



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

Virulencia de tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre el gusano cogollero del maíz, bajo condiciones *in vitro*.

Laura Alejandra Rueda Adán

1118562384

Programa de Ingeniería Agronómica

30 de noviembre de 2022

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA



Virulencia de tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre el gusano cogollero del maíz, bajo condiciones *in vitro*.

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

Laura Alejandra Rueda Adán

1118562384

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

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

Programa de Ingeniería Agronómica

30 de noviembre de 2022

## **Agradecimientos**

Primeramente, a Dios por darme la vida y la oportunidad de completar uno de mis más grandes sueños. Seguidamente a mi madre Vivia Osmany Adán y a mi abuela materna Rosalba Adán Moreno, quienes desde siempre han sido mi más grande apoyo para salir adelante.

A la universidad de Pamplona por permitirme formarme en ella.

A los docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias, por haber sido parte importante en mi proceso de formación como Ingeniero Agrónomo.

A mi tutor de tesis, I.A. Dr. Humberto Giraldo Vanegas, por confiar en mis capacidades, por acompañarme en todo el proceso de mi trabajo de investigación con sus conocimientos y experiencia.

A mi Co-directora, Microbióloga Magister. Angela Maritza Cajiao Pedraza por brindarme su apoyo.

## **Dedicatoria**

Agradezco a Dios por formar a una mujer fuerte y creyente de mis capacidades y por mantener siempre la resiliencia en muchos aspectos de mi vida, llena de mucha felicidad y amor dedico este trabajo a madre Vivia Osmany Adán y abuela materna Rosalba Adán Moreno, y mi hermano por confiar en mis capacidades quienes desde siempre me motivaron a seguir adelante con mi carrera profesional, me siento feliz y orgullosa de construir y cumplir este sueño de ser una ingeniera Agrónoma.

## Tabla de contenido

1.	Resumen.....	11
2.	Abstract.....	12
3.	Glosario.....	13
4.	Introducción.....	15
5.	Problema.....	17
	5.1 Planteamiento del problema.....	17
	5.2 Justificación.....	18
6.	Objetivos.....	21
	6.1 Objetivo General.....	21
	6.2 Objetivos específicos.....	21
7.	Marco teórico.....	22
	7.1 Antecedentes locales.....	22
	7.2 Antecedentes nacionales.....	22
	7.3 Antecedentes internacionales.....	24
	7.4 Marco contextual.....	26
	7.5 Bases conceptuales.....	27
	7.5.1 Bacillus thuringiensis (Berliner).....	27
	7.5.2 Spodoptera frugiperda (J. E. Smith).....	31
8.	Marco legal.....	34
9.	Metodología.....	37
	9.1 Tipo de Investigación.....	37

9.2	Diseño Metodológico.....	37
9.2.1	Hipótesis.....	37
9.3	Sistema de Variables.....	37
9.3.1	Variables Cuantitativas Continuas .....	37
9.3.2	Variables Cualitativas .....	37
9.4	Diseño de la investigación .....	38
9.4.1	Localización del ensayo .....	38
9.5	Diseño Experimental.....	38
9.5.1	Colecta y Cría masiva de <i>S. frugiperda</i> .....	40
9.5.2	Técnica de Cría de <i>S. frugiperda</i> .....	40
9.6	Descripción de las Actividades.....	41
9.6.1	Caracterización de tres cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner), aisladas de muestras de suelos agrícolas y un suelo de bosque. ....	41
9.6.2	Determinación de la mortalidad de larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> , causada por las tres cepas locales de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	43
9.6.3	Cálculo del CL <sub>50</sub> y el TL <sub>50</sub> de tres cepas locales de <i>B. thuringiensis</i> , sobre larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith), bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	44
10.	Resultados y Discusión .....	45
10.1	Caracterización morfológicamente tres cepas locales de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner) de muestras de suelos agrícolas y suelos no disturbados. ....	46
10.1.1	Porcentaje de identificación. ....	46
10.1.2	Porcentaje de identificación de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	46
10.2	Comparación de la mortalidad causada a larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith), por las tres cepas locales de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner), en condiciones <i>in vitro</i> . ....	50

10.2.1 Mortalidad de larvas neonatas de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith), causadas por la cepa 1 de <i>B. thuringiensis</i> . .....	50
10.3 Concentración Letal Media (CL <sub>50</sub> ).....	53
10.4 Determinación de la CL <sub>50</sub> .....	55
10.5 Determinación del Tiempo Letal Medio (TL <sub>50</sub> ).....	56
11. Conclusiones .....	61
12. Recomendaciones.....	62
13. Bibliografía .....	63
14. Anexos .....	67

### Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner). .....	29
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith).....	32
<b>Tabla 3.</b> Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a las tres cepas del bioensayo. ....	47
<b>Tabla 4.</b> Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas .....	51
<b>Tabla 5.</b> Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> , en las diferentes concentraciones de la cepa 2, potenciales <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner), bajo condiciones in vitro.....	52
<b>Tabla 6.</b> Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de <i>S. frugiperda</i> , en las diferentes concentraciones de la cepa 3, potenciales <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner), bajo condiciones in vitro.....	52
<b>Tabla 7.</b> Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa 1, potencial de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner). .....	53
<b>Tabla 8.</b> Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa 2, potenciales de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	54
<b>Tabla 9.</b> Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa 3, potencial de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner). .....	54
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones letales (CL <sub>50</sub> ) de las tres cepas locales de <i>B. thuringiensis</i> , para larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> , en condiciones de laboratorio.....	56
<b>Tabla 11.</b> Tiempo Letal Medio (TL <sub>50</sub> ), en larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> , sometidas a cuatro concentraciones de la cepa 1 de <i>B. thuringiensis</i> , en condiciones in vitro.....	56

## Listado de figuras

<b>Figura 1.</b> Laboratorio de Sanidad Vegetal Unipamplona.....	26
<b>Figura 2.</b> Micrografía de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. kurstaki.....	30
<b>Figura 3.</b> Ciclo de reproducción del género <i>Bacillus</i> .....	31
<b>Figura 4.</b> El ciclo de vida del cogollero del maíz .....	33
<b>Figura 5.</b> Representación gráfica del diseño experimental de una concentración de una cepa. .....	39
<b>Figura 6.</b> Observación en el microscopio óptico Zeiss Primo Star 1000X .....	48
<b>Figura 7.</b> Cultivo de <i>B. thuringiensis</i> (CVCM 1813), en fase estacionaria de crecimiento. ....	48
<b>Figura 8.</b> Células vegetativas de la cepa 3 (bosque de pinos) con 18 horas de crecimiento ....	49
<b>Figura 9.</b> Cristales en objetivos 100x de cepas locales .....	50
<b>Figura 10.</b> Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> sometidas a la concentración $10^8$ de la cepa 1 de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	59
<b>Figura 11.</b> Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> sometidas a la concentración $10^8$ de la cepa 2 de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Figura 12.</b> Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> sometidas a la concentración $10^8$ de la cepa 3 de <i>B. thuringiensis</i> , bajo condiciones <i>in vitro</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## Lista de anexos

<b>Anexo 1.</b> Instrumento (planilla) para la toma de datos de Mortalidad de larvas, en laboratorio. .....	67
<b>Anexo 2.</b> Anova de Mortalidad de las tres cepas locales evaluadas .....	68
<b>Anexo 3.</b> Prueba de Tukey para la cepa 1 local de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	69
<b>Anexo 4.</b> Prueba de Tukey para la cepa 2 local de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	70
<b>Anexo 5.</b> Prueba de Tukey para la cepa 3 local de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner).....	71
<b>Anexo 6.</b> Recolecta con jama de adultos de cogollero de maíz. ....	72
<b>Anexo 7.</b> Recolecta de larvas y pupas de forma manual de <i>S.frugiperda</i> .....	72
<b>Anexo 8.</b> Cría de adultos .....	72
<b>Anexo 9.</b> A. Huevos de <i>S. frugiperda</i> sin proteccion. B. huevos eclosionados de <i>S. frugiperda</i> . C. Huevos con protección. D. Copulación de macho y hembra. ....	74
<b>Anexo 10.</b> Larvas neonatas de <i>S. frugiperda</i> .....	75
<b>Anexo 11.</b> Pupas de <i>S. frugiperda</i> .....	75
<b>Anexo 12.</b> Adulto de <i>S. frugiperda</i> .....	76

## 1. Resumen

El objetivo de la investigación fue caracterizar morfológicamente y evaluar la mortalidad causada por tres cepas locales aislada de dos suelos agrícolas y una proveniente de suelo de bosque de pinos, potenciales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), bajo condiciones in vitro. El gusano cogollero es una plaga primaria causante de grandes daños y pérdidas económicas a los productores de cultivos de Poaceae principalmente el maíz y plantas dicotiledóneas. Igualmente, se evaluó la toxicidad aguda (CL<sub>50</sub>) y el TL<sub>50</sub> de las tres cepas en las concentraciones de 1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>10</sup>, 1x10<sup>12</sup> UFC/ml y un testigo absoluto sobre larvas neonatas. Se utilizó un Diseño al azar con seis tratamientos, cinco repeticiones, repetición con cinco larvas neonatas para cada una de las tres cepas. La mortalidad se evaluó cada 12 horas hasta la muerte total de las larvas o la emergencia de adultos. Los datos fueron analizados por medio de Software SPSS y Pruebas Probit para calcular CL<sub>50</sub>, transformando las concentraciones a log<sub>10</sub> y las mortalidades a Probit, y con las mortalidades acumuladas y la hora de muerte se encontró el TL<sub>50</sub>, mediante Análisis de Regresión. Las cepas aisladas de suelos agrícolas y la cepa aislada de suelos de bosque de pinos presentaron características similares a bacilos del género *Bacillus* spp.; presentando las colonias color crema, borde irregular y redondeado, con apariencia de huevo frito. Con base en la morfología y la inclusión del cristal al lado de las esporas en las tres cepas estudiadas, se concluyó con altas posibilidades sean cepas de *B. thuringiensis*. Todas las concentraciones de las tres cepas causaron mortalidades superiores al 92% a larvas neonatas de *S. frugiperda*. Los valores de CL<sub>50</sub> obtenidos, permiten afirmar que las tres cepas probadas, exhiben un modo de acción insecticida pudiendo ser un recurso promisorio para el control de poblaciones de *S. frugiperda* en campo. La concentración 1x10<sup>8</sup> UFC/ml de las tres cepas del bioensayo manifestaron Tiempos Letales Medios muy similares; así, los TL<sub>50</sub>, fueron 56; 61 y 57 horas, respectivamente para las cepas 1, cepa 2 y cepa 3; motivo por el cual las tres cepas se presentan como una excelente alternativa como controlador biológico de *S. frugiperda*, las cuales deben ser incluidas en futuros trabajos de investigación, pues matan al 50% de la población entre el segundo y tercer día de su aplicación.

**Palabras clave:** *Spodoptera frugiperda*, bacteria entomopatógena, mortalidad, toxicidad aguda.

## 2. Abstract

The objective of the research was to characterize morphologically and evaluate the mortality caused by three local strains isolated from two agricultural soils and one from pine forest soil, possibly of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), under outdoor conditions. *in vitro*. The fall armyworm is a primary pest that causes great damage and economic losses to Poaceae crop producers, mainly corn and dicotyledonous plants. Likewise, the acute toxicity (LC<sub>50</sub>) and TL<sub>50</sub> of the three strains were evaluated at concentrations of 1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>6</sup>, 1x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>10</sup>, 1x10<sup>12</sup> CFU/ml and an absolute control on neonatal larvae. A randomized design was used with six treatments, five repetitions, repetition with five neonate larvae for each of the three strains. Mortality was evaluated every 12 hours until the total death of the larvae or the emergence of adults. The data were analyzed by means of SPSS Software and Probit Tests to calculate LC<sub>50</sub>, transforming the concentrations to log<sub>10</sub> and the mortalities to Probit, and with the accumulated mortalities and the time of death, the TL<sub>50</sub> was found, by means of Regression Analysis. The strains isolated from agricultural soils and the strain isolated from pine forest soils presented characteristics similar to bacilli of the genus *Bacillus* spp., presenting cream-colored colonies, irregular and rounded edges, with the appearance of a fried egg. Based on the morphology and the inclusion of the crystal next to the spores in the three strains studied, it was concluded with high possibilities that they are strains of *B. thuringiensis*. All concentrations of the three strains caused mortalities greater than 92% in neonatal larvae of *S. frugiperda*. The LC<sub>50</sub> values obtained allow us to affirm that the three strains tested exhibit an insecticidal mode of action and may be a promising resource for the control of *S. frugiperda* populations in the field. The 1x10<sup>8</sup> CFU/ml concentration of the three bioassay strains showed very similar Median Lethal Times; thus, the TL<sub>50</sub>, were 56; 61 and 57 hours, respectively for strains 1, strain 2 and strain 3; which is why the three strains are presented as an excellent alternative as a biological controller of *S. frugiperda*, which should be included in future research work, since they kill 50% of the population between the second and third day of their application.

**Key words:** *Spodoptera frugiperda*, entomopathogenic bacteria, mortality, acute toxicity.

### 3. Glosario

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

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

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

**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 controladores biológicos, para mantener el equilibrio natural de agroecosistemas principalmente y por lo general implica un papel humano.

**Control Biológico:** es un componente natural integrado por depredadores, parasitoides, entomopatógenos y antagonistas encargados en la reducción de las poblaciones de plagas.

**CL<sub>50</sub>:** Concentración letal media, es la cantidad de la dosis de una sustancia, radiación o patógeno necesario para matar a la mitad de un conjunto de animales de prueba después de un tiempo determinado.

**Gusano cogollero:** es una especie de lepidóptero cuyo nombre científico es *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) de la familia Noctuidae, dicha plaga causa graves daños en hojas, cogollos, foliares del cultivo del maíz principalmente.

**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

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

***Spodoptera frugiperda*:** es un insecto lepidóptero de la familia Noctuidae llamado vulgarmente gusano cogollero del maíz.

**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.

**TL<sub>50</sub>:** es el valor medio del intervalo de tiempo, durante el cual se espera que muera el 50% de una población dada, durante la exposición a esta misma.

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

**Toxinas *Cry* y *Cyt*:** son proteínas perforadoras de membranas celulares, aunque no relacionadas estructuralmente y difieren en sus requerimientos de componentes esenciales de membrana. Las proteínas *Cry* se unen a receptores de membrana, mientras que las *Cyt* se unen con alta afinidad a fosfolípidos insaturados.

**Virulencia:** es el grado de patogenicidad de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible.

#### 4. Introducción

El maíz *Zea mays* L., es uno de los granos alimenticios más antiguos que se conocen y pertenece a la familia de las Poacea (Gramíneas) (Acosta, 2009)

Este cereal es consumido en todo el mundo y es utilizado para el consumo humano y animal y como materia prima en la producción de almidón tanto como industrial y alimenticio y en la elaboración de edulcorantes que tienen como función brindar sabor dulce a una comida y productos derivados de la fermentación como el etanol, alcohol industrial, algunos aminoácidos y antibióticos (Tovar & Colonia, 2013)

Los insectos plaga en el cultivo son los causantes de las limitantes en la producción del cultivo de maíz, estos insectos causan daños muy graves en el desarrollo de la planta y reducen considerablemente el rendimiento en la plantación. El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y *Helicoverpa zea* (Boddie), (Lepidoptera: Noctuidae) son las de mayor presencia en el cultivo de maíz (Hernández, et al., 2019)

El gusano cogollero El gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* tiene origen de las Américas tropicales y subtropicales y es calificada como una plaga lepidóptera polífaga dañina para distintos cultivos como tomate, arroz, soja , y especialmente en el maíz, esta plaga tiene favoritismo en las primeras etapas vegetativas ya que en este momento la planta presenta hojas tiernas lo que es muy apetitoso para las larvas, ya en la etapa reproductiva el gusano causa el daño en la mazorca afectando ampliamente el rendimiento de calidad y cantidad. Esta plaga llegó a África occidental en el año 2016, luego ligeramente se propagó por África y tuvo continuación hasta Oriente Medio para el año 2017, luego aparece la plaga en Asia entre los años 2018 y 2019, y para el año 2020 tiene incidencia en Australia y se espera que llegue hasta Europa, la expansión de la especie tiene relación con el comportamiento migratorio y sus largas distancias ya que las polillas tienen la capacidad de volar más de 100 km por hora en una noche. (Buchailot et al., 2022).

La bacteria a nivel mundial más utilizada es *Bacillus thuringiensis* (Berliner) siendo uno de los organismos biológicos más eficaces utilizados en la agricultura para combatir larvas de

lepidópteros como *S. frugiperda*, este presenta un efecto residual y produce parálisis intestinal en las larvas, este entomopatógeno se usa principalmente en un 80 o 90 % de los programas de control biológico ya que tiene una amplia gama de hospederos que son las larvas de lepidópteros (Sotelo & Zelaya, 2004)

Hoy en día se han creado insecticidas microbiológicos en base a la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) esta es altamente comercializada a nivel mundial toxicidad, alta especificidad, inocuidad para el medio ambiente y el ser humano, y es considerada como una buena opción frente al uso desordenado de insecticidas químicos para controlar los insectos plagas. (Rutte et al., 2020).

La bacteria *B. thuringiensis* es el biopesticida más utilizado en programas de control biológico y fue el primer organismo utilizado a gran escala en el control de insectos del Orden Lepidoptera (González, 2018).

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

El objetivo del presente trabajo pretende encontrar la patogenicidad de tres cepas de *B. thuringiensis*, sobre *S. frugiperda* en condiciones controladas *in vitro*; información básica para iniciar estudios sobre su posible incorporación en Programas de Manejo Integrado de cogollero del maíz.

## 5. Problema

### 5.1 Planteamiento del problema

Las gramíneas representan un renglón significativo en la economía de diversas regiones, estas fueron domesticadas e incorporadas desde la antigüedad, a fin de satisfacer diversas necesidades del hombre. Siendo así como, estas plantas han permitido el desarrollo de diferentes culturas a través del tiempo, puesto que representan una fuente importante de alimento, tal es el caso, por ejemplo, del maíz *Z. mays* y el arroz *O. sativa*. Respecto al maíz, en este cultivo se presentan numerosos problemas de control fitosanitario en cuanto a plagas y enfermedades que, de no ser tratados a tiempo, generan serios problemas a dicho rubro, trayendo entre otras consecuencias, la disminución en los rendimientos e inocuidad de la producción.

En lo tocante a los problemas de plagas, se presenta el gusano cogollero, conocido también como gusano trozador, palomilla del maíz y/o Fall armyworm, en inglés, es un insecto considerado como plaga primaria, el cual según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) afecta a más de 80 diferentes especies de plantas, causando daños de gran importancia económica, como es el caso de cereales (arroz, maíz y sorgo), hortalizas (tomate y pimentón) y cultivos industriales (algodón), entre otros. En cuanto a su control, actualmente el más empleado y difundido, es el control químico, el cual de manera general ha mostrado una buena efectividad, donde se debe considerar al momento de su aplicación, el uso de productos selectivos, dirigidos especialmente a la plaga, evitando así el empleo de productos de amplio espectro que pudiesen dañar a otros organismos benéficos presentes en el sistema de cultivo.

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura – FAO (2017) el insecto es nativo del continente americano, de las regiones tropicales y subtropicales. No obstante, durante el año 2016 se reportó por primera vez en el continente africano, en Nigeria, Santo Tomé, Benin y Togo, es decir que esta plaga está distribuida mundialmente y se ha adaptado a diferentes condiciones climáticas gracias a su plasticidad genética, lo cual le permite adquirir una rápida resistencia a los insecticidas comerciales (Goergen et al., 2016).

Según el Centre for Agricultural Bioscience International (CABI), el gusano cogollero, es uno de los insectos fitófagos de mayor importancia en Colombia, puesto que puede causar daños de gran escala económica, disminución significativa en los rendimientos, de cultivos como el maíz, sorgo, arroz, pastos, caña de azúcar, así como ciertos cultivos de hoja ancha, por lo cual es indispensable un adecuado y estricto control, considerando que existen muchas variables que permiten determinar la pérdida del potencial de rendimiento debido a la infestación de esta plaga. Normalmente, la forma en que el cultivo responde a la infestación del gusano cogollero depende del nivel de población de la plaga, y si al momento de la infestación existen los enemigos naturales, así como los niveles de patógenos que pudiesen ayudar a regular naturalmente las poblaciones, además del vigor de las plantas (CABI, 2019)

Ahora bien, con respecto al control de esta plaga, *S. frugiperda*, el control químico, o uso de plaguicidas, resulta ser el más generalizado y altamente efectivo, en cultivos como el maíz *Z. mays*, aunado a los inconvenientes que se pudiesen presentar como es el incremento en los costos de producción del cultivo, además que su aplicación indiscriminada conlleva a efectos nocivos sobre la salud humana y sobre la entomofauna benéfica. También se tiene la generación de resistencia en las poblaciones de insectos plaga. Cabe destacar, que además del control químico, existen tácticas, manejo integrado de plagas (MIP), donde se emplean diversidad de métodos complementarios, bien sean culturales, físicos, mecánicos, genéticos, legales, químicos, fitoquímicos y/o biológicos, con el objeto de disminuir y hasta eliminar el uso de plaguicidas, minimizando de esta manera los impactos a la economía, así como al medio ambiente.

Concerniente al MIP, específicamente al uso de métodos o control biológico, es oportuno indicar que según Sepúlveda (2012), este se trata del uso enemigos naturales de la plaga, bien sea insectos, hongos, virus y/o bacterias, con el fin de conservar la población del insecto plaga por debajo del nivel o umbral de daño económico.

## **5.2 Justificación**

Actualmente en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), el control biológico forma parte fundamental, y como se dijo anteriormente, este se caracteriza por utilizar enemigos naturales para el manejo y control de plagas en los cultivos agrícolas. Considerando que *S. frugiperda* es

una grave amenaza en diversos cultivos, hoy día se han y deben implementar nuevas estrategias, amigables con el medio ambiente y la salud humana, que impulsen el uso de bioinsecticidas, especialmente aquellos cuya formulación contienen la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (Bt), considerado de acuerdo con Sauka y Benintende (2008), como el insecticida biológico más aplicado a nivel mundial, que se utiliza para controlar diversos insectos que afectan la agricultura, la actividad forestal, y que son vectores de patógenos humanos y animales.

De acuerdo con Carballo & Guharay (2004), las bacterias entomopatógenas son organismos unicelulares que miden entre menos de un micrómetro a varios micrómetros y carecen de núcleo definido. Estas, son clasificadas en dos categorías: 1) bacterias que producen esporas y 2) bacterias que no producen esporas. Respecto a las bacterias formadoras de esporas o esporulantes, a este grupo pertenece *B. thuringiensis*, genero *Bacillus*, el cual presenta forma de bastón, familia Bacillaceae, igualmente señalan que las bacterias esporulantes por su capacidad de formar esporas poseen una alta persistencia en el ambiente, son altamente virulentas y tienen una gran capacidad invasiva y de producción de toxinas. *B. thuringiensis*, produce tres exotoxinas a saber, la beta, la alfa y la gama, así como una endotoxina llamada delta endotoxina, que es la principal responsable del efecto insecticida. Es oportuno acotar que, en cultivos transgénicos, las plantas contienen cristales parasporales de delta endotoxina de *B. thuringiensis*, a los que se les denomina genes CRY, de los cuales, observan los mismos autores, que existen al menos cinco grupos, el CRY I para lepidópteros, el CRY II para lepidópteros y dípteros, el CRY III para coleópteros, el CRY IV para dípteros y el CRY V para lepidópteros y coleópteros. Estos cristales, producen la toxina dentro del tejido de la planta, la cual causa la muerte a la plaga cuando esta se alimenta del cultivo.

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

Después de lo anteriormente expuesto, se tiene que la presente investigación busca evaluar la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), frente a tres cepas locales de *B.*

*thuringiensis*, tomadas en campo, bajo condiciones *in vitro*. En la actualidad, el control de esta plaga se fundamenta en la aplicación de productos de origen químico. No obstante, el uso de Bt, como control biológico de plagas agrícolas, se basa en el empleo de productos comerciales, los cuales presentan gran eficacia para el control de larvas de lepidópteros, siendo su uso muy seguro, puesto que no se manifiesta contaminación del ambiente y tampoco muestran efectos negativos sobre la salud humana y sobre animales.

## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo General

Evaluar la mortalidad de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), frente a tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bajo condiciones *in vitro*.

### 6.2 Objetivos específicos

- Caracterizar morfológicamente tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), de muestras de suelos agrícolas y suelos no disturbados.
- Comparar la mortalidad causada a larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), por las tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), en condiciones *in vitro*.
- Determinar la CL<sub>50</sub> y el TL<sub>50</sub> de tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), bajo condiciones *in vitro*.

## 7. Marco teórico

### 7.1 Antecedentes locales

Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021). El nombre de la investigación fue evaluar la susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) a dos cepas locales potenciales de *B. thuringiensis* en comparación con producto comercial bajo condiciones *in vitro*. Dicha investigación se realizó en Pamplona-Norte de Santander. El objetivo del bioensayo fue caracterizar fenotípicamente las cepas estudiadas; evaluar la mortalidad, CL<sub>50</sub> y TL<sub>50</sub> *in vitro* de tres cepas de *B. thuringiensis*; una comercial y dos locales. Las tres cepas tuvieron dosis de  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{12}$  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<sub>50</sub> 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  $1 \times 10^4$  causó el 84% de mortalidad, no así para las otras dos cepas donde las mortalidades estuvieron por debajo del 76%. Aunque las CL<sub>50</sub> fueron muy similares a  $1 \times 10^8$  entre las tres cepas; el TL<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> 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

Beltrán et al., (1998). Realizaron estudios sobre un medio de cultivo para la fermentación con *B. thuringiensis* en la producción de un ingrediente activo como biopesticida, en la cual emplearon cepas nativas de dicha bacteria. Realizaron las fermentaciones empleado un matraz de 1000 mL de volumen total con 100 mL de volumen de fermentación, utilizando 10 mL de inóculo bacteriano, una temperatura de 29 °C, utilizando una velocidad de agitación de 200 revoluciones por minuto (rpm). El estudio lo llevaron a cabo utilizando un modelo de diseño

experimental con glucosa como fuente de carbono, evaluando la concentración de las fuentes de minerales en el medio de cultivo para la cepa HD1. De la misma manera evaluaron la relación óptima del nitrógeno orgánico y del nitrógeno inorgánico en el medio de cultivo, para la producción de proteína asociada al cristal en la cepa nativa en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional.

Díaz (2016). Evaluaron la acción de cepas nativas de *B. thuringiensis*, como control biológico de *S. frugiperda*, se evaluó la actividad insecticida de las cepas M3001, M3003, M3004, M3007, M3008, M4001, M2006, M5002, M5004 y M28005 de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda* las cuales son originarias de suelos de Funza y Silvania (Cundinamarca) y Tunja (Boyacá) en cultivos de fríjol, arveja, maíz y naranja, comparadas con un testigo comercial HD1 (Subsp. Kurstaki), contra *S. frugiperda*. Se determinó la CL<sub>50</sub> por el método “PROBIT”, la cual fue de 5.88 E-4 mg de i.a/ml de dieta, de la cepa HD1 con diferentes dosis (0,0; 6,8 E-2; 3,4E-2; 6,8E-3; 6,8E-4; 6,8E-5 y 6,8E-6 mg de i.a/ml de dieta) en larvas de *S. frugiperda*. Evaluando la mortalidad a las 96 y 120 horas; posteriormente la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) determinada con la cepa HD1 se procedió a utilizar esta concentración en cada uno de los aislamientos nativos de *B. thuringiensis* para ser comparada con la CL<sub>50</sub> del testigo comercial. Se empleó diseño completamente al azar, con siete tratamientos (cada uno con 25 larvas de primer instar) y tres repeticiones. Para el segundo ensayo de la determinación de aislamientos promisorios de *B. thuringiensis*, se arregló un diseño completamente al azar, con 11 tratamientos (cada uno con 20 larvas de primer instar) y 3 repeticiones. Los resultados indicaron que los aislamientos M3008 y M4001 presentaron mayores promedios de mortalidad, de 75% y 71,65% respectivamente, en las larvas en dieta purificada, comparada con la mortalidad de la CL<sub>50</sub> del testigo comercial.

Ramírez et al., (2010). Estandarizaron un bioensayo y evaluaron tres formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick). Es una de las plagas más destructoras de tomate en Colombia y países suramericanos, causando pérdidas totales en cultivos sin protección. En el año 2009, fue detectada en España, Portugal y en países del mediterráneo, de la misma manera se encontró en Inglaterra, Bulgaria y Alemania. Para su control emplean insecticidas de origen químico, los cuales generan resistencia e impacto ambiental y de salud, debido a esto buscaron implementar nuevas estrategias amigables, optando

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

### **7.3 Antecedentes internacionales**

García et al., (2018). Realizaron la investigación en aislados nativos de *B. thuringiensis* del sureste de México. Tuvieron como objetivo principal encontrar aislados nativos de *B. thuringiensis*, a partir de diferentes materiales obtenidos del sureste de México, entre los años 2014 - 2015. Eligieron colonias bacterianas en base a la presencia de cristales parasporales, gen *cry*, gen *hag*, perfil de proteínas y actividad insecticida del género *Bacillus*. Lograron un aislado de muestras de suelo (ITCBT34) y dos muestras de larvas *Chlosyne lacinia* (Geyer) (ITCBT61) y (ITCBT62), presentando amplificación de los genes *cry* y *hag*. El aislado de muestra de suelo, se identificó cristales de morfología oval, mientras que los aislados de larva de *C. lacinia* se identificaron cristales bipiramidales. Se notaron diferencias en el tamaño del fragmento en la amplificación del gen *hag* y en el perfil de proteínas de los diferentes aislados. Determinaron la actividad insecticida mediante bioensayo burdo a una concentración de 10 µg cm<sup>-2</sup>. Las larvas de *Manduca sexta* (L.) presentaron mortalidad total en los tres aislados a las 96 h de exposición. Mostraron similitudes en su tamaño y características morfológicas los aislado de larva *C. lacinia* en referencia a la cepa de referencia *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* HD1, el aislado de muestra de suelo no presentó similitud alguna, por lo cual este aislado no se relaciona al serovar *kurstaki* HD1.

Vásquez et al., (2015) evaluaron y caracterizaron cinco cepas mexicanas de *B. thuringiensis* con actividad hacia el gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* mediante bioensayos, perfiles proteicos, patrones de DNA plasmídico, y PCR. Los bioensayos mostraron que dos de las cinco cepas estudiadas LBIT13 y LBIT-418, mostraron alta toxicidad hacia *S. frugiperda*. Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki (Btk) fueron denominadas LBIT-13, LBIT-44, LBIT-383, LBIT-418 y LBIT428. Estas se aislaron de suelo, telarañas y filoplano, y fueron proporcionadas por Jorge E. Ibarra Rendón, Laboratorio de Bioinsecticidas, CINVESTAV IPN Unidad Irapuato. Se utilizó como cepa control el estándar HD-1. Para la producción de cepas de Btk. Las cepas se sembraron en cajas Petri con medio sólido estéril infusión cerebro-corazón (BHI por sus siglas en inglés) más agar bacteriológico (3,7% BHI; 1,5% agar bacteriológico y agua destilada).

Carmona, (2002). Realizaron el aislamiento y caracterización parcial de una cepa *B. thuringiensis* toxica a *S. frugiperda*, se realizó el aislamiento de la cepa UCLA-10 de una muestra de suelo proveniente de un cultivo de repollo (*Brassica oleracea* L.) ubicado en la localidad de La Y en el estado Trujillo se verificó, mediante una encuesta hecha a los agricultores de la zona, que nunca se habían utilizado productos conteniendo Bt para el control de insectos en esos campos de cultivo. Las muestras de suelo fueron pulverizadas y tamizadas para facilitar su procesamiento. Posteriormente se tomó 1 g de la muestra y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de agua destilada estéril, homogeneizando la muestra mediante agitación vigorosa durante 1 minuto. Se colocó 1 mL de la muestra en un tubo Eppendorf y se sometió al proceso de pasteurización en un Termo Blot a 80 °C durante 10 minutos y enfriada instantáneamente después en hielo, para el proceso de bioensayo el efecto de la cepa UCLA-10 fue evaluado utilizando larvas del primer instar de *S. frugiperda*, criadas durante 24 horas en dieta artificial. El tipo de bioensayo realizado permitió determinar cualitativamente la toxicidad de la cepa aislada contra insectos del orden Lepidoptera (*S. frugiperda*). Los ensayos se realizaron a partir de la muestra liofilizada del complejo espora cristal, lo cual permitió tener concentraciones conocidas de la cepa.

#### 7.4 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 Cárcota 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  $16^{\circ}\text{C}$ , con una extensión del área urbana de 59.214 km<sup>2</sup> y la extensión del área rural de 1,176 km<sup>2</sup>, la economía del municipio se basa en su gastronomía, agricultura, turismo y educación (Alcaldía de Pamplona, 2022)

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica, 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  $17^{\circ}\text{C}$  y 65% de humedad relativa (Figura1).



**Figura 1.** Laboratorio de Sanidad Vegetal Unipamplona.

**Nota.** En la imagen se observa el campus de la Universidad de Pamplona y en el círculo pertenece al laboratorio de Sanidad Vegetal.

Fuente: Google Earth (2022).

## **7.5 Bases conceptuales**

### **7.5.1 *Bacillus thuringiensis* (Berliner)**

#### **7.5.1.1 Origen y distribución.**

El género *Bacillus* spp., lo reporto por primera vez en el año 1872 el botánico y bacteriólogo alemán Ferdinand Julius Cohn, el las describió como bacterias que producen endosporas resistentes al calor, el género incluye más de 336 especies las cuales por su similitud genética pueden clasificarse en distintos grupos (Villarreal, et al., 2018).

La especie *B. thuringiensis* la descubrió en 1901 Shigetane Ishiwata científico japonés, para el año 1915 la bacteria fue descrita por el bacteriólogo alemán Ernst Berliner que la aisló de la polilla mediterránea de la harina *Anagasta kuehniella* (Meyrick) realizando por primera vez la descripción formal, nombrándola *Bacillus thuringiensis* (Berliner), nombre procedente de Thuringia, región de Alemania donde esta especie fue aislada (Guevara, 2016).

Dentro de la literatura esta pertenece a la familia Bacillaceae y se diferencia de las otras bacterias por la capacidad para formar durante la fase de esporulación, una o más inclusiones cristalinas de naturaleza proteica, llamadas  $\delta$ -endotoxinas, que son tóxicas para distintos invertebrados, principalmente larvas de insectos. Este microorganismo tiene una alta capacidad de encontrarse en diversos ecosistemas terrestres y es considerado como un habitante frecuente del suelo. En la actualidad se ha determinado varios números de colecciones de *B. thuringiensis* en diferentes partes del mundo, con el propósito de encontrar cepas que produzcan nuevas proteínas Cry con mayor potencial insecticida. *B. thuringiensis*, en especial la variedad kurstaki (Btk), en la actualidad es utilizada como una alternativa ecológicamente sostenible contra los insecticidas químicos para el control de plagas de lepidópteros en cultivos de interés agronómico como el cultivo de maíz caso del cogollero del maíz *S. frugiperda* que causa más afectación, disminuyendo considerablemente la productividad (Gonzáles, 2018).

#### **7.5.1.2 Modo de acción de *Bacillus thuringiensis* (Berliner)**

Esta bacteria posee la capacidad de producir una amplia variedad de proteínas insecticidas letales para larvas del orden lepidóptero, es muy importante conocer el modo de

acción de *Bacillus thuringiensis* para lograr entender todas las posibilidades de desarrollo de resistencia en los insectos.

Durante la fase de esporulación Bt produce una o varias formas cristalinas y estas poseen las proteínas Cry, y en la fase de esporulación la bacteria produce proteínas Vip.

En su modo de acción Bt y sus proteínas actúan solo por ingestión del insecto, en las proteínas Cry tras la ingestión el segundo paso es la solubilización de cristales aquí ocurre la rotura de la estructura cristalina y la liberación de las protoxinas presentes en el cristal; para que se produzca la solubilización y se liberen las protoxinas en el intestino medio de los insectos, como ejemplo de ello el pH, las proteínas Vip son secretadas al exterior de la bacteria en forma soluble, no requieren pasar por el proceso de solubilización. Las protoxinas solubilizadas Cry, como las protoxinas Vip son procesadas por las enzimas proteasas endógenas que están presentes en los fluidos intestinales de dichos insectos, lo que origina de esta manera una toxina activa el proceso es producido por tripsinas y quimiotripsinas, estas son las de mayor abundancia en los fluidos intestinales de los insectos.

Las toxinas deben atravesar la membrana del intestino medio que está compuesta por una capa abundante de quitina y su función es separar el alimento de las células epiteliales, esa barrera producida impide que el alimento pueda tener un efecto abrasivo sobre el intestino y lo resguarda de infecciones bacterianas, víricas y parasíticas (Pinos & Hernández, 2019).

### **7.5.1.3 Empleo**

*B. thuringiensis* es un bacilo Gram positivo que durante su fase de esporulación produce una inclusión parasporal, conformada por proteínas Cry con actividad biológica contra insectos-plaga. Gracias a estas proteínas *B. thuringiensis* presenta toxicidad contra larvas de insectos-plaga de los Orden Lepidoptera, Coleoptera y Diptera, entre otros. Además, es amigable con el medioambiente, razones por la cuales se ha hecho común el uso y desarrollo de productos comerciales y plantas transgénicas a base de toxinas Cry en el sector agrícola. En esta revisión se describirá los aspectos más importantes de Bt y su aplicación como herramienta biotecnológica para el sector agrícola, con una consideración sobre bioensayos usando esta bacteria. (Lang et al., 2011).

#### 7.5.1.4 Clasificación

En la Tabla 1, se presenta la clasificación taxonómica de *B. thuringiensis*.

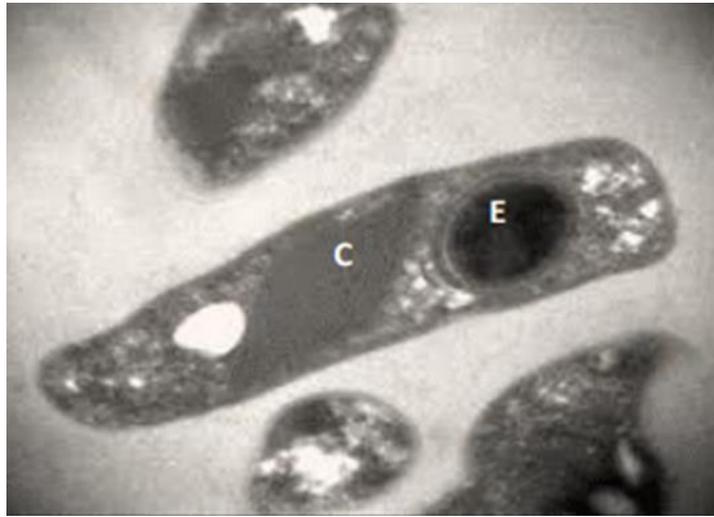
**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *Bacillus thuringiensis* (Berliner).

Dominio	Bacterias
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus</i> <i>thuringiensis</i> (Berliner)

Fuente; CABI (2019).

#### 7.5.1.5 Descripción

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

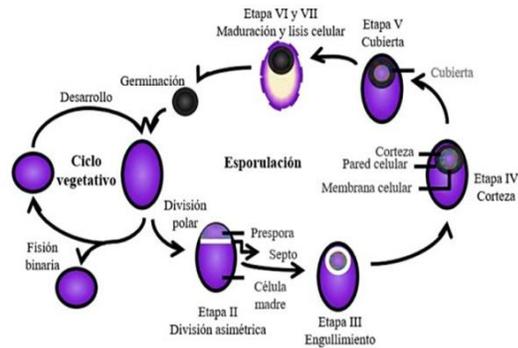


**Figura 2.** Micrografía de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki  
Nota: Micrografía de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki en microscopio electrónico de transmisión: (C) cristal proteínico bipiramidal, (E) espora.  
Fuente: Torres, et al., (2006).

#### **7.5.1.6 Ciclo de vida de *Bacillus thuringiensis* (Berliner)**

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

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



**Figura 3.** Ciclo de reproducción del género *Bacillus*  
Fuente: Villarreal (2018).

## 7.5.2 *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

### 7.5.2.1 Origen y distribución

*Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) conocido como gusano cogollero del maíz, es un insecto del orden Lepidoptera, es originaria de las regiones tropicales y subtropicales de América; en el año 2016 la reportan como primera vez en el continente africano y causa una gran afectación en cultivos de maíz y posee un gran potencial en su propagación así como los graves daños económicos y posteriormente está confirmada en más de 30 países africanos, en 2017 se registra en Oriente Medio, para el 2018 fue confirmada su presencia en el subcontinente indio, luego aparece la plaga en Asia entre los años 2018 y 2019 (CABI, 2019); para el 2020 tiene incidencia en Australia y se espera que llegue hasta Europa; la expansión de la especie tiene relación con el comportamiento migratorio y sus largas distancias ya que las polillas tienen la capacidad de volar más de 100 km por hora en una noche (Buchaillet et al., 2022).

### 7.5.2.2 Descripción morfológica

En condiciones naturales en el cultivo de maíz *S. frugiperda* en su etapa de huevo presentan diámetro de 0,4 mm y 0,3 mm de altura, de coloración amarillo pálido cremoso cuando ocurre la ovoposición y de color marrón claro antes de la eclosión en la madurez del huevo se requiere de 2 a 3 días a temperaturas entre 20-30 °C.

Este insecto plaga, presenta metamorfosis holometábola, es decir presenta los estadios de huevo, larva, pupa y adulto. Los huevos depositados por la hembra habitualmente son de 150-200 y están cubiertos por una capa protectora de escamas con coloración grisácea, la masa de los huevos es depositada en la parte inferior preferiblemente o superior de las hojas. Las larvas presentan coloración verde claro a marrón oscuro con rayas longitudinales, en su sexto estadio alcanzan los 4,5 cm de longitud, estas larvas tienen ocho propatas y un par de propatas en el último segmento abdominal; en su estado de pupa presentan longitud entre 1.3-1,5 cm en machos y las hembras presentan longitudes entre 1,6-1,7 cm y presentan coloraciones marrón brillante, esta etapa de pupa ocurre en el suelo y su duración puede darse de 8 a 9 días durante el verano en condiciones más frescas tiene una duración más larga entre 20 a 30 días, cuando ya llegan a la etapa de imago o adulto los insectos machos tienen longitud de 1,6 cm y envergadura de 3,7 cm y sus alas anteriores son moteadas (marrón claro gris), y las hembras presentan longitud de 1,7 cm y envergadura de 3,8 cm las alas anteriores son menos marcadas y tienen color marrón grisáceo uniforme hasta fino moteado gris y marrón (CABI, 2019).

### 7.5.2.3 Clasificación

La ubicación taxonómica del gusano cogollero del maíz se presenta en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)

Dominio	Eukaryota
Reino	Metazoa
Filo	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Lepidoptera
Familia	Noctuidae
Género	<i>Spodoptera</i>
Especie	<i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> (J. E. Smith)

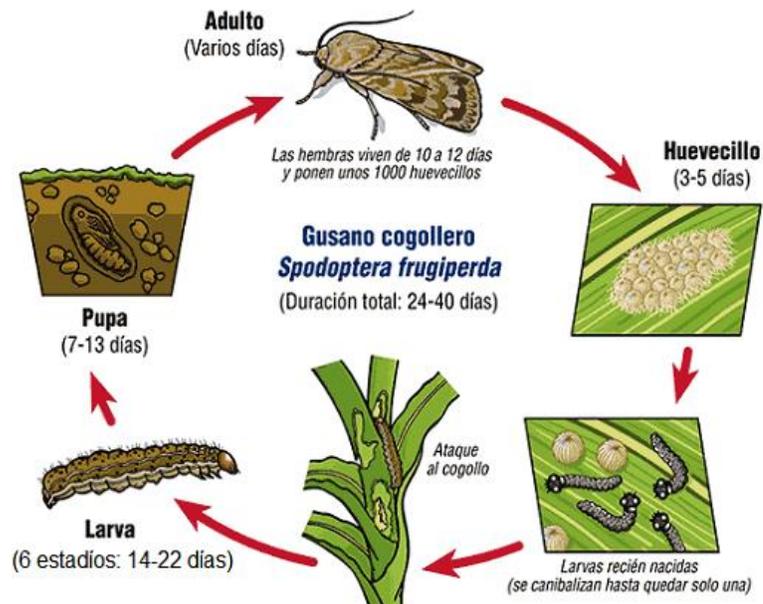
Fuente: CABI (2019).

#### 7.5.2.4 Morfología y biología

El gusano cogollero tiene varias generaciones por año, su ciclo biológico consiste en huevo, seis o siete estadios larvares, pupa y adulto, la duración en el estado de huevo es de dos a tres días en los meses de verano. Una vez que el huevo eclosiona, el número de instares por los que pasa la larva depende de la planta hospedante de la cual se alimenten; en maíz comúnmente tiene 6 instares, y estos requieren: 53.9, 42.6, 38.2, 38.6, 44.8, 58.9 unidades calor (con temperatura base de 10.9 °C) para que se completen del 1 al 6, respectivamente. En estadio de prepupa duran en promedio dos días. Para pupar se entierran en el suelo, donde forman una cámara pupal en la cual permanecen de 10 a 15 días aproximadamente, la profundidad de la pupación depende de factores como la textura, humedad y temperatura del suelo. Posteriormente emergen como adultos. El ciclo de vida (Figura 4) lo completan en 30 días durante el verano y de 80 a 90 días durante el invierno (DGSV-CNRF, 2020)

#### 7.5.2.5 Ciclo de vida de *S. frugiperda*

El ciclo del gusano cogollero se presenta en la siguiente figura:



**Figura 4.** El ciclo de vida del cogollero del maíz  
Fuente: CropLife (2014)

## 8. Marco legal

### **Acuerdo No. 186**

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

### **Capítulo VI. Trabajo de Grado**

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

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

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

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

**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.

### **Resoluciones del Instituto Colombiano Agropecuario**

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

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

#### **Plaguicidas.**

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

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

Artículo 139°.- El Ministerio de Salud podrá realizar la importación o fabricación de muestras de plaguicidas para fines de investigación, experimentación o registro. Cuando la experimentación con estos productos pueda causar daño a la salud de los trabajadores, de la población o del ambiente tal actividad debe someterse a la vigilancia de las autoridades de salud, las cuales exigirán la adopción de las medidas necesarias para prevenir o remediar tales daños.

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

#### **Ministerio de salud decreto 775 del 16 de abril de 1990**

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

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

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

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

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

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

## **9. Metodología**

### **9.1 Tipo de Investigación**

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

### **9.2 Diseño Metodológico**

#### **9.2.1 Hipótesis**

En condiciones naturales es posible encontrar bacterias entomopatógenas, las cuales pueden ser evaluadas a nivel de laboratorio como potenciales agentes de control biológico de *S. frugiperda*.

#### **10.2.1.1 Hipótesis Nula**

Todos los Tratamientos tienen un efecto igual.

#### **10.2.1.2 Hipótesis Alterna**

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

### **9.3 Sistema de Variables**

#### **9.3.1 Variables Cuantitativas Continuas**

##### **9.3.1.1 Variables dependientes.**

- a. Porcentajes de Mortalidad.
- b. Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>).
- c. Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>).

##### **9.3.1.2 Variables independientes**

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

#### **9.3.2 Variables Cualitativas**

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

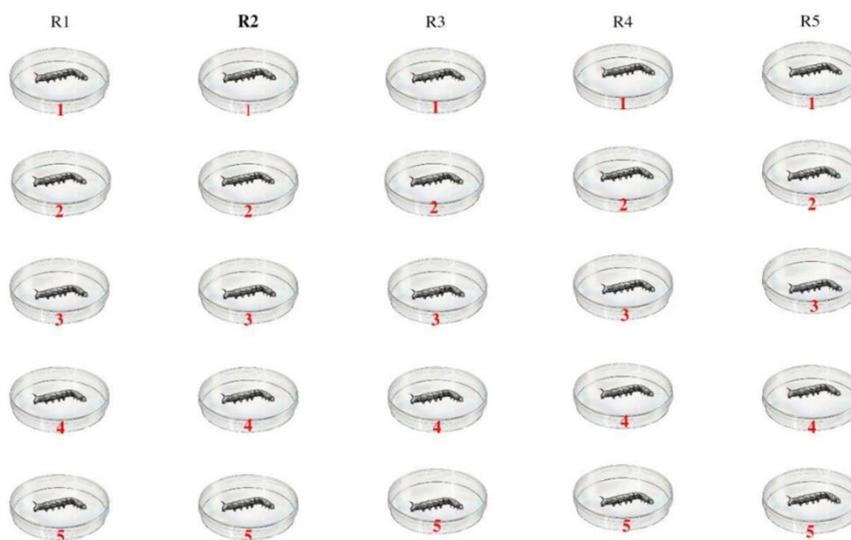
## **9.4 Diseño de la investigación**

### **9.4.1 Localización del ensayo**

En el Cepario del Programa de Microbiología de la Facultad de Ciencias Básicas, se encuentran depositadas las tres cepas locales purificadas. Dichas cepas fueron aisladas de suelos en campos agrícolas cultivados lechuga y con papa, y una tercera muestra de un suelo sin intervención agrícola, con las cuales se prepararon de las concentraciones para el bioensayo; mientras que, la cría masiva de *S. frugiperda* y la pruebas *in vitro* se desarrollaron 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 realizará, bajo condiciones *in vitro*.

## **9.5 Diseño Experimental**

El Diseño Experimental es un modelo estadístico completamente al azar, cada cepa con cinco tratamientos (concentraciones) y cada tratamiento con 5 repeticiones y cada repetición con cinco larvas individualizadas. Cada Unidad Experimental estará constituida por una larva; de tal manera que fueron 150 unidades experimentales en cada cepa, para un total de 450 larvas neonatas. Cada unidad experimental consistió de un vaso plástico con tapa, de 50 mL, sus tapas con un orificio circular de 1 cm de diámetro e internamente se le pegó tela tul, para conseguir condiciones similares al exterior. Cada una de las cajas contenía un disco de papel filtro de 5 cm de diámetro y un disco de hoja de maíz de 3 cm de diámetro. Los discos de hojas de maíz se sumergieron en las diferentes concentraciones de las tres cepas, por espacio de 5 segundos antes de introducirlos a su respectivo vaso de cada concentración correspondiente, conteniendo una larva recién emergida de *S. frugiperda* (Figura 5).



**Figura 5.** Representación gráfica del diseño experimental de una concentración de una cepa.

Fuente: Autor (2022)

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

Cada una de las tres cepas de *B. thuringiensis* tuvo cinco tratamientos (concentraciones), las cuales fueron:

$1 \times 10^{12}$  UFC/ml

$1 \times 10^{10}$  UFC/ml

$1 \times 10^8$  UFC/ml

$1 \times 10^4$  UFC/ml

Testigo absoluto

La selección de estas dosis está fundamentada sobre la concentración de la cepa comercial Dipel®, y otras marcas comerciales que formulan sus productos con  $1 \times 10^8$  UFC/ml,

esto con la finalidad de uniformizar las concentraciones de las cepas locales, con la cepa comercial de uso agrícola.

### **9.5.1 Colecta y Cría masiva de *S. frugiperda***

Para iniciar la cría de *S. frugiperda*, se colectaron huevos, larvas, pupas y adultos (Anexo 6,7) en los cultivos de maíz en el Centro de Investigación en Sanidad Vegetal y Bioinsumos (CISVEB) y en áreas aledañas a Pamplona en horarios diurnos, recolectando en forma directa los huevos, larvas y pupas que se localizan en el envés de las hojas de maíz, y otros gusanos fueron extraídos del cogollo de las plantas de maíz, utilizando una lupa entomológica de 30x de aumento para su mejor búsqueda. Las larvas se buscaron principalmente en el envés ya que son sensible a la luz solar, siendo colectadas con un pincel doble cero (00), depositándolas en frascos de vidrio transparentes cubierta como tapa, una malla o toldillo para su oxigenación, adicionándoles hojas frescas de maíz como alimento.

La recolección de los adultos se realizó mediante el uso de una jama entomológica en los cultivos, depositándolos en frascos plásticos con la misma característica de los recipientes anteriores en la tapa, los cuales se transportaron al laboratorio para empezar su cría masiva.

### **9.5.2 Técnica de Cría de *S. frugiperda*.**

Los huevos y larvas obtenidos en campo se llevaron al Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica, de la Universidad de Pamplona, donde se estableció el pie de cría, hasta lograr una generación de adultos de *S. frugiperda*, los cuales se sexaron y se colocaron por parejas en jaulas (Anexo 8) o en frascos de vidrio de cuatro litros con hojas de maíz, previamente sumergidas en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% para eliminar posibles entomopatógenos y luego fueron lavados en agua destilada, introduciendo dentro del frasco una hoja de papel plegado para que las hembras realizaran las oviposturas, colocándole a los frascos una tela tul asegurada con una banda de goma para evitar la condensación de agua dentro del frasco. Las masas de huevos recién puestos se individualizaron, recortando el pedazo de papel que contenía la masa de huevos (Anexo 9), y colocándolos en vasos plásticos de 25

mL con en su tapa (Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas, 2021). El pie de cría a nivel de laboratorio se mantuvo hasta que se logró una producción de huevos de la misma edad, para tener mínimo 500 larvas neonatas y poder iniciar el experimento.

## **9.6 Descripción de las Actividades**

### **9.6.1 Caracterización de tres cepas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), aisladas de muestras de suelos agrícolas y un suelo de bosque.**

#### **Primer objetivo**

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

Se recolectaron tres muestras de suelo, la primera de suelo agrícola con un huerto de lechugas, la segunda muestra de un suelo agrícola con cultivo de papa en la vereda Monteadentro; Latitud 7.3426754 y Longitud 72.6629528, piso altitudinal 2618.94 msnm; mientras la tercera muestra de suelo colectada en un suelo de bosque de pino con Latitud 7.3879636 y Longitud 72.661056, piso altitudinal 2678.7 msnm; los tres sitios pertenecientes al municipio de Pamplona, Norte de Santander, Colombia.

Se procedió a la toma de muestras de los suelos agrícolas, recogiendo la muestra sin superar los 5 cm de profundidad, colocándola en frascos de vidrio estéril, tapándolas, y transportándolas hasta el Cepario del Programa de Microbiología. Para obtener la tercera cepa, se recogió muestras de suelo en sistemas no disturbados por la actividad agropecuaria (bosque de pinos), descartándose la capa superficial del suelo, sin superar los 5 cm de profundidad, se tomó muestra bajo condiciones estériles, colocándola en frascos plásticos estériles y transportadas igualmente al Cepario.

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

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

#### **9.6.1.2 Selección de cepas y microscopia**

La selección de las colonias cultivadas en LB se basó en las características macroscópicas de las mismas, teniendo en cuenta que las colonias típicas de *B. thuringiensis* son grandes, irregulares, blancas, cremosas y opacas. Una vez seleccionadas las colonias que por sus características podrían corresponder al microorganismo de interés, se realizó una siembra por agotamiento en agar LB y se incubaron a 30°C por 24 horas. Se realizaron pruebas bioquímicas respectivas para cada cepa, prueba agar almidón, caldo nitrato, citrato simons, caldo ureasa, hidrólisis de gelatina, reducción indol, manitol, fermentación fructuosa, fermentación manosa, fermentación maltosa, catalasa y esculina teniendo en cuenta las cepas de control (Carreras et al., 2007; Rutte et al., 2020; Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas, 2021).

#### **9.6.1.3 Caracterización microscópica de aislamientos locales**

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

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

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

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

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

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

### **9.6.2 Determinación de la mortalidad de larvas neonatas de *S. frugiperda*, causada por las tres cepas locales de *B. thuringiensis*, bajo condiciones *in vitro*.**

#### **Segundo objetivo**

Comparar la mortalidad causada a larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), por las tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), en condiciones *in vitro*.

Una vez emergidas las larvas, se registraron con un número y fecha, individualizándolas en cajas plásticas de 5 cm de diámetro y colocándolas en discos de hoja de maíz de 3 cm de diámetro, los cuales previamente habían sido sumergidos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% para eliminar posibles entomopatógenos y luego fueron lavados en agua destilada, dejándolos secar por media hora en una malla de plástico. Los discos de hojas de maíz se colocaron sobre un disco de papel absorbente de 5 cm de diámetro dentro de las cajas plásticas, con el fin mantener a la larva en un solo sitio y hacer un mejor manejo al momento de la observación. Tanto los discos de hoja de maíz como los del papel absorbente se cambiaron cada tres días, y se procedió a realizar el montaje del ensayo.

Las larvas para el bioensayo tuvieron un ayuno de tres horas, al término del cual fueron colocadas en discos de hojas de maíz de 3 cm de diámetro, previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,5%, para evitar mortalidades causadas por factores como entomopatógenos. Los discos de hoja de maíz fueron sumergidos durante cinco segundos en cada uno de los tratamientos a diferentes concentraciones ( $1 \times 10^{12}$  UFC/ml,  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml,  $1 \times 10^8$  UFC/ml,  $1 \times 10^4$  UFC/ml y un testigo).

Una vez retirados los discos, se pusieron a secar a temperatura ambiente por dos horas. Cada disco se colocó individualizado en cajas plásticas de 5 cm de diámetro, sobre discos de papel filtro del mismo diámetro y, sobre cada disco se colocó una larva de *S. frugiperda* neonatas (Anexo 10). Es importante hacer la anotación que todas las larvas utilizadas en este ensayo eran neonatas recién emergidas del huevo, para uniformizar esta variable, ya que la tolerancia a los tóxicos aumenta con la edad de las larvas de lepidópteros. Cada caja plástica fue identificada con tratamiento, repetición, número de larva y fecha de iniciación del ensayo.

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

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

### **9.6.3 Cálculo del CL<sub>50</sub> y el TL<sub>50</sub> de tres cepas locales de *B. thuringiensis*, sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), bajo condiciones *in vitro*.**

#### **Tercer objetivo**

Para determinar la CL<sub>50</sub> y el TL<sub>50</sub>, las mortalidades se tomaron hasta las 96 horas de exposición de las larvas, sin cambiar los discos tratados; ya que, dentro del concepto de la CL<sub>50</sub>,

que es la dosis de un material determinado, administrado una sola vez, que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba. Al quinto día se cambiaron el disco tratado por un disco de maíz desinfectado, pero no tratado, los cuales se renovaron cada tres días hasta la formación de pupas y adultos de *S. frugiperda*, que sobrevivieron a las diferentes concentraciones de las tres cepas de *B. thuringiensis*. Al comprobarse la mortalidad de una larva, se anotaron en el instrumento diseñado (Anexo 1), el tratamiento, la repetición, el número de larva en esa repetición y hora de observación de su muerte.

Los valores de  $CL_{50}$  se determinaron con un Análisis Probit, transformando las cinco concentraciones de cada cepa a logaritmo base 10 y las mortalidades se transformaron a Probit; utilizando el Software SPSS Statistics 26.0, con el cual se realizó un Análisis de Varianza, previa comparación de la normalidad de datos y homogeneidad de varianzas, seguido del test de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia  $p \leq 0,05$ . Se realizó análisis de regresión para determinar la relación entre la mortalidad y la concentración de las diferentes dosis, lo que permitió construir la respuesta concentración-efecto. Para cada dosis, en cada una de las tres cepas, que es la base para la determinación de la  $CL_{50}$ . Con los datos de mortalidad acumulados cada doce horas (desde la hora doce de montado el bioensayo hasta la hora 96), se determinó el tiempo al cual murió el 50% de la población ( $TL_{50}$ ) para cada cepa y concentración evaluada.

## **10. Resultados y Discusión**

## **Primer objetivo**

### **10.1 Caracterización morfológicamente tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) de muestras de suelos agrícolas y suelos no disturbados.**

#### **10.1.1 Porcentaje de identificación.**

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

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

Las características morfológicas de las tres cepas locales coinciden con las observadas por Theunis et al., (1998); Iriarte et al., (1998); Schnepf et al., (1998); Salehi et al., (2008); Muniady et al., (2011); Galvis y Moreno (2018); Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021) y Navya et al., (2021), los cuales describen colonias circulares de color blanquecino, cremosas, con bordes irregulares, márgenes planos, ondulados y textura mucosa, con aspecto típico de huevo frito, en las diferentes investigaciones en donde aislaron colonias con características morfológicas pertenecientes a la especie *B. thuringiensis*.

#### **10.1.2 Porcentaje de identificación de *Bacillus thuringiensis*.**

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

**Tabla 3.** Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a las tres cepas del bioensayo.

	Si		Glucosa		Ramnosa		Arabinosa		Manitol		Almidón		Gelatina		Urea		Sim		Tinció n de gram	
	exp	lit	exp	lit	exp	lit	exp	lit	exp	lit	exp	lit	exp	lit	exp	lit	exp	lit	exp	lit
Cepa 1	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Cepa 2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Cepa 3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Fuente: Autor (2022)

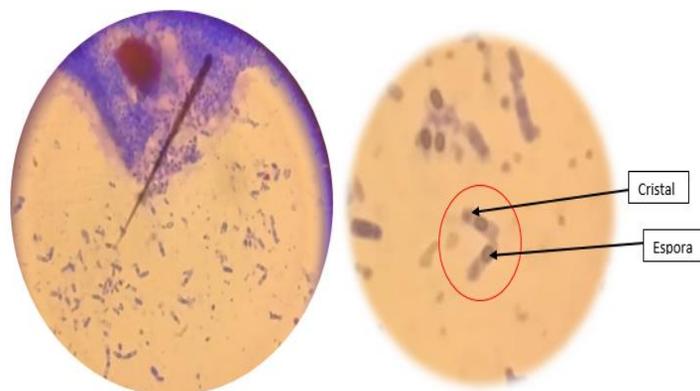
$$\% \text{ de identificación} = \frac{\text{número de pruebas positivas} \times 100}{\text{número de pruebas realizadas}} \quad \% \text{ de identificación} = \frac{8 \times 100}{10} =$$

80%

Los resultados son similares a las investigaciones realizadas por varios autores en cuanto a las pruebas bioquímicas para *B. thuringiensis*, en las que demuestran que este bacilo es un microorganismo con actividad de catalasa (Schnepf et al., 1998; Álvarez et al., 2011) y que las distintas cepas de *B. thuringiensis* poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y Nacetil-glucosamina (Sauka y Benintende, 2008; Vitelli-Flores et al., 2010; Blackburn et al., 2013; Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas, 2021).

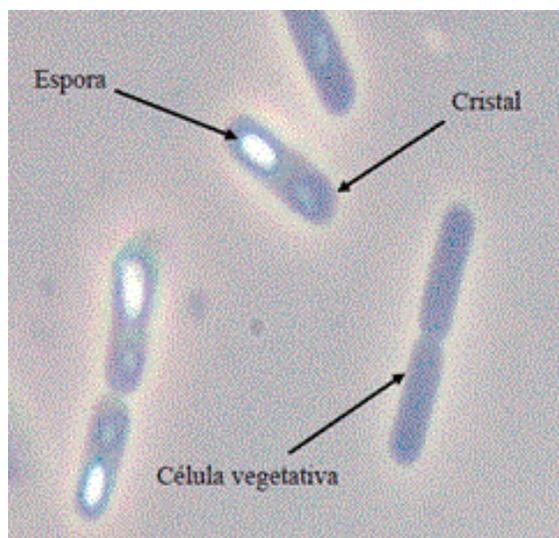
Rafael, et al., (2020), estudiaron 600 colonias del género *Bacillus*, encontrando 37 cepas nativas que presentaron características morfológicas similares a las cepas estándares comerciales de Bt (HD1 y NA118). La caracterización morfológica y bioquímica de esas cepas nativas presentaron el cristal paraesporal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

*thuringiensis*, estructuras similares internas observadas por Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021), después de la tinción simple con azul de metileno (Figura 6) en la cepa 3 proveniente de suelo de bosque de pinos.



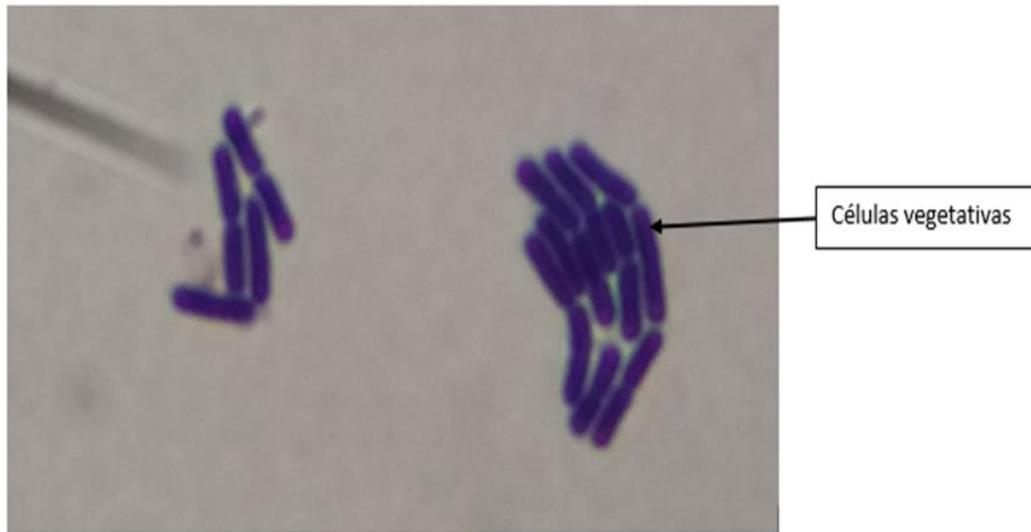
**Figura 6.** Observación en el microscopio óptico Zeiss Primo Star 1000X.  
Fuente: Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021).

En la Figura 7, se observa un cultivo de *B. thuringiensis* (CVCM 1813), en fase estacionaria de crecimiento, visto en microscopio de contraste de fases a 1000x (Viteli-Flores et al., 2010)



**Figura 7.** Cultivo de *B. thuringiensis* (CVCM 1813), en fase estacionaria de crecimiento.  
Fuente: Viteli-Flores et al., (2010).

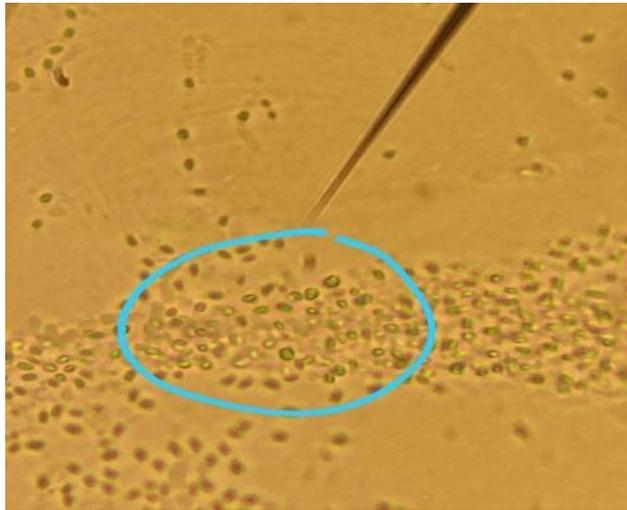
Una vez realizada la Tinción de Gram al microscopio óptico Zeiss Primo Star 100 X, se apreciaron células vegetativas con 18 horas de crecimiento (Figura 8).



**Figura 8.** Células vegetativas de la cepa 3 (bosque de pinos) con 18 horas de crecimiento.

Fuente: Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021).

La codificación de *B. thuringiensis* se realizó basándose en la existencia y la morfología de la inclusión cristalina al lado de las esporas de cada una de las cepas aisladas (Figura 9), por ser uno de los criterios más utilizados en la caracterización de cepas de *B. thuringiensis* (Carreras, 2008). Estos son cristales fueron observados por Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021) a 100x en las cepas locales aisladas (+++), más de 20 cristales y esporas por campo óptico (Figura 9).



**Figura 9.** Cristales en objetivos 100x de cepas locales.  
Fuente: Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021).

Con la cuantificación de cristales realizada se encontró que el 100% de los bacilos locales esporulados presentaron más de 20 cristales y esporas por campo óptico (Carreras, et al., 2008). De la misma manera los resultados concuerdan con otros autores como Ramírez et al., (2010); Vitelli-Flores et al., (2010); Azizoglu et al., (2011); Vázquez-Ramírez et al., (2015); Rabinovich et al., (2017) y Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021) quienes al caracterizar cepas nativas observaron los cristales bipiramidales típicos de la mayoría de las cepas pertenecientes a *B. thuringiensis*.

## **Segundo objetivo**

### **10.2 Comparación de la mortalidad causada a larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), por las tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), en condiciones *in vitro*.**

#### **10.2.1 Mortalidad de larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), causadas por la cepa 1 de *B. thuringiensis*.**

La mortalidad de larvas de *S. frugiperda*, causadas por las diferentes concentraciones de la cepa 1 local (cultivos de zanahoria) es presentada en la Tabla 4; en donde

se puede apreciar que realizado el Anova simple (Anexo 2) y la Comparación de Medias con la Prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) (Anexos 3, 4, 5), 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  $10^4$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$ , y  $10^{12}$ , las cuales causaron el 100% de mortalidad de las larvas de *S. frugiperda*, a excepción de la concentración  $10^{10}$  que causó el 92,00% de mortalidad, pero sin llegar a ser diferente significativamente de este grupo. Los resultados obtenidos pueden indicar que la población de larvas neonatas de *S. frugiperda* demostró ser altamente susceptibles a bajas concentraciones por debajo de la concentración recomendada de la cepa comercial existente en el mercado nacional.

**Tabla 4.** Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *S. frugiperda* en las diferentes concentraciones de la cepa 1, potenciales *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bajo condiciones *in vitro*.

Concentración (UFC/mL)	N	Mortalidad (%)
$1 \times 10^{12}$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^{10}$	5	92,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^8$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^4$	5	100,00 <sup>a</sup>
0	5	4,00 <sup>b</sup>

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

Nota: Cepa 1 (cultivo de lechuga).

Fuente: Autor (2022).

En la Tabla 5, se presentan las diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), entre los porcentajes de mortalidad causados a larvas neonatas de *S. frugiperda* por las cinco concentraciones probadas, detectándose igualmente dos grupos con diferencias significativas; un primer grupo constituido por las concentraciones de  $10^4$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$  y  $10^{12}$ , las cuales causaron el 100% de mortalidad; mientras que el segundo grupo con el Testigo absoluto que presentó una mortalidad del 4%. Por los resultados obtenidos en el bioensayo, se puede especular que la población de *S. frugiperda* es igualmente altamente susceptible a concentraciones bajas probadas.

**Tabla 5.** Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *S. frugiperda*, en las diferentes concentraciones de la cepa 2, potenciales *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bajo condiciones in vitro

<b>Concentración (UFC/mL)</b>	<b>N</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
$1 \times 10^{12}$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^{10}$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^8$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^4$	5	100,00 <sup>a</sup>
0	5	4,00 <sup>b</sup>

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

Nota: Cepa 2 (cultivo de papa ).

Fuente: Autor (2022).

La cepa 3 (bosque de pinos) de *B. thuringiensis* causó mortalidades a las larvas neonatas de *S. frugiperda* similares a las causadas por la cepa 2. De la misma manera, con dos grupos con diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ), un grupo con el Testigo con 4,00% de mortalidad y un segundo grupo con las concentraciones  $10^4$ ,  $10^8$ ,  $10^{10}$  y  $10^{12}$ , causando todas el 100,00% de mortalidad (Tabla 6).

**Tabla 6.** Prueba de medias de Tukey para los porcentajes de mortalidad de larvas de *S. frugiperda*, en las diferentes concentraciones de la cepa 3, potenciales *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bajo condiciones in vitro

<b>Concentración (UFC/mL)</b>	<b>N</b>	<b>Mortalidad (%)</b>
$1 \times 10^{12}$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^{10}$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^8$	5	100,00 <sup>a</sup>
$1 \times 10^4$	5	100,00 <sup>a</sup>
0	5	4,00 <sup>b</sup>

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

Nota: Cepa 3 (bosque de pinos).

Fuente: Autor (2022).

Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021) trabajando en el Laboratorio de Sanidad Vegetal del Programa de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Pamplona (Colombia) con larvas de segundo instar de larvas de *Plutella xylostella* (L.) encontraron que esta cepa 3, proveniente de suelo de bosque de pinos no intervenido en el municipio de Pamplona logró mortalidades muy parecidas al presente ensayo, en donde las concentraciones de  $10^8$ ,  $10^{10}$  y  $10^{12}$  mataron al 100% de las larvas; mientras que las concentraciones  $10^4$  y  $10^6$  causaron la muerte al 84% y 88% de la población en prueba.

### Tercer objetivo

- **Determinar la  $CL_{50}$  y el  $TL_{50}$  de tres cepas locales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), sobre larvas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), bajo condiciones *in vitro*.**

### 10.3 Concentración Letal Media ( $CL_{50}$ )

CL son las siglas de "Concentración Letal", así la  $CL_{50}$  es la concentración de un material determinado, administrado una sola vez, que provoca la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba. La  $CL_{50}$  es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo (toxicidad aguda) de un material. Cabe destacar que el  $CL_{50}$  mide la concentración letal, pero no otros efectos secundarios graves, pero no letales.

En la Tabla 7, se presentan los datos de mortalidad transformados a Probit y las concentraciones transformadas a  $\log_{10}$ , para la cepa 1, potencial de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bajo condiciones *in vitro*.

**Tabla 7.** Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a  $\log_{10}$ , para la cepa 1, potencial de *Bacillus thuringiensis* (Berliner).

Concentración (UFC/mL)	Concentración ( $\log_{10}$ )	Mortalidad (%)	Mortalidad (Probit)
$1 \times 10^{12}$	12	100	8,09

$1 \times 10^{10}$	10	100	8,09
$1 \times 10^8$	8	92	6,41
$1 \times 10^4$	4	100	8,09
0	0	4	3,25

Nota: Concentraciones (UFC/mL) transformadas a log10; Mortalidad (%) transformadas a Probit.  
Cepa 1 (Cultivo de lechuga).  
Fuente: Autor (2022).

En la Tabla 8, se presentan los datos de mortalidad transformados a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa 2, potenciales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bajo condiciones *in vitro*.

**Tabla 8.** Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa 2, potenciales de *Bacillus thuringiensis* (Berliner).

Concentración (UFC/mL)	Concentración (log10)	Mortalidad (%)	Mortalidad (Probit)
$1 \times 10^{12}$	12	100	8,09
$1 \times 10^{10}$	10	100	8,09
$1 \times 10^8$	8	100	8,09
$1 \times 10^4$	4	100	8,09
0	0	4	3,25

Nota: Concentraciones (UFC/mL) transformadas a log10; Mortalidad (%) transformadas a Probit.  
Cepa 2 (Cultivo de papa).  
Fuente: Autor (2022).

Los datos de mortalidad transformados a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa 3, potencial de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), bajo condiciones *in vitro*, se observan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Mortalidades transformadas a Probit y las concentraciones transformadas a log10, para la cepa 3, potencial de *Bacillus thuringiensis* (Berliner).

Concentración (UFC/mL)	Concentración (log10)	Mortalidad (%)	Mortalidad (Probit)
---------------------------	--------------------------	-------------------	------------------------

$1 \times 10^{12}$	12	100	8,09
$1 \times 10^{10}$	10	100	8,09
$1 \times 10^8$	8	100	8,09
$1 \times 10^4$	4	100	8,09
0	0	4	3,25

Nota: Concentraciones (UFC/mL) transformadas a log10; Mortalidad (%) transformadas a Probit.

Cepa 3 (suelo bosque de pinos).

Fuente: Autor (2022).

#### 10.4 Determinación de la CL<sub>50</sub>

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 (CL<sub>50</sub>), para cada una de las tres cepas.

Los resultados obtenidos en las pruebas para encontrar la CL<sub>50</sub>, arrojaron que la CL<sub>50</sub> para la cepa 1 es de 7.620 UFC/mL, para matar el 50% de la población de *S. frugiperda* de la prueba; la CL<sub>50</sub> para la cepa 2 y cepa 3 fueron de 6.234 UFC/mL para ambas cepas. Estos resultados indican que las tres cepas probadas de *B. thuringiensis* contra las larvas neonatas de *S. frugiperda*, fueron altamente tóxicas, pues las CL<sub>50</sub> de las tres cepas son inferiores a la concentración más baja probada en el bioensayo. Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021) hallaron una CL<sub>50</sub> de 150.533 UFC/ml trabajando con larvas de segundo instar de *Plutella xylostella* (L.). Estos resultados refuerzan el principio de que las larvas neonatas son muy susceptibles a dosificaciones bajas o subdosis, aspecto muy importante en el manejo de larvas lepidópteras en los agroecosistemas, lo que redundaría en un control temprano, menos daño a los cultivos reflejándose en productos menos afectados, logrando mejorar el retorno económico de los agricultores.

De la misma manera, las regresiones resultantes de la relación concentraciones y porcentajes de mortalidad causados por las tres cepas locales de *B. thuringiensis* arrojaron las correspondientes Ecuaciones de Regresión  $y = 0,33x + 4,52$  y un Coeficiente de Determinación ( $R^2$ ) igual a 0,58, para la cepa 1;  $y = 0,35x + 4,71$  y  $R^2 = 0,62$ , para la cepa 2; mientras que para la

cepa 3 fueron  $y=0,35x + 4,71$  y un  $R^2=0,62$ ; indicando estos resultados que no existe un ajuste no muy aceptable del modelo entre las dos variables (Tabla 10).

**Tabla 10.** Concentraciones letales ( $CL_{50}$ ) de las tres cepas locales de *B. thuringiensis*, para larvas neonatas de *S. frugiperda*, en condiciones de laboratorio.

Cepa <i>B. thuringiensis</i>	Ecuación Regresión	$R^2$	$CL_{50}$ (UFC/mL)
1	$y=0,33x+4,2$	0,58	7,62
2	$y=0,35x + 4,71$	0,62	6,23
3	$y=0,35x + 4,71$	0,62	6,23

Nota: Cepa 1 (cultivo lechuga), Cepa 2 (cultivo papa), Cepa 3 (bosque de pinos).

Fuente: Autor (2022).

### 10.5 Determinación del Tiempo Letal Medio ( $TL_{50}$ ).

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

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 cuatro concentraciones de las tres cepas de *B. thuringiensis* 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 1 de *B. thuringiensis*. Se determinó que la concentración de  $10^{12}$  UFC/mL mata al 50% de la población a las 13 horas con un coeficiente de determinación ( $R^2=0,51$ ); mientras que la concentración  $10^8$  causa la muerte al 50% de la población del bioensayo a las 56 horas.

**Tabla 11.** Tiempo Letal Medio ( $TL_{50}$ ), en larvas neonatas de *S. frugiperda*, sometidas a cuatro concentraciones de la cepa 1 de *B. thuringiensis*, en condiciones *in vitro*.

Concentración	Ecuación	$R^2$	$TL_{50}$
---------------	----------	-------	-----------

(UFC/mL)	Regresión		(Hora)
10 <sup>4</sup>	y=1,53x + (-39)	0,82	58
10 <sup>8</sup>	y=1,41x -28,57	0,81	56
10 <sup>10</sup>	y=0,86x+22,27	0,55	32
10 <sup>12</sup>	y=0,82x + 39,14	0,51	13

Nota: Cepa 1 (cultivo lechuga).

Fuente: Autor (2022).

El TL<sub>50</sub> para las cuatro concentraciones de la cepa 2 de *B. thuringiensis* se pueden observar en la Tabla 12. Se determinó que la concentración de 10<sup>12</sup> UFC/mL mata al 50% de la población a las 32 horas con un coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>=0,65); mientras que la concentración 10<sup>8</sup> causa la muerte al 50% de la población del bioensayo a las 61 horas, alargándose el TL<sub>50</sub> aproximadamente al 100%. De la misma manera se presentan las Ecuaciones de Regresión, el Coeficiente de Determinación (R<sup>2</sup>) y los TL<sub>50</sub> de todas las concentraciones probadas.

**Tabla 12.** Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>), en larvas neonatas de *S. frugiperda*, sometidas a cuatro concentraciones de la cepa 2 de *B. thuringiensis*, en condiciones *in vitro*.

Concentración (UFC/mL)	Ecuación Regresión	R <sup>2</sup>	TL <sub>50</sub> (Hora)
10 <sup>4</sup>	y=1,33x-37,29	0,78	66
10 <sup>8</sup>	y=1,26x - 27,14	0,79	61
10 <sup>10</sup>	y=1,40x-30,14	0,90	57
10 <sup>12</sup>	y=1,13x+13,71	0,65	32

Nota: Cepa 2 (cultivo de papa).

Fuente: Autor (2022).

De la misma manera que la mortalidad fue de 100% y los CL<sub>50</sub> en las cepas 2 y cepa 3 fueron de 6.234; los TL<sub>50</sub> de la cepa 2 y cepa 3 son iguales; pues la concentración de 10<sup>12</sup> UFC/mL en ambas cepas mata al 50% de la población a las 32 horas (Tabla 13).

Igualmente, Cabrera-Morales y Giraldo-Vanegas (2021) determinaron un TL<sub>50</sub> de 19 horas con la concentración 10<sup>8</sup> con la cepa 3 local de bosque no intervenido para matar al 50% de la población de las larvas de segundo instar de *P. xylostella*, demostrando que esta cepa 3 también fue muy letal para la población de prueba de *S. frugiperda*.

**Tabla 13.** Tiempo Letal Medio (TL<sub>50</sub>), en larvas neonatas de *S. frugiperda*, sometidas a cuatro concentraciones de la cepa 3 de *B. thuringiensis*, en condiciones *in vitro*.

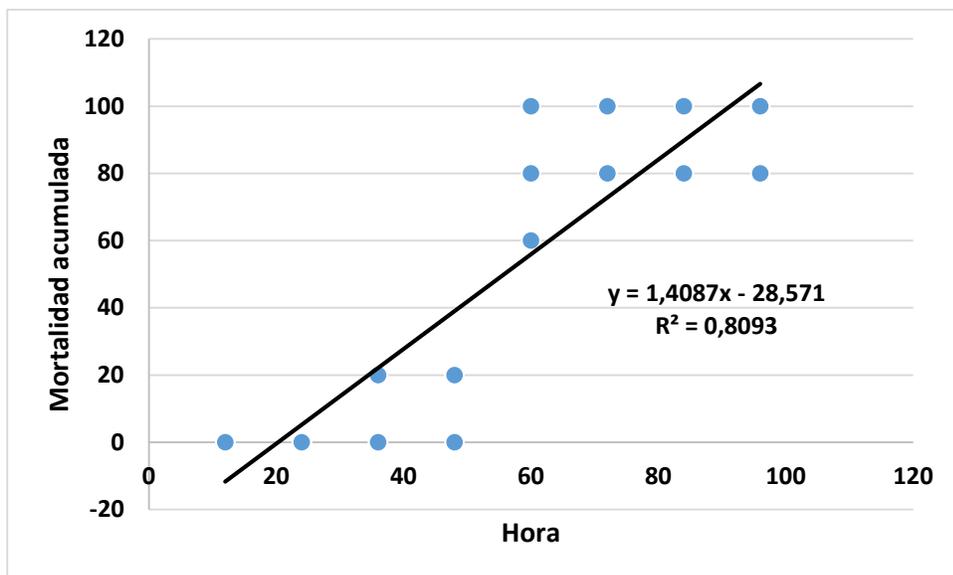
<b>Concentración (UFC/mL)</b>	<b>Ecuación Regresión</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>TL<sub>50</sub> (Hora)</b>
10 <sup>4</sup>	y=1,15x-35,86	0,72	75
10 <sup>8</sup>	y=1,38x-28,57	0,82	57
10 <sup>10</sup>	y=1,41x-22,57	0,87	51
10 <sup>12</sup>	y=1,13x+13,71	0,65	32

Nota: Cepa 3 (bosque de pinos).

Fuente: Autor (2022).

En las Figuras 10, 11 y 12; se presentan las Regresiones de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte causados por las tres cepas locales de *B. thuringiensis*, para larvas neonatas de *S. frugiperda*, en condiciones de laboratorio.

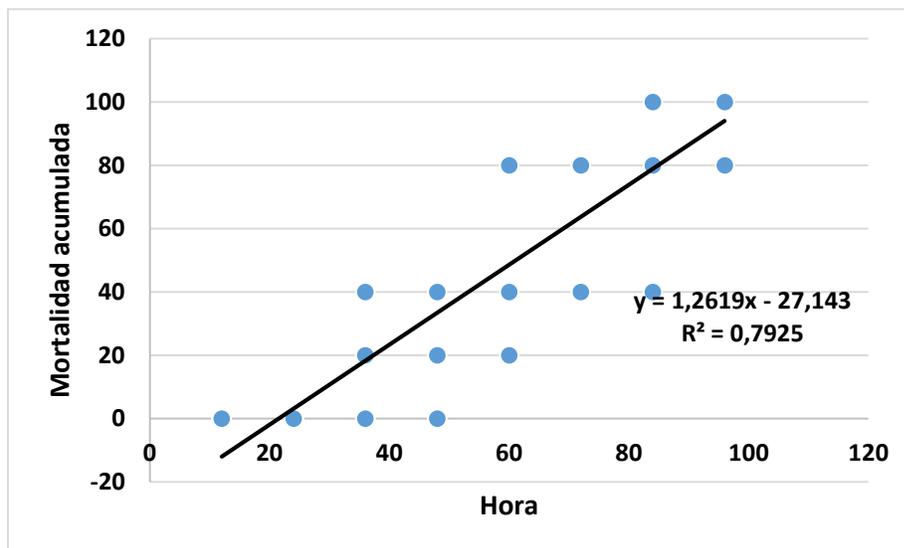
A manera de ejemplo se discuten las concentraciones 10<sup>8</sup> de las tres cepas locales de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *S. frugiperda*, en donde se aprecia que los Coeficientes de Determinación (R<sup>2</sup>) de las tres cepas son similares, igualmente sus TL<sub>50</sub>, los cuales fueron 56; 61 y 57 horas, respectivamente para las cepas 1, cepa 2 y cepa 3.



**Figura 10.** Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas neonatas de *S. frugiperda* sometidas a la concentración  $10^8$  de la cepa 1 de *B. thuringiensis*, bajo condiciones *in vitro*.

Nota: Cepa 1 (cultivo de lechuga).

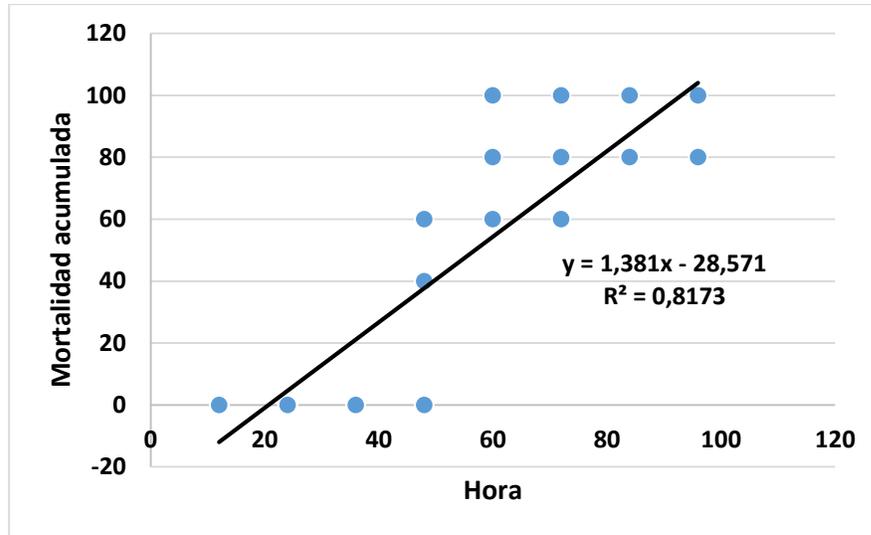
Fuente: Autor (2022).



**Figura 11.** Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas neonatas de *S. frugiperda* sometidas a la concentración  $10^8$  de la cepa 2 de *B. thuringiensis*, bajo condiciones *in vitro*

Nota: Cepa 2 (cultivo de papa).

Fuente: Autor (2022).



**Figura 12.** Regresión de la interacción Mortalidad acumulada-Hora de muerte para larvas neonatas de *S. frugiperda* sometidas a la concentración  $10^8$  de la cepa 3 de *B. thuringiensis*, bajo condiciones in vitro

Nota: Cepa 3 (bosque de pinos).

Fuente: Autor (2022).

## 11. Conclusiones

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

Todas las concentraciones de las tres cepas probadas causaron mortalidades del 100% a larvas neonatas de *S. frugiperda*; solamente la concentración  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml de la cepa 1 causó el 92% a larvas neonatas, pero sin llegar a ser significativamente diferente de las demás concentraciones.

Los valores de  $CL_{50}$  obtenidos, permiten afirmar que los aislamientos de las cepas provenientes de suelos agrícolas y de suelo de bosque de pinos, exhiben un modo de acción insecti

cida pudiendo ser un recurso promisorio para el control de poblaciones de *S. frugiperda* en campo, pues todas causaron mortalidades superiores al 92% de la población bajo ensayo.

La concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ml de las tres cepas del bioensayo manifestaron los siguientes Tiempos Letales Medios; los cuales fueron muy similares; así, los  $TL_{50}$ , fueron 56; 61 y 57 horas, respectivamente para las cepas 1, cepa 2 y cepa 3; motivo por el cual las tres cepas se presentan como una excelente alternativa como controlador biológico de *S. frugiperda*, las cuales deben ser incluidas en futuros trabajos de investigación, pues matan al 50% de la población entre el segundo y tercer día de su aplicación.

## **12. Recomendaciones**

Es urgente realizar alianzas con otros programas de la Universidad de Pamplona para lograr investigaciones interdisciplinarias.

Se recomienda la continuación del presente trabajo, para avanzar en otros aspectos relevantes para lograr el escalamiento de la presente investigación y descubrir el potencial oculto de estos aislamientos tóxicos.

Es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para el manejo del cogollero del maíz y otras plagas, en los agroecosistemas.

Se sugiere realizar estudios bioecológicos asociados al gusano cogollero del maíz, para dar respuestas a los productores de la Provincia de Pamplona y contribuir a disminuir los daños causados por este insecto y al uso indiscriminado de insecticidas de síntesis.

### 13. Bibliografía

- Acosta, R. (2009). El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. *Cultivos tropicales*, 30(2), 113-120.
- Alcaldía de Pamplona. (01 de 22 de 2022). *Identificación del municipio*. Obtenido de <https://www.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%20>
- Bolívar, B., & Hernández, J. (2012). *Manglares y Bacillus thuringiensis en Colombia*. Bogotá, Colombia.: Lap Lambert Academic Publishing GmbH & Co.
- Buchailot, M., Cairns, J., Hamadziripi, E., Wilson, K., Hughes, D., Chelal, J., & Kefauver, S. (2022). (2022). Monitoreo Regional del Gusano Cogollero (FAW) Utilizando Sistemas de Alerta Temprana. . *Detección Remota*, 14(19), 5003.
- CABI. (2019). *Spodoptera frugiperda*. . Obtenido de <https://www.cabi.org/isc/datasheet/29810#toPictures>
- Cabrera-Morales, J. (2021). Evaluar la susceptibilidad de *Plutella xylostella* (L.) a dos cepas locales posibles *Bacillus thuringiensis* en comparación con producto comercial bajo condiciones *in vitro*. Pamplona, Norte de Santander: Trabajo de Grado Pregrado, Universidad de Pamplona.
- Carballo, M., & Guharay, F. (2004). Control biológico de plagas agrícolas. Turrialba, Cartago: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Serie técnica. Manual técnico/CATIE; N° 53. Primera Edición.
- Carmona, A. (2002). Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de bacillus thuringiensis tóxica a spodoptera frugiperda (lepidoptera: noctuidae). *Bioagro*, 14(1), 3-10.

- DGSV-CNRF. (2020). *Gusano cogollero Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)*. . Tecámac, México: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria.
- Díaz, J. (2016). Acción de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Berliner), como control biológico de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Lepidoptera: Noctuidae. Revista Temas Agrarios*, 21(2).
- García, A., Reyes, A., Ruíz, E., & Ibarra, J. (2018). Aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* del sureste de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(3), 539-551.
- Goergen, G., Kumar, P., Sankung, S., Togola, A., & Tamó, M. (2016). Primer informe de brotes del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), una nueva plaga exótica invasora en África occidental y central. *PLoS ONE*, 11(10).
- González, A. (2018). *Aislamiento, caracterización y selección de cepas nativas de B. thuringiensis para el control de lepidópteros plaga*. Montevideo, Uruguay: Universidad de la República de Uruguay.
- Guevara, I. (2016). *Aislamiento y caracterización de cepas de Bacillus thuringiensis var. Kurstaki obtenidas de muestras de suelo de alta montaña*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela. Instituto de Biología Experimental (IBE) .
- Hernández, A., Estrada, B., Rodríguez, R., García, J., Patiño, A., & Osorio, E. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(4), 803-813.
- Hernández-Trejo, A. O.-H.-S.-V.-F.-H. (2018). *INSECTOS BENÉFICOS ASOCIADOS AL CONTROL*. Agroproductividad.
- Lang, O., Pérez, A., Martínez, J., Platas, D., Ojeda, L., & González, I. (2011). Crofaunaedáfica asociada a plantaciones de mango y caña de azúcar. *Terra Latinoamericana*, 29, 169-177.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura-FAO. (2017). *Preguntas sobre el gusano cogollero del maíz*. Obtenido de División de Producción y

Protección Vegetal: <https://www.fao.org/3/I7471s/I7471s.pdf>plant-protection/fall-armyworm/

Pérez, M. (2016). *Factores de virulencia de B. thuringiensis y su utilización para el control de coleópteros de alto impacto en el Sector Agropecuario*. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Buenos Aires.

Pinos, D., & Hernández, P. (2019). *Modo de acción del insecticida biológico Bacillus thuringiensis*. Obtenido de <https://higieneambiental.com/productos-biocidas-y-equipos/modo-de-accion-del-insecticida-biologico-bacillus-thuringiensis>

Rafael, R., Aguilar, R., Maldonado, E., & Ruiz, M. (2020). CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA *Spodoptera frugiperda* y *Alabama argillacea* EN EL CULTIVO DE ALGODÓN (*Gossypium barbadens*) EN PIURA, PERÚ. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 36(1), 52-62.

Ramírez, L., Ramírez, N., Fuentes, L., Jiménez, J., & Hernández, J. (2010). Estandarización de un bioensayo y evaluación preliminar de tres formulaciones comerciales de *Bacillus thuringiensis* sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 12-21.

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>

Rutte, R., Aguilar, R., Maldonado, E., & Ruiz, M. (2020). Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* y *Alabama argillacea* en el cultivo de algodón (*Gossypium barbadens*) en Piura, Perú. *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 36(1), 52-62., 36(1), 52-62.

Sauka, H., & Benintende, B. (2008). *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 124-140.

- Sepulveda, M. (2012). *Hongos Entomopatógenos BioINIA: Tecnología limpia para el control de plagas agrícolas*. Obtenido de Tierra Adentro. no. 100.: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/5326>
- Sotelo, I., & Zelaya, J. (2004). *Evaluación de la eficacia de cinco bioplaguicidas sobre poblaciones de gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) y su efecto sobre el crecimiento y rendimiento en el cultivo de maíz (*Zea mays*) *mays* L.*. Bogotá: Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia.
- Szwarc, D., & Trumper, E. (2018). *Dispersión y mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en híbridos de maíz convencional y transgénico Bt. Potenciales implicancias para el manejo de la resistencia*. Buenos Aires, Argentina : Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata.
- Tovar, C., & Colonia, B. (2013). Producción y procesamiento del maíz en Colombia. *Revista Guillermo de Ockham*, 11(1), 97-110.
- Vázquez, M., Rangel, J., Ibarra, J., & Del Rincón, M. (2015). Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia*, 40(6), 397-402.
- Villarreal-Delgado, M., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L., Estrada-Alvarado, M., Parra-Cota, F., & Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de Fitopatología*.