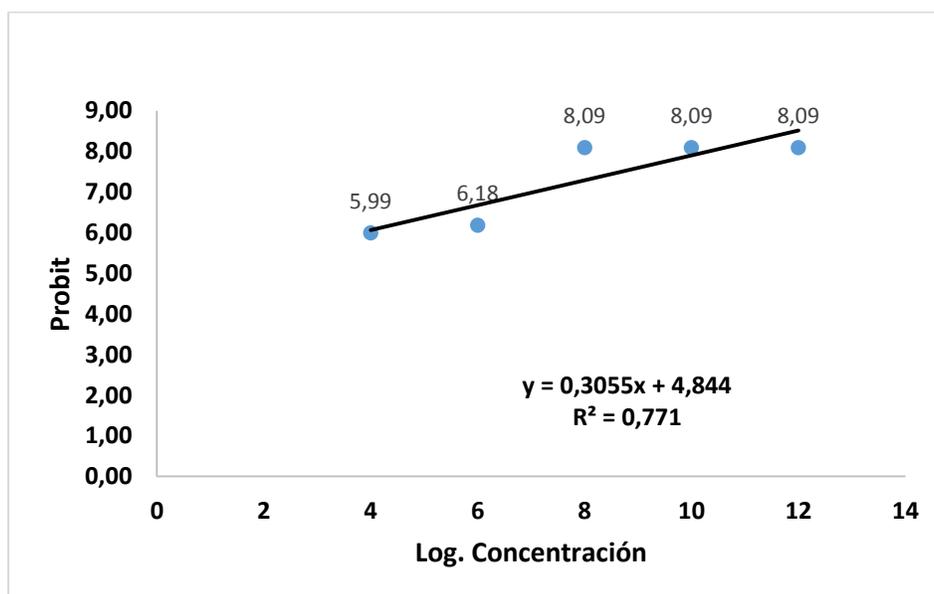
*Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de *P. xylostella* sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo agrícola de *B. thuringiensis*, bajo condiciones in vitro.*



Nota: Mortalidad transformada a Probit y dosis transformadas a Log. Fuente: Propia, 2021.

Figura 18

*Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de *P. xylostella* sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo de bosque de *B. thuringiensis*, bajo condiciones in vitro.*



Nota: Mortalidad transformada a Probit y dosis transformadas a Log. Fuente: Propia, 2021.

Los valores de DL_{50} y DL_{90} , obtenidos permiten afirmar que los aislamientos de las cepas proveniente de un suelo agrícola y de suelo de bosque, exhiben un modo de acción insecticida pudiendo ser un recurso promisorio para el control de poblaciones de *P. xylostella* en campo, pues su letalidad es similar a la de la cepa comercial Dipel.

Estos resultados nos reflejan la bondad del ajuste de los Modelos a las variables que se compararon; de tal manera, en los Anexos 6, 7, y 8; se presenta el Resumen de los Modelos generados por el análisis de todas las variables, en donde los Coeficientes de Determinación (R^2) Ajustados para la cepa comercial, la cepa de suelo agrícola y la cepa de suelo de bosque fueron de 0,94%, 0,90 y 0,77 respectivamente, los cuales son sumamente confiables y manifestándose una alta significancia.

11.3.2. Determinación del TL_{50}

Con los datos de mortalidad acumulados cada doce horas (desde la hora 12 de montado el bioensayo hasta la hora 96), se determinó el tiempo en el cual murió el 50% de la población (TL_{50}) para cada una de las cinco concentraciones en cada una de las tres cepas evaluadas, igualmente mediante análisis de regresión entre la relación mortalidad acumulada y tiempo de muerte.

El Tiempo Letal Medio (TL₅₀), es el valor medio del intervalo de tiempo, durante el cual se espera que muera el 50% de una población dada, tras la administración aguda de un agente químico a una determinada concentración y bajo un conjunto de condiciones definidas.

El TL₅₀ para las cinco concentraciones de la cepa comercial Dipel se pueden observar en la Tabla 8. Se determinó que la concentración 1×10^8 mata al 50% de la población a las 52 horas con un coeficiente de determinación ($R^2=0,84$); mientras que la TL₉₀ (90% de la población) muere a las 90 horas de exposición al entomopatógeno (Tabla 8). De la misma manera se presentan las TL₅₀ y TL₉₀ de todas las concentraciones probadas.

Tabla 8

Tiempo Letal Medio (TL₅₀), en larvas de segundo instar de P. xylostella, sometidas a cinco concentraciones de la cepa comercial (Dipel), en condiciones in vitro.

Tratam. Dipel	Dosis	Ecuación Regresión	R²	TL₅₀ (hora)	TL₉₀ (hora)
1×10^{12}	1.000.000.000.000	$y=1,26x-6,43$	0,79	45	81
1×10^{10}	10.000.000.000	$y=1,21x-7,57$	0,79	48	86
1×10^8	100.000.000	$y=1,21x-12,57$	0,84	52	90
1×10^6	1.000.000	$y=1,15x-14,71$	0,85	56	96
1×10^4	10.000	$y=0,84x-11,43$	0,86	73	128

Nota: Tiempo Letal Medio (TL₅₀) en larvas de *P. xylostella* a diferentes concentraciones.
Fuente: Propia, 2021

En la Tabla 9, se observan los TL₅₀ para las cinco concentraciones de la cepa de suelos agrícolas; determinándose que la concentración 1×10^8 mata al 50% de la población a las 48 horas con un coeficiente de determinación ($R^2=0,72$); mientras que la TL₉₀ (90% de la población) muere a las 91 horas de exposición al entomopatógeno. Igualmente se presentan las TL₅₀ y TL₉₀ de todas las concentraciones probadas para esta cepa proveniente de suelo agrícola.

Tabla 9

Tiempo Letal Medio (TL₅₀), en larvas de segundo instar de P. xylostella, sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo agrícola, en condiciones in vitro.

Tratam Agrícola	Dosis	Ecuación Regresión	R²	TL₅₀ (hora)	TL₉₀ (hora)
1×10^{12}	1.000.000.000.000	$y=1,12x-6,43$	0,89	50	91
1×10^{10}	10.000.000.000	$y=1,12x-5,14$	0,83	49	90
1×10^8	100.000.000	$y=1,05x-0,29$	0,72	48	91
1×10^6	1.000.000	$y=0,83x+3,71$	0,81	56	111
1×10^4	10.000	$y=0,90x-11,43$	0,85	68	119

Nota: Tiempo Letal Medio (TL₅₀) en larvas de *P. xylostella* a diferentes concentraciones.
Fuente: Propia, 2021.

Los Tiempos Letales Medios (TL₅₀) y (TL₉₀) para las cinco concentraciones probadas de la cepa aislada de suelo de bosque se presentan en la Tabla 10; determinándose que la concentración 1×10^8 mata al 50% de la población a las 19 horas, con un coeficiente de

determinación ($R^2=0,59$); mientras que la TL₉₀ (90% de la población) muere a las 76 horas de exposición a la cepa. El resto de los TL₅₀ y TL₉₀ de todas las concentraciones probadas para esta cepa proveniente de suelo no disturbado de bosque.

Tabla 10

Tiempo Letal Medio (TL₅₀), en larvas de segundo instar de P. xylostella, sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo de bosque, en condiciones in vitro.

Tratam Bosque	Dosis	Ecuación Regresión	R²	TL₅₀ (hora)	TL₉₀ (hora)
1x10 ¹²	1.000.000.000.000	y=0,97x+20	0,78	31	78
1x10 ¹⁰	10.000.000.000	y=0,80x+33,64	0,50	21	78
1x10 ⁸	100.000.000	y=0,81x+34,57	0,59	19	76
1x10 ⁶	1.000.000	y=0,55x+28	0,40	40	124
1x10 ⁴	10.000	y=0,67x+16	0,58	51	119

Nota: Tiempo Letal Medio (TL₅₀) en larvas de *P. xylostella* a diferentes concentraciones.
Fuente: Propia, 2021.

En las Figuras 19, 20 y 21, se presentan las regresiones resultantes de las relaciones Mortalidad Acumulada y Hora de Muerte de larvas de segundo instar larval de *P. xylostella*, causados por las cepas de *B. thuringiensis* de producto comercial, cepa de suelos agrícolas y cepa de suelos de bosque respectivamente, a la concentración de 1x10⁸, correspondiéndole en el

mismo orden las siguientes ecuaciones de regresión y R^2 , para la cepa comercial $y=1,21x-12,57$ y un $R^2=0,84$; para la cepa de suelo agrícola $y=1,05x-0,29$ y un $R^2=0,72$; mientras que para la cepa de suelos de bosque fue $y=0,81x+34,57$ y un $R^2=0,58$.

Figura 19

*Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas de segundo instar de *P. xylostella* sometidas a cinco concentraciones de la cepa comercial de *B. thuringiensis*, bajo condiciones in vitro.*

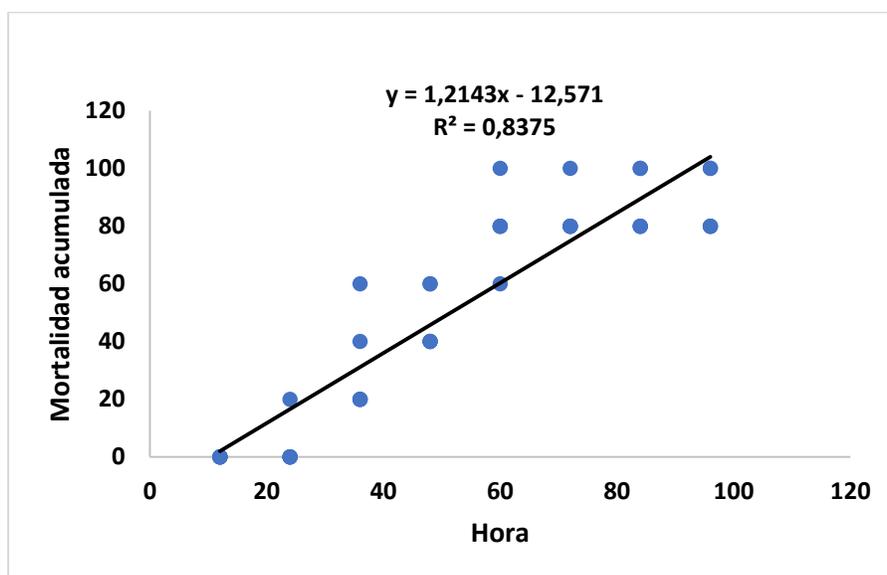


Figura 20

Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas de segundo instar de P. xylostella sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo agrícola de B. thuringiensis, bajo condiciones in vitro.

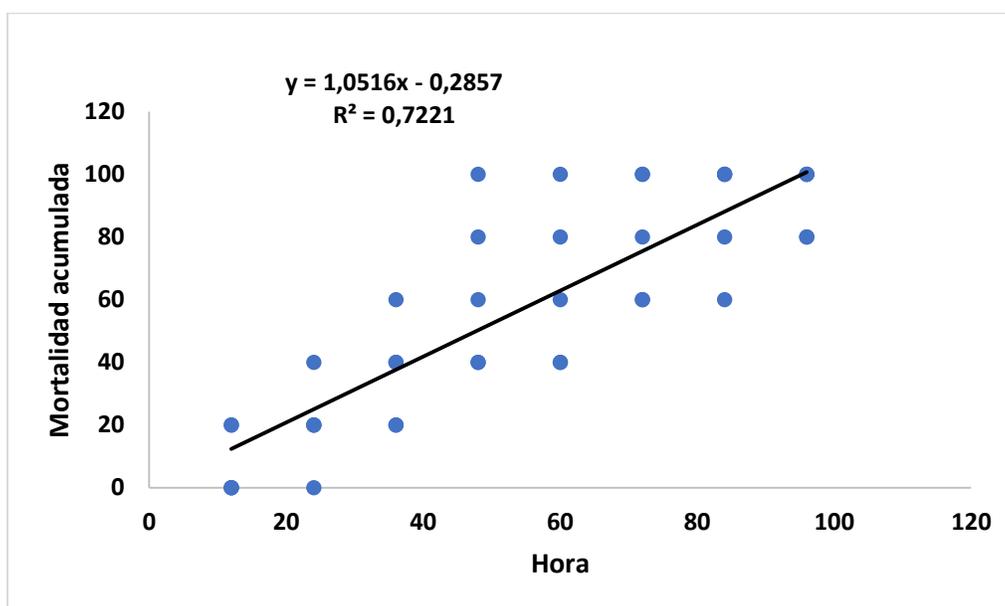
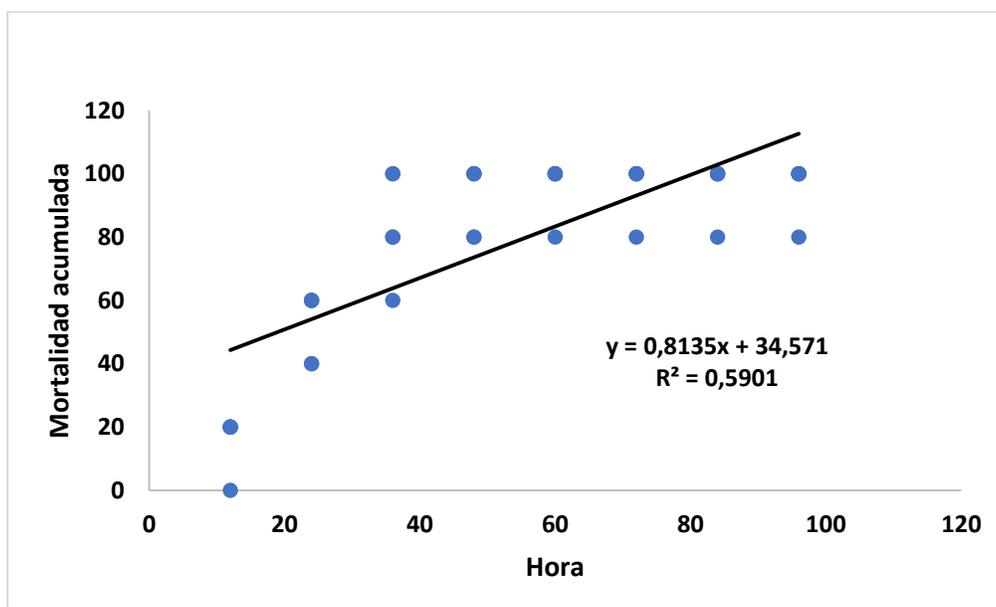


Figura 21

Regresión de la interacción Dosis-Mortalidad para larvas de segundo instar de P. xylostella sometidas a cinco concentraciones de la cepa de suelo de bosque de B. thuringiensis.



12. Conclusiones

Las cepas aisladas de suelos agrícolas, la cepa aislada de suelos de bosque de pinos y la cepa comercial, presentaron características similares a bacilos del género *Bacillus*; las colonias presentaron color crema, borde irregular y redondeado. Además, con base en la morfología y la inclusión del cristal al lado de las esporas en las tres cepas estudiadas, se concluyó con altas posibilidades sean cepas de *Bacillus thuringiensis*

La cepa comercial de Dipel y la cepa local aislada de suelos agrícolas lograron mortalidades de 100% con las dosis de 1×10^{10} y 1×10^{12} UFC/ml; mientras que, con la cepa aislada de suelo no disturbado de bosque se lograron mortalidades de 100% con las dosis de 1×10^8 , 1×10^{10} y 1×10^{12} UFC/ml. Además, la cepa proveniente de suelo de bosque causó mayor mortalidad de 84% a la concentración 1×10^4 , siendo las mortalidades a esa misma concentración, de 76% y 72% para las cepas comercial y la cepa de suelos agrícolas respectivamente.

Los valores de DL_{50} y DL_{90} , obtenidos permiten afirmar que los aislamientos de las cepas proveniente de un suelo agrícola y de suelo de bosque, exhiben un modo de acción insecticida pudiendo ser un recurso promisorio para el control de poblaciones de *P. xylostella* en campo, pues su letalidad es similar a la de la cepa comercial Dipel.

La concentración 1×10^8 UFC/ml de las tres cepas del bioensayo manifestaron los siguientes Tiempos Letales; la concentración comercial formulada para Dipel tuvo un TL_{50} de 52 horas y un TL_{90} de 85 horas; en el suelo agrícola el TL_{50} de 48 horas y un TL_{90} de 86 horas; mientras la cepa local de suelo de bosque fue el TL_{50} fue de 19 horas y de 68 horas para el TL_{90} ; motivo por el cual la cepa de suelo de bosque se presenta como un buen candidato para

controlador biológico de *P. xylostella*, la cual debe ser incluida en futuros trabajos de investigación.

13. Recomendaciones

Se hace imprescindible realizar alianzas con otros programas de la Universidad para lograr investigaciones interdisciplinarias como la presente.

Se recomienda la continuación del presente trabajo, para avanzar en otros aspectos relevantes como el escalamiento de la presente investigación.

Caracterizar a nivel molecular las cepas de *B. thuringiensis*.

Se sugiere realizar estudios bioecológicos asociados a la polilla *P. xylostella*, para dar respuestas a los productores de hortalizas brasicáceas de la Provincia de Pamplona y contribuir a disminuir los daños causados por este insecto.

14. Referencias bibliográficas

- Álvarez, A., E. Virla, L. Pera, and M. Baigorí. (2011). Biological characterization of two *Bacillus thuringiensis* strains toxic against *Spodoptera frugiperda*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 2343-2349.
- Blackburn M.B., P.A. Martin, D. Kuhar, R.R. Jr. Farrar, and D.E. Gundersen-Rindal. (2013). Phylogenetic distribution of phenotypic traits in *Bacillus thuringiensis* determined by multilocus sequence analysis. *PLoS One*. 8(6):1-5.
- Beltrán, L., Díaz, S., Berdugo, C., Buitrago, G., Zamora, A. & Moreno, N. (1998). Estrategia para el diseño de un medio de cultivo para la fermentación con *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/29981>
- CABI. (2019, 20 diciembre). *Bacillus thuringiensis* (Bt). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/91843>
- CABI. (2019, 20 diciembre). *Plutella xylostella*. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42318>
- Carreras, Bertha; Rodríguez, Sandra; Ancheta, Odelsa; Valdés, Tania; Harvey, Yahima. (Mayo-agosto, 2008). La morfología de los cuerpos paraesporales y su relación con la actividad biológica en cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 39, núm. 2, pp. 105-108 Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana, Cuba.
- Chávez, G. (2017). La palomilla dorso de diamante, una plaga importante a nivel mundial AM *Agricultura Moderna*, 48 - 49.

- Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T. R. & Bonning, B. C. (2020). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107438. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107438>
- Curis, M., Bertolaccini, I., Lutz, A., Favaro, J. C. (18 de diciembre, 2019). Estado del MIP de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: plutellidae) en argentina. *FAVE Sección Ciencias Agrarias*, 18(2), 7-18. <https://doi.org/10.14409/fa.v19i2.8780>
- DANE. (2014). Producción limpia de hortalizas, una mejor salud y bienestar. *Insumos y Factores Asociados a la Producción Agropecuaria*, 01(20), 01-06.
- Fornaris, G. J. (2014). Conjunto tecnológico para la producción de repollo. Características de la planta. Estación experimental agrícola de la universidad de Puerto Rico. p- 158, 2-6.
- Galvis, F., y L. Moreno. 2018. Identification of Cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates and their toxic effect against *Milax gagates*, a pest on lettuce (*Lactuca sativa*). *Revista Chapingo Serie Horticultura* 24(2):97-106.
- García, A., Reyes, A., Ruiz, E. & Ibarra, J. (2018). Aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* del sureste de México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrarias*. Yucatán, México.
- Gonzales, A. (2018). *Aislamiento, caracterización y selección de cepas nativas de Bacillus thuringiensis para el control de lepidópteros plaga*. [Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad de la República de Uruguay].
- Guadalupe, D. (2011). *Toxicidad de microencapsulados de Bacillus thuringiensis (berliner) sobre larvas en primer instar de Manduca sexta (Linneo)*. [Tesis presentada como

- requisito parcial para obtener el título de Ingeniera Agrónoma Fitotecnista, Universidad Autónoma de San Luis Potosí*] repositorio institucional.
- Guevara, I. (2016). *Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus thuringiensis var. Kurstaki obtenidas de muestras de suelo de alta montaña. [Trabajo de grado, Universidad Central de Venezuela]*. Instituto de Biología Experimental (IBE) Caracas, Venezuela.
- Hernández -Fernández, J., & Ramírez, L. & Fuentes - Quintero, L. (2012). *Metodologías estandarizadas para la caracterización de cepas nativas de Bacillus thuringiensis y bioensayos con Tuta absoluta insecto plaga del tomate*. Universidad Jorge Tadeo Lozano
Editor: Henry Colmenares ISBN: 978-958-725-105-0
- Iriarte, J., M. Porcar, M.M. Lecadet, and P. Caballero. (2000). Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from aquatic environments in Spain. *Current Microbiology* 40: 402-408.
- Jiménez, A. (julio, 2019). *Bacterias entomopatógenas como alternativa para el biocontrol de plagas. [Trabajo de grado de Biología, Universidad de la Laguna]*
- López, J. (2002). *Heredabilidad de la resistencia al complejo espora-cristal de Bacillus thuringiensis (hd-1 kurstaki) en una población de Plutella xylostella de Guanajuato [tesis de maestría, Universidad de Guadalajara]*. Repositorio institucional.
- Martin Phyllis A.W., Gundersen-Rindal Dawn E., Blackburn Michael B. (2010). Distribution of phenotypes among *Bacillus thuringiensis* strains. *Systematic and Applied Microbiology* ISSN 0723-2020 v.33 204–208.

- Maughan H and van der Auwera G. (2011). Taxonomía de *Bacillus* en la era genómica encuentra que los fenotipos son esenciales, aunque a menudo diez engañosas. *Infección, genética y evolución*. 11:789-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
- Mena, J. & Hernández, J. (2017). Brasicáceas y perspectivas de control biológico del insecto plaga *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) utilizando *Bacillus thuringiensis*. *Mutis*, 7(2), 7-22, en prensa, doi: <http://dx.doi.org/10.21789/22561498.1245>
- Mondragón-Sánchez, Y. D.; Triana-Marroquín, B. S. & Giraldo-Vanegas, H. (2020). Determinación de la mortalidad, la DL₅₀ y el TL₅₀ de extractos acuosos de hojas y semillas de *Azadirachta indica* A. Juss, sobre *Plutella xylostella* (L.), bajo condiciones de laboratorio. Universidad de Pamplona. Pamplona, Norte de Santander.
- Muniady, S., X. Rathinam, and S. Subramaniam. (2011). Quick isolation and characterization for the confirmation of a novel *Bacillus thuringiensis* strains from chicken manure samples. *African Journal of Microbiology Research* 5(20):3131-3137.
- Niedmann-Lolas L. & Meza-Basso L. (2006). Evaluation of Native Strains of *Bacillus thuringiensis* as an Alternative of Integrated Management of the Tomato Leaf Miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) in Chile. *Agricultura Técnica* ISSN 0365-2807 v.66 n.3 Chillán
- Orduz, S. (1992). *Bacillus thuringiensis*: Aspectos generales y biología molecular. *Revista Palmas*, Volumen 13 No. 4

Pérez, M. (2016). *Factores de virulencia de Bacillus thuringiensis y su utilización para el control de coleópteros de alto impacto en el Sector Agropecuario. [Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires]*

Rafael-Rutte, Robert, Aguilar, René, Maldonado, Edgar A., & Ruiz, Marianella. (2020). cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* y *Alabama argillacea* en el cultivo de algodón (*Gossypium barbadens*) en piura, Perú. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 36(1), 52-62. <https://dx.doi.org/10.29393/chjaas36-2s30002>

Rabinovitch, L., A. Vivoni, V. Machado, N. Knaak, D. Berlitz, R. Polanczyk (2017). pathotype, cellular, and molecular aspects. p. 1-18. In L. Fiuza, R. Polanczyk, N. Crickmore (eds). *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus*. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland.

Ramírez, L., Ramírez, N., Fuentes, L., Jiménez, J. & Hernández, J. (2010). *Estandarización de un bioensayo y evaluación preliminar de tres formulaciones comerciales de Bacillus thuringiensis sobre Tuta absoluta (Meyrick) Lepidoptera: Gelechiidae*. Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15501>

Rojas, N. (2019). *Uso de dos especies de Trichogramma para el manejo de Plutella xylostella en cultivos de Brassica oleracea y estrategias para potenciar sus resultados*. 33 p. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile.

- Romero Bozzetta, J. L., Canales Carrera, E. E., Meneses Huacachi, P. K. & Herbozo Rondan, S. F. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus thuringiensis* en cultivos de plátano, para la producción de bioinsecticidas. *Big Bang Faustiniiano*, Vol. 6 Núm. 1.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011). *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, 9(3), 283–300. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x>
- Sauka, H. & Benintende, B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40 (2), 124-140. [Fecha de Consulta 3 de Junio de 2021]. ISSN: 0325-7541. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016787013>
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:775-806.
- Silva-Lizarazo, J. S. & Giraldo-Vanegas, H. (2018). *Ciclo biológico de Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) y sus Enemigos Naturales en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB)*, Universidad de Pamplona. Pamplona, Norte de Santander.
- Szwarc, D. & Trumper, E. (2018). *Dispersión y mortalidad de larvas de Spodoptera frugiperda J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en híbridos de maíz convencional y transgénico Bt. Potenciales implicancias para el manejo de la resistencia. [Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae en Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata]*

Theunis, W., R.M. Aguda, W.T. Cruz, C. Decock, M. Peferoen, B. Lambert, et al. 1998. *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution, δ -endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera: Pyralidae). *Bulletin of Entomological Research* 88:335-342

Torres, E., Cárdenas, H, De La Torres M. (2006). Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas.

Vázquez-Ramírez, M.F., J.C. Rangel-Núñez, J.E. Ibarra y M.C. Del Rincón-Castro. (2015). Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia* 40(6):397-402.

Villarreal, M., Villa, E. D., Cira, (L.) A., Estrada, M. I., Parra, F. I., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1).
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Vitelli-Flores, Juana y Gajardo, Roxana y Lage, Liset y Fajardo, Ysalexia y Dorta, Blas y Vidal Rodríguez, Lemoine (2010). Aislamiento y caracterización molecular, ribotipificación, de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en suelos y larvas muertas de *Hylesia metabus* en la región nororiental de Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30 (2), 90-96. ISSN: 1317-973X. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=199419354003>.

15. Anexos

Anexo 1

Formato para la toma de datos de Mortalidad de larvas.

TRATAMIENTO (Cepa):

Dosis (concentración):

		HORAS
--	--	--------------

REP.	LARVA	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	156	168	180	192	204	216	228	240	252	
1	1																					
	2																					
	3																					
	4																					
	5																					
2	1																					
	2																					
	3																					
	4																					
	5																					
3	1																					
	2																					
	3																					
	4																					
	5																					
4	1																					
	2																					
	3																					
	4																					
	5																					
5	1																					
	2																					
	3																					
	4																					
	5																					

Anexo 2

Anova Mortalidades de las tres cepas, la comercial, de suelo agrícola y suelo de bosque.

ANOVA

			Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Dipel	Entre grupos	(Combinado)	33432,173	5	6686,435	115,306	,000
		Término	21900,417	1	21900,417	377,666	,000
		lineal	11531,756	4	2882,939	49,715	,000
	Dentro de grupos		1391,732	24	57,989		

	Total			34823,905	29			
Suelo agrícola	Entre grupos	(Combinado)		32185,666	5	6437,133	54,557	,000
		Término lineal	Contraste	23184,348	1	23184,348	196,496	,000
			Desviación	9001,318	4	2250,329	19,072	,000
	Dentro de grupos			2831,732	24	117,989		
	Total			35017,398	29			
Suelo bosque	Entre grupos	(Combinado)		37121,870	5	7424,374	111,366	,000
		Término lineal	Contraste	21776,402	1	21776,402	326,646	,000
			Desviación	15345,469	4	3836,367	57,546	,000
	Dentro de grupos			1600,000	24	66,667		
	Total			38721,870	29			

Anexo 3

Comparación de medias Tukey cepa comercial Dipel.

		Dipel			
		Subconjunto para alfa = 0.05			
	Dosis	N	1	2	3
HSD	6	5	5,2560		
Tukey ^a	5	5		76,0000	
	4	5		88,0000	88,0000
	3	5			96,0000
	1	5			100,0000
	2	5			100,0000
	Sig.			1,000	,166

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

Anexo 4

Comparación de medias Tukey proveniente de suelo agrícola.

		Suelo agrícola			
		Subconjunto para alfa = 0.05			
	Dosis	N	1	2	3
HSD	6	5	5,2560		
Tukey ^a	5	5		72,0000	
	4	5		80,0000	80,0000
	3	5		92,0000	92,0000
	1	5			100,0000
	2	5			100,0000
	Sig.			1,000	,073

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

Anexo 5

Comparación de medias Tukey cepa proveniente de suelo de bosque.

Suelo bosque

	Dosis	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
HSD	6	5	1,5700		
Tukey ^a	5	5		84,0000	
	4	5		88,0000	88,0000
	1	5			100,0000
	2	5			100,0000
	3	5			100,0000
	Sig.			1,000	,969

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 5,000.

Anexo 6

Resumen del Modelo para la Regresión de cepa comercial (DL50).

Resumen del modelo ^b									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Cambio en R cuadrado	Estadísticos de cambio			Sig. Cambio en F
						Cambio en F	gl1	gl2	
1	,970 ^a	,940	,920	,31926	,940	47,116	1	3	,006

a. Predictores: (Constante), Log. Concentración

b. Variable dependiente: Probit

Anexo 7

Resumen del Modelo para la Regresión de cepa de suelo agrícola.

Resumen del modelo^b									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Cambio en R cuadrado	Estadísticos de cambio			Sig. Cambio en F
						Cambio en F	gl1	gl2	
1	,947 ^a	,897	,863	,44907	,897	26,208	1	3	,014

a. Predictores: (Constante), Log. Concentración

b. Variable dependiente: Probit

Anexo 8

Resumen del Modelo para la Regresión de suelo de bosque.

Resumen del modelo^b									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado ajustado	Error estándar de la estimación	Cambio en R cuadrado	Estadísticos de cambio			Sig. Cambio en F
						Cambio en F	gl1	gl2	
1	,878 ^a	,771	,695	,60797	,771	10,100	1	3	,050

a. Predictores: (Constante), Log. Concentración

b. Variable dependiente: Probit

Anexo 9

*Depositando *Plutella xylostella* en bolsas en campo. Fuente: Cabrera, 2021.*

**Anexo 10**

Nevera de icopor para trasladar muestras desde el campo a laboratorio. Fuente: Cabrera, 2021.



Anexo 11

Cámaras de reproducción y crianza de P. xylostella. Fuente: Cabrera, 2021.

