

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA



Susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) a una cepa colectada en campo y una comercial de *Beauveria bassiana* (Balsamo), bajo condiciones *in vitro* en Pamplona, Norte de Santander.

Yedys Angélica Pirazán Galvis

1115742250

Cindy Tatiana Sandoval Alarcón

1013680207

Programa de Ingeniería Agronómica

02 de junio de 2022

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA



Susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) a una cepa colectada en campo y una comercial de *Beauveria bassiana* (Balsamo), bajo condiciones *in vitro* en Pamplona, Norte de Santander.

Trabajo de grado de la modalidad de investigación presentado como requisito para optar el título Ingeniero agrónomo.

Yedys Angélica Pirazán Galvis

1115742250

Cindy Tatiana Sandoval Alarcón

1013680207

Director: I.A., Dr. Entomología. Humberto Giraldo Vanegas

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

Programa de Ingeniería Agronómica

02 de junio de 2022

1. Agradecimientos

Estamos orgullosas de hacer mención a todas aquellas personas que nos ayudaron al cumplimiento de esta meta tan anhelada de obtener nuestro título profesional a través de este trabajo de grado. Deseamos expresar nuestro agradecimiento a los siguientes:

Primeramente, a nuestra familia por ser nuestro principal apoyo, inspiración y paciencia, a la Universidad de Pamplona por darnos la oportunidad de formarnos en ella, amigos, también a los docentes quienes fueron parte fundamental de nuestro proceso de formación, en especial a nuestro director de trabajo de grado Humberto Giraldo Vanegas quien gracias a su conocimiento, apoyo y consejos nos ayudó a desarrollar cada una de las etapas de este proyecto para así lograr culminarlo con éxito y a nuestra coodirectora Angela Maritza Cajiao Pedraza y a Luis Becerra por brindarnos gran parte de su tiempo y conocimiento, sin ninguno de ellos no habría sido posible llevar a cabo este proceso.

2. Dedicatoria

Este trabajo se lo dedicamos con todo el amor y cariño a nuestros padres, quienes con su esfuerzo, dedicación, amor y paciencia nos han permitido cumplir este sueño, Lilia

Alarcón Guzmán, Raúl Sandoval Villamarín, Carlos Pirazán, Elena Galvis,

Tabla de contenido

1.	Agradecimientos	2
2.	Dedicatoria.....	3
3.	Resumen.....	11
	Palabras claves: <i>Plutella xylostella</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , entomopatógenos, mortalidad.....	11
	Summary.....	12
	Keywords: <i>Plutella xylostella</i> , <i>Beauveria bassiana</i> , entomopathogens and mortality.	12
	Glosario.....	13
4.	Introducción.....	14
5.	Problema.....	16
	5.1 Planteamiento del problema	16
	5.2 Justificación	17
6.	Objetivos.....	18
	6.1 Objetivo general.....	18
	6.2 Objetivos específicos	18
7.	Marco teórico.....	18
	7.1 Antecedentes locales.....	19
	7.2 Antecedentes nacionales	20
	7.3 Antecedentes internacionales.....	22
8.	Marco contextual	24
	8.1 Bases conceptuales	25
	8.1.1 <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin.....	25
	8.1.1.1 Origen y distribución.	25
	8.1.1.2 Empleo.....	26

8.1.1.3	Clasificación.....	26
8.1.1.4	Descripción.....	27
8.1.1.5	Ciclo de vida de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo).....	27
8.2	<i>Plutella xylostella</i> (L.).....	28
8.2.1	Origen y distribución.....	28
8.2.2	Situación actual.....	29
8.2.3	Clasificación.....	29
8.2.4	Morfología y biología.....	29
8.2.4.1	Huevo.....	29
8.2.4.2	Larva.....	30
8.2.4.3	Pupa.....	30
8.2.4.4	Adulto.....	30
8.2.4.5	Ciclo de vida <i>Plutella xylostella</i> (L.).....	31
9	Marco legal.....	31
9.1	Reglamento estudiantil Universidad de Pamplona.....	31
Acuerdo No. 186.....		31
Artículo 35.....		32
PARÁGRAFO PRIMERO.....		32
Artículo 36.....		32
9.2	DECRETO 1376 DE 2013.....	32
9.2	DECRETO 3016 DE 2013.....	32
9.3	RESOLUCIÓN 000200 2015.....	33
9.4	RESOLUCIÓN No. 00375 (27 de febrero de 2004).....	33
10	Metodología.....	33
10.1	Tipo de Investigación.....	34

10.2	Diseño Metodológico	34
10.2.1	Hipótesis.	34
10.2.1.1	Hipótesis Nula.	34
10.2.1.2	Hipótesis Alterna.	34
10.3	Sistema de Variables	34
10.3.1	Variables Cuantitativas Continuas.....	34
10.3.1.1	Variables dependientes	34
10.3.1.2	Variables independientes	34
10.3.1.3	Variables Cualitativas	34
11.	Diseño de la investigación.	35
11.1	Localización del ensayo.....	35
11.2	Diseño Experimental	35
11.3	Colecta y Cría masiva de <i>Plutella xylostella</i> (L.).	36
11.4	Técnica de Cría de <i>Plutella xylostella</i> (L.).....	37
12.	Descripción de las Actividades.....	38
12.1	Caracterización de dos cepas de <i>Beauveria bassiana</i> , aisladas del suelo.....	38
12.2	Aislamiento de las cepas de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo).....	38
12.3	Caracterización morfológica y fisiológica.....	39
12.4	Crecimiento micelial.....	39
12.5	Producción de conidios en medio SDA.	40
12.5	Producción de conidios en arroz.....	40
13.	Determinación de concentración de las cepas de <i>B. bassiana</i>	41
14.	Determinación la mortalidad de <i>P. xylostella</i> , causada por una cepa colectada en campo y una cepa comercial de <i>B. bassiana</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	41
15.	Cálculo de la CL ₅₀ y el TL ₅₀ de una cepa colectada en campo y una cepa comercial de <i>B. bassiana</i> en <i>P. xylostella</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	42

16. Resultados.....	43
16.2 Caracterizar una cepa colectada en campo de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo), aisladas a partir de larvas de <i>P. xylostella</i> o insectos y muestras del suelo.....	43
16.2.1 Identificación de aislamientos.	43
16.2.2 Caracterización fisiológica	45
17. Mortalidad de <i>P. xylostella</i> causada por una cepa colectada en campo y una cepa comercial de <i>B. bassiana</i> en condiciones <i>in vitro</i>	46
17.1 Mortalidad de larvas de <i>Plutella xylostella</i> (L.), causadas por la cepa comercial de <i>B. bassiana</i>	¡Error! Marcador no definido.
18. Determinar la CL ₅₀ y TL ₅₀ de dos cepas, una colectada en campo y una cepa comercial de <i>B. bassiana</i> , sobre <i>P. xylostella</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	48
18.1 Concentración Letal Media (CL ₅₀).....	48
18.2 Determinación de la CL ₅₀	49
18.3 Determinación del TL ₅₀	50
19. Discusión	53
19.1 Comparación de las cepas evaluadas con otros autores.....	57
20. Plantas hospederas.....	59
21. Enemigos naturales.....	60
22. Conclusiones.....	61
23. Recomendación	62
24. Referencias	63
25. Anexos	73

Tablas:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>B.bassiana</i>	26
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Plutella xylostella</i> (L.).....	29
Tabla 3. Desarrollo micelial e inhibición o incremento de cepas poliespóricas de <i>Beauveria</i> spp.	45
Tabla 4. Tiempo de germinación del 50% de los conidios (TG ₅₀) de aislamientos de <i>Beauveria</i> spp evaluados a 25, 30 y 35 °C.	45
Tabla 5. Producción de conidios de <i>B. bassiana</i> cultivados en arroz y medio ADS + EL.	45
Tabla 6. Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> , en las diferentes concentraciones de la cepa comercial de <i>B. bassiana</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	46
Tabla 7. Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>P. xylostella</i> , en las diferentes concentraciones de la cepa local de <i>B. bassiana</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	47
Tabla 8. mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log ₁₀ , para la cepa comercial de <i>B. bassiana</i>	48
Tabla 9. Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log ₁₀ , para la cepa local de <i>B. bassiana</i>	49
Tabla 10. Concentraciones letales (CL ₅₀) de las dos cepas de <i>B bassiana</i> , para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , en condiciones de laboratorio.	50
Tabla 11. Tiempo Letal Medio (TL ₅₀), en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a seis concentraciones de la cepa comercial de <i>B. bassiana</i> , en condiciones <i>in vitro</i>	51
Tabla 12. Tiempo Letal Medio (TL ₅₀), en larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> , sometidas a seis concentraciones de la cepa local de <i>B. bassiana</i> , en condiciones <i>in vitro</i>	51
Tabla 13. Cámara de Neubauer para las cepas comercial y nativa.....	75

Tabla de Figuras

Figura 1. Laboratorio de Sanidad Vegetal	24
--	----

Figura 2. Ciclo de vida de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo),.	28
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Plutella xylostella</i> (L.)	31
Figura 4. Representación gráfica del diseño de experimental	36
Figura 5. Conidióforos sencillos, agrupados irregularmente, hinchados en la base y adelgazándose hacia el raquis con su conidio.	44
Figura 6. Macroscópia de <i>B. bassiana</i> A cepa comercial de <i>B. bassiana</i> y B cepa nativa de <i>B. bassiana</i>	44
Figura 7. Regresión de la interacción mortalidad acumulada-hora muerte para larvas de segundo instar <i>P.xylostella</i> sometidas a la concentración 10^9 de la cepa comercial de <i>B. bassiana</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	52
Figura 8. Regresión de la interacción mortalidad acumulada-hora de muerte para larvas de segundo instar de <i>P. xylostella</i> sometidas a la concentración de 10^9 de la cepa local de <i>B. bassiana</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i>	53
Figura 9. A-B larvas muertas por <i>B. bassiana</i> con micelio blanco parcial y total, C-D sequedad y necrosis miento de las larvas de <i>Plutella xylostella</i> , E-F larvas con una coloración rojiza y amarilla.	54
Figura 10. A Veronica (<i>Veronica persica</i> Poir.), B Nudosilla (<i>Persicaria capitata</i> (Buch-Ham) (D. Don), C Manzanilla de Castilla (<i>Matricaria chamomilla</i> L.) y D Ortiga menor (<i>Urtica urens</i> L.).	59
Figura 11. A-B larvas y depredador de Syrphidae; C-D parasitoide <i>Diadegma insulare</i> Cresson.	60

Tabla de anexos:

Anexo 1. Instrumento para la toma de datos de Mortalidad de larvas.	73
Anexo 2. Anova de Mortalidad de las dos cepas evaluadas.	74
Anexo 3. Prueba de Tukey para la cepa comercial de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo).	74
Anexo 4. Prueba de Tukey para la cepa colectada en campo de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo).	75
Anexo 5. Recolecta de adultos con jama.	76
Anexo 6. Recolecta de larvas y pupas de forma manual de <i>P. xylostella</i>	76

Anexo 7. Cría de adultos	76
Anexo 8. A medición del terreno para el muestreo y B mezclado de las muestras de suelo para obtener 1kg.	77
Anexo 9. A. Huevos de <i>Plutella xylostella</i> (L.); B. huevos eclosionados de <i>Plutella xylostella</i> (L.).....	77
Anexo 10. A formación de larvas de <i>Plutella xylostella</i> (L.), B larvas del primer instar de <i>Plutella xylostella</i> (L.).	78
Anexo 11. Pupa de <i>Plutella xylostella</i> (L.).....	78
Anexo 12. Adulto de <i>Plutella xylostella</i> (L.), en una planta hospedera Verónica (<i>Veronica persica</i> Poir).	78
Anexo 13. Procedimiento para impregnar insectos de hongos presentes en el suelo	79
Anexo 14. adulto de <i>Plutella xylostella</i> (L.) impregnada de hongo entomopatógeno de suelo <i>Beauveria bassiana</i>	79
Anexo15, zona sin perturbación agrícola	80
Anexo 16, zona sin perturbación agrícola	80

3. Resumen

El objetivo de esta investigación fue evaluar la mortalidad de *Plutella xylostella* (L.), con una cepa colectada en campo y una comercial de *Beauveria bassiana* (Balsamo), bajo condiciones *in vitro*.

Se utilizó una cepa colectada en campo y una comercial de *Beauveria bassiana* (Balsamo), con 6 diferentes dosis y un testigo absoluto 1×10^4 UFC/g, 1×10^5 UFC/g, 1×10^6 UFC/g, 1×10^7 UFC/g, 1×10^8 UFC/g y 1×10^9 UFC/g. El diseño fue completamente al azar y cada tratamiento con 5 repeticiones y cada repetición con 5 larvas de segundo instar (L2), de tal manera fueron 175 unidades experimentales en cada cepa. La mortalidad se evaluó cada 12 horas hasta la muerte de las larvas de la polilla. Los datos, analizados por medio del Software SPSS y pruebas Tukey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Para calcular la CL_{50} , las dosis se transformaron a \log_{10} y las mortalidades a Probit, y con las mortalidades acumuladas y la hora de muerte se encontró el TL_{50} , mediante Análisis de Regresión. Los resultados con respecto a la mortalidad de la cepa colectada en campo muestran que las concentraciones de 10^6 hasta 10^9 , causaron el 100% y 10^4 , 10^5 causaron el 92%. La CL_{50} , de la cepa comercial es de 34.659 UFC/mL, para la cepa colectada en campo fue de 118.342 UFC/mL. Los TL_{50} de la cepa comercial determinaron que la concentración de 10^9 UFC/mL mata al 50% de la población a las 35 horas, mientras que 10^4 la causa a las 111 horas. El TL_{50} para la cepa colectada en campo a la concentración de 10^9 UFC/mL fue a las 53 horas, mientras que 10^4 a las 73 horas.

Los resultados obtenidos pueden indicar que la población de *P. xylostella* L. colectada en el Colegio Normal Superior de Pamplona es muy susceptible a concentraciones de *B. bassiana*, tanto altas o más bajas de la recomendada por la cepa comercial.

Palabras claves: *Plutella xylostella*, *Beauveria bassiana*, entomopatógenos, mortalidad.

Summary

The objective of this research was to evaluate the mortality of *Plutella xylostella* (L.), with a strain collected in the field was used and a commercial strain of *Beauveria bassiana* (Balsamo), under in vitro conditions

A strain collected in the field was used and a commercial strain of *Beauveria bassiana* (Balsamo), were used, with 6 different doses and an absolute control 1×10^4 CFU/g, 1×10^5 CFU/g, 1×10^6 CFU/g, 1×10^7 CFU/g, 1×10^8 CFU/g and 1×10^9 CFU/g. The design was completely randomized and each treatment with 5 replicates and each replicate with 5 second instar larvae (L2), so there were 175 experimental units in each strain. Mortality was evaluated every 12 hours until the death of the moth larvae. The data were analyzed using SPSS software and Tukey tests to determine significant differences between treatments. To calculate the LC_{50} , doses were transformed to \log_{10} and mortalities to Probit, and with the accumulated mortalities and time of death, the TL_{50} was found by Regression Analysis. The results with respect to the mortality of the A strain collected in the field was used strain show that concentrations from 10^6 to 10^9 caused 100% and 10^4 , 10^5 caused 92%. The LC_{50} of the commercial strain is 34,659 CFU/mL, for the A strain collected in the field was used strain it was 118,342 CFU/mL. The TL_{50} for the commercial strain determined that the concentration of 10^9 CFU/mL kills 50% of the population at 35 hours, while 10^4 causes it at 111 hours. The TL_{50} for the A strain collected in the field was used strain at the concentration of 10^9 CFU/mL was at 53 hours, while 10^4 at 73 hours.

The results obtained may indicate that the population of *P. xylostella* L. collected at the Colegio Normal Superior de Pamplona is very susceptible to concentrations of *B. bassiana* both high and lower than that recommended by the commercial strain.

Keywords: *Plutella xylostella*, *Beauveria bassiana*, entomopathogens and 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.

Beauveria bassiana: es un hongo imperfecto de la clase Deuteromycetes, capaz de infectar a más de 200 especies de insectos. Es de apariencia polvosa, de color blanco algodonoso o amarillento cremoso, siendo un agente control biológico para artrópodos plaga.

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.

Control químico: Los pesticidas químicos suelen utilizarse para controlar enfermedades, plagas o malezas. El control químico se basa en sustancias tóxicas (venenosas) para la plaga en cuestión.

CL₅₀: Concentración 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

Eficacia: es la capacidad de realizar un efecto deseado, esperado o anhelado.

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

Plaga: Es una población de animales fitófagos (se alimentan de plantas) que disminuye la producción del cultivo, reduce el valor de la cosecha o incrementa sus costos de producción, una plaga también es una enfermedad y especies invasoras (malas hierbas).

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

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

4. Introducción

El cultivo de hortalizas es de vital importancia ya que juegan un papel fundamental en la seguridad alimentaria de la población, sumando a esto han tenido una demanda creciente por factores relacionados con la salud, además las crucíferas son muy importantes no solo en área sembrada sino como generadoras de empleo y las especies de mayor importancia económica son el brócoli, coliflor, el repollo, col china, col de bruselas y col (Jaramillo & Diaz, 2006).

El repollo morado *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* es una planta nativa de Europa y Asia occidental. Botánicamente pertenece a la clase Dicotyledoneaea, orden Popaverales, familia Brassicaceae, género *Brassica*, especie *B. oleracea* L., por otro lado, la cabeza compacta de hojas muy apretadas son la parte comestible (Solano, 2017) citado en (Ramos, 2019).

La producción de repollo en Colombia es 299,9 toneladas en el país y un área de siembra de 60,91 ha (Agronet, 2019). Además, los departamentos que participan en la producción del repollo en el país desde el 2006 hasta el 2020 son Antioquia con una participación de 54.28 % (53,35 ton/ha), Cundinamarca 16.25% (26,49 ton/ha), Nariño 12.81% (27.18 ton/ha), Valle del Cauca 12.11% (20.89 ton/ha), Boyacá 2.24% (16.12 ton/ha) y Norte de Santander 1.82% (19.92 ton/ha) (Agronet, s.f.).

Por otro lado, *Plutella xylostella* (L.) es uno de los lepidópteros más destructivos de las crucíferas que causan grandes daños económicos, es cosmopolita e infecta a 39 especies de crucíferas, posee un corto periodo y alta tasa generacional. además ha desarrollado resistencia a muchos agentes de control como el dicloro-difenil-tricloroetano (DTT) un producto que ya salió del mercado debido a su persistencia en el medio ambiente, también ha desarrollado resistencia a *Bacillus thuringiensis* (Zafar et al., 2020), así mismo Talekar y Shelton (1993) citado en (Fernández et al, 2003) afirman que la polilla dorso de diamante *P. xylostella* es considerada el insecto plaga más importante de crucíferas a nivel mundial, siendo especialmente problemática porque su control con insecticidas ha promovido la evolución de resistencia, conjuntamente trae consecuencias negativas significativas a las medidas químicas y microbiales actualmente utilizadas. Por consiguiente, se hace necesario rotar ampliamente las medidas de control y mayor variabilidad de los agentes de control biológico.

El hongo *Beauveria bassiana* (Balsamo), es apreciado a nivel mundial en el campo agrícola como uno de los más eficientes en el control biológico, siendo exitoso contra diversas plagas (Chiriboga et al., 2015).

Beauveria bassiana (Balsamo), posee un amplio rango de hospederos ocasionando la enfermedad muscardina blanca acarreado la muerte a los insectos que infecta (Ferron, 1978.). Hay registros que indican que *B. bassiana* tiene influencia como control de insectos

del orden Lepidoptera y Coleoptera, mostrando efectividad y especificidad sobre estos órdenes (Malpartida-Zevallos et al., 2013). Una de las características que sobresalen de este hongo es su potencial antagonista tanto epífita como endófito, lo que le permite suprimir el desarrollo de la larva a adulto; con lo cual aumenta el éxito de infección en cualquier instar del insecto (Klieber y Reineke, 2016) (Rondot y Reineke, 2018).

Teniendo en cuenta que conforme pasa el tiempo las plagas presentan mayores resistencias a las moléculas químicas a las que se someten, cuyo caso cumple *Plutella xylostella*, y esto sumando que a nivel mundial está creciendo el deseo y la demanda de productos naturales u orgánicos, con su respectiva certificación, surge la necesidad de generar una alternativa para los agricultores, con soluciones tanto ambientalmente sanas como eficientes en el control de las plagas, por ello es de vital importancia el estudio acerca de hongos entomopatógenos como *B. bassiana*.

5. Problema

5.1 Planteamiento del problema

Debido a las prácticas agrícolas insostenibles que hacen parte del deterioro del medio ambiente como la contaminación del agua que es una grave amenaza para la salud humana y a su vez a los ecosistemas del planeta (FAO, 2018). No obstante, el mejoramiento de la calidad de vida del ser humano implica el deterioro del medio ambiente, además los métodos de control que se realizan para el control de plagas no son los más adecuados porque no se tienen en cuenta los impactos negativos que conlleva la utilización excesiva de productos de síntesis química, como la resistencia de poblaciones de plagas; como en el caso de *P. xylostella* que se ha documentado presenta resistencia a alrededor de 97 ingredientes activos (Salas et al., 2020). Ya que para su control se utilizan insecticidas de síntesis química, como piretroides, carbamatos u organofosforados, los cuales tienen acción inmediata, no obstante, causan efectos adversos en la salud, el ambiente y la ausencia de enemigos naturales, de

hecho, su resistencia a numerosos insecticidas convencionales hace que este insecto se establezca rápidamente en áreas productoras de brasicáceas (Mena y Hernández, 2017).

Por lo anterior se hace necesario el generar alternativas para el control de esta plaga, que sean eficientes y buenas con el medio ambiente y la salud humana. En este proyecto de investigación se empleó el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. (Balsamo), quien es utilizado a nivel mundial para el control de diversas plagas siendo muy eficiente (Chiriboga et al., 2015).

5.2 Justificación

La polilla *Plutella xylostella* (L.) es el insecto plaga más destructivo de brasicáceas en todo el mundo y ha desarrollado resistencia a la mayoría de los insecticidas sintéticos aplicados, haciendo a menudo difícil su control (Bertolaccini et al., 2010). Esto debido al uso indiscriminado de control químico de amplio espectro en la especie que data hasta de 16 tratamientos por ciclo de cultivo, lo cual, sumado al alto nivel de selección y alta fecundidad de *P. xylostella* han generado en esta resistencia a alrededor de 97 ingredientes activos (Salas et al., 2020). Por ello se hace necesaria la búsqueda de una alternativa sostenible y sustentable para el control adecuado de la polilla, se hace referencia a 130 especies de antagonistas entre virus, hongos, bacterias, artrópodos, que atacan diferentes estadios de crecimiento de *P. xylostella*. pero su eficiencia en el control es variable y cuestionable (Salas et al., 2020), a nivel comercial se generan diversos productos con *B. Bassiana* de los cuales varían sus resultados en campo, por ello mediante esta investigación se emplearán dos cepas: una cepa colectada en campo y una cepa comercial de *B. bassiana* para evaluar el efecto controlador en *P. xylostella*.

Esta investigación tiene como finalidad comprobar la efectividad de dos cepas: una colectada en campo de Pamplona – Norte de Santander que fue recolectada en los tanques que se especula no ha tenido intervención humana y una cepa comercial aislada del producto SAFER MIX en el Cepario de microbiología de la Universidad de Pamplona, con el propósito de evaluar la mortalidad, la CL₅₀ y el TL₅₀, sobre *Plutella xylostella* (L.), bajo condiciones *in vitro* en repollo. Para presentar un método ecológicamente seguro que permita tener un alto porcentaje de mortalidad de esta plaga que es resistente a muchos productos de síntesis

química que disminuyen la calidad del repollo y no permite garantizar la inocuidad de este producto.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar la mortalidad de *Plutella xylostella* (L.), con una cepa colectada en campo y una comercial de *Beauveria bassiana* (Balsamo), bajo condiciones *in vitro* en Pamplona, Norte de Santander.

6.2 Objetivos específicos

- Caracterizar una cepa colectada en campo de *B. bassiana*, aisladas a partir de larvas de *P. xylostella* o insectos y muestras del suelo.
- Determinar la dosis ideal para la mayor mortalidad causada por una cepa colectada en campo y una cepa comercial de *B. bassiana* sobre *P. xylostella* en condiciones *in vitro*.
- Determinar la CL₅₀ y TL₅₀ de una cepa colectada en campo y una cepa comercial de *B. bassiana*, sobre *P. xylostella* bajo condiciones *in vitro*.

7. Marco teórico

7.1 Antecedentes locales

Mondragón, Triana y Giraldo (2020 b) evaluaron los efectos de extractos acuosos de *Nim Azadirachta indica* A. Juss, para el control de *Plutella xylostella* (L.), en condiciones de laboratorio. El diseño experimental consistió en 7 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, a partir de estas soluciones madre se prepararon las disoluciones al 33% y 66% de hojas y semillas. De igual modo realizaron el proceso de recolección de adultos, sexaje y crianza de las larvas de la plaga problema, cuando las larvas estaban en estado larval II se aplicaron extractos en los discos de las hojas de repollo de 3cm de diámetro, las revisiones se hicieron periódicas cada 6 horas por 4 días, se evaluó el porcentaje de mortalidad y el tiempo correspondiente. Se determinó que el tratamiento 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%, en donde se obtuvieron el 84%, 64% y 36% respectivamente en cuanto a la mortalidad en comparación con el control que fue del 0%. El CL50, en el caso de los tratamientos con extracto de semilla fue de 37.000 mg/L y de los tratamientos con extracto de hoja fue de 57.250 mg/L. Por otro lado, TL50 que es el valor medio del intervalo de tiempo en el cual se esperó que muriera el 50% de la población a las 22 horas, la dosis 66% lo hace a las 36 horas y la dosis 33% mata la mitad de la población a las 57 horas, en el caso de los extractos de hoja, se determinó la dosis 100% mata el 50% de la población a las 39 horas, la dosis 66% lo hace a las 55 horas y la dosis 33% mata la mitad de la población a las 114 horas. Lo anterior indica que la aplicación de una solución de semilla al 100% es más efectiva para el control de la plaga problema en condiciones de laboratorio debido al alto contenido de terpenoides.

Silva y Giraldo (2018 a) su investigación se llevó a cabo en el municipio de Pamplona Norte de Santander, en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB), por otro lado, la colecta de los estados inmaduros de *P. xylostella* y sus enemigos naturales y la parte experimental en el Laboratorio de Entomología del Programa de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Pamplona, como resultados obtuvieron que la

duración promedio de su ciclo de vida de 57,06 días, pasando por huevo con duración de $9,11 \pm 1,242$ días; estado larval fue de $19,54 \pm 2,620$ días, y la duración del estado de pupa fue de $9,93 \pm 1,698$ días en nuestras condiciones climáticas, el promedio de las cápsulas cefálicas fue de: 0,144 mm larva I; 0,253 mm larva II; 0,405mm larva III; 0,599 mm larva IV y la oviposición de las hembras fue 43,66 huevos con una duración de $28 \pm 8,082$ días; número de generaciones en 28 días por hembra fue de 6,667; 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.

Cabrera y Giraldo (2021). El objetivo del bioensayo fue caracterizar fenotípicamente las cepas estudiadas; evaluar la mortalidad, CL_{50} y TL_{50} *in vitro* de tres cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner); una comercial y dos locales. Las tres cepas tuvieron 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*. Diseño al azar con seis tratamientos, cinco repeticiones, repetición con cinco larvas para cada una de las tres cepas. La mortalidad se evaluó cada 12 horas hasta la mortalidad de las larvas o la emergencia de adultos de la polilla. Los datos se analizaron con SPSS, para calcular CL_{50} se usaron Pruebas Probit. Las dos cepas locales aisladas 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 CL_{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 CL_{50} fue de 52 horas y para la cepa de suelos agrícolas fue de 48 horas. La cepa de suelo de bosque se proyecta como una buena alternativa para continuar estudios, ya que demostró ser más letal que la cepa comercial.

7.2 Antecedentes nacionales

En este estudio se evaluó la susceptibilidad de *P. xylostella* a los entomopatógenos *Heterorabditis bacteriofora* HNI0100, *Beauveria bassiana* (Balsamo), Bb9205 y *Metarhizium anisopliae* Ma9236. La metodología se basó en la inoculación de larvas de tercer estadio de *P. xylostella* con 5×10^1 , 1×10^2 , 3×10^2 , 6×10^2 y $1,2 \times 10^3$ IJs/cm² de *H. bacteriofora* HNI0100 y los evaluó a las 24, 48 y 72 h y 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 con/cm² de *B. bassiana* Bb9205 y *anisopliae* Ma9236, que fueron evaluados durante dos semanas. A una dosis de $1,2 \times 10^3$ IJs/cm², *P. xylostella* tenía una susceptibilidad a *H. bacteriofora* HNI0100 del 91,66%. Similarmente *B. bassiana* Bb9205 y *anisopliae* Ma9236 tuvo una mortalidad de 95,33 y 99,67% a 1×10^5 con/cm². Los resultados sugieren que el uso de cepas de nematodos y hongos entomopatógenos es una alternativa innovadora para el control de *P. xylostella*. Sin embargo, los estudios sobre la interacción de nematodos y hongos y *P. xylostella* son necesarios (Correa et al., 2014).

En el presente estudio, se realizó una presión de selección de abamectina durante diez generaciones de *P. xylostella* y se determinaron las concentraciones subletales (CL20) de las líneas resistente y susceptible. Luego, estas concentraciones se aplicaron a larvas de tercer instar y se evaluó el efecto sobre el porcentaje de pupas formadas, peso de pupas, emergencia de adultos, en dos generaciones, así como los tiempos de desarrollo de cada una de las fases desde huevo hasta adulto. La resistencia y la aplicación de concentraciones subletales presenta costos importantes en la biología y desarrollo de *P. xylostella* al aumentar el porcentaje de pupación de una generación a otra, así como un mayor peso de pupas, un mayor número de huevos por hembra/día. Sin embargo, se presenta un efecto transgeneracional al disminuir la oviposición en sus descendientes; en lo que se refiere al tiempo de desarrollo, presentó un efecto nocivo al prolongarlo en más de siete días lo que generaría un mayor número de aplicaciones por ciclo (Rodríguez et al., 2021, p.1).

Se estudió la virulencia de 17 aislamientos nativos y tres productos comerciales de *B. bassiana* sobre *P. xylostella* y se seleccionaron los tres con mayor actividad sobre la mencionada plaga; así como el efecto de los tres productos comerciales sobre larvas de *Copitarsia* sp., *Peridroma* sp., y *Leptophobia aripa* (Boisduval), plagas éstas que también están asociadas a la producción de crucíferas en la región mencionada. La patogenicidad de *B. bassiana* sobre *P. xylostella* se caracterizó mediante las variables: porcentaje de

mortalidad, tiempo letal medio y mortalidad intrínseca. El efecto en el campo se evaluó en parcelas de 30 plantas, en un diseño de bloques aleatorios, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones. Los tratamientos consistieron en dos aislamientos nativos CLS 029 y CLS 003 (que tenían mayor actividad biológica sobre *P. xylostella*), el producto comercial Bauveril y dos testigos. Las concentraciones letales medias para estos tres tratamientos fueron 2.7×10^5 , 2.1×10^6 y 2.4×10^6 c/ml, respectivamente. Los tres tratamientos probados causaron mortalidad a *P. xylostella* en condiciones de campo. Se destaca adicionalmente la infección del aislamiento CLS 029 sobre larvas de *L. aripa* y del aislamiento CLS 003 sobre *Copitarsia* sp. Ninguno de los tratamientos afectó a *Peridroma* sp (Fernández et al., 2003, p.211).

7.3 Antecedentes internacionales

Se evaluaron tres especies diferentes de hongos entomopatógenos *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *I. fumosorosea*. El estudio fue diseñado para investigar la mortalidad, el desarrollo y las respuestas inmunitarias de *P. xylostella* cuando se enfrenta a *M. anisopliae*, un hongo entomopatógeno que existe naturalmente en el suelo. *M. anisopliae* resultó en una alta mortalidad de plagas al matar el 93% de las larvas. El estudio fue diseñado para investigar la mortalidad, el desarrollo y las respuestas inmunitarias de *P. xylostella* cuando se enfrenta a *M. anisopliae*, un hongo entomopatógeno que existe naturalmente en el suelo. *M. anisopliae* resultó en una alta mortalidad de plagas al matar el 93% de las larvas, sin embargo, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo sobre la concentración de hemocitos. La actividad de las enzimas (fenoloxidasas y superóxido dismutasa) y los genes inmunitarios (Defensin, Spaetzle, Cecropin, Lysozyme y Hemolin) variaron en diferentes momentos (24, 48, 72 y 96 h) después de la exposición a *M. anisopliae*. También se detectó una alteración en los ciclos biológicos de *P. xylostella*, se observó una vida adulta significativamente más corta (8.11:6.87, M:F) y una fecundidad reducida (101 huevos/hembra) junto con una alteración en la duración de las larvas y pupas. Los resultados sugieren que *M. anisopliae* puede obstaculizar eficazmente el sistema de defensa y desarrollo de *P. xylostella*, lo que provoca mortalidad y alteraciones demográficas (Zafar et al., 2020).

Se usaron ocho aislamientos de los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *M. anisopliae* autóctonos de Benín fueron examinados para comprobar su virulencia frente a las larvas del insecto. Los aislamientos de *B. bassiana* analizados fueron Bba14, Bba5644, Bba5645, Bba5653, Bba5654 y Bba5655, y los aislamientos de *M. anisopliae* fueron Ma178 y Ma182. El aislado Bba5653 causó una mortalidad del 94 % de las larvas de DBM, y la mortalidad fue significativamente mayor que la causada por cualquiera de los otros aislados. El rendimiento del repollo fue de 44,1 kg de conidios en polvo (PB) por hectárea y 41,9 kg t/ha para parcelas tratadas con formulación en emulsión de Bba5653 a la misma dosis de CP. Cada uno de los rendimientos fue aproximadamente tres veces mayor que el rendimiento en las parcelas tratadas con el insecticida bifentrina o en las parcelas no tratadas. En formulaciones de agua, 1 kg/ha del polvo de conidios de Bba5653 redujo las poblaciones de DBM aproximadamente al mismo ritmo que 0,75 kg y 0,5 kg PB/ha, pero significativamente más que 0,25 kg PB/ha. PC/ha (Godonou et al., 2009, p.220).

La eficacia del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin aislado Bb11, Bb115, Bb116 y Bb362 contra la población de polilla de espalda de diamante (DBM), *Plutella xylostella* (L.) de Cotonou, Benin. En el laboratorio se utilizaron seis concentraciones, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 conidios/ml de cada aislado para evaluar *B. bassiana* virulencia. Se inocularon larvas de DBM de tercer estadio con 2 μ l de las concentraciones de cada aislado mediante el método de aplicación tópica. Las larvas de control se inocularon con solución esterilizada de Tween 80 (0,05%). En comparación con otros aislamientos, Bb11 fue más virulento contra DBM con un valor de LD 50 estimado en $4,96 \times 10^6$ conidios/ml y las tasas más altas de esporulación de cadáver. La eficacia de Bb11 contra DBM en repollo se evaluó posteriormente en la estación y en la granja en Benin y Togo, en dosis bajas de 53 g/ha una o dos veces por semana y una dosis alta de 315 g/ha por semana. En comparación con los tratamientos de control y deltametrina sin aspersión, la dosis de 53 g/ha de Bb11 aplicada dos veces por semana a intervalos de 4 días fue capaz de reducir en la granja la densidad de DBM en un 83% y un 93%, respectivamente. Además, el rendimiento de repollo comercial obtenido en la granja con esta dosis fue significativamente mayor en comparación con los otros tratamientos, con un aumento del 199 % y del 452 % en Danyi y Cotonou sobre el control sin pulverizar, respectivamente. Estos resultados confirman el mejor desempeño de Bb11 sobre otros aislados (Lakpo et al., 2020).

8. Marco contextual

El presente trabajo se realizó en el municipio de Pamplona, departamento de Norte de Santander, situado en las coordenadas de $7^{\circ} 22' 34''$ de latitud Norte y a $72^{\circ}38' 54''$ 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 2.200 metros sobre el nivel del mar en la cabecera municipal. Su temperatura promedio de 14 a 16°C , con una extensión del área urbana de 59.214 km^2 y la extensión del área rural de 1,176 km^2 , la economía del municipio se basa en su gastronomía, agricultura, turismo y educación (Alcaldía de Pamplona, s.f.).

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal ubicado en el campus de la Universidad de Pamplona, a $7^{\circ} 23' 14''$ de latitud Norte y a $72^{\circ}39' 02''$ 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 (Figura1).



Figura 1. Laboratorio de Sanidad Vegetal

Nota: Vista aérea del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad de Pamplona. Tomada de (Google Earth, 2021).

Sumando a esto, las muestras de suelo que se usaron para aislar la cepa colectada en campo de *B. bassiana* fueron obtenidas de áreas sin intervención agrícola, como se muestra en el anexo (15) en donde se puede observar que esta zona no se encuentra disturbada, se localiza lejos de cultivos y desechos de los mismos, la zona está ubicada en el municipio de Pamplona en los Tanques N7°21´ 26.43084 W 72° 39´30.90888. Esta muestra se tomó allí, con la finalidad de obtener una cepa con la mayor probabilidad de que fuese colectada en campo. Para garantizar que es una cepa nativa se hace necesaria la realización de estudios moleculares.

8.1 Bases conceptuales

8.1.1 *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

8.1.1.1 Origen y distribución.

(Lord, 2005), (De Kouassi, 2001) y (Halouane, 2008) citados en (Dannoh et al., 2020) dicen que en el año 1835 el entomólogo BASSI Agostino de Lodi, descubrió que los gusanos de seda de Italia se convertían en legiones de gusanos de seda por la enfermedad de la pebrina, los cadáveres tenían un aspecto característico donde estaban cubiertos por una cepa de polvo blanco, posteriormente, BEAUVÉRIE Jean realizó la descripción de este patógeno como *Botrytis bassiana*. El género *Beauveria* fue formalmente reconocido alrededor del siglo XX cuando Vuillemin (1912) afirmó que *Botrytis bassiana* (Bals.-Criv) era una especie que pertenecía al género *Beauveria*.

Por otro lado, se dice que fue descrita por primera vez por Jean Beauverie en el año 1911, fue llamado *Botrytis bassiana*. Ensayos enzimáticos posteriores, determinaron el género como *Beauveria* sp, y diferenciaron seis especies, a saber: *B. alba*, *B. amorpha* (Von

Höhnel) Samson & Evans, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. velata* Samson & Evans, *B. vermiconia* (Hoog & Rao), y *B. caledonica* (Bissett & Widden) (NLP Tools, 2004; Viaud et al., 1998; Kouassi, 2001) citados en (Echeverría Beirute, 2006).

Zimmermann (2007), dice que *Beauveria bassiana* (Balsamo), es una de las especies más ampliamente distribuidas del género y se distribuye por todo el mundo. Además, se encuentra en áreas templadas como tropicales de todo el mundo y generalmente está presente en insectos infestados, se encuentra de manera natural en el aire es un hongo aerotransportado. También, se estos hongos están presentes de forma natural en el suelo en todo el mundo. Por otro lado, “los hábitats de *B. bassiana* van desde un suelo alpino hasta brezales, turberas, suelos con vegetación tipo sabana, bosques y suelos cultivados, arenales y dunas, suelo desértico y agua corriente. También se mencionaron aislamientos del rizoplaneo de plantas de turba, la rizosfera de trébol, corteza muerta, nidos, plumas y excrementos de aves de vida libre.” (Zimmermann, 2007, p. 555).

8.1.1.2 Empleo.

Beauveria bassiana (Balsamo), es un microorganismo usado para el control biológico, empleado como bioinsecticidas, ha asumido un papel clave en el manejo de numerosas plagas de artrópodos agrícolas, veterinarios y forestales. *Beauveria* se implementa típicamente en una o más aplicaciones de inundación de grandes cantidades de conidios aéreos en formulaciones secas o líquidas (Moura y Jaroskin, 2016). Además, su elevado uso se basa en su gran variabilidad genética, una gama inmensa de hospederos, fácil producción en escala industrial, formulación y aplicación (Rios, 2020).

8.1.1.3 Clasificación.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana* (Balsamo).

Reino	Fungi
División	Amastigomicotina
Subdivisión	Deuteromycete
Clase	Hyphomycete
Orden	Moniliales

Familia	Moniliaceae
Genero	<i>Beauveria</i>
Especie	<i>bassiana</i> (Bals.-Criv.) (Vuil., 1912).

Adaptado de (Kouassi, 2001, p.3) citado en (Noboa y Quelal, 2015).

8.1.1.4 Descripción

De acuerdo a (Castillo et al., 2014)

Es un hongo entomopatógeno que pertenece a la clase Deuteromycetes, de acuerdo a la morfología de la estructura reproductora y comúnmente se encuentra parasitando un alto número de especies de insectos, por lo que es considerado uno de los patógenos más importantes. Los insectos muertos infectados por especies de *Beauveria*, presentan una cubierta blanca muy densa formada por el micelio y esporulación del hongo (p.275).

8.1.1.5 Ciclo de vida de *Beauveria bassiana* (Balsamo).

Es un hongo saprofito que es capaz de crecer en el suelo y en otros materiales en descomposición, no requiere de la patogenicidad de los insectos ni de la interacción con las plantas para lograr completar su ciclo de vida, por otro lado, el ciclo de vida parasitario implica la adhesión y penetración de la cutícula del insecto, que implica que se genere una producción de estructuras de infección especializadas, la secreción de enzimas y metabolitos que ayudan a degradar el exoesqueleto para permitir la penetración de las hifas en crecimiento (Ortíz et al., 2014).

Ortíz y Keyhani (2013) en (Dannoh et al., 2020) las esporas asexuales (conidios) se dispersan por el viento, las salpicaduras de lluvia o incluso por vectores artrópodos que facilitan que el hongo establezca la infección en huéspedes susceptibles, sumando a esto, la infección del huésped por el hongo ocurre en cuatro pasos: adhesión, germinación y diferenciación, penetración y diseminación.

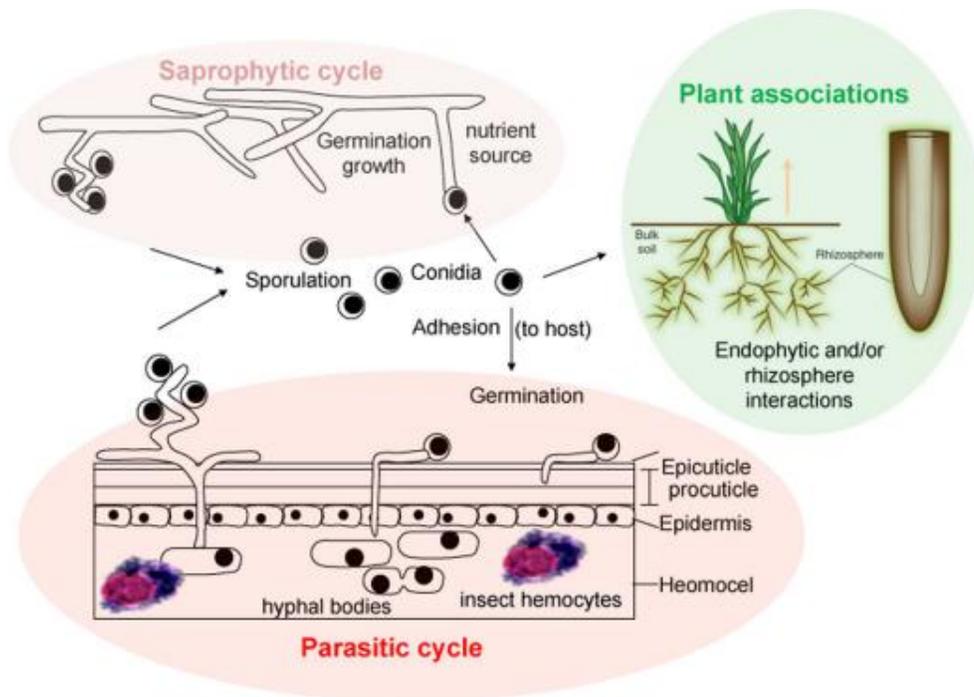


Figura 2. Ciclo de vida de *Beauveria bassiana* (Balsamo).

Fuente: Ortíz et al., (2014)

8.2 *Plutella xylostella* (L.)

8.2.1 Origen y distribución.

Es una plaga originaria de la región mediterránea debido a la diversa fauna de parasitoides de *P. xylostella* presentes en estas regiones de igual modo el número de especies nativas de Brassicaceae y se cree que este insecto es el de mayor distribución universal de todos los Lepidoptera (Huaripata, 2018).

Se especula que se originó en Sudáfrica y luego se dispersó a Europa según Kfir (1998), también Hardy (1938) dice que la base de sus formas complejas y sexuales de los parasitoides y plantas hospederas se encuentran en Sudáfrica y Liu et al., (2000) dice que esta polilla se originó en el este de Asia, sumando a esto es probable que sea de origen Europeo las poblaciones norteamericanas (Hardy, 1983) en (Cabi, s.f.).

De acuerdo a Omaña (2016) se estima que es la especie de Lepidoptera de más amplia distribución, hoy día puede encontrarse en toda América, Europa, Sudeste Asiático, Australia, Nueva Zelanda, India, y África, ha sido reportada en más de 80 países (Mondragón-Sánchez et al., 2020).

8.2.2 Situación actual.

Wang y Wu (2012) dicen que es una plaga particularmente dañina debido a su alta tasa de reproducción y además por su capacidad para desarrollar resistencia a los insecticidas utilizados para su control algunos de ellos son la cipermetrina, abametina, indoxacar, spinosad, chlorantranilipole y *Bacillus thuringiensis* (Rodríguez et al., 2021).

Es una de las plagas de las crucíferas más importantes en el mundo, sus pérdidas directas y costos de control son millonarias, además es una de las plagas más difíciles controlar debido a su resistencia a productos utilizados para su control, sumando a esto, la industria en los últimos años ha trabajado en desarrollar nuevos tipos de insecticidas con modos de acción novedosos pero que se han vuelto cada vez más costosos. Por lo cual los estudios que están llevando a cabo buscan desarrollar estrategias integradas y antirresistencia para un control óptimo (Irac, 2020).

8.2.3 Clasificación.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Plutella xylostella* (L.)

Dominio	Eukaryota
Reino	Metazoa
Filum	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera
Familia	Plutellidae
Subfamilia	Plutellinae
Género	<i>Plutella</i>
Especie	<i>Plutella</i> <i>xylostella</i> (L.)

Nota: Adaptado de (Arias, 2000) y (Cabi, s.f.).

8.2.4 Morfología y biología

8.2.4.1 Huevo

Las hembras pueden depositar 250 a 300 huevos, se caracterizan por ser pequeños en tamaño, aplanados, ovales y de color amarillo, además, se oscurecen después del desarrollo

del embrión; son colocados individualmente o en pequeños grupos en depresiones de la superficie de las hojas ya sea a lo largo de la nervadura central y de las venas de las hojas (King & Saunders, 1984; Common, 1990; Ahmad, 2005 y Capinera, 2008) en (Huaripata, 2018).

8.2.4.2 Larva

Cuando las larvas están recién eclosionadas son de color crema con un punto negro que es la cabeza a medida que aumentan los estadios la coloración de tonar de color verde pálido a verde acua próximo a empupar. Además, esta forma de insecto tarda entre 14-21 días, las larvas de primer y segundo instar minan las capas cerosas epidermales de las hojas y el tercer y cuarto instar se alimenta por el envés consumiendo toda la lámina foliar (Arias, 2000). La longitud de las larvas del último estadio en promedio es de 10 mm; el cuerpo tiene relativamente pocos pelos, cortos en longitud; el cuerpo de la larva es estrecho en ambos extremos, las propatas posteriores forman una “V” distintiva; son bastante activas y si son molestadas se mueven violentamente hacia atrás (King & Saunders, 1984 y Capinera, 2008) citados en (Huaripata, 2018).

8.2.4.3 Pupa

Dura entre 7-14 días, las larvas van a tejer un cochon blanco en donde se transforma, por otro lado, las pupas se encuentran adheridas a la superficie de las hojas son de color verde al inicio que después se tornan de color amarillo amarillento (Arias, 2000). En coliflor y brócoli, la pupación puede ocurrir en los floretes (King & Saunders, 1984; Capinera, 2008 y Sánchez & Vergara, 2014) citados en (Huaripata, 2018).

8.2.4.4 Adulto

El ciclo de vida de huevo adulto tarde entre 25 a 45 días (Arias, 2000).

Según (Alford, 1999 y Capinera, 2008):

Es pequeña, esbelta, marrón grisáceo con antenas pronunciadas; en posición de descanso es posible ver sobre el dorso tres constricciones de coloración amarillo cremoso, mucho más definidas en los machos que en las hembras, este carácter le dio el nombre común a esta especie; por otro lado, pueden ser fácilmente sexados usando estas figuras a modo de diamantes. También las hembras pueden ser identificadas por el mechón de pelos al final del abdomen, en tanto los machos tienen dos clasper definidos (Huaripata, 2018).

8.2.4.5 Ciclo de vida *Plutella xylostella* (L.)

Las condiciones climáticas influyen sobre el desarrollo del ciclo de vida de *P. xylostella* donde la duración de huevo fue de $9,11 \pm 1,242$ días, del estado larval fue de $19,54 \pm 2,620$ días, y la duración del estado de pupa fue de $9,93 \pm 1,698$ días en las condiciones climáticas del experimento (Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas, 2018).

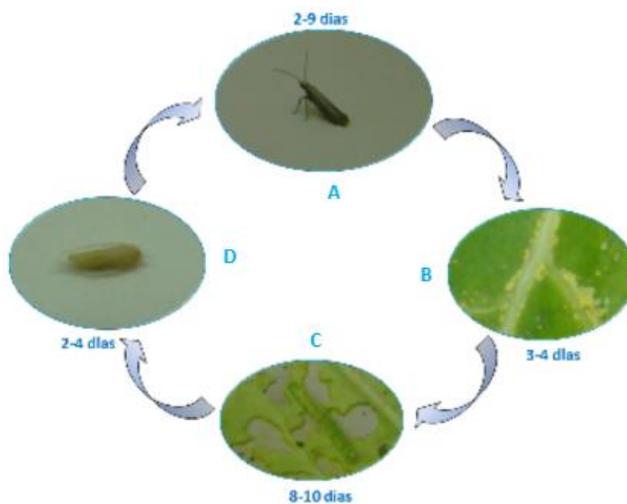


Figura 3. Ciclo biológico de *Plutella xylostella* (L.)

Fuente: Marieli Vacari (2009).

9 Marco legal

9.1 Reglamento estudiantil Universidad de Pamplona.

Acuerdo No. 186

Este anteproyecto está regido bajo la normatividad establecida por la Universidad de Pamplona, según el acuerdo Número 186 del 02 de diciembre 2005, según lo estipulado en el Capítulo VI. Trabajo de grado.

Artículo 35.

Por el cual se establece para los programas un requisito específico para la obtención del título profesional: “TRABAJO DE GRADO”.

PARÁGRAFO PRIMERO

Un trabajo de grado se puede realizar individual o en grupo, dependiendo de las características del mismo, el comité responsable evalúa si se admite o no la ejecución del mismo.

Artículo 36

Por el cual se definen las modalidades de Trabajo de Grado: este proyecto se desarrolla por medio de la modalidad de investigación, la cual está sostenida por diseños y ejecución de proyectos, también dicta que para desarrollar un trabajo de grado mediante esta modalidad, es crucial la entrega de un anteproyecto ante el director del departamento, remitiéndose de acuerdo a cada carrera (Universidad de Pamplona, 2005).

9.2 DECRETO 1376 DE 2013.

El cual reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. En este decreto se toma espécimen de especie silvestre como: organismo silvestre de la diversidad biológica vivo o muerto o sus productos, partes, en adelante. Para su recolección es importante la referencia de información básica inherente a los especímenes como la taxonomía, localidad de colecta, fecha de colecta y colector, entre otras. También se dictan disposiciones acerca de las Instituciones Nacionales de Investigación entre las cuales están las Instituciones de educación superior.

9.2 DECRETO 3016 DE 2013.

Reglamenta el permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de elaboración de estudios ambientales, que tenga la finalidad de elaborar estudios ambientales necesarios para solicitar y/o modificar licencias ambientales o su equivalente, permisos, concesiones o autorizaciones. Así mismo, requisitos de las solicitudes, tramites, obligaciones, vigencia de los permisos, modificación del permiso entre otros.

9.3 RESOLUCIÓN 000200 2015

Otorga el marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial, la Universidad de Pamplona cumple con las condiciones de un permiso Marco de Recolección, además el proyecto tiene como objetivo los inventarios de flora, fauna y microorganismos, propagación, caracterización morfológica, anatómica, fisiológica y genética. De igual modos estudios ecológicos, de comportamiento para fomentar el conocimiento de la diversidad biológica del departamento fortaleciendo la investigación científica en la universidad de Pamplona.

9.4 RESOLUCIÓN No. 00375 (27 de febrero de 2004).

Por la cual se dictan las disposiciones sobre Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia.

El gerente general del ICA de acuerdo a sus disposiciones y conforme con el Decreto 1840/94, le corresponde al ICA otorgar el registro y ejercer el control legal y técnico de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en el país

10 Metodología

10.1 Tipo de Investigación

La presente Investigación se enmarca como cuantitativa descriptiva y experimental, debido a que se obtuvieron resultados a partir de la toma sistemática de datos, para analizarlos estadísticamente y determinar diferencias significativas de los tratamientos y en el componente descriptivo se llevó a cabo la caracterización de la cepa colectada en campo de *B. bassiana*.

10.2 Diseño Metodológico

10.2.1 Hipótesis.

En condiciones naturales es posible encontrar hongos entomopatógenos, los cuales pueden ser identificados y evaluados a nivel de laboratorio como posibles agentes de control biológico de *P. xylostella*.

10.2.1.1 Hipótesis Nula.

Hay al menos un Tratamiento con un efecto diferente a los demás.

10.2.1.2 Hipótesis Alternativa.

Todos los Tratamientos tienen un efecto igual.

10.3 Sistema de Variables

10.3.1 Variables Cuantitativas Continuas

10.3.1.1 Variables dependientes.

- a. Porcentajes de Mortalidad.
- b. Concentración Letal Media (CL₅₀).
- c. Tiempo Letal Medio (TL₅₀).

10.3.1.2 Variables independientes

- a. Concentraciones de las dos cepas de *B. bassiana*.

10.3.1.3 Variables Cualitativas

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

11. Diseño de la investigación.

11.1 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 la muestra de suelo obtenidas de un área sin intervención agrícola; mientras que, la cría masiva de *P. xylostella* y la pruebas *in vitro* se realizaron 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 hizo, bajo condiciones *in vitro*.

11.2 Diseño Experimental

El Diseño Experimental es un modelo estadístico completamente al azar, cada cepa conto con siete tratamientos (concentraciones) y cada tratamiento con 5 repeticiones y cada repetición con cinco larvas. Cada Unidad Experimental está constituida por una larva; de tal manera fueron 175 unidades experimentales en cada cepa, para un total de 350 larvas de segundo instar (L₂). El desarrollo 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 colocó un pedazo de tela tul, con la cual se consiguió condiciones similares con el 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 fueron sumergidos en las diferentes concentraciones de las 2 cepas, por un espacio de 5 segundos antes de introducirlos a la caja de cada disco con sus respectivas L₂ de *P. xylostella*.

Cada una de las cepas de *B. bassiana* tiene seis tratamientos (concentraciones) y un Testigo Absoluto, las cuales son:

1. 1×10^4 UFC/mL
2. 1×10^5 UFC/mL
3. 1×10^6 UFC/mL

4. 1×10^7 UFC/mL
5. 1×10^8 UFC/mL
6. 1×10^9 UFC/mL
7. Testigo absoluto

La selección de estas dosis está fundamentada sobre la concentración de la cepa comercial SAFER MIX, la cual es 1×10^8 UFC/g para *B. bassiana*. esto con la finalidad de uniformizar las concentraciones de la cepa colectada en campo con la cepa comercial.

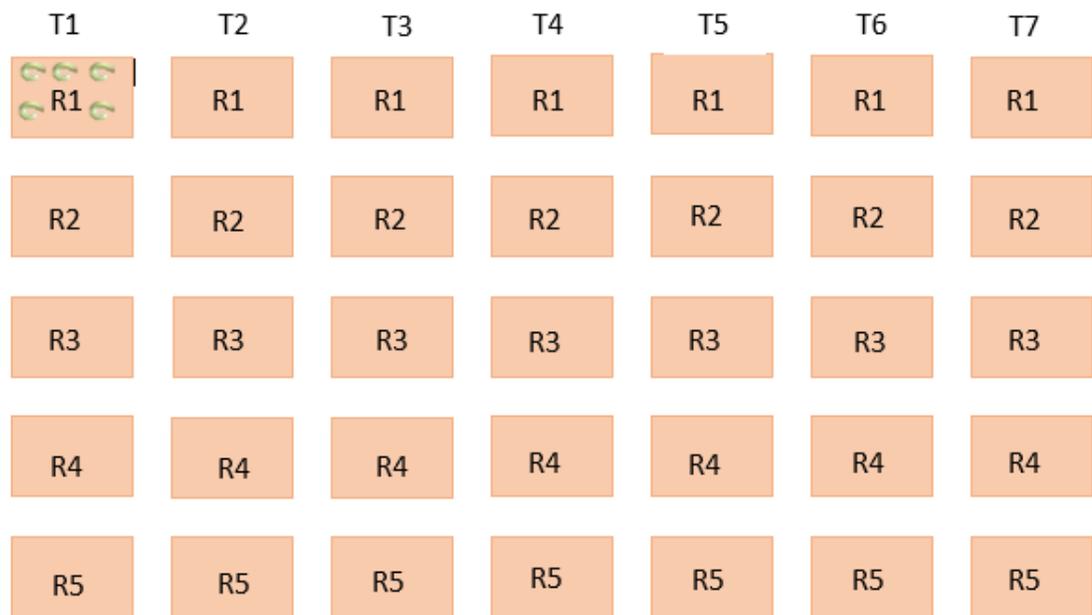


Figura 4. Representación gráfica del diseño de experimental
Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

11.3 Colecta y Cría masiva de *Plutella xylostella* (L.).

Al iniciar la cría de *P. xylostella*, se colectaron larvas, pupas y adultos en el cultivo de repollo morado *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* y en brócoli *Brassica oleracea* var. *Itálica*, cultivadas en el Colegio Escuela Normal Superior de Pamplona en horarios diurnos, recolectando en forma directa larvas y pupas que se localizaban en el envés de las hojas de repollo, se utilizó una lupa entomológica de 30X de aumento para una 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 colocándoles como tapa, una malla o toldillo para su oxigenación, se adicionaron hojas frescas de repollo como alimento que previamente fueron sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% y luego lavados en agua destilada. La recolección de los adultos se realizó mediante jameos en los cultivos como se puede observar en el anexo (12), depositando en bolsas transparentes individuales, luego fueron llevados al laboratorio donde se inició con su cría masiva, este procedimiento fue seguido gracias a sugerencia de los trabajos de Silva-Lizarazo y Giraldo-Vanegas, (2018 a) y Mondragón-Sánchez et al., (2020 b).

11.4 Técnica de Cría de *Plutella xylostella* (L.).

Las larvas y adultos obtenidas 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, logrando una generación de adultos de *P. xylostella*, los cuales se sexaron y se colocaron por parejas en frascos de vidrio, 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, en donde los adultos realizaron las oviposturas, se colocó a los frascos una tela tul asegurada con una banda de goma lo que evitó la condensación de agua dentro del frasco. Se realizaron observaciones cada 12 horas, con la ayuda de un estereoscopio (ocular de 40x) para el seguimiento a su desarrollo biológico (Mondragón-Sánchez et al., 2020 b). Los adultos fueron alimentados con agua azucarada, colocando con un pincel gotas de esta sobre la tela tul que cubría los envases (Figura 14).

Los huevos se obtuvieron cada tres días de las hojas de repollo de los recipientes de los adultos, esto con la finalidad de que, al nacer, fuesen larvas homogéneas y se colocaron en recipientes de vidrio con una tela tul asegurada con una banda de goma para lograr conseguir condiciones similares con el exterior, además, los huevos no se individualizaron debido a que tienen una forma ovalada y aplanada, lo cual los hace muy delicados a la hora de manipular. El pie de cría a nivel de laboratorio se mantuvo hasta que se logró una producción de huevos de la misma edad, de los cuales nacieron las larvas necesarias para los tratamientos con una edad homogénea.

12. Descripción de las Actividades

12.1 Caracterización de una cepa de *Beauveria bassiana*, aisladas del suelo.

En la Escuela Normal Superior de Pamplona se observó si había larvas enfermas de *P. xylostella*, o algún otro insecto que presentara síntomas de algún entomopatógeno, pero no fue posible. Entonces se procedió a la toma de muestras de suelo que se usaron para aislar una cepa colectada en campo de *B. bassiana* del suelo sin intervención agrícola tomada en campo del municipio de Pamplona, ubicada en los Tanques N7°21' 26.43084 W 72° 39'30.90888, donde se realizó una limpieza superficial del suelo de 3cm y la toma de las muestras a una profundidad de 15 cm, en total en cada espacio se tomaron 8 submuestras en puntos diferentes (zig – zag), éstas se depositaron en un balde estéril, se mezclaron, seguidamente se tomó 1 kg, se pasó a una bolsa ziploc, se rotuló y fueron transportadas al Cepario.

12.2 Aislamiento de las cepas de *Beauveria bassiana* (Balsamo).

Para lograr el aislamiento se realizaron dos procedimientos, de los cuales, el primero no resultó efectivo para la obtención de la cepa colectada en campo, el segundo procedimiento fue el que nos permitió obtenerla.

Primer procedimiento: se realizó un aislamiento general de las muestras de suelo que se recolectaron; de cada muestra se pesaron 11 g y se colocaron en un Erlenmeyer con solución salina, se mezcló con agitación vigorosa durante 1 minuto, se pasaron a tubos de ensayo; el tubo de ensayo contaba con 2 ml de solución salina, al primer tubo se le agregó 1 mL de la mezcla del Erlenmeyer, de éste se sacó 1mL y se pasó al siguiente y así sucesivamente hasta que se completaron 4 tubos de diferentes concentraciones (este procedimiento se realizó para cada muestra de suelo). Después se tomaron pequeñas muestras con micropipeta y se pasaron a Medio OGY (dos cajas por muestra) y medio SPC (dos cajas por muestra) y se llevaron a incubar. De este procedimiento creció mucho micelio, así que se procedió a colocar larvas de *P. xylostella*. con estadio de crecimiento 3 para que se redujera

la cantidad de hongos que se encontraran en las cajas, estas larvas murieron y fueron sembradas en el centro de la caja de Petri, se llevaron a incubar y crecieron varios mucorales.

Segundo procedimiento: resultó eficiente y del cual se pudo aislar la cepa de *B. bassiana*, se tomaron las muestras de suelo y se colocó una porción de cada una de las muestras en cajas individualizadas de 5 cm, debidamente rotuladas, seguidamente se les colocaron distintos insectos, a los que se les realizó un seguimiento, observando cada 12 horas, los insectos usados, se logró el aislamiento de un adulto de *P. xylostella* (Anexo 13) que estaba en la caja de la muestra recolectada en los Tanques, este adulto fue sembrado en el centro de una caja Petri y se llevó a incubar, de allí surgieron varios hongos, de los cuales se aisló el de nuestro interés de estudio *B. bassiana*. por consiguiente, la cepa colectada en campo obtenidas de muestras de suelo se aisló e identificarán con base a las estructuras reproductivas, según Humber (1997) y Samson (1981) y el uso de claves dicotómicas.

En el caso de la cepa comercia esta fue obtenida del producto SAFER MIX que ya había sido aislada por el Cepario de microbiología, al igual que los demás hongos presentes en el producto.

12.3 Caracterización morfológica y fisiológica.

Los hongos que se desarrollaron sobre la superficie del adulto de *P. xylostella* mostraron características compatibles con el género *Beauveria*, se aislaron e identificaron a nivel de genero con base a las estructuras reproductivas, según Humber (1997) y Samson (1981). Los aislamientos se conservaron en el Cepario. En la caracterización fisiológica se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

12.4 Crecimiento micelial.

A partir de cultivos in vitro de *B. bassiana* de 8 días de edad, un fragmento de 5 x 5 mm del borde de las colonias fue transferido al centro de una caja Petri de 90 mm de diámetro, con el medio SDA + E.L (López y Carbonell 1999). Las placas se incubaron en oscuridad a 25, 30, y 35 ± 1 °C. El crecimiento micelial (CM) se evaluó de acuerdo con Dimbi et al. (2004), registrándolo cada 2 días hasta el día que un aislamiento cubrió en su totalidad la caja, y las medidas del último día se consideraron para el análisis estadístico. Cinco repeticiones por aislamiento y temperatura se utilizaron. El efecto de la temperatura sobre el CM se evaluó mediante el porcentaje de inhibición e incremento del crecimiento radial al

pasar de 25 a 30 °C, el cual se obtuvo con la fórmula: % inhibición/incremento = (crecimiento a 30 °C x 100/ crecimiento a 25 °C)-100 (Torres-de la Cruz et al., 2013).

12.5 Producción de conidios en medio SDA.

De acuerdo a Britania (s.f) nos dice que el medio SDA es un “Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos. Contiene, la peptona, la tripteína y la glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos y el alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras” (p.1).

A partir de colonias de 15 días de edad, un fragmento de 5 x 5 mm del borde de la colonia se colocó en cajas con medio SDA + E.L. Las cajas con el inóculo se incubaron a 25, 30 y 35 °C ± 1 °C, en oscuridad, durante 30 días. Posteriormente, los conidios se cosecharon de la superficie del cultivo, inundando la caja con agua destilada estéril + tween 80 (0.1%), y raspando la superficie con una espátula de acero inoxidable. Mediante un agitador magnético (Thermolyne®, Artur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, EUA), la suspensión de conidios se homogenizó durante 10 min. La suspensión se filtró con gasa clínica para separar el micelio y posteriormente, con una cámara de Neubauer, se estimó el total de conidios producidos. El número de conidios ml-1 se estimó mediante la fórmula propuesta por Lipa y Slizynski (1973): $C = (Cc) (4 \times 10^6) (Fd/80)$, donde: C = Número de conidios ml-1; Cc = Número promedio de conidios contados en la cámara de Neubauer y, Fd = Factor de dilución. Se establecieron cinco repeticiones por aislamiento y temperatura. El efecto de la temperatura sobre la producción de conidios (PdC) en medio SDA se evaluó mediante el porcentaje de inhibición e incremento de la producción de conidios al pasar de 25 a 30 °C, y de 25 a 35 °C, los cuales se obtuvieron con las fórmulas: % Inhibición/incremento = (crecimiento a 30 °C x 100/ crecimiento a 25 °C)-100, y % Inhibición/incremento = (crecimiento a 35 °C x 100/ crecimiento a 25 °C)-100 (Torres-de la Cruz et al., 2013).

12.5 Producción de conidios en arroz.

Para evaluar la capacidad de los aislamientos de *B. bassiana* para producir conidios en arroz, se utilizaron bolsas con 50 g de arroz, contenidos en bolsas de polipapel, se humedecieron con 12 ml de agua destilada y se esterilizaron durante 20 min a 121 °C (Porrás y Leucona, 2008). Posteriormente, las bolsas con arroz se inocularon con 5 ml de una

suspensión de 1×10^6 conidios ml⁻¹, y se incubaron durante 15 d a 25 ± 1 °C, y fotoperiodo 12:12. Se establecieron cinco repeticiones por aislamientos. Transcurrido los 15 d, los 50 g de arroz se suspendieron en 150 ml de agua destilada estéril + tween 80 (0,1%). La suspensión fue agitada durante 10 min y posteriormente filtrada con gasa clínica para separar los conidios del arroz y micelio. El conteo de conidios se realizó en cámara de Neubauer, y la PdC g⁻¹ se estimó mediante la fórmula de Lipa y Slizynski (1973) descrita en producción de conidios en medio SDA.

13. Determinación de la concentración de las cepas de *B. bassiana*.

Para determinar la concentración se usó una cámara de Neubauer (American Optical Co.) de 0.1 mm de profundidad, por medio de estas cámaras de recuento se puede llegar a determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido, partículas como leucocitos, bacterias, esporas, entre otros (Brand, 2022). Se cuentan visualmente con un microscopio, en este caso se usó para apreciar la concentración de conidias.

En primer lugar, se hizo un raspado de la cepa de *B. bassiana*. de la caja y se diluyeron en solución salina (1 mL), se mezcló bien hasta obtener una solución homogénea, luego se tomó una gota de esta solución con una micropipeta y se colocó cuidadosamente en la cámara de Neubauer, ayudándonos de la capilaridad que se generaba entre la cámara y cubreobjetos. Esta cámara presenta unos campos de conteo, representados en cuadrantes, así que se procedió a contar conidias por cuadrante (3 cuadrantes para cada cepa) (Tabla 13), cada uno de estos cuadrantes presenta 16 cuadros pequeños, así que se contaron las conidias presentes en cada cuadro y al final se sumaron el total de las células presentes en cada cuadrante (Gilchrist et al, 2005). Luego, teniendo en cuenta que cada uno de estos cuadros grandes y pequeños tienen dimensiones determinadas como constantes, se procedió a conocer el número de conidias por mL gracias a la fórmula propuesta por Lipa y Slizynski (1973).

14. Determinación la mortalidad de *P. xylostella*, causada por una cepa colectada en campo y una cepa comercial de *B. bassiana* bajo condiciones *in vitro*.

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. La mortalidad de las larvas se comprobó con la observación directa a través de una lupa estereoscópica y con la ayuda de un pelo de pincel, cada una fue removida para comprobar si respondían a estímulos, según la respuesta dada, se apartaban aquellas que no se movían y se le hizo un seguimiento para estar seguros de su muerte. La sintomatología presentada por las larvas afectadas fue: la apariencia inicial de color café claro y acortamiento del cuerpo, hasta aparentar sequedad intensa, así como coloraciones rojizas y presencia de micelio blanco, fueron los signos indicadores sobre la muerte de las larvas. La mortalidad se evaluó cada doce horas, hasta la muerte total de estas o hasta la continuación de los estadios larvarios de *P. xylostella* al comprobarse la mortalidad de una larva, se anotó en el instrumento diseñado (Anexo 1), junto con el tratamiento, la repetición, el número del individuo y hora en la que se observó su muerte.

15. Cálculo de la CL₅₀ y el TL₅₀ de una cepa colectada en campo y una cepa comercial de *B. bassiana* en *P. xylostella*, bajo condiciones *in vitro*.

Para determinar la CL₅₀ y el TL₅₀, las mortalidades se tomaron hasta las 96 horas de exposición de las larvas, sin cambiar los discos tratados (primeros 4 días), 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 y los valores de CL₅₀ y TL₅₀ se determinaron con un Análisis 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 dos cepas, que es la base para la determinación de la CL₅₀. 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 (TL₅₀) para cada cepa y dosis evaluada.

16. Resultados

Primer objetivo:

16.2 Caracterizar una cepa colectada en campo de *Beauveria bassiana* (Balsamo), aisladas a partir de larvas de *P. xylostella* o insectos y muestras del suelo.

16.2.1 Identificación de aislamientos.

Se realizó una caracterización macroscópica y microscópica de la cepa colectada en campo de Pamplona de *Beauveria* spp; fue evidente que los conidios observados presentaron una forma lisa, así mismo, redondeada a ovoides e incoloros donde coincidimos con Samson (1981) y Humber (1997), además, el aislamiento mostro que los conidióforos eran sencillos, hinchados en la base, se agrupaban irregularmente y adelgazaban hacia el raquis, coincidiendo con Bustillos (2001) con lo descrito para el género *Beauveria*. De igual, modo median aproximadamente $3,95-7,29 \times 1,38-2,83 \mu\text{m}$, y el raquis de $4,82- 9,29 \times 1 \mu\text{m}$. es más, el tamaño del aislamiento oscilo en $2,20-2,95 \times 1,96-2,39 \mu\text{m}$, medidas que concuerdan con Humber (1997). Por otro lado, la cepa tenía conidios esféricos y menores de $3 \mu\text{m}$ de diámetro pueden ser consideradas como *B. bassiana*. de acuerdo a Glare y Inwood (1998) quienes compararon diversas cepas de especies de *Beauveria* spp, de diferentes países.

En la caracterización macroscópica como se puede observar en la figura (6) ambas cepas presentaron colonias con micelios de aspecto algodonoso con una coloración blanca, al igual que las esporas con superficie semielepada, y formación de sinemas. Después de unos días empezaron a pasar de características algodonosas a polvorientas, además el anverso, se observó un color de un amarillo claro en su totalidad en la cepa comercial que en comparación con la colectada en campo solo el centro de las colonias presentó un amarillo oscuro que se hacía tenue. Por último, la cepa colectada en campo figura (6) C-D se presenta de una manera más separada que la A-B que se encuentra más agrupada. Cañedo y Ames (2004) en bonilla (2012) afirman que las colonias en un medio de PDA a los 14 días presentan características algodonosas y blancas, también se tornan a color y consistencias amarillentas y cremosas. Si se colocan las cajas, al contrario, se pueden observar tonalidades rojizas al centro y amarillento alrededor.



Figura 5. Conidióforos sencillos, agrupados irregularmente, hinchados en la base y adelgazándose hacia el raquis con su conidio a 10x, y 100x.

Fuente: Cepario de microbiología, Universidad de Pamplona (2022).

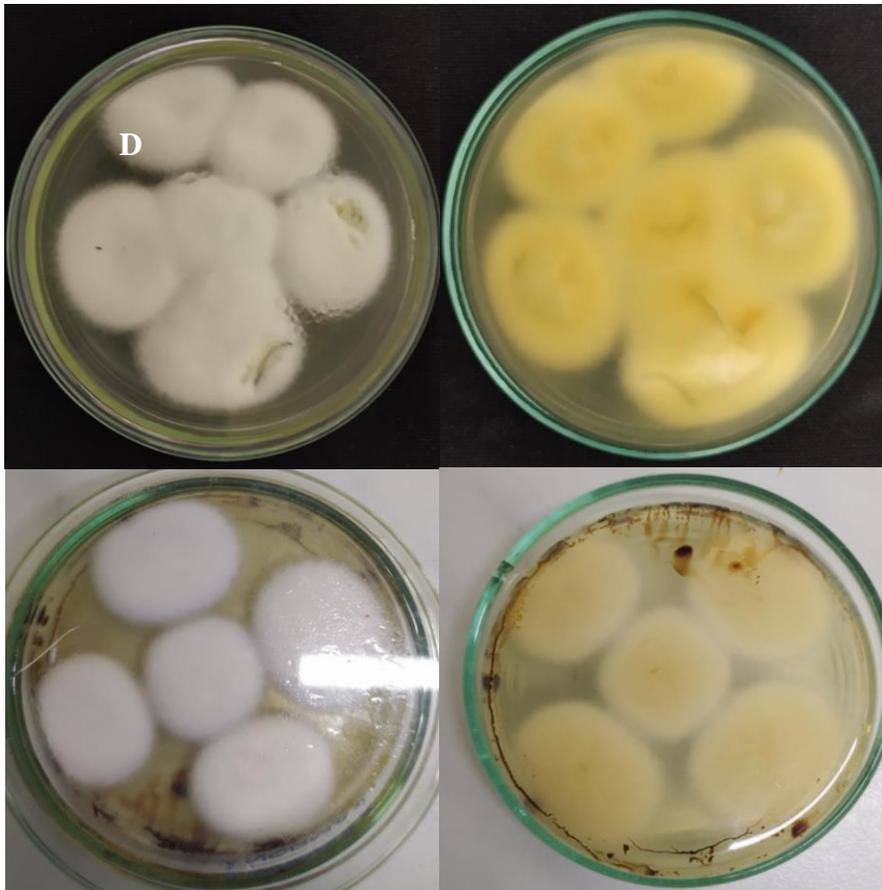


Figura 6. Macroscópica de *B. bassiana* : **A-B** cepa comercial de *B. bassiana* de SAFER MIX y **C-D** cepa colectada en campo de *B. bassiana*.

Fuente: Piázan, Sandoval y Becerra (2022).

16.2.2 Caracterización fisiológica

Efecto de la temperatura sobre el crecimiento micelial. A 25 °C se registraron diferencias (Tabla 3).

Tabla 3. Desarrollo micelial e inhibición o incremento de cepas poliespóricas de *Beauveria* spp.

Desarrollo micelial (cm)			
	Mediaz ± Dst	Media ± Dst	Media ± Dst
Cepa	25°C	30°C	35°C
Bb1	3,41 ± 0,02	3,35 ± 0,03	0 ± 0
Bb2	3,09 ± 0,05	3,34 ± 0,03	0 ± 0

Nota: Bb1 cepa comercial y Bb2 cepa colectada en campo.

Fuente: Cajiao, Pirazán y Sandoval (2022).

Tabla 4.

	Media RVz	Media RV	Media RV
Cepa	25 °C	30 °C	35 °C
Bb1	16,7 (15,3-18,1)	13,8 (14,9-14,1)	18,0 (16,0-23,9)
Bb2	16,9 (16,1-17,7)	14,8 (13,9-16,1)	23,0 (19,0-34,5)

Nota: Bb1 cepa comercial y Bb2 cepa colectada en campo.

Fuente: Cajiao, Pirazán y Sandoval (2022).

Tabla 5. Producción de conidios de *Beauveria* sp cultivados en arroz y medio ADS + EL.

	Arroz	ADS + EL . 25 °C	ADS + EL. 30 °C
cepa	Mediay ± Dst	Media ± Dst	Media ± Dst
Bb1	411,70 ± 21,40	3,95 ± 0,8	1,58 ± 0,2
Bb2	427,00 ± 28,39	3,76 ± 0,4	2,68 ± 0,7

ADS + EL = agar-dextrosa de Sabouraud + 0.1% de extracto de levadura. z
A 35°C y en medio ADS + EL leve o poca producción de conidios.

Nota: Bb1 cepa comercial y Bb2 cepa colectada en campo.

Fuente: Cajiao, Pirazán y Sandoval (2022).

Segundo objetivo

17. Mortalidad de *P. xylostella* causada por una cepa colectada en campo y una cepa comercial de *B. bassiana* en condiciones *in vitro*.

La mortalidad de larvas de *P. xylostella* causadas por las diferentes concentraciones de la cepa comercial de *B. bassiana* es presentada en la Tabla 6; en donde se puede apreciar que realizado el Anova simple y la Comparación de Medias con la Prueba de Tukey ($p \leq 0,05$) (Anexos 2, 3 y 4), se detectaron diferencias significativas, generándose dos grupos; así. El primer grupo conformado por el testigo con 4,00% de mortalidad y un segundo grupo constituido por las concentraciones 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 , las cuales causaron el 100% de mortalidad de las larvas de segundo instar de *P. xylostella*. Los resultados obtenidos pueden indicar que la población de *P. xylostella*, colectada en el huerto de hortalizas del Colegio Normal Superior de Pamplona es muy susceptible a bajas concentraciones por debajo de la concentración recomendada de la cepa comercial probada de *B. bassiana*.

Tabla 6. Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *P. xylostella*, en las diferentes concentraciones de la cepa comercial de *B. bassiana*, bajo condiciones *in vitro*.

Concentración (UFC/mL)	N	Mortalidad (%)
1000000000	5	100 a
100000000	5	100 a
10000000	5	100 a

1000000	5	100 a
100000	5	100 a
10000	5	100 a
0	5	4 b

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

Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

En la Tabla 7, se presentan las diferencias significativas ($p \leq 0,05$), entre los porcentajes de mortalidad causados a larvas de segundo instar larval de *P. xylostella*, por las diferentes concentraciones, detectándose igualmente dos grupos con diferencias significativas; un primer grupo constituido por las concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 , las cuales causaron el 100% de mortalidad y las concentraciones 10^4 , 10^5 causaron el 92% de mortalidad de las larvas de segundo instar de *P. xylostella* y el segundo grupo con el Testigo absoluto que presentó una mortalidad del 4%. Por los resultados obtenidos en el bioensayo con la cepa colectada en campo aislada de suelos no disturbados colectados en el parque Los Tanques, del municipio de Pamplona, se puede especular que la población de *P. xylostella* es igualmente, altamente susceptible a concentraciones bajas probadas.

Tabla 7. Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *P. xylostella*, en las diferentes concentraciones de la cepa colectada en campo de *B. bassiana*, bajo condiciones *in vitro*.

Concentración (UFC/mL)	N	Mortalidad (%)
1000000000	5	100 a
100000000	5	100 a
10000000	5	100 a
1000000	5	100 a
100000	5	92 a
10000	5	92 a
0	5	4 b

Nota, medias con la misma letra no son significativamente

diferentes ($p \leq 0,05$).
 Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

Tercer objetivo

18. Determinar la CL₅₀ y TL₅₀ de dos cepas, una colectada en campo y una cepa comercial de *B. bassiana*, sobre *P. xylostella* bajo condiciones *in vitro*.

18.1 Concentración Letal Media (CL₅₀)

La prueba fue creada por JW Trevan en 1927, es la cantidad mínima de un material determinado que se requiere para causar la muerte. Generalmente se expresa en términos de la concentración letal mediana (CL₅₀), la cantidad requerida para causar la muerte (dentro de un marco de tiempo específico) en el 50 % de la población, siendo una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo. Cabe resaltar que mide la concentración letal, pero no otros efectos secundarios graves, pero no letales (Dictionary, s.f.).

En la Tabla 8, se presentan los datos de mortalidad transformados a Probit y las concentraciones transformadas a log₁₀, para la cepa comercial de *B. bassiana*.

Tabla 8. Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log₁₀, para la cepa comercial de *B. bassiana*.

Concentración (UFC/mL)	Concentración (log ₁₀)	Mortalidad (%)	Mortalidad (Probit)
1000000000	9	100	8,09
100000000	8	100	8,09
10000000	7	100	8,09
1000000	6	100	8,09
100000	5	100	8,09
10000	4	100	8,09

Nota: Concentraciones (UFC/mL) transformadas a log₁₀;

Mortalidad (%) transformadas a Probit.
Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

Los datos de mortalidad transformados a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa colectada en campo de *B. bassiana* se observan en la Tabla (9).

Tabla 9. Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa **colectada en campo** de *B. bassiana*.

Concentración (UFC/mL)	Concentración (log10)	Mortalidad (%)	Mortalidad (Probit)
1000000000	9	100	8,09
100000000	8	100	8,09
10000000	7	100	8,09
1000000	6	100	8,09
100000	5	92	6,41
10000	4	92	6,41

Nota: Concentraciones (UFC/mL) transformadas a log10;
Mortalidad (%) transformadas a Probit.
Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

18.2 Determinación de la CL₅₀

Una vez realizadas las Pruebas Probit con los datos transformados, se encontró las Ecuaciones de Regresión, los Coeficientes de Determinación (R^2) y las Concentraciones Letales Medias (CL₅₀), para cada una de las cepas, la cepa colectada en campo y la cepa comercial (Anexos 1,2 y 3). Los resultados obtenidos en las pruebas para encontrar la CL₅₀, arrojaron que la CL₅₀ para la cepa comercial es de 34.659 UFC/mL, para matar el 50% de la población de la prueba; la CL₅₀ para la cepa colectada en campo fue de 118.342 UFC/mL. Estos resultados indican que la cepa comercial de *B. bassiana* es más letal para las larvas de *P. xylostella*, ya que a menor CL₅₀, mayor toxicidad en la población probada. De la misma manera, la regresión resultante de la relación concentraciones y porcentajes de mortalidad causados por la cepa comercial de *B. bassiana* arrojaron una Ecuación de Regresión $y=1,38x+2,17$ y un Coeficiente de Determinación (R^2) igual a 1,0; indicando un ajuste perfecto

del modelo, con un 100% de aceptación; mientras que la regresión resultante de la relación concentraciones y porcentajes de mortalidad causados por la cepa colectada en campo de *B. bassiana* arrojó una Ecuación de Regresión $y=0,38x+5,03$ y un Coeficiente de Determinación (R^2) de 0,69; indicando que el modelo, posee un 69% de aceptación (Tabla x).

Tabla 10. Concentraciones letales (CL_{50}) de las dos cepas de *B. bassiana*, para larvas de segundo instar de *P. xylostella*, en condiciones de laboratorio.

Cepa	Ecuación	R^2	CL_{50}
<i>B. bassiana</i>	Regresión		(UFC/mL)
Comercial	$y= 1,38x+2,17$	1,00	34.659
colectada en campo	$y=0,38x+5,03$	0,69	118.342

Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

18.3 Determinación del TL_{50}

De acuerdo a (IUPAC, 1997):

Intervalo de tiempo promedio derivado estadísticamente durante el cual se espera que el 50% de una población dada muera después de la administración aguda de un agente químico o físico (radiación) a una concentración dada bajo un conjunto definido de condiciones.

Sumando a esto, 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 siete concentraciones en cada una de las dos cepas evaluadas, igualmente mediante análisis de regresión entre la relación mortalidad acumulada y tiempo de muerte.

En la Tabla 11, se presentan las Ecuaciones de Regresión, el Coeficiente de Determinación (R^2) y los TL_{50} de todas las concentraciones probadas de la cepa comercial de *B. bassiana*. Se determinó que la concentración de 10^9 UFC/mL mata al 50% de la población a las 35 horas con un coeficiente de determinación ($R^2=0,71$); mientras que la concentración 10^4 causa la muerte al 50% de la población del bioensayo a las 111 horas.

Tabla 11. Tiempo Letal Medio (TL₅₀), en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a seis concentraciones de la cepa comercial de *B. bassiana*, en condiciones *in vitro*.

Concentración (UFC/mL)	Ecuación Regresión	R²	TL₅₀ (Hora)
10 ⁹	y=1,15x+10,14	0,71	35
10 ⁸	y=1,13x+5,43	0,81	39
10 ⁷	y=0,91x+5,43	0,61	50
10 ⁶	y=0,74x+13,30	0,66	50
10 ⁵	y=0,89x+(-14)	0,73	72
10 ⁴	y=0,48x+(-3,14)	0,57	111

Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

El TL₅₀ para las seis concentraciones de la cepa colectada en campo de *B. bassiana* se pueden observar en la Tabla 12. Se determinó que la concentración de 10⁹ UFC/mL mata al 50% de la población a las 53 horas con un coeficiente de determinación (R²=0,73); mientras que la concentración 10⁴ causa la muerte al 50% de la población del bioensayo a las 73 horas. De la misma manera se presentan las Ecuaciones de Regresión, el Coeficiente de Determinación (R²) y los TL₅₀ de todas las concentraciones probadas Tabla (12).

Tabla 12. Tiempo Letal Medio (TL₅₀), en larvas de segundo instar de *P. xylostella*, sometidas a seis concentraciones de la cepa colectada en campo de *B. bassiana*, en condiciones *in vitro*.

Concentración (UFC/mL)	Ecuación Regresión	R²	TL₅₀ (Hora)
10 ⁹	y=0,76x+9,86	0,73	53
10 ⁸	y=0,83x+6,71	0,69	53
10 ⁷	y=0,57x+9,43	0,39	71
10 ⁶	y=0,63x+3,57	0,54	74
10 ⁵	y=0,73x+1,57	0,67	67
10 ⁴	y=0,60x+6,14	0,50	73

Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

Los Análisis de Regresión determinaron que la concentración de 10^9 UFC/mL de la cepa comercial de *B. bassiana*, mata al 50% de la población a las 35 horas; mientras que esa misma concentración de la cepa colectada en campo logra causar la muerte al 50% de la población de las larvas de segundo instar larval de *P. xylostella* del bioensayo a las 73 horas.

En las Figuras (7-8); se presentan las Regresiones de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte causados por la cepa comercial y colectada en campo de *B. bassiana*, para larvas de segundo instar de *P. xylostella*, en condiciones de laboratorio.

De esta manera, las dosis de 10^9 UFC/mL de la cepa comercial arrojó una Ecuación de Regresión $y=1,15x+10,14$ y un Coeficiente de Determinación (R^2) de 0,71; mientras que la cepa colectada en campo con una Ecuación de Regresión $y=0,76x+9,86$ y un Coeficiente de Determinación (R^2) de 0,73.

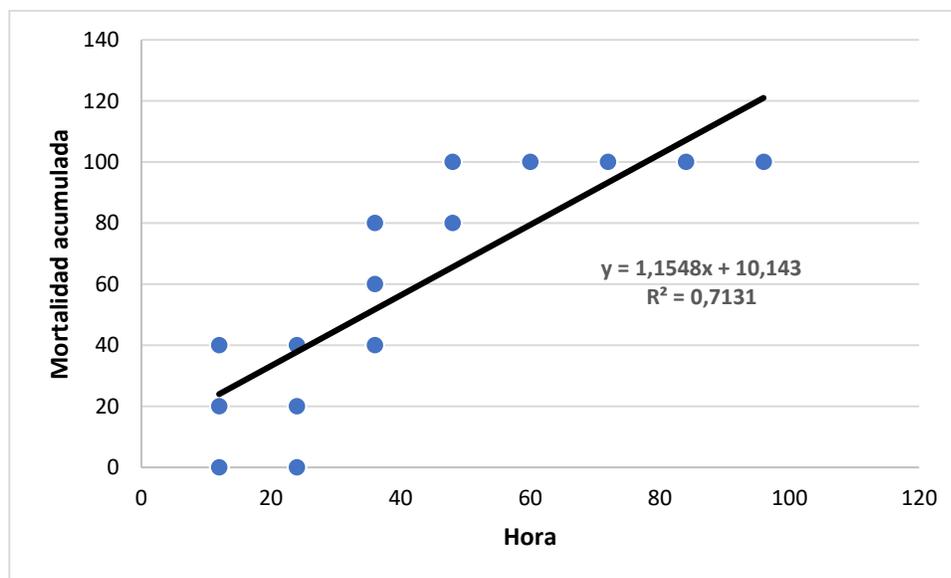


Figura 7. Regresión de la interacción mortalidad acumulada-hora muerte para larvas de segundo instar *P. xylostella* sometidas a la concentración 10^9 de la cepa comercial de *B. bassiana*, bajo condiciones *in vitro*.

Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

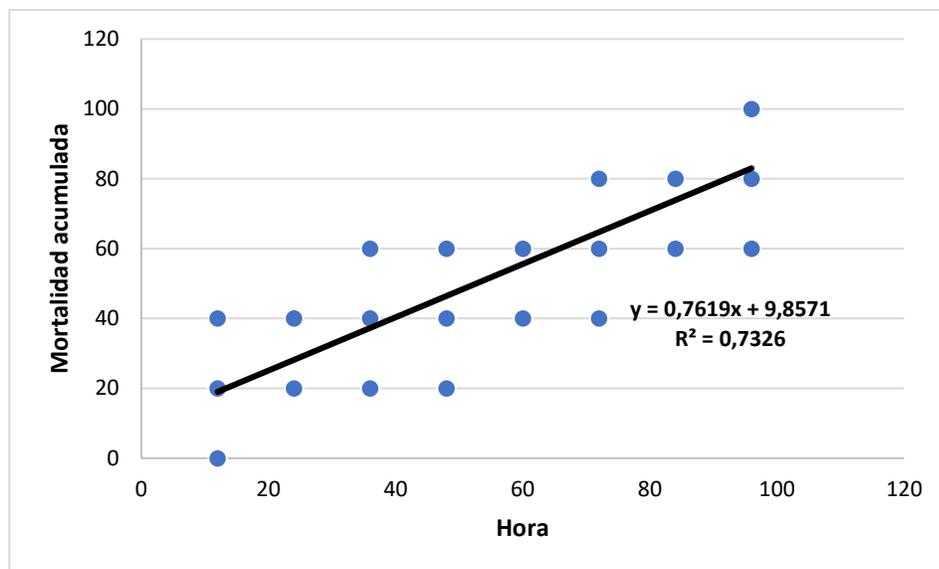


Figura 8. Regresión de la interacción mortalidad acumulada-hora de muerte para larvas de segundo instar de *P. xylostella* sometidas a la concentración de 10^9 de la cepa colectada en campo de *B. bassiana*, bajo condiciones *in vitro*.
Fuente: Pirazán y Sandoval (2022).

19. Discusión

Se discutirán los resultados obtenidos en el desarrollo del proyecto, basándonos en bases teóricas que refuten o afirmen a estos:

Arboleda (2004) citado por (Peteira et al., 2011) afirma que:

El proceso patogénico se inicia en la cutícula del insecto, con la germinación de los conidios y la producción de hifas invasoras, las cuales penetran los tejidos a través de los intersticios y partes blandas del insecto, dando inicio de esta forma a la actividad enzimática degradativa de la cutícula. Las hifas se ramifican, colonizan y llegan hasta la cavidad hemocélica del insecto, donde se produce una masa micelial por el crecimiento del hongo. En muchos casos, el insecto puede ser colonizado totalmente por el hongo. Además, se liberan toxinas, las cuales están implicadas en el bloqueo del desarrollo fisiológico y pueden causar la muerte del insecto (p.17).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, y recapitulando los resultados obtenidos y las observaciones en laboratorio en el proyecto presente se destaca que la muerte por infección fúngica se confirmó mediante la observación de la misma, las características presentes de los cadáveres y la posterior esporulación donde algunas de las larvas fueron colonizadas totalmente como se puede observar en la Figura 9, o en algunos casos

parcialmente, sumando a esto, otro de los síntomas presentados son una sequedad parcial o total hasta causar una necrosis de las larvas de *Plutella xylostella* (L.). Así mismo, el cuerpo de algunas larvas presentaba una coloración amarilla y rojiza. También a simple vista las larvas presentaron reducción en la actividad motora, desplazamiento y una reducción en su alimentación.

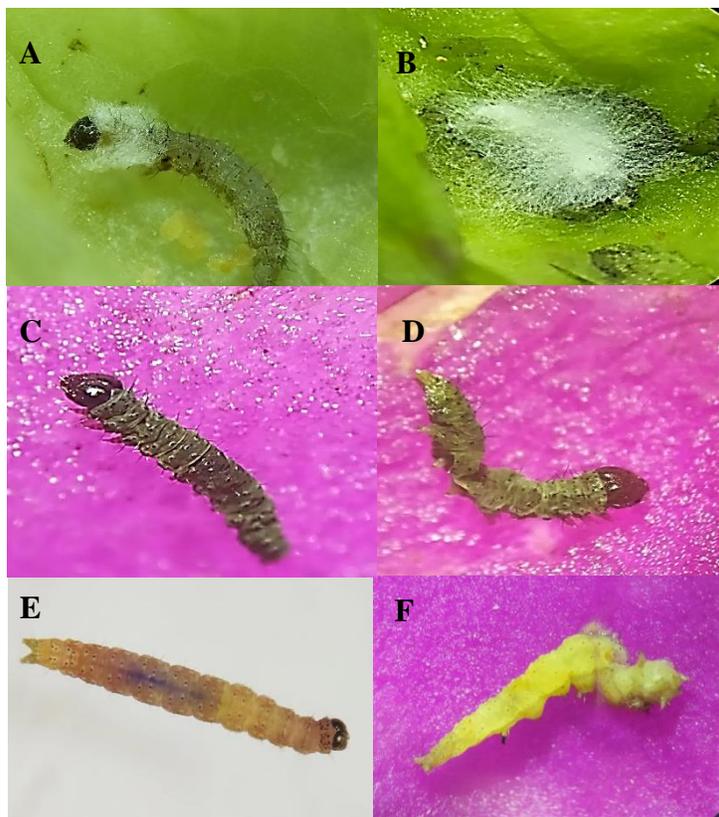


Figura 9. **A-B** larvas muertas por *B. bassiana* con micelio blanco parcial y total, **C-D** sequedad y necrosis miento de las larvas de *P. xylostella*; **E-F** larvas con una coloración rojiza y amarilla.

Zimmermann (2007) y Zibae (2009) en (Peteira et al., 2011) afirman que:

Los hongos entomopatógenos tienen diferentes atributos que determinan su virulencia frente a sus hospedantes, incluyendo la producción de enzimas hidrolíticas. Durante el proceso de infección *Beauveria* spp. produce enzimas proteolíticas y toxinas, mientras los insectos hospedantes responden con reacciones de defensa humoral y celular (p.18).

Básicamente las enzimas hidrolíticas son las proteasas, quitinasas y lipasas, que son importantes para el inicio del proceso de infección, sumando a esto, los conidios de *B. bassiana* comienzan después de unas 10 h a invadir el insecto y se completan en gran medida a las 20 h a 20–25 °C, generalmente, el hongo penetra en áreas más delgadas y no esclerotizadas de la cutícula, como las articulaciones, entre los segmentos o las piezas bucales (Zimmermann, 2007).

Con lo anterior, fue evidente en el desarrollo de la investigación que 12 h después de montado el ensayo se procedía a evaluar la mortalidad de las larvas que en tan solo 12 horas algunas larvas fallecían o su mortalidad aumentaba con el transcurso de las horas de evaluación, como se evidenció con las concentraciones de 10^9 de las dos cepas, en donde la mortalidad presentada por la cepa comercial fue de un 50% en las primeras 35 horas de aplicado el tratamiento, mientras que para la cepa colectada en campo se obtuvo ese porcentaje de muerte a la misma concentración fue a las 53 horas. En el caso de las concentraciones menores de la cepa colectada en campo 10^4 y 10^5 causaron un 92% de mortalidad, pero tardaron más tiempo.

Después de la penetración que realiza el hongo se van a producir cuerpos de hifas que se van a distribuir sobre la hemolinfa, causando que el hongo invada otros tejidos del insecto huésped mediante un extenso crecimiento vegetativo y la producción de toxina; por ejemplo, el metabolito oosporeína es producido por *B. brongniartii*, que es visible al teñir de rojo el cadáver de su huésped. Durante su invasión del cuerpo del insecto, el hongo agota los nutrientes en la hemolinfa y el cuerpo graso (Boucias & Pendland 1998). Además, produce sustancias tóxicas como beauvericina, beauverina, bassianolido, isarolido, ácido oxálico y pigmentos como benzoquinona, oosporeína, tenelina, bassianina (Kucera y Samsinakiva, 1968; Burgues, 1981); (Domsch y Gams, 1993) en (Tapias & Dussán, 2000).

Los pigmentos producidos por *B. bassiana*, principalmente rojo y amarillo, son relevantes en el proceso patogénico contra insectos y tienen propiedades antivirales, citotóxicas y antimicrobianas contra bacterias de interés clínico y hongos fitopatógenos (Guadalupe et al., 2020).

Cabe resaltar que posiblemente alguno de los metabolitos mencionados anteriormente sean el causante de la coloración rojiza y el amarillamiento de las larvas *P. xylostella* en ambos tratamientos, como oospereína causa el color rojo y el amarillo por la tenelina o bassianina. Por otro lado, el hongo al agotar los nutrientes presentes en la hemolinfa y el cuerpo graso del insecto hace que esté presente una sequedad, a su vez encogimiento en su cuerpo y posteriormente una necrosis. También otros autores como (Chintapenta et al., p.5, 2014) dicen que “La producción de pigmentos específicos confiere a las esporas resistencia a la radiación ultravioleta, y a las condiciones ambientales que pueden ser perjudiciales para el hongo” en (Guadalupe et al., 2020). Estos pigmentos son de suma importancia porque los insectos tienen mecanismos de defensa frente al ataque de hongos o productos de síntesis química, además estos pigmentos hacen que las esporas tengan resistencia a diferentes factores externos, por ejemplo Ortiz y Keyhani (2013) dicen que:

En la cutícula, los insectos promueven la liberación de benzoquinonas, secreciones glandulares de compuestos antifúngicos volátiles como monoterpenos iridoides (epicrisomelidial) y salicilaldehído, péptidos antimicrobianos como β -1,3-glucanasas, quitinasa e inhibidores de proteasa. Además, la melanización contribuye a la inhibición del crecimiento de hifas y la germinación de esporas. Además, la sinergia entre acicalarse, excavar e incluso el aumento de temperatura inducido por el sol pueden limitar la infección de hongos entomopatógenos (p.359).

Con lo mencionado anteriormente, cabe la posibilidad que esto pudo haber ocurrido con las larvas de los tratamientos que tardaron más en morir. En adición, la muda es un factor muy importante en algunos insectos ya que este factor puede causar que la aplicación de entomopatógenos no sea efectiva, como menciona (Vandenberg, Ramos, y Altre, 1998):

La muda simple puede proporcionar un medio para evitar la infección. Las ecdisis rápidas en los áfidos pueden ser un factor importante que contribuye a los malos resultados en las aplicaciones de hongos entomopatógenos y la muda en la polilla de espalda de diamante *Plutella xylostella* (L.) también puede ayudar a minimizar la capacidad de los patógenos fúngicos para infectar completamente al huésped.

De igual forma, en el estudio realizado por (Vandenberg et al., 1998) donde determinaron la respuesta a la dosis y la susceptibilidad relacionada con la edad y la temperatura de las larvas de *P. xylostella* a 2 aislamientos de *B. bassiana*. Fue evidente que los estadios tercero y cuarto fueron más susceptibles que el segundo debido a que es el menos susceptible a la infección, porque tiene una menor duración de este estadio, por consiguiente, mayor probabilidad de muda poco después de la inoculación, y el posterior desprendimiento

de esporas con la cutícula entre las larvas de los primeros estadios. indicando la importancia de la muda como medio para evitar la infección. De acuerdo con lo anterior, en nuestro caso se emplearon larvas de segundo estadio, lo cual, da la posibilidad de que las larvas tardaron en presentar síntomas y posterior muerte, debido al estadio en el que se emplearon, ya que presentaban síntomas como: coloraciones rojizas y amarillas, así como presencia de micelio tanto en las larvas de segundo estadio como las que lograron llegar hasta el tercer estadio.

19.1 Comparación de las cepas evaluadas con otros autores

A continuación, hablaremos acerca de algunos documentos en los que se utilizaron cepas de *B. bassiana* con los siguientes resultados:

Se utilizo *B. bassiana* para el control de la broca del café *H. hampei*, la mortalidad en las tres repeticiones empleadas fue directamente proporcional a la concentración de conidias, siendo que el 4 día posterior a la inoculación el T1, a 1×10^8 conidias mL^{-1} , fue el tratamiento de mayor eficacia sobre *H. hampei* fue un 60,33% de mortalidad el cual llego al 96,66% dos días después, los T2, T3 y T4 de 1×10^7 , 1×10^6 y 1×10^5 , en el cuarto día registraron 31,66%, 10,66% y 0% y a los 2 días 60,33%, 46% y 12,33% (Fernández, 2020).

En esta investigación de (Romo, 2020) se evaluaron tres cepas de *B. bassiana* para el control del pulgón *Neotoxoptera formosana* Takahashi utilizado como insecto modelo, este se encuentra en la cebolla y otras especies de la familia Alliaceae. El hongo fue propagado en un medio de arroz y un caldo nutritivo. La concentración de esporas fue de 1×10^7 . La cepa 3 resultó ser más efectiva en relación con las otras 2, la cepa 3 causo un 89.10% de mortalidad a los 7 días del estudio.

En el caso de lepidópteros como *P. xylostella* (Correa et al., 2014) menciona que la mayor mortalidad producida por *B. bassiana* fue Bb9205 (95,33%) estaba a una dosis de 1×10^5 con/cm² 15 días después de la inoculación, la interacción entre la dosis y el tiempo de *B. bassiana*, además tiene patogenicidad fúngica que se caracteriza por un aumento gradual de la mortalidad con un tiempo de exposición prolongado. Sumando a esto, las concentraciones de 1×10^5 con/cm² son bajos para causar un porcentaje de mortalidad superior al 60% en *P. xylostella*; por lo tanto, recomiendan el uso de concentraciones superiores a

1×10^9 con/cm² para producir una mortalidad del 80%. Este estudio demuestra que se puede obtener una alta mortalidad a dosis bajas, dependiendo de la especie y cepa del hongo entomopatógeno. Lo cual es muy cierto debido a que en nuestro ensayo la cepa comercial a dosis superiores de 10^5 se lograron mortalidades de un 100% en un menor tiempo, así mismo con la cepa colectada en campo 10^4 y 10^5 generaron mortalidades de un 92% superiores al estudio mencionado anteriormente, de igual forma hace evidente que dependiendo de la especie y la cepa de hongo se van a obtener diferentes porcentajes de mortalidad.

En el caso de (Fernández et al., 2003) usaron 17 diferentes aislamientos nativos de *B. bassiana* y 3 productos comerciales, donde el aislamiento que causó la mortalidad mayor fue CLS 029, con 97,83%, seguido de los aislamientos CLS 003, CLS 018, CLS 014 y el producto comercial Bouveril con 82,61%, 71,74%, 65,22% y 63,04%, respectivamente. También mencionan que, de presentarse esporulación en condiciones de campo, los insectos muertos por el hongo aumentarían el inóculo inicial aplicado, convirtiéndose en multiplicadores del microorganismo (Vahos et al., 1998) en (Fernandez et al., 2003), seguido de que el aislamiento proviene del mismo insecto sobre el cual se desea conocer su efecto, es más patógeno que los aislamientos de hongos obtenidos de insectos diferentes, ya que puede existir cierta especificidad entre el hongo y su huésped. Con todo lo anterior, en nuestro caso al realizar el aislamiento del adulto de *P. xylostella* inoculado con el suelo de los Tanques, se podría decir que por esa razón el aislamiento de la cepa colectada en campo presentó una buena mortalidad sobre la polilla a diferencia de otros estudios en los que se utilizó cepas nativas de *B. bassiana*.

Otros estudios que hablan sobre la mortalidad causada en algunos lepidópteros con el uso de *B. bassiana*.

Los porcentajes de mortalidad causados a larvas de segundo instar larval de *P. xylostella*, de la cepa colectada en campo de *B. bassiana* arrojaron resultados entre el 92% y 100% de mortalidad, lo cual coincide con los datos obtenidos por García-Gutiérrez et al (2020) quienes confirmaron en laboratorio la patogenicidad de un aislamiento nativo de *B. bassiana* sobre larvas del segundo instar de *H. virescens* quienes causan 90-100% de mortalidad de larvas.

Las CL₅₀ para cada una de las cepas estudiadas de *B. bassiana* fueron: la CL₅₀ para la cepa comercial es de 34.659 UFC/mL y para la cepa colectada en campo fue de 118.342 UFC/mL. Estos resultados indican que la cepa comercial de *B. bassiana* es más letal para las larvas de *P. xylostella* a diferencia del trabajo realizado por Villegas-Rodríguez et al., (2107) quienes evaluaron la susceptibilidad del psílido de la papa a dos cepas comerciales y dos nativas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, al realizar una comparación entre las cuatro cepas de los hongos evaluados, con respecto a su CL₅₀ la cepa comercial de *B. bassiana* es la más virulenta, aproximadamente 21 veces más que la cepa nativa de *M. anisopliae*, y cuatro veces más que la comercial del mismo; contrastando con la cepa colectada en campo de *B. bassiana*, ésta resultó no ser muy diferente de la cepa comercial.

20. Plantas hospederas



Figura 10. **A** Veronica (*Veronica persica* Poir.), **B** Nudosilla (*Persicaria capitata* (Buch-Ham)(D. Don), **C** Manzanilla de Castilla (*Matricaria chamomilla* L.) y **D** Ortiga menor (*Urtica urens* L.).

Durante la recolecta de adultos de *Plutella xylostella* L. en el cultivo de repollo morado *Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra*, fue evidente que el adulto presenta hábitos nocturnos, por lo cual, en el día buscaba plantas hospederas para alojarse en ellas de la radiación solar. Además, esto nos permitió conocer los hábitos del adulto en el día para lograr generar mayores capturas de adultos con la ayuda de la jama.

21. Enemigos naturales

Las larvas que fueron recolectadas en la Escuela Normal Superior de Pamplona fueron depositadas en frascos de vidrio transparentes colocándoles como tapa, una malla o toldillo para su oxigenación. Conjuntamente, algunas de las larvas que fueron recolectadas del envés de las hojas de la roseta del repollo, presentaban un color verde brillante y estaban hinchadas, por lo cual se dejaron en diferentes frascos para descartar si se trataba de un parasitoide o de un depredador. Por consiguiente, encontramos que las larvas de color verde brillante se trataban de un depredador de la familia Syrphidae. Así mismo, en los otros frascos con larvas y pupas recolectadas en su interior emergieron adultos del parasitoide *Diadegma insulare* Cresson. tanto hembras como machos, que fueron identificados por el Ph.D. en Entomología Humberto Giraldo Vanegas.

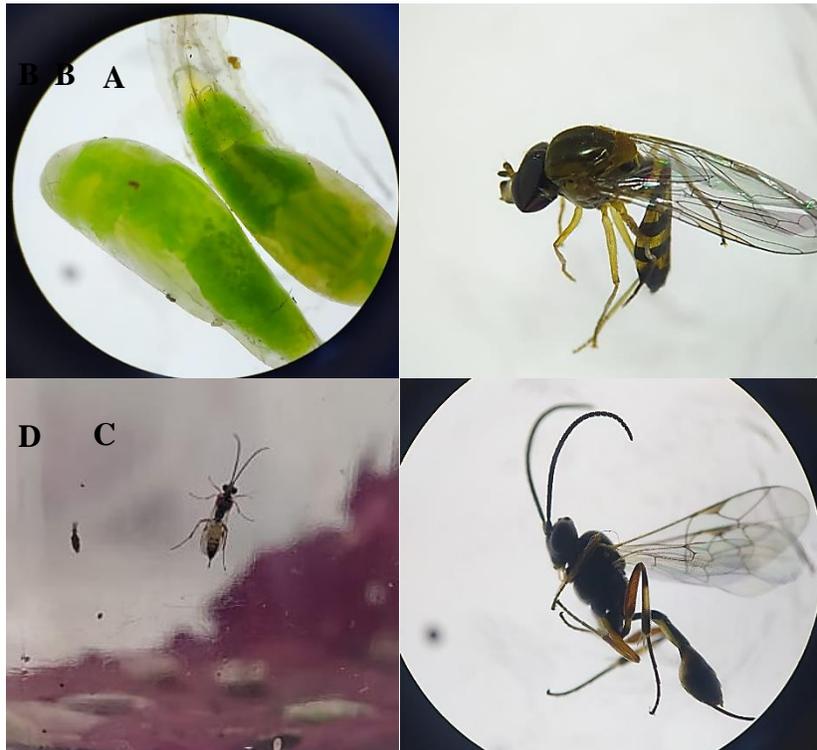


Figura 11. **A-B** larvas y depredador de Syrphidae. **C-D** parasitoide *Diadegma insulare* Cresson.

En promedio *D. insulare*, puede parasitar del 70 al 90 % de las larvas de *Plutella xyloestella* (L.) y las larvas parasitadas consumen entre un 35 y un 80 % menos de alimento que las larvas no parasitadas y en América del Norte, el parasitismo por *D. insulare* que a veces supera el 80% para el cuarto estadio y el 50% para el tercer estadio (Keddie et al., 2007).

22. Conclusiones

En el suelo sin intervención agrícola ubicado en Los Tanques, se logró recolectar el hongo de interés de estudio, conjuntamente, en la caracterización macroscópica de la cepa colectada en campo de *B. bassiana*. se observó que los aislamientos presentaron colonias con micelios de aspecto algodonoso color blanco, con superficie semielevada, además estas colonias se tornan amarillentas y cremosas, pero al voltear las cajas de petri se pueden observar tonalidades rojizas al centro y amarillento alrededor. En la caracterización microscópica los conidios observados fueron lisos, redondeados a ovoides y el tamaño de los conidios de los 2 aislamientos osciló en 2,20-2,95 x 1,96-2,39 μm .

Con respecto a la mortalidad de la cepa comercial de *B. bassiana*. se detectaron diferencias significativas, generándose dos grupos; así: el primer grupo conformado por el testigo con 4,00% de mortalidad y un segundo grupo constituido por las concentraciones 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 , las cuales causaron el 100% de mortalidad de las larvas de segundo instar de *P. xylostella*.

Las mortalidades para la cepa colectada en campo presentaron que en las concentraciones 10^6 , 10^7 , 10^8 y 10^9 , causaron el 100% de mortalidad y 10^4 , 10^5 causaron el 92% de mortalidad, y el testigo absoluto presentó una mortalidad del 4%.

Los resultados obtenidos en las pruebas para encontrar la CL_{50} , arrojaron que la cepa comercial es de 34.659 UFC/mL; la CL_{50} ; para la cepa colectada en campo fue de 118.342 UFC/mL

Con los TL_{50} de todas las concentraciones probadas de la cepa comercial de *B. bassiana*. se determinó que la concentración de 10^9 UFC/mL mata al 50% de la población a las 35 horas; mientras que la concentración 10^4 a las 111 horas. Además, para la cepa

colectada en campo la concentración de 10^9 UFC/mL mata al 50% de la población a las 53 horas; mientras que 10^4 la causa a las 73 horas.

Con todo lo anterior se puede decir que las dos cepas estudiadas presentan excelentes resultados para el control de *P. xylostella*, pero que la cepa Comercial de *B. bassiana*. es más efectiva para el control de la plaga en comparación con la cepa colectada en campo; que en concentraciones 10^4 y 10^5 presenta mortalidades de un 92% a diferencia de la comercial que en todas sus concentraciones causó mortalidades del 100%. Sumado a esto, los resultados obtenidos pueden indicar que la población de *P. xylostella* colectada en el Colegio Normal Superior de Pamplona es muy susceptible a concentraciones de *B. bassiana*, tanto altas o más bajas de la recomendada por la cepa comercial.

23. Recomendación

Emplear el uso de entomopatógenos como *B. bassiana* para el control de plagas, como el lepidóptero *Plutella xylostella* (L.) ya que presenta una efectividad en laboratorio del 100% con el uso de cepas tanto comercial como colectada en campo, con la finalidad de ser empleados en el campo.

Es de suma importancia que se genere continuidad de la presente investigación, desarrollando pruebas en campo, en donde se evalué la efectividad de las diferentes cepas de *Beauveria* sp., frente al control de *P. xylostella* en el municipio de Pamplona.

La búsqueda de nuevas alternativas ecológicas para el control de *P. xylostella* permiten garantizar la conservación del medio ambiente y así mismo la obtención de la inocuidad de los productos para el consumo humano.

Realizar un análisis químico que permita determinar cuáles son los metabolitos activos de la cepa colectada en campo de *Beauveria* sp., de esa manera poder determinar de manera más precisa su comportamiento de acuerdo con su producción de metabolitos.

24. Referencias

- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18 (2): 265-267.
- Agronet. (2019). *Área, producción y rendimiento Nacional por cultivo*. Recuperado el 2022, de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>
- Agronet. (s.f.). *Comparativo de Área, producción, rendimiento y participacion departamental por cultivo*. Recuperado el 2022, de <https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=3>
- Alcaldía de Pamplona. (s.f.). *Información del municipio*. Recuperado el 11 de 10 de 2021, de <http://pamplona-nortedesantander.gov.co/MiMunicipio/Paginas/Informacion-del-Municipio.aspx#:~:text=Pamplona%2C%20limita%20al%20Norte%20con,y%20al%20occidente%20con%20Cucutilla.&text=Altitud%20de%20la%20cabecera%20municipal,sobre%20el%20nivel%20del%20mar>.
- Almeida, J. E.; Alves, M. S. B.; Pereira, R. M. (1997). Selection of *Beauveria* spp. Isolates for control of the termite *Heterotermes tenuis* (Hagen, 1858). *Journal of Applied Entomology* 121 (5): 539-543.
- Arias Rivas, P. R. (2000). *Evaluación de tres palguicidas en diferentes dosificaciones para el control de la palomilla dorso de diamante (Plutella xyloestela L.) en brocoli (Brassica oleracea vas Italica, con uso de nivel critico de aplicaciones en Barcena, Villa nueva*. Universidad de San carlos de Guatemala [trabajo de grado]. Obtenido de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_1879.pdf
- Bertolaccini, I., Sánchez, D., & Arregui, C. (2010). Incidencia de algunos factores naturales de mortalidad de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), en el área centro-este de Santa Fe, Argentina. *Horticultura*. Obtenido de [file:///C:/Users/Tatiana%20Sandoval/Documents/trabajo%20de%20frado/documentos/Incidencia%20de%20algunos%20factores%20naturales%20de%20mortalidad%20de%20Plutella%20xylostella%20\(L.\)%20\(Lepidoptera_%20Plutellidae\),%20en%20el%20C3%A1rea%20centro-este%20de%2](file:///C:/Users/Tatiana%20Sandoval/Documents/trabajo%20de%20frado/documentos/Incidencia%20de%20algunos%20factores%20naturales%20de%20mortalidad%20de%20Plutella%20xylostella%20(L.)%20(Lepidoptera_%20Plutellidae),%20en%20el%20C3%A1rea%20centro-este%20de%2)

Bonilla, M. (2012). *INOCULACIÓN Y ESTABLECIMIENTO ENDOFÍTICO DE CEPAS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae Y Lecanicillium lecanii EN PLANTAS DE FRÍJOL (Phaseolus vulgaris) [Trabajo de grado].* Universidad del Valle. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/309430834_inoculacion_y_establecimiento_endofitico_de_cepas_de_los_hongos_entomopatogenos_Beauveria_bassiana_Metarhizium_anisopliae_Y_Lecanicillium_lecanii_EN_PLANTAS_DE_FRIJOL_Phaseolus_vulgaris

Boucias, DG y Pendland, JC. 1998 _ *Principios de patología de insectos* , 568 Boston, MA : Kluwer Academic Publishers

Brand. (2022). *cámaras de recuento. Laboratorio Clínico V.* Recuperado 27 de mayo de 2022, de

http://biociencias.jodra.net/wpcontent/uploads/2019/04/GK900_05_Clinical_Lab_Zaehlkammern_s.pdf

Britania. (s.f.). *Sabouraud Glucosado Agar.* Recuperado el 2022, de https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5af08a08a7afe.pdf

BURGES, H. D.; HUSSEY, N. W. 1971. *Microbial control of insects and mites*, Academic Press, New York, 861 p.

BUSTILLO, A. 2001. *Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia.* pp. 30-53. En: *Seminario sobre uso de entomopatógenos en Colombia.* SOCOLEN. Bogotá, Colombia. Octubre 12 de 2001.

Cabi. (s.f.). *Polilla dorso de diamante (Plutella xyloestela L.)* . Recuperado el 11 de 10 de 2021, de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/42318>

Cabrera Morales, J. (2021). *Susceptibilidad de Plutella xylostella (L.) a dos cepas locales posibles Bacillus thuringiensis y una cepa comercial de Bacillus thuringiensis (Berliner), bajo condiciones in vitro.* [Trabajo de grado] Universidad de Pamplona.

- Castillo, C., Cañizalez, L., Valera, R., Godoy, J., Guedez, C., Olivar, R., & Morillo, S. (2014). Caracterización Morfológica de *Beauveria bassiana*, Aislada De Diferentes Insectos En Trujillo- Venezuela. *Universidad de los Andes*, 275-281. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/271825762_CHARACTERIZACION_MORFOLOGICA_DE_BEAUVERIA_BASSIANA_AISLADA_DE_DIFERENTES_INSECTOS_EN_TRUJILLO-_VENEZUELA
- Chiriboga, Gómez y Garcés. (2015). Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: beauveria bassiana, hongo entomopatógeno para el control biológico de hormigas cortadoras. Obtenido de: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724e.pdf;jsessionid=25A91A059A509B2B780C720F325B598D?sequence=1>
- Choque Miranda, A. V., Berrios Espejo, Y., Florez Salas, J. L., Soto Gonzales, H. H., González Aguilera, J., & Argente Martínez, L. (2021). Bioplaguicidas: Mecanismos de acción biocida en insectos plaga. *Research, Society and Development*, 10(7), 1-12. doi:<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16893>
- Corponor. (13 de 4 de 2015). Marco de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. Obtenido de [000200]: <https://corponor.gov.co/ACTOSJURIDICOS/RESOLUCIONES/2015/ene0200.pdf>
- Correa, J., Rodríguez, M., & Sáenz, A. (2014). Susceptibility of *Plutella xylostella* (Lepidoptera:Plutellidae; Linnaeus 1758) to *Beauveria bassiana*Bb9205, *Metarhizium anisopliae* Ma9236 and *Heterorhabditis bacteriophora* HNI0100 . *Universitarias scientiarum*, 19(3), 277-285. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/499/49931030009.pdf>
- Dannoh, F., Dannon, E., Douro, K., Zinsou, V., Houndete, T., Toffa, J., . . . Tamo, M. (2020). Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *Journal of Cotton Research volume*, 3(24), 1-21. doi:<https://doi.org/10.1186/s42397-020-00061-5>
- Dictionary. (s.f.). *Dosis letal (DL)*. Recuperado el 18 de 5 de 2022, de <https://dictionary.apa.org/lethal-dose>

- DIMBI, S. N.; MANIANIA, N. K.; LUX, S. A.; MUEKE, J. M. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. *BioControl* 49 (1): 83-94.
- Doberski, J.; Tribe, H. T. 1980. Isolation of entomopathogenic fungi from elm bark and soil with reference to ecology of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Transactions*
- Echeverría Beirute, F. (2006). *Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno*. [Trabajo de grado] Instituto tecnológico de Costa Rica. Obtenido de <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/463/Trabajo%20Final%20de%20Graduacion%20Biblioteca.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Estrada, V. M. N.; Vélez, A. P. E.; López, N. J. C. 1997. Estandarización de una metodología para obtener cultivos monospóricos del hongo *Beauveria bassiana*. *Cenicafé* 48 (1): 59-65.
- Fao. (20 de 6 de 2018). *Los contaminantes agrícolas: una grave amenaza para el agua del planeta*. Recuperado el 7 de 10 de 2021, de <https://www.fao.org/in-action/agronoticias/detail/es/c/1141955/>
- Feng, M. G.; Johnson, J. B.; Kish, L. P. 1990. Virulence of *Verticillium lecanii* and an aphid-derived isolate of *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) for six species or cereal-infesting aphids (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 19 (3): 815-820.
- Fernández, J. (2020). *Evaluación de la actividad biopesticida del hongo entomopatógeno B.bassiana sobre la broca del café (Hypothenemus hampei) [Trabajo de grado]*. Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, Cuenca. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/19620/1/UPS-CT008915.pdf>
- Fernandez, C., Londoño, M., & Jaramillo, J. (2003). Susceptibilidad de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Iponomeutidae) a diferentes aislamientos nativos de *Beauveria bassiana* y su efecto adicional sobre otros lepidópteros asociados a la coliflor. *Revista Colombiana de Entomología*, 29(2), 211-219. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v29n2/v29n2a14.pdf>
- Ferron P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23:409-442. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>

- García-Gutiérrez, Armenta-Bojórquez, Gaxiola-Castro, Vázquez-Montoya, y Acuña-Jiménez (2020) Evaluación de insecticidas biorracionales y *Beauveria bassiana* (Vuill) para el control del gusano del fruto del tomate. Agricultura, Sociedad y Desarrollo, enero - marzo, 2020. file:///C:/Users/User/Downloads/Dialnet-EvaluacionDeInsecticidasBiorracionalesYBeauveriaBa-7556619.pdf
- Gaxiola. L., (2012). Evaluación de aislamientos nativos de *Beauveria bassiana*. y *Metarhizium anisopliae*. para el control del gusano del fruto *Heliothis virescens*. (Fabricius 1771) en el cultivo de tomate *Solanum lycopersicum*. (Mill) en Guasave, Sinaloa. Tesis. Instituto Politecnico Nacional. <http://www.cienciasinaloa.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/279/1/Luis%20Alberto%20Gaxiola%20Castro.pdf>
- Gilchrist, Fuentes, Martínez, López, Duveiller, Singh, M. Henry y García. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT.
- GLARE, T. R.; INWOOD, A. J. 1998. Morphological and genetic characterization of *Beauveria* spp. from New Zealand. *Mycological Research* 102 (2): 250-256.
- Godonou, I., James, B., Atcha, C., Vodouhe` , S., Kooyman, C., Ahanche´de´ , A., & Korie, S. (2009). Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection*, 220-224. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219408002032>
- Guadalupe, J., Carrillo, M., Reynaldo de la Cruz, Wong, J., Muñoz, D., Parra, R., . . . Aguilar , P. (2020). Metabolitos secundarios de *Beauveria bassiana*: una revisión dentro de los sistemas de producción, biosíntesis y bioactividades. *Revista Mexicana de Biotecnología*, 5(4), 1-33. Obtenido de https://10316b55-bcaf-49d1-aa23-a9959305f101.filesusr.com/ugd/38ce56_5266a4b1d59c478a915cb898154eefa6.pdf
- Huaripata Zárata, C. H. (2018). *Ciclo biológico de Plutella xylostella (Lepidoptera: Plutellidae), en brócoli y coliflor bajo condiciones de laboratorio, en La Molina – Perú [trabajo de grado]*. Universidad Agraria La Molina, Molina. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3159/huaripata-zaratecesar-hugo.pdf;jsessionid=DDA77CF1DE200584C212372648908653?sequence=3>

- Humber, R. A. (1997). Fungi: Identification. pp. 153-185. En: Lacey, L. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. San Diego, 409 p.
- Humber, R. A. 1997. Fungi: Identification. pp. 153-185. En: Lacey, L. (Ed.). Manual of techniques in insect pathology. Academic Press. San Diego, EEUU. 409 p.
- IUPAC. (1997). *Compendio de terminología química 2da Ed.* Oxford: SJ Chalk. doi:<https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- Jaramillo, J., & Diaz, C. (2006). El cultivo de las crucíferas :brócoli, coliflor, repollo, col china. *Agrosavia*, 1-176. Obtenido de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13457>
- Keddie, A., Sarfraz , M., & Dossall, L. (2007). Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: A review. *Biocontrol Science and Technology*, 15, 763-789. Obtenido de <https://doi-org.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/10.1080/09583150500136956>
- Klieber., J. y Reineke., A. (2016). The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *Journal of Applied Entomology*, 140(8), 580-589. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/jen.12287>
- Lakpo, K., Guillaume, k., Orou, K., Thibaud , M., Glitho, I., & Tamò, M. (2020). Improving the efficiency of *Beauveria bassiana* applications for sustainable management of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) in West Africa. *Biological control*, 144, 3-9. Obtenido de <https://www-sciencedirect-com.unipamplona.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S1049964419301707>
- Länge, T , Pernfuss, B , Seger, C y Strasser, H. 2005 . Evaluación de la eficacia en campo de *Beauveria brongniartii* contra *Melolontha melolontha* en cultivos de papa . *Sydowia* , 57: 54 – 93

- Lipa, J. J.; Slizynski, K. 1973. Wskazówki metodyczne I terminologia dowyznaczania snedniej dawki swiertelnej (LD50). W Patologii Owadow i toksykologii. Prace Naukowe Instytutu
- Lipa, J. J.; Slizynski, K. 1973. Wskazówki metodyczne i terminologia do wyznaczania średniej dawki śmiertelnej (LD50) w patologii owadów i toksykologii. Prace Navkome Instytutu Ochrony Roslin Poznań 15 (1): 59-83.
- López, L. L.; CARBONELL, T. 1999. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. *Revista Iberoamericana de Micología* 16 (3): 136-142.
- Malpartida-Zevallos. J., Narrea. M., & Dale-Larraburre. W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador del maracuyá *Dione juno* (Cramer)(Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima., Peru. <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v12n2/a02v12n2.pdf>
- Marieli Vacari , A. (2009). *Caracterização biológico-comportamental de Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) *PREDANDO Plutella xylostella* (L., 1758) [trabajo de grado]. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/242544753_Universidade_Estadual_Paulista_Julio_De_Mesquita_Filho_Faculdade_De_Ciencias_Agrarias_E_Veterinarias_Campus_De_Jaboticabal_Caracterizacao_Biologicocomportamental_De_Podisus_nigrispinus_Dallas_1851_PRE
- Mena Guerrero, J., & Hernández Fernández, J. (2017). Brasicáceas y perspectivas de control biológico del insecto plaga *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) utilizando *Bacillus thuringiensis*. 7-22. Obtenido de <https://revistas.utadeo.edu.co/index.php/mutis/article/view/1245/1245>
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (27 junio 2013). Reglamentación permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial. [Decreto1376]. Diario Oficial. N. 48834. 27, junio, 2013. pag. 35. <http://www.suin-juriscol.gov.co/viewDocument.asp?ruta=Decretos/1275905>
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. (27 de 12 de 2013). Reglamentación del permiso de recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biologica con fines de elaboración de estudios ambientales. Obtenido de [Decreto

2016]: http://observatorio.epacartagena.gov.co/wp-content/uploads/2016/11/dec-3016_27122013-PERMISO-RECOLECCION-ESPECIES.pdf

- Mondragón , Y., Triana, B., & Giraldo Vanegas , H. (2020 b). 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 [trabajo de grado]. *VIII jornada técnico científica*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/348923569_Determinacion_de_DL50_y_TL50_por_extractos_acuosos_de_Azadirachta_indica_A_Juss_en_Plutella_xylostella_L_bajo_condiciones_de_laboratorio
- Moura, G., & Jaroskin, S. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *Revista mundial de microbiología y biología*. Obtenido de <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-016-2131-3>
- Noboa Guerra, G. P., & Quelal Guerrero, A. D. (2015). *Diseño e implementación de un protocolo para mejorar la producción y conservación Beauveria bassiana y Trichoderma harzianum como aporte a los productores de café orgánico de la asociación "RÍO INTAG", Cantón Cotacachi*. [Trabajo de grado] Universidad de Politecnica Salesiana. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/9400/1/UPS-QT07115.pdf>
- Ochroy Roslin 15 (1): 59-83. of the British Mycological Society 74 (1): 95-100.
- Ortiz, A., & Keyhani, N. (2013). Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insectos*, 4(3), 357-374. doi:<https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- Peteira, B., González, I., Arias, Y., Fernandez, A., Miranda, I., & Martinez, B. (2011). Caracterización bioquímica de tres aislamientos de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Protección vegetal*, 26(1), 16-22. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v26n1/rpv03111.pdf>
- Porras, L.; Lecuona, R. 2008. Estudios de laboratorio para el control de *Ceratitis capitata* (Wiedmann) (Diptera: Tephritidae) (Mosca del Mediterráneo) con *Beauveria bassiana*. *Agronomía Costarricense* 32 (2): 119-128.

- Ramos, V. (2019). *Efecto del abonamiento del guano de islas y humus de lombriz en el rendimiento del repollo morado (Brassica oleracea L.var. capitata - rubra) en el C.I.P Camacani-Puno [Trabajo de grado]*. Universidad Nacional del ANtiplano-Puno. Obtenido de http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/11464/Ramos_Llanos_Vladimir.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Rios, R. (2020). *Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae como controladores compatibles y eficientes de insectos plaga en cultivos acuapónicos. Beauveria bassiana y Metarhizium anisopliae como controladores compatibles y eficientes de insectos plaga en cultivos acuapónicos*, 11(3), 419-426. doi:<http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.14>
- Rodríguez Rodríguez , J., Cerna Chávez , E., Ochoa Fuentes, Y. M., Landeros Flores, J., Guevara Acevedo, L., & Cisneros Lopez, H. (2021). Efectos subletales y costos de resistencia a abamectina en palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella*) (Lepidoptera: Plutellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 47(2). doi:<https://doi.org/10.25100/socolen.v47i2.10657>
- Rodriguez, J. F., Cerna, E., Ochoa, Y., Landeros, J., Guevara, L., & Cisneros, H. (2021). Efectos subletales y costos de resistencia a abamectina Efectos subletales y costos de resistencia a abamectina (Lepidoptera: Plutellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 47(2), 1-7. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v47n2/2665-4385-rcen-47-02-e10657.pdf>
- Romero Bozzetta, J. L.; Quiroz Sotelo, J. Y.; Romero Canales, Y. M. del C.; & Romero Canales, M. Y. (2017). Aislamiento de microorganismos celulolíticos del intestino de *Kaloterms* sp. “Termita” degradadores de extracto de chala y alfalfa. *Big Bang Faustiniiano*, 6(2):9-12.
- Romo, I. (2020). *Evaluación de tres cepas de Beauveria bassiana para el control de Neotoxoptera formosana en el cultivo de Cebolla blanca de rama (Allium fistulosum) [Trabajo de grado]*. Universidad San Francisco de Quito. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/9040/1/124466.pdf>
- Rondot. y Reineke., A. (2018). Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biological Control*, 116, 82-89. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1049964416302080>

- Ortiz, A., Keyhani, N., & Luo, Z. (2014). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi:DOI 10.1007/s00253-014-6270-x
- Salas, C., Portilla, M., y Layana, A., (2020). Polilla Dorso de Diamante, una plaga clave de la horticultura mundial y nacional. Redagricola. Fitosanidad. Noviembre 2020. <https://www.redagricola.com/cl/polilla-dorso-de-diamante-una-plaga-clave-de-la-horticultura-mundial-y-nacional/>
- Samson, R. A. 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. pp. 93-105. In: Burges, H. D. (Ed.). Microbial control of pests and plant diseases. Ed. Academic press, Londres 949 p.
- Samson, R. A. 1981. Identification: Entomopathogenic Deuteromycetes. pp. 93-105. En: Burges, H. D. (Ed.). Microbial control of pests and plant diseases. Ed. Academic Press, Londres. 949 p.
- Silva-Lizarazo, J. S., & Giraldo-Vanegas, H. (2018 a). Ciclo biológico de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) y sus enemigos naturales en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB), Pamplona, Norte de Santander. . VII *goranda técnico científica*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/348923699_Ciclo_biologico_de_Plutella_xylostella_\(L.\)_Lepidoptera_Plutellidae_y_sus_enemigos_naturales_en_el_Centro_de_Investigacion_en_Sanidad_Vegetal_y_Bioinsumos_CISVEB_Pamplona_Norte_de_Santander_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/348923699_Ciclo_biologico_de_Plutella_xylostella_(L.)_Lepidoptera_Plutellidae_y_sus_enemigos_naturales_en_el_Centro_de_Investigacion_en_Sanidad_Vegetal_y_Bioinsumos_CISVEB_Pamplona_Norte_de_Santander_Colombia)
- Tapias, S., & Dussán, J. (2000). *Actual Biol*, 22(72), 17-27.
- Torres-De La Cruz, M.; Cortez-Madriral, H.; Ortizgarcía, C. F.; Cappello-García, S.; De La Cruzpérez, A. 2013. Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium anisopliae* y su patogenicidad hacia *Aeneolamia postica*, en Tabasco, México. *Revista Colombiana de Entomología* 39 (1): 40-46.
- Vandenberg, J., Ramos, M., & Altre, J. (1998). Dose-Response and Age- and Temperature-Related Susceptibility of the Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) to Two Isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). *Environmental entomology*, 27(4), 1017-1021. Obtenido de https://watermark.silverchair.com/ee27-1017.pdf?token=AQECAHi208BE49Ooan9kkhW_Ercy7Dm3ZL_9Cf3qfKAc485y sgAAAr4wggK6BgkqhkiG9w0BBwagggKrMIICpwIBADCCAqAGCSqGSib3DQ