

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Escuela de Posgrado

DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**AISLAMIENTO Y ACTIVIDAD ENTOMOPATÓGENA
COMO CONTROL BIOLÓGICO CONTRA LA
PLAGA MARGARONIA (*Palpita persimilis*)
DEL CULTIVO DE OLIVO DE LA
YARADA – LOS PALOS, TACNA**

TESIS

PRESENTADA POR:

M.Sc. ANGELA VERONICA CHOQUE MIRANDA

**Para optar el Grado Académico de:
DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**

TACNA - PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN


Escuela de Posgrado

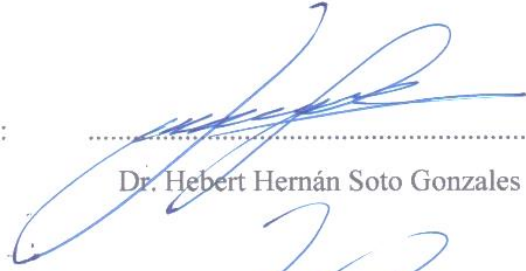
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

AISLAMIENTO Y ACTIVIDAD ENTOMOPATÓGENA COMO CONTROL BIOLÓGICO CONTRA LA PLAGA MARGARONIA (*Palpita persimilis*) DEL CULTIVO DE OLIVO DE LA YARADA – LOS PALOS, TACNA.

Tesis sustentada y aprobada el 12 de junio del 2023; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE : 
Dra. Rosario Elena Zegarra Vda. de Chávez

SECRETARIO : 
Dr. Carlos Francisco Tito Vargas

MIEMBRO : 
Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales

ASESOR : 
Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales** en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Posgrado N°12306-2023-ESPG/UNJBG de la tesis titulada: “ **AISLAMIENTO Y ACTIVIDAD ENTOMOPATOGENA COMO CONTROL BIOLÓGICO CONTRA LA PLAGA MARGARONIA (*Palpita persimilis*) DEL CULTIVO DE OLIVO DE LA YARADA – LOS PALOS, TACNA**” Presentado por la Magister Angela Verónica Choque Miranda para optar el grado de Doctor en Ciencias Ambientales.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual Turnitin, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es 5%. Por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD en una similitud baja** de la tesis y está de acuerdo al nivel **PERMITIDO**, para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio Institucional**.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para su obtención del grado de Doctor en Ciencias Ambientales.



.....
Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales
DNI: 01317360

DEDICATORIA

A mis padres Luis y Concepción que no escatimaron esfuerzos para que inicie este camino y que hoy, aunque están en el cielo, sé que pueden ver cómo llego a la meta.

A mi esposo Francisco, a mis hijos Franjo y Checa que con su amor incondicional me dieron fuerza y aliento, que me permitieron alcanzar una nueva meta en mi vida.

AGRADECIMIENTO

A Dios y la Virgen, por acompañarme siempre en cada paso que doy.

A mi asesor, Dr. Hebert Hernán Soto Gonzales, por su confianza, dedicación y guía para la realización de esta tesis.

A mi profesor y colega, Dr. César Julio Cáceda Quiroz, por su apoyo desinteresado que permitió la culminación de este trabajo de tesis.

A mi colega Dr. Vicente Freddy Chambilla Quispe, por su apoyo desprendido en esta tesis.

A mi colega Blgo. Mblgo. Edwin Denis Obando Velarde, por su ayuda y soporte en el desarrollo de esta tesis.

A mis colegas: Milena Carpio, Gisela Maraza, Gabriela Fora, Mayumi Chachaque y Galeska Farfán, por su apoyo desinteresado en esta tesis.

Al Sr. Roy Orocollo W. y Sra. Dina Aguilar M. por las facilidades y soporte logístico con los agricultores de olivo del distrito de La Yarada – Los Palos.

A mis amigos: Victor Carbajal, Soledad Bornás, Gabriela Gonzalez, Erika Sanchez y Yemile Berrios, por su acompañamiento y aliento para continuar.

.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN	x
ABSTRACT.....	xi
RESUMO.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	4
1.2.1 <i>Problema general</i>	4
1.2.2 <i>Problemas específicos</i>	4
1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	5
1.4 LIMITACIONES	5
1.5 OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	6
1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	6
1.6 HIPÓTESIS	6
1.6.1 <i>Hipótesis general</i>	6
1.6.2 <i>Hipótesis específicas</i>	7
1.7 VARIABLE	7
1.7.1 <i>Variable independiente</i>	7
1.7.2 <i>Variable dependiente</i>	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes de la investigación	8
2.1.1. <i>En el ámbito internacional</i>	8
2.1.2. <i>En el ámbito nacional</i>	10
2.2 Bases teóricas.....	13
2.2.1. <i>Control biológico</i>	13
2.2.1.1. <i>Agentes de control biológico</i>	14

2.2.2. <i>Olivo</i>	24
2.3. Definición de términos básicos.....	30
2.4. MARCO FILOSÓFICO.....	30
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	32
3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	32
3.1.1. <i>Diseño de la investigación</i>	32
3.1.2. <i>Nivel de investigación</i>	32
3.1.3. <i>Tipo de estudio</i>	32
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO.....	32
3.2.1. <i>Población</i>	32
3.2.2. <i>Muestra</i>	32
3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	33
3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	33
3.5. TRATAMIENTO DE DATOS.....	37
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	41
DISCUSIÓN	62
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Diseño para la evaluación de la actividad de control de bacterias entomopatógenas nativas versus producto biológico comercial.....	36
Tabla 2.	Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la primera zona de muestreo.....	38
Tabla 3.	Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la segunda zona de muestreo.....	39
Tabla 4.	Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la tercera zona de muestreo.....	40
Tabla 5.	Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la cuarta zona de muestreo.....	41
Tabla 6.	Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la quinta zona de muestreo.....	42
Tabla 7.	Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad.....	45
Tabla 8.	Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad.....	46
Tabla 9.	Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad	47
Tabla 10.	Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad.....	49
Tabla 11.	Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad.....	51
Tabla 12.	Actividad entomopatógena de bacterias nativas sobre larvas de la <i>Margaronia</i> según dosis de aplicación	53
Tabla 13.	Actividad entomopatógena del producto comercial bacteriano (cepa patrón) sobre larvas de la <i>Margaronia</i> según dosis de aplicación	54
Tabla 14.	Identificación filogenética de las bacterias nativas con actividad entomopatógena sobre la <i>Margaronia</i>	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas del mecanismo de acción de <i>Bacillus thuringiensis</i> en la larva del insecto.....	16
Figura 2.	Etapas que ilustran el mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.....	21
Figura 3.	Estado adulto de la <i>Margaronia</i>	27
Figura 4.	Estado larval de la <i>Margaronia</i>	27
Figura 5.	Estado adulto de la queresa móvil atacando hojas y ramas de olivo.....	29
Figura 6.	Estado adulto del barrenillo del olivo.....	30
Figura 7.	Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo agrupadas según su morfología microscópica.....	43
Figura 8.	Actividad entomopatógena de las bacterias nativas aisladas de suelos de cultivo olivo.....	44
Figura 9.	Actividad entomopatógena de las bacterias nativas aisladas de suelos de cultivo olivo según horas de exposición.....	52
Figura 10.	Árbol filogenético elaborado mediante el secuenciamiento del gen ADNr 16S para las 18 cepas con actividad entomopatógena.....	55

RESUMEN

En esta investigación se busca demostrar la actividad de control, a nivel de laboratorio de bacterias entomopatógenas nativas sobre la Margaronia (*Palpita persimilis*) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada – Los Palos; considerando que el olivo es la principal producción agraria de la región de Tacna y esto la hace la primera región olivarera del Perú, ya que es donde se produce aproximadamente el 78 % de la producción nacional (189 414 toneladas). Es así que para el cumplimiento de este objetivo se realizó el aislamiento de bacterias nativas a partir de muestras de suelo de cultivos de olivo, las mismas que fueron aplicados como parte del alimento de las larvas de primer y segundo estadio de la Margaronia. Los ensayos para demostrar la actividad entomopatógena de estas bacterias nativas se midieron en porcentaje de mortalidad de las larvas. Como resultados se obtuvo que del total de bacterias nativas aisladas, el 90 % presentan actividad entomopatógena, de ellas 15 cepas provocaron un porcentaje de mortalidad de las larvas por encima del 50 % y que el tiempo necesario para lograr la mayor actividad entomopatógena fue de 72 horas. Así también se logró identificar filogenéticamente que estas bacterias pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus*

Palabras clave: bacterias nativas, entomopatógeno, plagas

ABSTRACT

This research seeks to demonstrate the control activity, at the laboratory level, of native entomopathogenic bacteria on the *Margaronia* (*Palpita persimilis*) of olive crops, in the agricultural area of La Yarada - Los Palos; considering that the olive tree is the main agricultural production of the Tacna region and this makes it the first olive-growing region of Peru, since it is where approximately 78% of the national production (189 414 tons) is produced. Thus, in order to fulfill this objective, the isolation of native bacteria was carried out from soil samples of olive crops, the same ones that were applied as part of the food of the first and second instar larvae of the *Margaronia*. The tests to demonstrate the entomopathogenic activity of these native bacteria were measured in percentage of mortality of the larvae. As results, it was obtained that of the total native bacteria isolated, 90% present entomopathogenic activity, of which 15 strains caused a percentage of mortality of the larvae above 50% and that the time necessary to achieve the highest entomopathogenic activity was 72 hours. Thus, it was also possible to identify phylogenetically that these bacteria belong to the genera *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus* and *Paenibacillus*.

Keywords: native bacteria, entomopathogen, pests

RESUMO

Esta investigação procura demonstrar a actividade de controlo, a nível laboratorial, de bactérias entomopatogénicas nativas sobre a *Margaronia* (*Palpita persimilis*) das culturas de oliveira, da zona agrícola de La Yarada - Los Palos; Considerando que a oliveira é a principal produção agrícola da região de Tacna, o que faz dela a primeira região olivícola do Peru, onde se produz cerca de 78 % da produção nacional (189 414 toneladas). É assim que para o cumprimento deste objetivo se realizou o isolamento de bactérias nativas a partir de amostras de solo de cultivos de oliveira, as mesmas que foram aplicadas como parte do alimento das larvas de primeiro e segundo estágio da *Margaronia*. Os ensaios para demonstrar a actividade entomopatogénica destas bactérias nativas foram medidos em percentagem de mortalidade das larvas. De acordo com os resultados, 90 % das bactérias nativas isoladas apresentam atividade entomopatogénica, das quais 15 estirpes provocaram uma taxa de mortalidade das larvas superior a 50 % e que o tempo necessário para atingir a maior actividade entomopatogénica foi de 72 horas. Assim também se conseguiu identificar filogeneticamente que estas bactérias pertencem aos géneros *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus* e *Paenibacillus*

Palavras-chave: bactérias nativas, entomopatogénicas, pragas

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos pueden ejercer diferentes tipos de actividades de control sobre los patógenos, es así que cuando estos microorganismos inhiben el ciclo de vida de los insectos, ésta es llamada como actividad entomopatógena (Altamira, 2020), este tipo de actividad forma parte de lo que se conoce como control biológico o control microbiológico. De forma específica, control biológico es la inserción artificial de microorganismos antagonistas en un componente de la naturaleza para someter a un patógeno o una plaga (Debach, 1964). Estos antagonistas naturales pueden ser parásitos, depredadores y patógenos (Belda et al., 2000). Esta se presenta como una alternativa amigable que propone reducir, y por qué no, eliminar el uso de insecticidas químicos (Chandrakasan et al., 2022). Hoy en día el empleo de insecticidas químicos está muy asociado a problemas ambientales, ecológicos y de salud de los seres vivos (Razaq & Shah, 2022), ya que se los puede encontrar formando parte de los alimentos y productos agrícolas en general.

Según los informes de monitoreo de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios de los años 2016, 2017 y 2018, se reportan que del total de los frutos de aceituna calificados como no conforme a nivel nacional, más del 60 % corresponden a aceitunas procedentes de Tacna; donde se encontró residuos de Oxydemeton methyl, cipermetrina, Clorpirifos y carbendazin (SENASA, 2019). Al respecto es importante señalar que la presencia de estos residuos de plaguicidas en los cultivos no solo provocaría daño en la salud de los consumidores, sino también en el medio ambiente (suelo y agua) así como en la economía de los mismos productores de olivos, ya que al ser detectados estos residuos de plaguicidas por encima de los Límites Máximos de Residuos (LMR), esto inhabilitaría las exportaciones del olivo, afectando no solo a nuestra región sino también a la economía de nuestro país, debido a que la zona agrícola de La Yarada - Los Palos es la responsable de más del 80 % de la producción a nivel nacional, que sale para exportación.

Es por ello que en este trabajo de investigación, se propone una alternativa de control biológico basado en la aplicación de microorganismos nativos (bacterias) de las

zonas productivas de olivo, del distrito de La Yarada - Los Palos, que demuestren actividad entomopatógena sobre una de las principales plagas que afectan al cultivo del olivo, como es la Margaronia o gusano del brote del olivo. Es así que con la realización de este trabajo se busca además en un futuro próximo contribuir a que los agricultores no continúen empleando productos de control de tipo químico en sus cultivos, debido a la no efectividad de los productos biológicos comerciales; así también disminuir la contaminación del suelo y agua que provocan los insumos de control químico en esta zona agrícola; Finalmente, disminuir la presencia de residuos de plaguicidas en los frutos del olivo y con ello salvar el riesgo que corren las exportaciones del olivo.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El olivo es la principal producción agraria de la región de Tacna y esto la hace la primera región olivarera del Perú, ya que es donde se produce aproximadamente el 78 % de la producción nacional (189 414 toneladas). Hasta el año 2018, en Tacna las plantaciones de olivo abarcaron 23 148 ha de áreas de cultivo, el mismo que representa el 50 % del área cultivada total de esta región (Dirección Regional de Agricultura-Tacna, 2019).

Con respecto al destino que se le da a la aceituna se debe mencionar que Tacna produce este producto para el mercado nacional y para exportación. Es así que, durante el año 2018 del total de aceitunas exportadas a nivel nacional, el 81 % es aceituna de origen tacneño, de los cuales casi en su totalidad (96 %) son producidas en las áreas agrícolas del distrito de La Yarada - Los Palos. Por otro lado, es importante señalar que los principales mercados de destino de esta aceituna son los países de Chile (73 %) y Brasil (26 %) (Dirección Regional de Agricultura-Tacna, 2019).

Sin embargo, según los reportes de seguimiento de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios de los años 2016, 2017 y 2018, se reportan que del total de los frutos de aceituna calificados como no conforme a nivel nacional, más del 60 % corresponden a aceitunas procedentes de Tacna; donde se encontró residuos de Oxydemeton methyl, cipermetrina, Clorpirifos y carbendazin (SENASA, 2019).

Cabe señalar que estos residuos encontrados son producto de los plaguicidas empleados para combatir las diferentes plagas que hasta la actualidad vienen atacando a los cultivos de olivo del distrito de La Yarada - Los Palos. Según el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) en esta zona agrícola las plagas de importancia en los cultivos del olivo son la Margaronia o Gusano del brote del olivo (*Palpita persimilis*), el

Gusano medidor de las flores (*Cyclophora serrulata*), el Barrenillo (*Phloeotribus scarabaeoides*) y la queresa blanca móvil (*Orthezia olivícola*) (SENASA, 2017a).

Es importante resaltar que el uso indiscriminado de los plaguicidas en los cultivos no solo provocaría daño en la salud de los consumidores, sino también en el medio ambiente (suelo y agua) así como en la economía de los mismos productores de olivos, ya que al ser detectados estos residuos de plaguicidas por encima de los Límites Máximos de Residuos (LMR), esto inhabilitaría las exportaciones del olivo a países como Chile y Brasil, y con ello se estaría afectando la economía de nuestro país, debido a que la zona agrícola de La Yarada - Los Palos es la responsable de más del 80 % del olivo que se exporta a nivel nacional.

Conocedores de esta problemática, se propone una alternativa de control biológico basado en la aplicación de microorganismos nativos (bacterias) de las zonas productivas de olivo, del distrito de La Yarada - Los Palos, que demuestren funcionabilidad individual y múltiple sobre una de las principales plagas que afectan al cultivo del olivo, como es la Margaronia o gusano del brote del olivo.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema general

¿Cuál será la actividad de control a nivel de laboratorio de bacterias nativas entomopatógenas, contra la plaga Margaronia (*Palpita persimilis*) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Existirá actividad de control contra la Margaronia (*Palpita persimilis*), de bacterias nativas de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos?
- ¿Cuál será la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas en comparación con bacterias de uso comercial contra la Margaronia (*Palpita persimilis*)?

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

La presente investigación servirá para dar solución al uso indiscriminado de los plaguicidas que son utilizados con la finalidad de controlar o eliminar las plagas de los cultivos de olivo, de la zona agrícola de la Yarada – Los Palos. Para lo cual, se realizará la aplicación de un control biológico basado en bacterias nativas, las mismas que serán probadas en forma individual y conjunta para evaluar su efectividad. Cabe señalar que se propone esta alternativa de control biológico, ya que actualmente los agricultores refieren tener este problema en sus cultivos a pesar de haber empleado también diferentes controles biológicos comerciales. Es importante mencionar que para lograr el éxito de un método de control no solo debe tenerse en cuenta el producto como tal, sino además se debe considerar los factores que condicionan el desempeño de las mismas, tales como temperatura, pH, características del suelo, entre otros.

Por otro lado, se ha considerado realizar este estudio en los cultivos de olivo de La Yarada - Los Palos, ya que del total de aceitunas exportadas a nivel nacional el 81 % es aceituna de origen tacneño, de los cuales casi en su totalidad (96 %) son producidas en las áreas agrícolas de este distrito.

Con respecto al alcance social se puede mencionar que al dar solución a este problema se evita: 1. que los agricultores continúen empleando controles de tipo químicos en sus cultivos, debido a la no efectividad de los productos biológicos comerciales, 2. la contaminación del suelo y agua en otras palabras, el deterioro del ambiente y 3. la presencia de residuos de plaguicidas en los frutos del olivo y con ello salvar el riesgo que corren las exportaciones del olivo al exterior.

1.4 LIMITACIONES

Limitaciones

Una de las principales limitaciones para este trabajo fue la falta de acceso a las instalaciones de los centros de investigación y laboratorios de la UNJBG, debido a la pandemia causada por el SARS-CoV-2. Por otro lado, otra limitación fue el

financiamiento ya que los trámites para obtenerlo por medio del Canon y regalías mineras que ofrece el Vicerrectorado de Investigación de nuestra universidad, toma demasiado tiempo.

1.5 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1 Objetivo general

- Demostrar la actividad de control, a nivel de laboratorio de bacterias entomopatógenas nativas sobre la Margaronia (*Palpita persimilis*) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos.

1.5.2 Objetivos específicos

- Estimar la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas contra la Margaronia (*Palpita persimilis*).
- Evaluar la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas en comparación con bacterias de uso comercial contra la Margaronia (*Palpita persimilis*).
- Identificar las bacterias nativas con actividad entomopatógena contra la Margaronia (*Palpita persimilis*), utilizando marcadores del gen ARN 16S.

1.6 HIPÓTESIS

1.6.1 Hipótesis general

Las bacterias nativas entomopatógenas ejercen una actividad de control eficaz a nivel de laboratorio, sobre la Margaronia (*Palpita persimilis*) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos.

1.6.2 Hipótesis específicas

Las bacterias nativas entomopatógenas ejercen una actividad de control superior a las bacterias de tipo comercial sobre la Margaronia (*Palpita persimilis*) a nivel de laboratorio.

1.7 VARIABLES

1.7.1 Variable independiente

Concentración o dosis (cel/ml o esporas/ml) de bacterias nativas de la zona agrícola de La Yarada - Los Palos.

1.7.2 Variable dependiente

Actividad de control sobre la Margaronia (*Palpita persimilis*) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos (%).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. *En el ámbito internacional*

En el estudio titulado “*Bacillus velezensis* MT9 y *Pseudomonas chlororaphis* MT5 como agentes de biocontrol contra la fumagina de los cítricos y los insectos plaga asociados”, se logró aislar a *Bacillus velezensis* MT9 y *Pseudomonas chlororaphis* MT5 de muestras de suelo, los que demostraron tener actividad antibacteriana, antifúngica y actividad semioquímica en insectos, por lo que podrían combatir eficazmente la fumagina posiblemente actuando tanto sobre los insectos como sobre los hongos que habitan en la biopelícula negra (Calcagnile et al., 2022).

En la investigación titulada “Eficacia biocontrolada de la protección de la proteína cry de *Bacillus thuringiensis* contra el barrenador del fruto del tomate *Helicoverpa armigera* en un entorno de laboratorio”, se realizó la selección como la caracterización de las cepas de *Bacillus thuringiensis* en función del contenido del gen Cry y la evaluación de su toxicidad, demostrándose que es un controlador eficaz contra las plagas de lepidópteros polífagos como *Helicoverpa armigera* (Chandrakasan et al., 2022).

En el artículo publicado “Caracterización de aislados de *Bacillus thuringiensis* de Argentina potencialmente útiles en el control de plagas de insectos”, se realizó 41 asilamiento de *B. thuringiensis* nativos, de los cuales cerca del 90 % de las cepas mostraron toxicidad contra *Spodoptera frugiperda* y *Anticarsia gemmatilis*, reportadas como dos plagas de importancia en Argentina (Berón & Salerno, 2006).

En el estudio “Caracterización molecular de una cepa de *Bacillus thuringiensis* de Argentina, tóxica contra lepidópteros y coleópteros, a partir de su análisis de genoma

completo y proteína Cry”, se reportó que la cepa FCC 7 de *B. thuringiensis*, evidenciaba una toxicidad del 97 % contra la plaga picudo del algodnero *Anthonomus grandis*, cuando era sometido a concentraciones de $3,5 \times 10^7$ células/ml de *B. thuringiensis* (Lazarte et al., 2021).

En el artículo “Detección de genes cry1 en aislamientos de *Bacillus thuringiensis* del sur de Brasil y actividad contra *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae)”, se reporta que de 12 aislados de *Bacillus thuringiensis*, 4 de ellos mostraron una toxicidad mejor, que un *Bacillus thuringiensis* conocido por su alta efectividad, mostrando una mortalidad por encima del 90 % contra las larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Bobrowski et al., 2001).

En el estudio “Diversidad de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* de suelos egipcios demostrado por caracterización molecular”, se realizó el aislamiento y selección de *Bacillus thuringiensis* considerando su actividad potencial contra *Spodoptera littoralis* y *Helicoverpa armígera*, es así que se encontró que los aislados provocaban una mortalidad que oscilaba del 50 al 96 % sobre *Helicoverpa armígera* y una mortalidad máxima de 50 % sobre las larvas de *Spodoptera littoralis* (Salama et al., 2015).

En la investigación “Diversidad de cepas de *Bacillus thuringiensis* de Colombia con actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)”, se logró el aislamiento a partir de muestras de suelo de 1100 cepas de *Bacillus thuringiensis*; de los cuales solo 32 presentaban actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* y de ellas 8 se reportaron como las más potentes (Arango et al., 2002).

En el artículo publicado “Aislamiento de *Bacillus* entomopatógenos de una explotación olivarera biodinámica y su patogenicidad frente a insectos plaga lepidópteros y coleópteros”, se logró aislar y caracterizar 40 cepas de *Bacillus*, las mismas que se enfrentaron por separado a larvas de lepidópteros (*Prays oleae* y *Palpita unionalis*) y coleópteros (*Hylesinus oleiperda* y *Phloeotribus scarabaeoides*) conocidas como plagas del olivo; encontrándose que solo las cepas asiladas de *B. licheniformis*, *P. polymyxa* y *B. brevis* fueron entomopatógenas (Blibech et al., 2012).

En el estudio “Detección de aislamientos brasileños de *Bacillus thuringiensis* activos contra *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* y *Anticarsia gemmatalis*”, se encontró que del total de cepas aisladas, solo 27 demostraron actividad toxica frente a las larvas de los insectos plagas, de las cuales, 3 registraron ser más potentes que la cepa control (Monnerat et al., 2007).

En la investigación “Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de picudo algodónero (*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae)”, se realizó ensayos de toxicidad con 100 cepas nativas y 24 cepas de exóticas de colecciones de otras partes del mundo. Es así que al final solo se seleccionaron aquellas cepas (4 cepas nativas y 3 exóticas) que provocaron una mortalidad por encima del 50 % de las larvas del picudo algodónero (Pérez et al., 2017).

2.1.2. En el ámbito nacional

En el estudio “Uso de entomopatógenos en el control de (*Leptophobia aripa* y *Brevicoryne brassicae*) en col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) en CIFO UNHEVAL, 2019”, provenientes de los campos agrícolas de Huánuco, reportaron que a nivel de laboratorio, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* reducía el número de larvas de *Leptophobia aripa* (primer y segundo estadillo) hasta en un 60 %, teniendo un mejor efecto cuando se trataba sobre las larvas de *Brevicoryne brassicae* ya que su eficiencia alcanzaba el 100 % (Miguel, 2019).

En la investigación titulada “Control biológico de cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y mazorquero (*Heliothis zea*) en el cultivo de maíz amiláceo (*Zea mays* L.), en la localidad de Maucacalle Abancay – Apurímac”, se reporta que el porcentaje de mortalidad provocado por *Bacillus thuringiensis* sobre el cogollero alcanzo un 65 % y 68 % para el mazorquero; superando al control biológico ejercido por *Beauveria bassiana*, ya que el porcentaje de mortalidad fluctuó de un 41 a 45 % para las larvas en estudio (Gutierrez y Medina, 2017).

En el artículo publicado “Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida”, se realizó el aislamiento y caracterización de *Bacillus thuringiensis* de muestras de suelos procedentes de diferentes partes del país, lográndose obtener un total de 54 cepas de *Bacillus thuringiensis* (Flores et al., 2011).

En el estudio publicado “Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* y *Alabama argillacea* en el cultivo de algodón (*Gossypium barbadens*) en Piura, Perú”, se encontró que el porcentaje de mortalidad causado por las cepas nativas, fue mayor cuando se contaminaron los alimentos de forma directa (hojas de lechuga y algodón) que cuando fueron aplicadas con dietas artificiales. Así mismo, se reporta también que algunas de las cepas aisladas provocaron un 100 % de mortalidad en larvas de ambas especies (Rafael-Rutte et al., 2020).

En la investigación titulada “Eficiencia de *Bacillus thuringiensis* en el control de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz (*Zea mays*) en el Bajo Mayo”, se reportó que después de las 72 horas de haberse aplicado el *Bacillus thuringiensis* y empleando una dosis de 1,0 kg/Ha se logra porcentajes de mortalidad que oscilan del 90 a 100 % (Girano, 2004).

En la investigación publicada «Tratamiento combinado a base de esporas y cristales de *Bacillus thuringiensis* en la mortalidad de *Heliothis virescens* F “gusano perforador” del *Asparagus officinalis* L. “espárrago verde”», se encontró que la mortalidad del gusano perforador era menor cuando se aplicaba los tratamientos por separado y mayor cuando se aplicaban las 3 especies a la vez, alcanzando un porcentaje de mortalidad de 95 % (Vargas, 2019).

En el estudio titulado “Efecto de *Beauveria bassiana* (bálsamo) y *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (berliner) para el control de polilla de las crucíferas (*Plutella xylostella* L.) en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea itálica*)”, realizado en la provincia de Tacna, se reportó que cuando se aplicaba el producto químico para controlar

la polilla este presentaba el mayor porcentaje de mortalidad siendo su eficacia solamente igualada cuando se aplicaba de forma conjunta los productos biológicos (Palza, 2014).

En el estudio “Control de *Spodoptera frugiperda* en *Asparagus officinalis* l.cv. uc 157 f1 aplicando *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e insecticidas en Huancaquito alto, La Libertad”, se encontró que el efecto sobre las larvas de estadio I y II de *Spodoptera frugiperda* fue el mismo cuando se empleaba *B. thuringiensis* var. *kurstaki* + abamectin con y sin azufre; así mismo, se reporta también que se logra un control eficaz sobre las larvas de estadios III y IV cuando se aplica *B. thuringiensis* var. *kurstaki* + abamectin con azufre (Ventura, 2016).

En el estudio publicado “Control biológico del cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.), en la comunidad de Santiago, Aymaraes – 2018”, se reportó los resultados de control biológico en campo agrícola de maíz contra el cogollero, donde se empleó 3 controladores que son *Bacillus thuringiensis*, Baculovirus y extracto de rocoto, obteniéndose los mejores resultados después de la tercera aplicación de los tratamientos o sea a los 40 días después de la siembra; Donde resalta por su eficacia *Bacillus thuringiensis* (100 %), seguido de Baculovirus 74,02 % y el extracto de rocoto (55,78 %) (Guevara, 2020).

En la investigación “Toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Dione juno* (Gusano defoliador) a nivel laboratorio”, se utilizaron cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para ver la toxicidad sobre el gusano defoliador, reportándose que se logra mayor porcentaje de mortalidad de las larvas a concentraciones de 2ng/cm², cuando se emplea la cepa con código *Bt-23* (Quiliche, 2021).

En el estudio titulado “Eficacia de control de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* sobre *Spodoptera frugiperda* en espárrago y su efecto residual en invernadero”, se analizó la eficacia de 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* a diferentes dosis en condiciones de campo, reportándose que la cepa BTK 32 WP (Cepa W-K) presentó un 98 % de efectividad cuando se empleó la dosis de 500g/200L (Alcántara, 2022).

En el estudio publicado “Influencia de dos bioinsecticidas comerciales a base *Bacillus thuringiensis* y un inhibidor de quitina en el control de cogollero (*Spodoptera frugiperda*) en el cultivo del maíz (*Zea mays* L.) opaco malpaso en la zona de La Yarada – Región Tacna”, se reportó que los bioinsecticidas comerciales a base de *Bacillus thuringiensis*, fueron los que mejor control ejercieron sobre las larvas del cogollero ya que los porcentajes de incidencia oscilaron entre un 9 a 15 % aproximadamente (Zegarra, 2012).

En la investigación titulada “Tratamiento químico y biológico en el control de *Trichoplusia ni* en el cultivo del repollo (*Brassica oleracea* var *capitata*) Carabayllo, 2019”, se reportó que si bien el tratamiento químico presentó un mejor control sobre las larvas de *Trichoplusia ni*, ya que supero en un 18 % al control ejercido por *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki*, éste permanecía en mayor concentración en las plantas de repollo evidenciando ser un contaminante con efecto residual a diferencia de las plantas de repollo que fueron tratadas con *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* (Tesen, 2019).

2.2 Bases teóricas

2.2.1. Control biológico

La mayoría de las plagas y organismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o enemigos naturales que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico. En un sentido más estricto, control biológico (o control microbiológico) es la inserción artificial de microorganismos antagonistas en un ecosistema determinado para controlar a un patógeno o una plaga (Debach, 1964). Estos antagonistas naturales pueden ser parásitos, depredadores y patógenos (Belda et al., 2000).

Dentro de las ventajas que posee el control biológico se puede mencionar que: no tiene efecto negativo sobre el hombre u otros organismos, no se ha reportado resistencia de las plagas hacia el control biológico, el efecto control es casi siempre permanente, el costo beneficio es mayor debido a que se elimina de forma fundamental el uso de insecticidas y puede formar parte de un manejo integral de plagas (Jiménez, 2009).

Por otro lado, cuando se quiere poner a efecto un control biológico, este debe tener en cuenta: la biología del organismo que se quiere controlar así como los factores abióticos que condicionan su desarrollo. Para el caso de los insectos plaga, se conoce que existen agentes que son patógenos, ya que pueden condicionar de forma significativa su dinámica poblacional, conocidos como entomopatógenos (Sabbahi et al., 2022).

Hoy en día el empleo de insecticidas químicos está muy asociado a problemas ambientales, ecológicos y de salud de los seres vivos (Razaq & Shah, 2022). Es por ello que en la actualidad se está optando por el uso de los llamados bioplaguicidas, los mismos que emplean microorganismos como agentes de control. Esta se presenta como una alternativa amigable que propone reducir y, por qué no, eliminar el uso de insecticidas químicos (Chandrakasan et al., 2022).

Los bioplaguicidas son compuestos u organismos naturales, que se encargan de disminuir o evitar la multiplicación de las plagas. Utilizando para ello diferentes mecanismos de acción propios de su naturaleza. Dentro de estos organismos existen diferentes especies de bacterias, hongos, nematodos, virus y protozoarios reconocidos por su capacidad entomopatógena (van Lenteren et al., 2018).

2.2.1.1. Agentes de control biológico

2.2.1.1.1. *Bacterias*

Actualmente se sabe que se puede encontrar bacterias patógenas de insectos ubicados en los tres phylas bacterianos, no obstante solo se ha podido demostrar la acción de estas como entomopatógenas, en aquellas que forman parte de las familias Bacillaceae, Paenibacillaceae, Enterobacteriaceae y Neisseriaceae (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012; Lacey et al., 2015). Es de conocimiento que las bacterias y los insectos a lo largo del tiempo han desarrollado diversos tipos de relaciones benéficas y antagónicas. Estas relaciones huésped-bacteria pueden ser facultativas u obligadas las que son productos de una coevolución dinámica promovida por la selección y apoyada por la diversidad genética (Jurat-Fuentes y Jackson, 2012).

Es importante señalar que las bacterias patógenas obligadas completan todo su ciclo de vida en el interior del insecto, es el caso de las abejas y escarabajos de la familia Scarabaeidae cuando son atacadas por *Paenibacillus* spp.. A diferencia de las que son patógenas facultativas que además pueden desarrollarse en el exterior del huésped, este es el caso de bacterias como *Bacillus* y *Serratia* entre otras (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012).

2.2.1.1.1.Mecanismos de acción

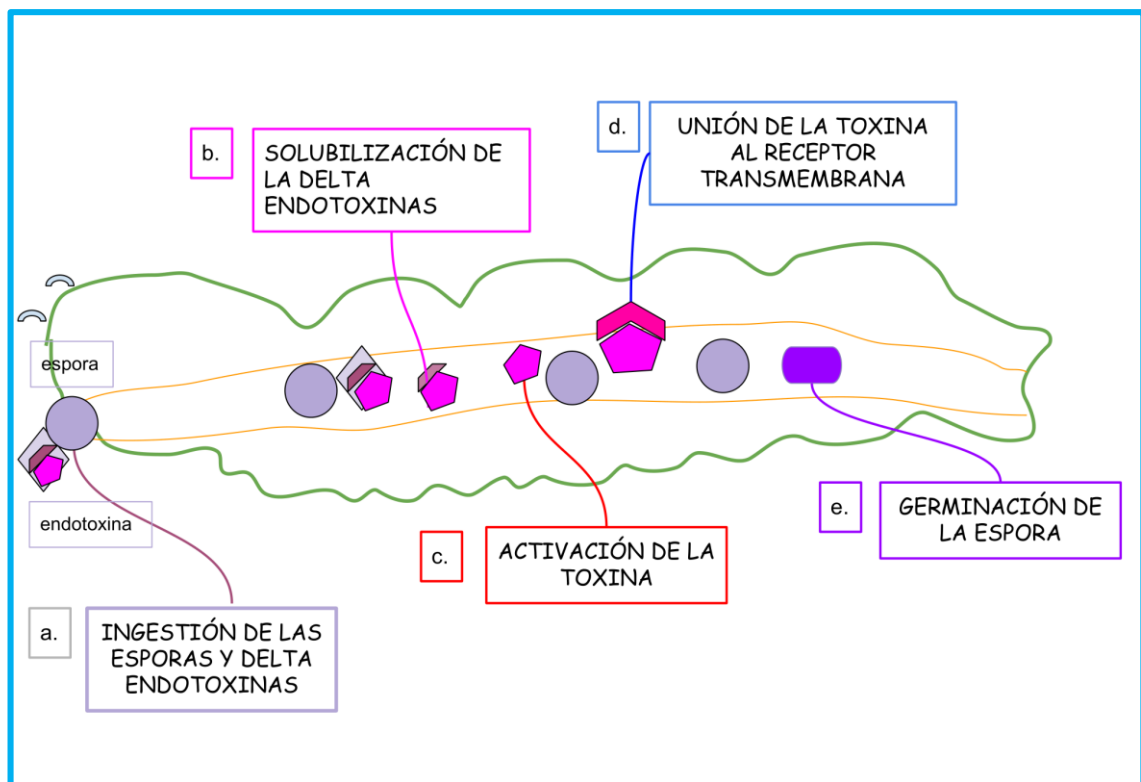
Una de las formas de como poder explicar el modo de acción de las bacterias entomopatógenas, es haciendo la diferencia entre bacterias formadoras de esporas, como los géneros *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Clostridium* y *Paenibacillus* entre otras y aquellas que no forman esporas como son *Photorhabdus*, *Xenorhabdus*, *Serratia*, *Yersinia* y *Pseudomonas* (Loulou et al., 2023; Park et al., 2006; Sabbahi et al., 2022). Las bacterias entomopatógenas ingresan al insecto por ingestión, llegan a sus tejidos y desarrollan capacidades para evitar las defensas del insecto, logrando de esta manera establecerse y multiplicarse gracias a que hace uso de factores de virulencia como enzimas y toxinas.

Bacillus thuringiensis es una bacteria entomopatógena, con forma de bastón, Gram positiva, formadora de esporas se encuentra generalmente en el suelo, polvo, insectos muertos y agua (Hernández-Fernández, 2016). *B. thuringiensis*, es la más usada en la formulación de biopesticidas (López & Cerón, 2010) gracias a su alta especificidad, a su mínima incidencia de fenómenos de resistencia y por no afectar o dañar al hombre (Lacey et al., 2015) ni a la entomofauna benéfica del ambiente (Schnepf et al., 1998). Otra de las razones importantes por las cuales es la más empleada en la formulación de biopesticidas, es que *B. thuringiensis* posee una inclusión paraesporal de naturaleza proteica que resulta ser tóxico para las larvas de insectos plagas como lepidópteros, dípteros y coleópteros (Xu et al., 2014), conocida como proteína Cry. El mecanismo de acción insecticida de *B. thuringiensis* como se visualiza en la Figura 1, inicia cuando las proteínas Cry o delta endotoxinas son ingeridos por las larvas (Vachon et al., 2012). Ya

en el intestino medio de la larva estas delta endotoxinas son solubilizadas (liberación en forma de protoxinas) gracias al pH alcalino que existe (Alba, 2012), seguidamente sucede la activación de las protoxinas provocada por proteasas del intestino, estas cortan la protoxina liberándose de esta manera el fragmento tóxico, las mismas que serán las responsables de la muerte del insecto (Bravo et al., 2004), esta toxina activa se une al receptor caderina (proteína transmembranal), localizado a nivel de la microvellosidades (Griko et al., 2007), e ingresa a través de ella e inmediatamente se da una cascada de señalización provocando la formación de una estructura oligomérica, primero como un pre-poro para terminar en un poro lítico (Vachon et al., 2012) a través del cual ocurre el paso de iones y agua, lo que provoca hinchazón y desequilibrio osmótico (Pigott & Ellar, 2007). Finalmente, sucede la muerte del insecto debido a que se dan condiciones para la germinación de las esporas y de esta forma *B. thuringiensis* invade en su totalidad al huésped provocando septicemia y daño en los tejidos (Xu et al., 2014).

Figura 1

Etapas del mecanismo de acción de Bacillus thuringiensis en la larva del insecto



Nota. Tomado de (Choque et al., 2021)

Lysinibacillus sphaericus es un bacilo Gram positivo esporulado que produce una toxina altamente tóxica para larvas de mosquitos. Esta toxina está formada por dos fracciones proteicas BinA y BinB de 41,9 y 51,4 kDa (Charles et al., 1996). Los componentes de esta toxina binaria ejercen actividades de forma individual lo que hacen a *Lysinibacillus sphaericus* que tenga un poder larvicida mejor que *Bacillus thuringiensis israelí* (Charles et al., 1996; Schwartz et al., 2001). Al igual que otra bacteria esporulada, la espora debe ser ingerida para luego ser solubilizada en el intestino medio donde gracias a la alcalinidad y a las proteasas existentes se logra la división y activación de las dos fracciones de la toxina (BinA y BinB), las cuales también se unen a receptores que se encuentran en la membrana del borde en cepillo de las células epiteliales del ciego gástrico e intestino medio, es así que permeabilizan vesículas de fosfolípidos unilamelares grandes y bicapas lipídicas planas y de esta manera dan lugar a la formación de poros, los que van a originar desorden en equilibrio osmótico y lisis de las células; provocándose de esta manera la muerte de la larva (Schwartz et al., 2001), en especial de mosquitos como del género *Culex*.

Paenibacillus spp. Son también bacilos gram positivos formadores de esporas y patógenos obligados de larvas de la familia Scarabaeidae (Koppenhöfer et al., 2012). *Paenibacillus* (anteriormente *Bacillus*) *popilliae* y *P. lentimorbus* son los causantes de la llamada enfermedad lechosa, se caracterizan por ser altamente específicas. Esta bacteria al igual que otras esporuladas inicia su infección cuando la larva ingiere las esporas, seguidamente sucede la germinación de ésta en el intestino y es ahí donde libera a la proteína paraesporal cristalina, provoca daño en la pared del intestino medio y de esta manera facilita la entrada de células vegetativas a la hemolinfa, es ahí donde se multiplican por veces repetidas y ocasionalmente vuelven a esporular y formar nuevamente cuerpos paraesporales (Lacey et al., 2015). Es este proceso el que indica que se está en la etapa final de la infección ya que la hemolinfa toma un color blanco lechoso. Es así que la larva muere, sin embargo es importante señalar que este suceso puede darse después de semanas e inclusive meses; lo real es que se desconoce exactamente la causa de la muerte ya que puede estar relacionada a la falta de reservas corporales de grasa debido a que la larva deja de alimentarse (Koppenhöfer et al., 2012).

Otras bacterias no formadoras de esporas, dentro de este grupo se encuentran las bacterias Gram negativas, las cuales se caracterizan precisamente por la no formación de esporas, por su amplia distribución y abundancia en el ambiente, lo que ha permitido poderlas encontrar en insectos enfermos o muertos (Bucher, 1981). Cabe señalar que los estudios de este grupo de bacterias no han trascendido como entomopatógenas por lo que actualmente son consideradas como patógenos potenciales o patógenas oportunistas (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012) debido a que muestran bajos porcentajes de mortalidad a nivel de laboratorio, a pesar de provenir de insectos muertos. Sin embargo, estas bacterias son fuertemente patógenas cuando se encuentran en el hemocele del insecto, el mismo que logran a través de vectores ya que les es difícil atravesar por si solas las membranas de las cutículas de los insectos (Jackson & McNeill, 2010). Una vez que las bacterias están en el hemocele su mecanismo de ataque consiste en que eluden las defensas del huésped sumado a la producción de toxinas, lo que termina en una septicemia generalizada para que finalmente llegue la muerte del insecto (Tan et al., 2006). Con respecto a esas toxinas se puede mencionar que en realidad son un “complejo de toxinas”, los que están codificados por genes (Ffrench-Constant & Waterfield, 2005) que no solo han sido reportados a nivel de plásmidos (Dodd et al., 2006) sino también en el cromosoma de las bacterias (Fuchs et al., 2008).

2.2.1.1.2. Hongos

Diversas investigaciones han demostrado que los mecanismos de acción insecticida de los hongos a diferencia de bacterias y virus, inicia cuando el hongo infecta a los insectos por penetración directa sobre la cutícula (Bilgo et al., 2018), en la cual participan diversas enzimas así como la acción de fuerzas hidrófobas y electrostáticas seguido de una actividad dirigida por hidrofobinas (Skinner et al., 2014).

2.2.1.1.2.1. Mecanismos de acción

Para la mejor comprensión de cómo es que los hongos entomopatógenos actúan, a continuación se detalla sus mecanismos en las siguientes etapas, el mismo que es ilustrado también en la Figura 2

Adhesión de la espora, la adhesión de los hongos entomopatógenos sobre la cutícula de los insectos implica mecanismos tanto físicos como químicos (Fargues, 1984). Es así, que todo inicia cuando la espora se deposita en la superficie del insecto (Téllez-Jurado et al., 2009), para luego continuar con la adsorción de la espora, en el cual se da el reconocimiento de receptores específicos (glicoproteínas) en el insecto (Pedrini et al., 2007), seguido de la activación de enzimas por parte del huésped como del hongo (Roberts & Humber, 1981) para luego germinar y formar el apresorio (Pucheta Díaz et al., 2006). Por otro lado, es importante señalar que cuando sucede la adhesión de la espora del hongo en la cutícula, participan proteínas tipo adhesinas las que son sintetizadas por el hongo (Holder & Keyhani, 2005). Finalmente, cabe resaltar que la etapa de adhesión es un condicionante importante, ya que el éxito de la muerte del insecto depende del número de esporas que se adhieren a la cutícula (Butt et al., 2016).

Penetración de la espora, existen características de la cutícula del huésped, que condicionan este proceso como son el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1992). Así mismo, esta cutícula es rica en lípidos, quitina y proteínas esclerotizadas (Ortiz-Urquiza & Keyhani, 2013). Terminado la adhesión de la espora, se inicia la fase de penetración, con la degradación de la cutícula, por acción de enzimas que se sitúan en el apresorio (Samuels et al., 2016), ello conlleva a la ruptura de la cutícula, para luego continuar con la penetración de las hifas a través de las rajaduras (Hajek & Leger, 2003). Durante esta etapa de la penetración además de actuar enzimas hidrolíticas también participan moléculas que inhabilitan las respuestas inmunitarias del huésped (Butt et al., 2016); sin embargo, el huésped puede expresar su defensa con antimicrobianos, entre péptidos y especies reactivas de oxígeno, que muchas veces puede suprimir al hongo (Feldhaar & Gross, 2008). Por otro lado, para que el hongo finalmente ingrese al hemocele e infecte sus tejidos, este secreta fosfolipasa C para hidrolizar los enlaces fosfodiéster que se encuentran en la membrana celular del huésped (Santi et al., 2010). Por último, es importante señalar que las diferentes enzimas y moléculas están codificadas por genes, los mismos que se presentan en la Tabla 1.

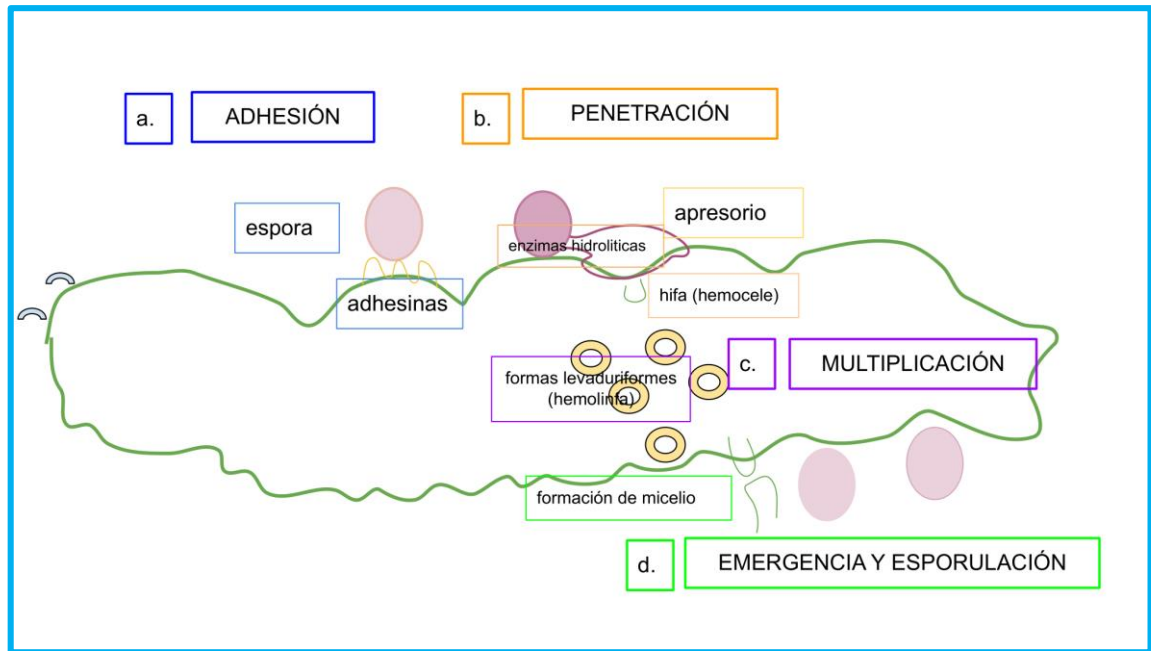
Multiplificación en el huésped, cuando el hongo llega al hemocele e invade la hemolinfa, muchos de ellos pasan de su forma micelial a la forma levaduriforme (Téllez-Jurado et al., 2009). Bajo esta forma se multiplica y con ella adquiere una gran ventaja,

con respecto a superficie/volumen, en la absorción de nutrientes (Altamira, 2020). Sin embargo, ello provoca la expresión y secreción de receptores de reconocimiento de patógenos del insecto a nivel de la hemolinfa, superficie de hemocitos, cuerpo graso y membranas de las células epidérmicas (Butt et al., 2016). También a modo de defensa producen moléculas (lectinas, inhibidores de fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos) y radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno (Jiang et al., 2010). Por su parte, los hongos tratan de minimizar las defensas inmunes del huésped, a través de la producción de toxinas, cambios estructurales en su pared celular y resistencia a péptidos antimicrobianos (Wang & Leger, 2006). También se sabe de la existencia de metabolitos secundarios, que sirven para evitar la defensa del insecto y la propagación de oportunistas (Donzelli et al., 2010), actuando como inmunomoduladores (aumenta la producción de conidios) y antimicrobianos, entre los que figura las hidroxifungerinas (Uchida et al., 2005) y la miriocina (De Melo et al., 2013), los mismos que favorecen la permanencia eficaz del hongo (Altamira, 2020). Finalmente, la multiplicación del hongo provoca cambios fisiológicos anormales en el insecto sobreviniendo la muerte de este (Bustillos, 2001).

Emergencia y esporulación, con la muerte del insecto, los nutrientes se agotan (fuentes de nitrógeno) ello provoca nuevamente que el hongo adquiera su forma micelial (Freimoser et al., 2003) y de esta forma emerge del insecto y en condiciones de humedad y temperatura se produce la esporulación en la superficie del cadáver (Butt et al., 2016). En secuencia, sucede la dispersión de la espora y su adhesión en un nuevo huésped (Vega & Kaya, 2012).

Figura 2

Etapas que ilustran el mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos



Nota. La figura muestra en orden cada uno de los mecanismos de los hongos entomopatógenos: a. Adhesión, la espora se deposita en la superficie del insecto y allí participan proteínas “adhesinas” producidas por el hongo; b. Penetración, formación del apresorio y ruptura de la cutícula y penetración de hifas al hemocele; c. Multiplicación transformación de la forma micelial a levaduriforme, bajo la cual se multiplica, absorbe nutrientes, provoca cambios fisiológicos y la muerte del insecto; d. Emergencia y esporulación, el hongo vuelve a su forma micelial, emerge del insecto y esporula. Tomado de (Choque et al., 2021)

2.2.1.1.3. Virus

Los virus entomopatógenos al igual que las bacterias entomopatógenas son reconocidas por su especificidad en cuanto a su huésped y por haber demostrado efectividad en el control de diversas plagas de lepidópteros, himenópteros, entre otros (Kalha et al., 2014). Los virus entomopatógenos pueden encontrarse repartidos en muchas familias, pero de forma general se los agrupa en dos grandes categorías no taxonómicas, los virus ocluidos o con cuerpos de oclusión y los no ocluidos. Los primeros se

caracterizan porque los viriones están incrustados dentro de una matriz proteica dando lugar a cuerpos paracrystalinos. Por otro lado, los virus no ocluidos son los que típicamente sus viriones se encuentran libres o sea no se encuentran dentro de un cuerpo de oclusión, aunque algunas veces pueden formar cuerpos paracrystalinos (Federici, 1999). Es importante señalar que de todos los virus entomopatógenos, los más dañinos son los pertenecientes a la familia Baculoviridae (Kalha et al., 2014), ya que existen reportes de su importante papel como controladores de plagas de insectos, como son lepidópteros, dípteros, himenópteros, ortópteros entre otros (Harrison & Hoover, 2012). Los baculovirus están organizados en 4 géneros como son los Alphabaculovirus (Nucleopolyhedrovirus que ataca lepidópteros), Betabaculovirus (Granulovirus aislados de lepidópteros), Gammabaculovirus (Nucleopolyhedrovirus ataca a himenópteros como las moscas de sierra) y Deltabaculovirus (aislado de dípteros como *Culex nigripalpus*) (Jehle et al., 2006). Finalmente, antes de conocer el mecanismo de infección de los baculovirus, por destacar como control de plagas de insectos, es importante señalar que su ciclo de vida incluye dos formas fenotípicas: los virus derivados de la oclusión o poliedros (ODV/PDV), autores de la infección primaria y los llamados virus germinados o de brote o no ocluidos (infección secundaria) (Kalha et al., 2014).

2.2.1.1.3.1.Mecanismo de acción

En los virus, al igual que en las bacterias entomopatógenas, la infección comienza casi siempre cuando el huésped ingiere los virus productos de oclusión, ya sea en su forma de poliedro o gránulos, a través de su alimento, este proceso comprende las siguientes etapas que es importante diferenciarlas:

Solubilización de las oclusiones, una vez que la forma ocluida del virus llega al intestino medio de la larva del insecto, esta se disuelve debido al pH alcalino (8,0), provocado por las bombas de potasio, propias de las células caliciformes de esta zona. Existen evidencias que los cuerpos cristalinos de las oclusiones se disuelven muy rápidamente una vez expuestos al líquido digestivo, así mismo, se cree que esta disolución es provocada por la ruptura de los puentes disulfuros de la poliedrina (Harrison & Hoover, 2012; Ji et al., 2010).

Penetración de la matriz peritrófica e ingreso a las células del intestino medio, esta matriz peritrófica que se encuentra en el intestino medio es como una red de fibrillas de quitina que están unidas a glicoproteínas y proteoglicanos, que tienen una función similar de protección tal como la mucosa en mamíferos (Hegedus et al., 2008). Los baculovirus para poder penetrar esta matriz peritrófica necesitan de unas proteínas potenciadoras para evitar las defensas del huésped. Estas son las que degradan la mucina que cubre el intestino medio y de esta manera los baculovirus, penetran en las células e inician propiamente la infección (Wang & Granado, 1997). Esta penetración de los virus es posible que suceda por fusión entre la membrana plasmática de las células del epitelio del intestino y la envoltura de los virus, valiéndose para ello de un receptor específico (Horton & Burand, 1993). Así mismo, para que la infección a nivel del intestino medio sea efectiva se necesita proteínas de la envoltura de los virus conocidas como factores de infectividad *per os* (Pijlman et al., 2003), así como otras que posibiliten la unión y fusión antes señalada (Peng et al., 2010).

Transporte e ingreso al núcleo de las células del intestino medio, una vez que los viriones lograron ingresar a las células, son las nucleocápsides las que se movilizan a través del citoplasma hasta llegar al núcleo que es donde los viriones se replicarán, es así que se encontraran nucleocápsides agregadas en los poros del núcleo y en el nucleoplasma (Ohkawa et al., 2010).

Liberación del ADN viral, este acontecimiento está relacionado con la participación de una quinasa que se encuentra en la cápside del virus, la cual es activada gracias a un proceso de quelación del zinc, el mismo que inicia la liberación del ADN de las nucleocápsides; así mismo, a este proceso viene acompañado de la fosforilación de una nucleoproteína, quien se cree que es la responsable del desnudamiento total del ADN (Harrison & Hoover, 2012).

Transcripción y replicación viral, esto sucede luego que el ADN viral liberado se une a las histonas del genoma del huésped. Es así que comienza la transcripción de los genomas virales y se da inicio a una nueva generación de virus. Cabe señalar que mientras

se van generando estas nuevas progenies, el huésped sufre alteraciones de sus funciones vitales, los mismos que condicionan de forma positiva la infección (Caballero et al., 2001).

Ensamblaje y salida de los viriones, las nucleocápside se ensamblan en el estroma virógeno y la región periestromal (dos compartimentos subnucleares en las células infectadas); estas cápsides están conformadas por proteínas como es la VP39 (proteína principal), la PP78/83, la VLF-1, VP1054 (importante para el ensamblaje), entre otras (Vanarsdall et al., 2006; Wu et al., 2008); las nucleocápsides a su vez están integradas por el ADN viral aunado con una proteína p6.9 (caracterizada por su alto contenido de arginina lo que le confiere una elevada carga positiva), la que gracias a su propiedad de poseer una elevada carga positiva ayuda a la condensación del ADN en el interior de la cápside (Kelly et al., 1983). Es importante mencionar que una vez que sucede el ensamblado a continuación recién se da la ocupación de este por el genoma viral (Fraser, 1986). Posteriormente, las nucleocápsides salen del núcleo y llegan hasta las regiones de la membrana plasmática ricas en colesterol y muy estructuradas, es por estas zonas por donde brotan estas nucleocápsides hacia el espacio extracelular, dando lugar de esta manera a un nuevo fenotipo de virión brotado o germinado, el mismo que es responsable de la infección secundaria (Haines et al., 2009). Cabe señalar que estos viriones brotados se trasladan por la hemolinfa infectando diversos tejidos y órganos, es así que este tipo de infección se singulariza por el encapsulamiento de las nucleocápsides en una matriz proteica que puede ser poliedrina o granulina formándose de esta manera nuevamente los cuerpos de oclusión, provocando con ello la muerte del huésped y la liberación de los cuerpos de oclusión hacia el ambiente, dándose así un nuevo ciclo de infección (Rohrmann, 2019).

2.2.2. *Olivo*

El nombre científico del olivo es *Olea europaea* L., esta especie corresponde a un árbol perennifolio, es decir es una planta que presenta sus hojas verdes y funcionales de una temporada a otra o por mucho tiempo, puede alcanzar un tamaño entre los tres a ocho metros de altura (Romero et al., 2012).

2.2.2.1. Clasificación taxonómica

El olivo según la taxonomía pertenece al dominio: Eukarya, reino: Plantae, división: Magnoliophyta, orden: Lamiales, familia: Oleaceae, genero: *Olea* y especie: *Olea europaea* L. (Casanova, 2022).

2.2.2.2. Características morfológicas

El árbol de olivo presenta una raíz que lo ancla al suelo y que a través de ella absorbe sus nutrientes y agua, los mismos que servirán para la alimentación de sus diferentes estructuras vegetativas y reproductivas. Con respecto al tronco se puede señalar que es recto, liso y cilíndrico en el caso de árboles jóvenes, el mismo que después termina en ramificaciones. Estas ramas son las encargadas de dar sostén a las hojas, flores y frutos (Casilla-García et al., 2021). Las ramas pueden sufrir subdivisiones formando así ramas primarias (armazón del árbol), secundarias (copa del árbol) y las fructíferas. Seguidamente se encuentra a las hojas de bordes enteros y con un corto peciolo, pueden tener forma elíptica, lanceolada o lineal. Se caracterizan por presentar un color verde oscuro en la zona abaxial y color blanco plata en la adaxial (Romero et al., 2012). A continuación se tiene a las flores, donde están ubicados los órganos reproductivos de la planta. Se caracterizan por presentar inflorescencias (cuatro pétalos blancos y dos anteras) que salen de las axilas de las hojas de las ramas fructíferas; cabe señalar que el número de flores oscila entre diez a cuarenta por racimo, las mismas que al transcurrir los días caen y se generan los frutos pequeños. Cuando los frutos maduran se tornan de un color oscuro vinoso y con un alto contenido energético. Tiene forma elipsoidal, ovoide (Casanova, 2022).

2.2.2.3. Estados fenológicos

Comprendido por el ciclo vegetativo y reproductivo de la planta, los mismos que a continuación se detallan:

Ciclo vegetativo, representado por: la **parada estival**, que es la fase en el cual se detiene el desarrollo de la planta y está comprendido entre los dos primeros meses del año; **el crecimiento vegetativo**, es la fase en el cual se observa el crecimiento de las hojas,

ramas y raíces. Esta fase sucede en dos momentos que son de marzo y abril así como de julio a diciembre; **reposo invernal**, etapa en el cual la planta se mantiene en latencia, sucede entre el quinto y sexto mes del año (Casanova, 2022).

Ciclo reproductivo, en él se encuentra la fase de **crecimiento de los frutos** (posterior al periodo de cuajado) que se da entre los meses de enero y febrero; **Maduración**, fase en donde se expresa el color según su variedad y puede ser observada entre marzo y abril; **iniciación floral**, etapa en donde las yemas axilares se vuelven en yemas florales y sucede entre mayo y junio; **diferenciación y crecimiento de primordios florales**, etapa donde aparecen las primeras inflorescencias los que posteriormente darán lugar a los botones florales, ocurre en el periodo de julio a setiembre; **floración, polinización, fecundación y cuajado**, en orden de ocurrencia está la floración, donde se observa que las flores tienen un crecimiento rápido alcanzan su tamaño límite, el mismo que sucede antes de octubre. Seguidamente está la polinización que puede ser anemófila o entomófila le sigue la fecundación y por último, el cuajado del fruto, estos últimos comprendidos entre octubre y noviembre (Huaracusi, 2016).

2.2.3. *Plagas del olivo*

Se llama plaga a cualquier organismo vivo o agente patógeno que cuando se encuentra en gran número provoca daños en los cultivos, la salud, los bienes o el ambiente del hombre (Chávez et al., 2008).

2.2.3.1. *La Margaronia*

El gusano del brote del olivo llamado comúnmente “Margaronia”, (*Palpita persimilis*) taxonómicamente se encuentra en el Orden Lepidóptera (Casanova, 2022). A esta plaga se la puede encontrar tanto en su forma adulta como larva. Con respecto al espécimen adulto es una mariposa blanca de 25 mm de expansión alar, donde se observa cuatro manchas negras, que pueden visualizarse en la Figura 3, las que le han dado nombre a la especie (SENASA, 2017b). Esta mariposa es una polilla, diurna, tímida, que coloca los huevos en el envés de las hojas, en el pecíolo y entre los botones florales en un

número de 200 por hembra. Cuando se observa al estado de larva, se puede apreciar que es de color verde con la cabeza marrón oscura, características que también se pueden evidenciar en la Figura 4, es así que la larva crece de 1,5 mm hasta 16 mm, estas tienen afinidad por localizarse en los brotes tiernos (Casanova, 2022).

Figura 3

Estado adulto de la Margaronia



Nota. Tomado de Chávez et al., 2008)

Figura 4

Estado larval de la Margaronia



Nota. Tomado de Chávez et al., 2008

Su ciclo de vida comprende la incubación de huevos, que dura de 8 a 12 días; el periodo larval que comprende de 30 a 45 días y estado de pupa y adulto que toma de 10 a 20 días (Casanova, 2022). Con respecto a los daños se debe mencionar que es la larva la causante de la caída de las hojas y flores; debido a que tiene afinidad por ubicarse en los brotes tiernos, los cuales los usa de alimento hasta dejarlos pegados y esqueletizados como si estuvieran quemados. Cuando el daño es muy severo sobre todo en épocas de climas calurosos como cuando sucede el fenómeno “El Niño”, puede inclusive afectar a los frutos, debido a que su población es excesiva; el ataque de este insecto plaga es de preocupación para los agricultores ya que el daño se inicia un año antes, en la etapa de floración del olivo, afectando así la cosecha próxima (Casanova, 2022; SENASA, 2017b).

2.2.3.2. Gusano medidor del olivo

Su nombre científico es *Cyclophora* sp., más conocido como el geométrido o gusano medidor ya que cuando se desplaza pareciera que estuviera midiendo el área por donde avanza, pertenece a los microlepidopteros. Esta plaga normalmente provoca daños a los órganos de las flores debido a que aparece justo en la etapa de floración del olivo, es así que al alimentarse de los botones y flores solo deja como rastros unos hilos que cuelgan de los pedúnculos que quedan (Casanova, 2022).

2.2.3.3. Queresá móvil del olivo

Este insecto plaga se caracteriza por su amplia distribución en las tierras donde se cultiva árboles de olivo. Su nombre científico es *Orthezia olivícola*, es una especie polífaga, con reproducción partenogenética poseen un ovisaco de color blanco, forma cilíndrica y encorvada hacia arriba con un tamaño de hasta 11 milímetros. Sus hembras producen entre 82 a 116 nuevos individuos (Chávez et al., 2008). La queresá móvil se alimenta de la sabia de las hojas del olivo, esto lo hace por succión, momento en el cual estas eliminan sustancias azucaradas, las mismas que sirven como nutriente para que pueda desarrollarse el hongo *Capnodium* sp que causa la fumagina en las hojas. Este fenómeno puede ser reconocido por el ennegrecimiento que cubre las hojas, lo que provoca disminución de la fotosíntesis debido a que no se puede aprovechar al máximo la energía solar. Por otro lado, cabe señalar que la duración del ciclo de vida de la queresá

móvil puede estar condicionado por las estaciones climatológicas, es así que en época de verano el ciclo dura aproximadamente 65 días y en invierno su ciclo es más extenso ya que puede alcanzar los 100 días. Finalmente, la queresa móvil del olivo debe su amplia distribución gracias a los vientos que se generan, aves entre otros (Casanova, 2022).

Figura 5

Estado adulto de la queresa móvil atacando hojas y ramas de olivo



Nota. Tomado de la página de Facebook de la Dirección de Agricultura-Tacna, 2020. <https://www.facebook.com/photo/?fbid=102419008179743&set=pb.100041702932180.-2207520000>.

2.2.3.4. Barrenillo del olivo

Esta plaga es llamada así debido a que barrenan las ramas y tallos del olivo. El nombre científico del barrenillo es *Hylesinus oleiperda*, los que se caracterizan porque durante su ataque construyen largas galerías llenas de aserrín, lo que provoca un desequilibrio hídrico en los árboles del olivo, lo que trae como consecuencia la falta de accesibilidad o transporte del agua hacia las ramas; motivo por el cual se observan ramas secas de color marrón y con agujeros, tal es así que cuando el daño es severo puede ocasionar que el árbol del olivo quede improductivo (Casanova, 2022).

Figura 6

Estado adulto del barrenillo del olivo



Nota. Tomado de Casanova (2022)

2.3. Definición de términos básicos

Control biológico: Consiste en la acción de enemigos naturales contra plagas y malas hierbas; sobre todo el uso de depredadores, insectos parásitos, hongos, bacterias, virus, nematodos, entre otros (Jiménez, 2009).

Entomopatógenos: microorganismos con la capacidad de eliminar o inhibir el desarrollo de insectos plagas, que pueden encontrarse de forma natural en el medio ambiente, suelo, restos de cultivo y sobre cadáveres de insectos (Cañedo & Ames, 2004)

Microorganismos nativos: Son microorganismos que presentan diferentes habilidades y que pertenecen a una zona determinada con características propias de la zona (Robaina et al., 2015)

Plagas: Las plagas son plantas, animales, insectos, microbios u otros organismos no deseados que interfieren con la actividad humana (SENASA, 2017a)

2.4. MARCO FILOSÓFICO

Esta investigación, por obedecer a la estructura de un método científico en donde se realizará la comprobación de una hipótesis, está basada en la corriente filosófica del empirismo, teniendo como principal representante para nuestro caso a Francis Bacon,

quien propone que el conocimiento tiene su origen en la demostración de los acontecimientos y para ello se debe utilizar el método científico (Bacón, 1949)

Por otro lado, esta investigación sin contradecir a lo propuesto por Francis Bacon, también comparte con lo propuesto por Karl Popper, quien sostiene que todo conocimiento para ser considerado como válido debe ser refutable (Burgos, 2015). O sea que los conocimientos parten de hipótesis a partir de las cuales se pueden deducir enunciados comprobables, mediante las observaciones experimentales, en caso de que estas observaciones revelen como falsos estos enunciados, la hipótesis debe ser refutada.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1. *Diseño de la investigación*

Experimental.

3.1.2. *Nivel de investigación*

Explicativo, porque expone cómo afecta la variable independiente (concentración de bacterias nativas) sobre las variables dependientes (larvas eliminadas) a través de un ANDEVA.

3.1.3. *Tipo de estudio*

Aplicada, por que determina el efecto que causa la concentración o dosis de bacterias nativas sobre la plaga “Margaronia”

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA DE ESTUDIO

3.2.1. *Población*

La población estuvo conformada por todas las bacterias nativas de las áreas de cultivo de olivo de la zona agrícola La Yarada – Los palos.

3.2.2. *Muestra*

Para la obtención de bacterias entomopatógenas: conformada por las muestras de suelos de las plantas de olivo, a excepción de las áreas de cultivo que fueron expuestas a algún tipo de producto biológico comercial

Para la obtención de las formas larvarias de la Margaronia: estuvo conformada por larvas de primer y segundo estadio, las mismas que procedieron de plantas de olivo que fueron seleccionadas por conveniencia por obedecer a un estudio dirigido, ya que el

criterio de selección está orientado a las plantas infestadas con la *Margaronia* (Hernández Sampieri et al., 2014).

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Operacionalización de variables de estudio

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Unidades /categorías	Escala
<p>Variable independiente</p> <p>Concentración o dosis (cel/ml o esporas/ml) de bacterias nativas entomopatógenas de la zona agrícola de la Yarada – Los Palos .</p>	<p>Las bacterias nativas entomopatógenas son organismos cuyo origen natural se corresponde con un territorio determinado.</p>	<p>Concentración de bacterias, capaces de inhibir o eliminar el desarrollo de plagas</p>	<p>Bacterias (Munshid et al., 2013)</p> <p>10⁷ cel/ml</p>	<p>Concentración o dosis de bacterias</p>	<p>Sí No</p>
<p>Variable dependiente</p> <p>Actividad de control sobre la <i>Margaronia</i> (<i>Palpita persimilis</i>) de los cultivos de olivo, de la zona agrícola La Yarada – Los Palos (%)</p>	<p>La actividad de control de las plagas estará determinada por el número de larvas eliminadas con respecto al control (número inicial de larvas).</p>	<p>Cantidad de larvas eliminadas</p>	<p>La actividad se determinara mediante la fórmula propuesta por (Ruano et al., 2007):</p> $Pfa / Pia \times Pib / Pfb \times 100,$ <p>Donde: Pia = población inicial del tratamiento, Pfa = población final del tratamiento, Pib = población inicial del testigo, sin control, Pfb = población final del testigo, sin control.</p>	<p>Número de larvas eliminadas</p>	<p>Razón</p>

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA RECOLECCIÓN DE DATOS

Teniendo en cuenta los objetivos específicos planteados en el presente estudio se estableció las técnicas e instrumentos para la recolección de los datos

3.4.1. Estimación de la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas contra la *Margaronia (Palpita persimilis)*.

3.4.1.1. Aislamiento de bacterias nativas

Muestreo, se realizó a partir de muestras de suelos de áreas de cultivo de plantaciones de olivo ubicados en el distrito de La Yarada Los Palos, provincia y departamento de Tacna, siendo su localización según coordenadas 18°17'7.51" S, 70°26'19.64" W. La muestra de suelo se extrajo entre los 10 a 20 cm de profundidad, se recolectó aproximadamente 100 g de suelo por cada punto de muestreo, las mismas que fueron colocados en bolsas de polipropileno de primer uso para ser trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann (Palma, 2018).

Aislamiento, de cada una de las muestras se tomó 10 gramos de suelo que fueron suspendidos en 90 ml de agua peptonada estéril. Seguidamente se realizaron dos series de diluciones hasta 10^{-5} , es así que de una de las series se realizó la siembra por diseminación de las dos últimas diluciones de forma directa en Agar Trypticosa soya, Agar nutritivo, Agar Mac conkey. Por otro lado, la segunda serie de diluciones fueron sometidos a baño maría de 70 °C por 15 minutos, transcurrido este tiempo se realizó la siembra de las dos últimas diluciones en los medios de cultivo antes mencionados. Luego todas las placas de cultivo fueron llevadas a incubación entre 28 a 30 °C por 72 horas (Mau et al., 2011).

Caracterización morfológica, transcurrido el tiempo de incubación se extrajo cada una de las colonias que crecieron en la superficie de los agares y fueron nuevamente sembradas sobre la superficie de agar Trypticosa soya para purificarlas y caracterizarlas de forma macroscópica (morfología de la colonia) y microscópica para lo que se empleó la coloración de Gram.

Cepario, finalmente a cada una de las bacterias se las sembró nuevamente en viales (frasco de vidrio tapa rosca de 50 x 20 mm) con el medio antes mencionado en superficie inclinada y se les asignó un código de identificación, de esta manera se mandaron a refrigeración a 5 °C para su conservación.

3.4.1.2. Colecta de las formas larvarias de la Margaronia

La colecta de las formas larvarias de la Margaronia se realizó a partir de plantaciones de olivo que presentaron daños característicos de esta plaga, así como los rasgos físicos de la larva. Las larvas se colectaron en depósitos de plástico (15 x 10 cm) de primer uso a los que se les acondicionó una tapa de tela de organza, los mismo que fueron colocados en un cooler para su traslado al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

3.4.1.3. Actividad entomopatógena de bacterias nativas a nivel de laboratorio

Preparación del inoculo, para ello se hizo la activación de cada una de las cepas bacterianas aisladas, la cual se realizó en caldo y agar Trypticasa soya para las bacterias no esporuladas y para el caso de las bacterias esporuladas se sembró en caldo y agar Luria Bertani, todos fueron incubados a 30 °C por 72 horas. Luego, se prepararon suspensiones de cada una de las bacterias en solución salina fisiológica estéril a una concentración igual al tubo N°5 de la escala de Mac Farland a $1,5 \times 10^9$ ufc/ml o esporas/ml, para el cual se utilizó el espectrofotómetro modelo AQ8100.

Prueba de patogenicidad, en esta etapa se tuvo en consideración que las larvas se infectan con la bacteria al ingerirlas con su alimento, es por ello que se prepararon depósitos de plástico de primer uso conteniendo hojas de olivo (las cuales fueron esparcidas con suspensiones de cada una de las bacterias) y 10 larvas de primer y segundo estadio indistintamente. El ensayo se realizó por triplicado para cada bacteria, además se consideró un control negativo (hojas de olivo esparcidas con agua destilada y las larvas) y un control positivo (hojas de olivo esparcidas con el producto biológico comercial). Transcurridos las 24 horas de iniciado el ensayo se registró el número de larvas muertas para determinar el porcentaje de mortalidad de cada cepa.

3.4.2. Evaluación de la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas en comparación con un producto de uso comercial a base de bacterias contra la *Margaronia (Palpita persimilis)*.

En esta etapa se tuvo en cuenta las cepas que mayor porcentaje de mortalidad presentaron en el ensayo anterior. Es así que se procedió según el detalle de la Tabla 2:

Tabla 1

Diseño para la evaluación de la actividad de control de bacterias entomopatógenas nativas versus producto biológico comercial

Bacterias	Dosis (ufc ó esporas/ml)		
CEPA A	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$
CEPA B	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$
PRODUCTO COMERCIAL	$1,5 \times 10^9$	$1,5 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$

Nota. Cabe mencionar que en cada ensayo se empleó 10 larvas

3.4.3. Identificación de las bacterias nativas con actividad entomopatógena contra la *Margaronia (Palpita persimilis)*, utilizando marcadores del gen ARN 16S.

Para la identificación genética de las bacterias se tuvo en cuenta las siguientes etapas:

Extracción de ADN bacteriano, previamente se activó las cepas bacterianas en agar Luria Bertani a 30°C x 24 horas. Seguidamente se realizó la extracción del ADN de cada una de las bacterias utilizando para ello el Kit de extracción y purificación de ADN (ANALITIK JENA): InnuPREP Bacteria DNA Kit (anexo 4). Finalmente, a los ADN extraídos se les realizó una electroforesis para conocer su integridad y la cantidad de ADN extraído con el equipo Qubit 4.

Amplificación del ADN, para la amplificación por PCR se utilizó primers universales forward 27F 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' y reverse 1492R 5'

TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3' (Anahis et al., 2019; Dos Santos et al., 2019; Raiyani et al., 2020). La reacción de PCR se realizó de acuerdo al protocolo del kit de Invitrogen Platinum Hot Start PCR 2X Master Mix (procedimiento en el anexo). La PCR se realizó en un termociclador con las siguientes condiciones a 96 °C por 4 min, y 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, y extensión de 1 min a 71 °C, con una final extensión de 10 minutos a 72 °C (Dos Santos et al., 2019). La cuantificación de ADN se realizó utilizando Qubit y se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %.

Secuenciación, la secuenciación del material genómico fue realizado por la empresa Macrogen, en Seúl-Corea del Sur, para lo cual se tuvo que enviar el ADN amplificado.

3.5. TRATAMIENTO DE DATOS

Para medir la actividad de control a nivel laboratorio, de microorganismos nativos sobre las plagas del olivo, se contará con un cuaderno de apuntes, donde se registró todos los datos de conteo de las larvas muertas. Posteriormente, estos datos fueron transferidos a una hoja de cálculo Excel.

Para el tratamiento de los resultados se aplicó estadísticos de prueba, para determinar si existe relación entre la actividad entomopatógena y las horas de exposición y para saber si existe diferencia entre la actividad del control de las bacterias nativas y el producto comercial biológico. Para ambos casos se utilizó Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) V.25 (Se descargó la versión V.25 gratis para estudiantes. (<https://www.ibm.com/pe-es/products/spss-statistics-campus-editions>))

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Tabla 2

Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la primera zona de muestreo

Zona de muestreo coordenadas	Bacterias nativas aisladas	
	Código de identificación	Morfología microscópica
18°10'06.3"S 70°25'58.6"W	2M-2	Bacilos Gram positivos
	2M-4	Bacilos Gram positivos
	2M-5	Bacilos Gram positivos
	2M-9	Bacilos Gram positivos
	2M-11	Coco Gram positivo
	2M-12	Coco Gram positivos
	2M-16	Bacilos Gram positivos
	2M-17	Coco Gram positivos
	2M-23	Bacilos Gram positivos

En la Tabla 2 se muestra la morfología microscópica de las bacterias, en donde se observa que todos se encuentran en el grupo de los Gram positivos. Así también se puede notar que la mayoría de ellas tienen forma de bacilos (70 %).

Tabla 3

Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la segunda zona de muestreo

Zona de muestreo coordenadas	Bacterias nativas aisladas	
	Código de identificación	Morfología microscópica
18°15'34.2"S 70°26'02.3"W	3M-5	Bacilos Gram positivos
	3M-6	Bacilos Gram negativos
	3M-19	Bacilos Gram positivos
	3M-21	Coco Gram positivo
	3M-22	Bacilos Gram positivos

Como se observa en la Tabla 3, la morfología de las bacterias nativas aisladas de los suelos de esta zona, son en su mayoría bacilos Gram positivos.

Tabla 4

Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la tercera zona de muestreo

Zona de muestreo coordenadas	Bacterias nativas aisladas	
	Código de identificación	Morfología microscópica
18°11'24.8"S 70°32'36.0"W	4M-1	Bacilos Gram positivos
	4M-5	Bacilos Gram positivos
	4M-12	Bacilos Gram positivos
	4M-13	Bacilos Gram positivos
	4M-14	Bacilos Gram positivos
	4M-21	Bacilos Gram positivos
	4M-23	Bacilos Gram positivos
	4M-24	Bacilos Gram positivos
	4M-25	Bacilos Gram positivos
	4M-26	Bacilos Gram positivos

En la Tabla 4 se puede notar que la totalidad de las bacterias nativas aisladas presentan una misma morfología microscópica, en su forma y reacción frente a la coloración de Gram.

Tabla 5

Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la cuarta zona de muestreo

Zona de muestreo coordenadas	Bacterias nativas aisladas	
	Código de identificación	Morfología microscópica
18°17'27.4"S 70°19'35.4"W	5M-4	Bacilos Gram positivos
	5M-6	Bacilos Gram positivos
	5M-7	Bacilos Gram negativos
	5M-10	Bacilos Gram positivos
	5M-11	Bacilos Gram positivos
	5M-12	Bacilos Gram positivos
	5M-13	Bacilos Gram positivos
	5M-14	Bacilos Gram positivos
	5M-16	Bacilos Gram positivos
	5M-18	Bacilos Gram positivos
	5M-19	Bacilos Gram negativos
	5M-20	Bacilos Gram positivos
	5M-22	Bacilos Gram positivos

En la Tabla 5 se distingue que del total de bacterias aisladas todas presentan una misma forma microscópica (bacilos) pero solo un 15 % de ellos son Gram negativos y el resto Gram positivos.

Tabla 6

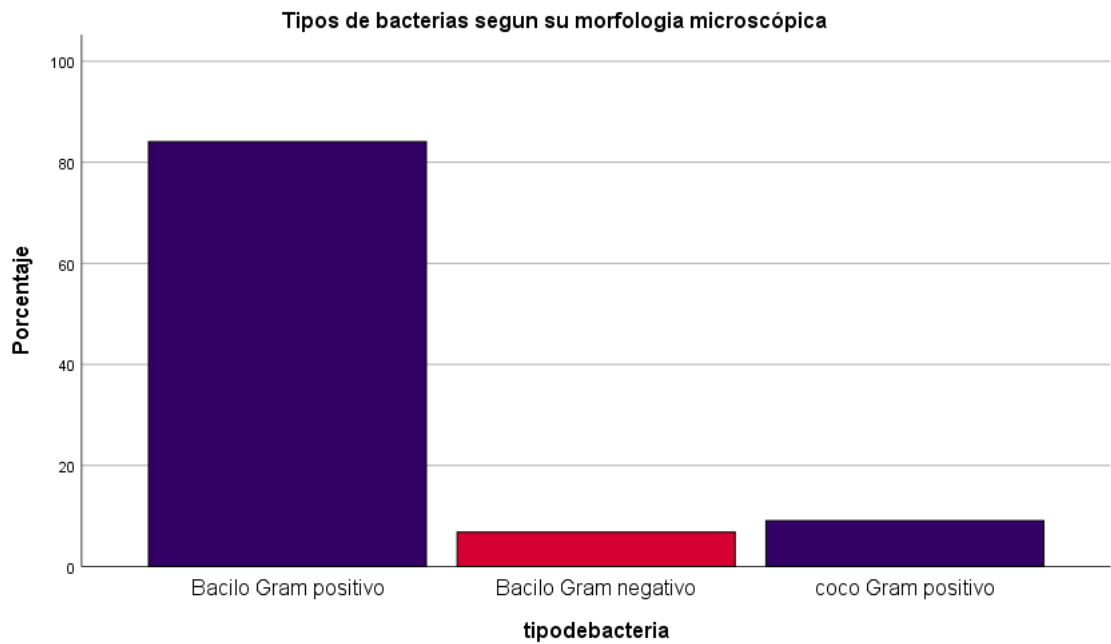
Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo en la quinta zona de muestreo

Zona de muestreo coordenadas	Bacterias nativas aisladas	
	Código de identificación	Morfología microscópica
18°07'39.9"S 70°23'29.4"W	6M-2	Bacilos Gram negativos
	6M-5	Bacilos Gram positivos
	6M-7	Bacilos Gram positivos
	6M-9	Bacilos Gram positivos
	6M-10	Bacilos Gram positivos
	6M-16	Bacilos Gram positivos
	6M-18	Bacilos Gram positivos

En la Tabla 6 se muestra que el total de las bacterias aisladas presentan un misma morfología microscópica y reacción frente a la coloración de Gram.

Figura 7

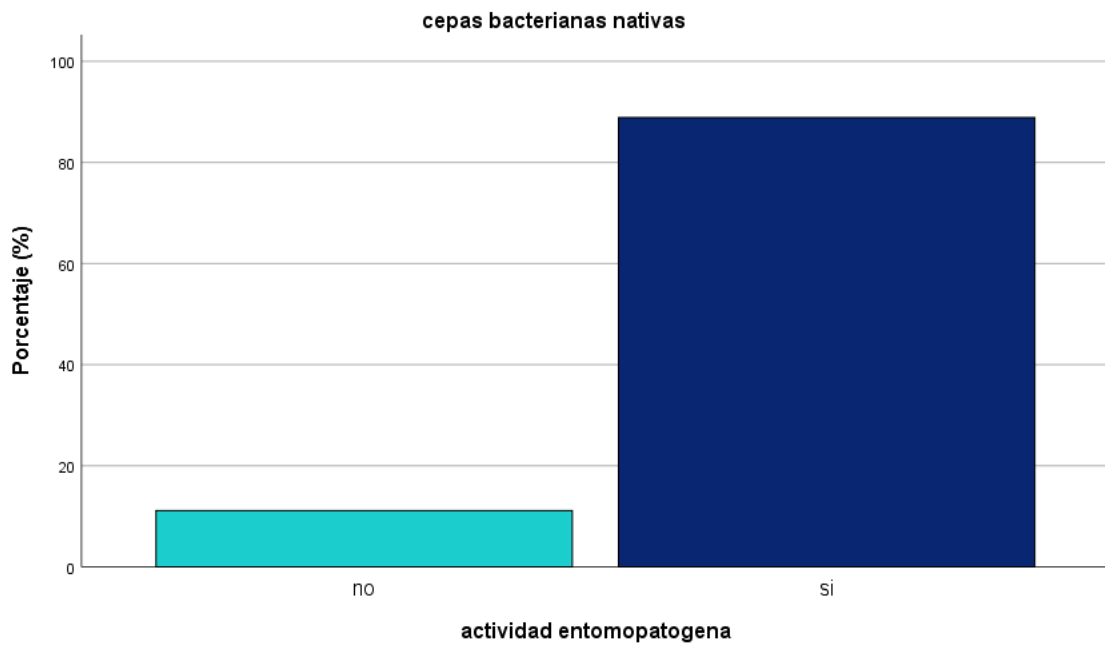
Bacterias nativas aisladas del suelo de cultivo de olivo agrupadas según su morfología microscópica



En la Figura 7 se registra el total de las bacterias nativas aisladas de los suelos de cultivo de olivo, agrupadas según su morfología microscópica y su reacción frente a la coloración de Gram. Asimismo, se puede visualizar que más del 80 % de las bacterias aisladas son bacilos Gram positivos.

Figura 8

Actividad entomopatógena de las bacterias nativas aisladas de suelos de cultivo olivo



En la Figura 8 se observa que del total de cepas bacterianas aisladas (36) aproximadamente el 90 % presentan actividad entomopatógena.

Tabla 7*Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad*

Cepa bacteriana	Tiempo de exposición (horas)	Individuos		
		Vivos	Muertos	% muertos
2M-2	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	8	2	20
	96	8	0	0
	Total	8	2	20
2M-4	24	10	0	0
	48	7	3	30
	72	3	4	70
	96	2	1	80
	Total	2	8	80
2M-5	24	10	0	0
	48	8	2	20
	72	5	3	30
	96	4	1	60
	Total	4	6	60
2M-9	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0
2M-16	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	8	2	20
	Total	8	2	20
2M-23	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	9	1	10
	96	8	1	10
	Total	8	2	20
Control negativo (agua destilada)	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0

En la Tabla 7 se tiene que de todas las bacterias que se muestran, aproximadamente el 33 % reportan porcentajes de mortalidad entre el 60 y 80 % ya que para los otros casos solo reportan como máximo un 20 % de mortalidad.

Tabla 8

Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad

Cepa bacteriana	Tiempo de exposición (horas)	Individuos		
		Vivos	Muertos	% muertos
3M-5	24	10	0	0
	48	5	5	50
	72	5	0	0
	96	5	0	0
	Total	5	5	50
3M-19	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	5	5	50
	96	4	1	60
	Total	4	6	60
3M-22	24	10	0	0
	48	5	5	50
	72	1	4	90
	96	1	0	0
	Total	1	9	90
Control negativo (agua destilada)	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0

En la Tabla 8 se visualiza que todas las bacterias nativas presentan porcentajes de mortalidad que oscilan entre un 50 a 90 %.

Tabla 9*Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad*

Cepa bacteriana	Tiempo de exposición (horas)	Individuos		
		Vivos	Muertos	% muertos
4M-1	24	10	0	0
	48	2	8	80
	72	0	2	100
	96	0	0	0
	Total	0	10	100
4M-5	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	4	6	60
	96	3	7	70
	Total	3	7	70
4M-12	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	9	1	10
	96	8	2	20
	Total	8	2	20
4M-13	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	9	1	10
	Total	9	1	10
4M-14	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	6	4	40
	96	4	2	60
	Total	4	6	60
4M-21	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	9	1	10
	96	8	1	10
	Total	8	2	20
4M-23	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	9	1	10
	96	8	1	10
	Total	8	2	20

continua

Cepa bacteriana	Tiempo de exposición (horas)	Individuos		
		Vivos	Muertos	% muertos
4M-24	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	7	3	30
	96	6	1	40
	Total	6	4	40
4M-25	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	9	1	10
	96	8	1	10
	Total	8	2	20
4M-26	24	10	0	0
	48	5	5	50
	72	0	5	100
	96	0	0	0
	Total	0	10	100
Control negativo (agua destilada)	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0

En la Tabla 9 se tiene que dos de las cepas bacterianas (4M-1 y 4M-26) eliminan en su totalidad a las larvas de la Margaronia y que el 40 % del total de las que se muestran reportan porcentajes de mortalidad de las larvas por encima del 60 %.

Tabla 10*Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad*

Cepa bacteriana	Tiempo de exposición (horas)	Individuos		
		Vivos	Muertos	% muertos
5M-4	24	10	0	0
	48	5	5	50
	72	5	0	0
	96	2	3	80
	Total	2	8	80
5M-6	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0
5M-10	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	7	3	30
	96	7	0	0
	Total	7	3	30
5M-11	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	7	3	30
	96	6	1	40
	Total	6	4	40
5M-12	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0
5M-13	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0
5M-14	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	6	4	40
	96	6	0	0
	Total	6	4	40

continua

Cepa bacteriana	Tiempo de exposición (horas)	Individuos		
		Vivos	Muertos	% muertos
5M-16	24	10	0	0
	48	5	5	50
	72	4	1	60
	96	2	2	80
	Total	2	8	80
5M-18	24	10	0	0
	48	9	1	10
	72	8	1	20
	96	8	0	0
	Total	8	2	20
5M-20	24	9	1	10
	48	9	0	0
	72	8	1	20
	96	8	0	0
	Total	8	2	20
5M-22	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	9	1	10
	Total	9	1	10
Control negativo (agua destilada)	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0

En la Tabla 10 se visualiza que solo el 20 % de las bacterias reportadas provocaron un 80 % de mortalidad en las larvas. Además, se observa que los porcentajes de mortalidad del resto de las bacterias van de 0 a 40 % como máximo.

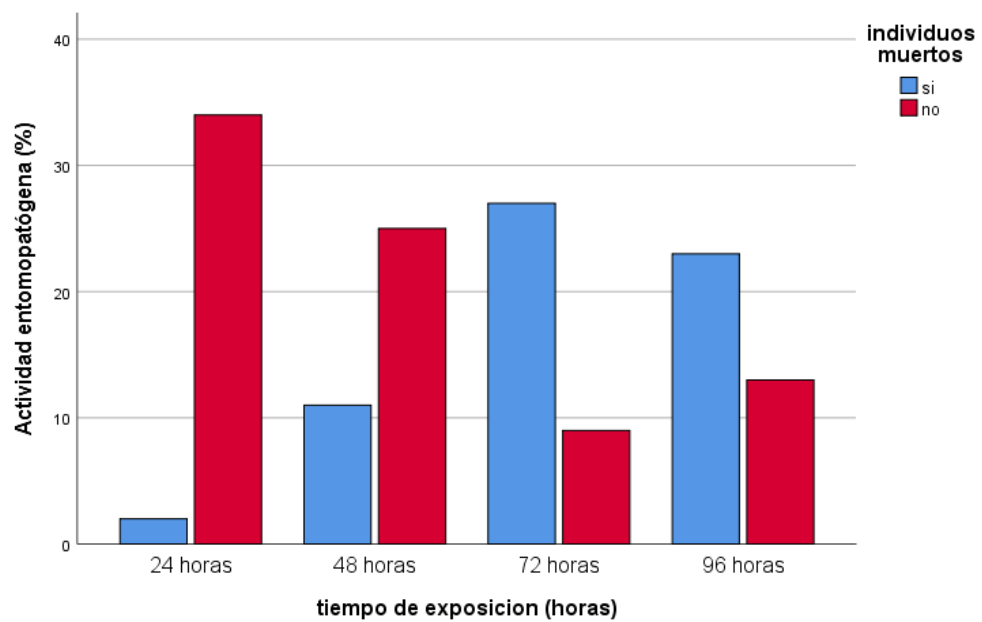
Tabla 11*Actividad entomopatógena de bacterias nativas expresado en porcentaje de mortalidad*

Cepa bacteriana	Tiempo de exposición (horas)	Individuos		
		Vivos	Muertos	% muertos
6M-5	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	7	3	30
	96	7	0	0
	Total	7	3	30
6M-7	24	10	0	0
	48	7	3	30
	72	5	2	50
	96	5	0	0
	Total	5	5	50
6M-9	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	8	2	20
	96	6	2	40
	Total	6	4	40
6M-10	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	5	5	50
	96	3	2	70
	Total	3	7	70
6M-16	24	10	0	0
	48	9	1	10
	72	6	3	40
	96	4	2	60
	Total	4	6	60
6M-18	24	10	0	0
	48	8	2	20
	72	4	4	60
	96	2	2	80
	Total	2	8	80
Control negativo (agua destilada)	24	10	0	0
	48	10	0	0
	72	10	0	0
	96	10	0	0
	Total	10	0	0

En la Tabla 11 se muestra que aproximadamente el 70 % de las bacterias que figuran reportan porcentajes de mortalidad entre un 50 a 80 % de las larvas.

Figura 9

Actividad entomopatógena de las bacterias nativas aisladas de suelos de cultivo olivo según horas de exposición



En la Figura 9 se visualiza la actividad entomopatógena de las bacterias nativas versus las horas exposición, donde se puede apreciar que la mayor actividad entomopatógena se logró a las 72 horas.

Por otro lado, con respecto a los resultados según las horas de exposición de las larvas frente a cada una de las bacterias aisladas que figuran en las Tablas 8, 9, 10, 11 y 12, se notifica que existe relación entre el tiempo de exposición y la actividad entomopatógena de las bacterias sobre las larvas según el estadístico de prueba (anexo 1), ya que se obtuvo un valor de $P = 0,00$ con un 95 % de confianza.

Tabla 12

Actividad entomopatógena de bacterias nativas sobre larvas de la Margaronia según dosis de aplicación

Cepa bacteriana (código)	Porcentaje de larvas muertas (%)		
	D1 ($1,5 \times 10^9$ ufc/ml)	D2 ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml)	D3 ($1,5 \times 10^7$ ufc/ml)
2M-4	80	50	50
2M-5	60	40	40
3M-5	50	30	10
3M-19	60	40	20
3M-22	90	80	50
4M-1	100	70	50
4M-5	70	40	20
4M-14	60	40	40
4M-26	100	70	70
5M-4	80	50	30
5M-16	80	40	40
6M-7	50	30	20
6M-10	70	50	40
6M-16	60	40	40
6M-18	80	50	30

En la Tabla 12 se muestra los códigos de bacterias que presentaron actividad entomopatógena sobre la Margaronia por encima del 50 %. Así mismo, en esta misma tabla se visualiza que la dosis de bacterias nativas que mayores porcentajes de mortalidad alcanzaron fue la dosis 1.

Por otro lado, cuando se aplicó el estadístico de prueba ANOVA para saber si existía diferencias entre los porcentajes de mortalidad de cada una de las dosis se obtuvo que sí existe diferencias significativas ($P = 0,00$) y que los porcentajes de mortalidad que resultaron de la dosis 1 son diferentes con respecto a los de la dosis 2 y 3, en los que sus resultados son iguales estadísticamente, según la prueba de especificidad de Tukey (anexo 2).

Tabla 13

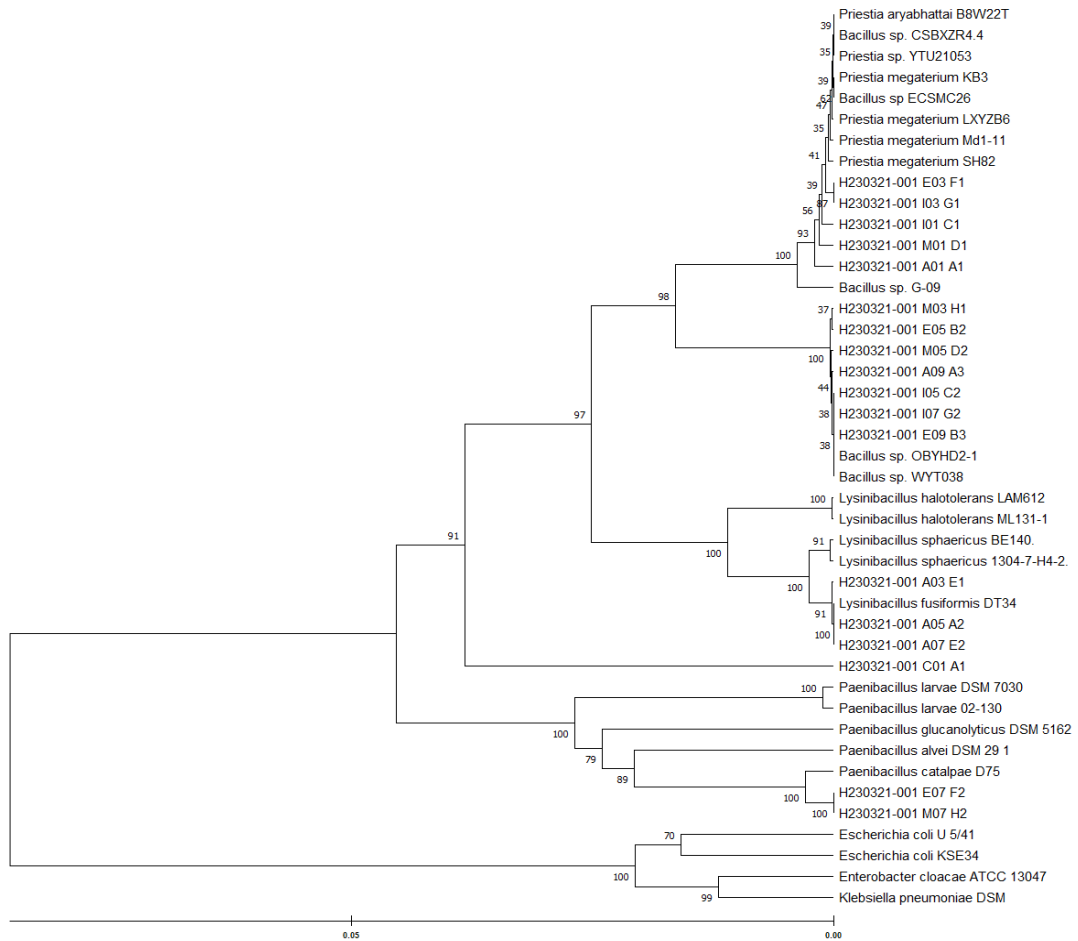
Actividad entomopatógena del producto comercial bacteriano (cepa patrón) sobre larvas de la Margaronia según dosis de aplicación

Producto biológico comercial	Porcentaje de larvas muertas (%)		
	D1 ($1,5 \times 10^9$ ufc/ml)	D2 ($1,5 \times 10^8$ ufc/ml)	D3 ($1,5 \times 10^7$ ufc/ml)
R1 (2M-4)	100	20	20
R2 (2M-5)	100	10	10
R3 (3M-5)	100	0	0
R4 (3M-19)	100	10	10
R5 (3M-22)	100	20	20
R6 (4M-1)	100	0	0
R7 (4M-5)	100	0	0
R8 (4M-14)	100	20	20
R10 (4M-26)	100	0	0
R11 (5M-4)	100	10	10
R12 (5M-16)	100	10	10
R13 (6M-7)	100	10	10
R14 (6M-10)	100	0	0
R15 (6M-16)	100	0	0
R16 (6M-18)	100	0	0

En la Tabla 13 se reporta los porcentajes de mortalidad que provocó el producto comercial bacteriano con las tres dosis de aplicación, además se visualiza el número de repeticiones (15) que se aplicó para este ensayo. Así mismo, se puede resaltar que los porcentajes de mortalidad reportados para la dosis 2 y 3 no sobrepasan el 20 %.

Figura 10

Árbol filogenético elaborado mediante el secuenciamiento del gen ADNr 16S para las 15 cepas con actividad entomopatógena



El Árbol filogenético fue elaborado mediante el secuenciamiento del gen ADNr 16S para 15 cepas aisladas, siendo los géneros bacterianos identificados *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus*. Para la construcción del árbol se empleó el método de reconstrucción filogenética *Neighbor-Joining* con 1000 réplicas. Los valores Bootstrap son mostrados entre las ramas respectivamente. El árbol fue realizado en el programa MEGA v 11.0.13 (2023).

Tabla 14

Identificación filogenética de las bacterias nativas con actividad entomopatógena sobre la Margaronia

Código de cepa	Nombre científico
2M-4	<i>Lysinibacillus</i> sp
2M-5	<i>Priestia</i> sp
3M-5	<i>Bacillus</i> sp
3M-19	<i>Paenibacillus</i> sp.
3M-22	<i>Bacillus</i> sp
4M-1	<i>Lysinibacillus</i> sp
4M-5	<i>Bacillus</i> sp
4M-14	<i>Lysinibacillus</i> sp
4M-26	<i>Bacillus</i> sp
5M-4	<i>Bacillus</i> sp
5M-16	<i>Paenibacillus</i> sp.
6M-7	<i>Priestia</i> sp
6M-10	<i>Bacillus</i> sp
6M-16	<i>Priestia</i> sp
6M-18	<i>Priestia</i> sp

En la Tabla 14 se muestra las especies de bacterias nativas con actividad entomopatógena sobre la Margaronia, identificadas filogenéticamente.

DISCUSIÓN

Los microorganismos pueden ejercer diferentes tipos de actividades de control sobre los patógenos, es así que cuando estos microorganismos inhiben el ciclo de vida de los insectos, ésta es llamada como actividad entomopatógena (Altamira, 2020), este tipo de actividad forma parte de lo que se conoce como control biológico o control microbiológico. En un sentido más estricto, control biológico (o control microbiológico) es la inserción artificial de microorganismos antagonistas en un componente de la naturaleza para controlar a un patógeno o una plaga (Debach, 1964). Estos antagonistas naturales pueden ser parásitos, depredadores y patógenos (Belda et al., 2000).

Dentro de las ventajas que posee el control biológico se puede mencionar que: no tiene efecto negativo sobre el hombre u otros organismos, no se ha reportado resistencia de las plagas hacia el control biológico, el efecto control es casi siempre permanente, el costo beneficio es mayor debido a que se elimina de forma fundamental el uso de insecticidas y puede formar parte de un manejo integral de plagas (Jiménez, 2009).

Por otro lado, cuando se quiere poner a efecto un control biológico, este debe tener en cuenta: la biología del organismo que se quiere controlar así como los factores abióticos que condicionan su desarrollo. Para el caso de los insectos plaga, se conoce que existen agentes que son patógenos, ya que pueden condicionar de forma significativa su dinámica poblacional, conocidos como entomopatógenos (Sabbahi et al., 2022).

Hoy en día el empleo de insecticidas químicos está muy asociado a problemas ambientales, ecológicos y de salud de los seres vivos (Razaq & Shah, 2022). Es por ello que en la actualidad se está optando por el uso de los llamados bioplaguicidas, los mismos que emplean microorganismos como agentes de control. Esta se presenta como una alternativa amigable que propone reducir y, por qué no, eliminar el uso de insecticidas químicos (Chandrakasan et al., 2022).

Los bioplaguicidas son compuestos u organismos naturales, que se encargan de disminuir o evitar la multiplicación de las plagas. Utilizando para ello diferentes mecanismos de acción propios de su naturaleza. Dentro de estos organismos se encuentran los microorganismos como son bacterias, hongos, nematodos, virus y protozoarios, todos ellos reconocidos por su capacidad entomopatógena (Lenteren et al., 2018).

En esta investigación se eligió a las bacterias como agentes de control biológico entomopatógeno, ya que es de conocimiento que las bacterias y los insectos a lo largo del tiempo han desarrollado diversos tipos de relaciones benéficas y antagónicas (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012). La actividad de las bacterias entomopatógenas ha sido reportada a lo largo de los años, donde se han demostrado que estas pueden estar ubicadas en los tres phylas bacterianos (Lacey et al., 2015) y en diferentes tipos de hábitat como son los suelos. Diversas investigaciones han demostrado la presencia y el aislamiento de bacterias entomopatógenas a partir de suelo agrícola (Calcagnile et al., 2022; Chandrakasan et al., 2022; Berón & Salerno, 2006; Bobrowski et al., 2001; Arango et al., 2002; Salama et al., 2015; Blibech et al., 2012) de diferentes cultivos. Las bacterias entomopatógenas aisladas del suelo pueden presentar diferentes características morfológicas vistas al microscopio, es así que por su morfología pueden ser bacilos, cocos cocobacilos, espirales, entre otros y por su forma de reaccionar frente a la coloración de Gram pueden ser Gram positivos y Gram negativos (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012); tal como se reportó en las Tablas 2, 3, 4, 5 y 6, donde figuran bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos. Cabe mencionar que del total de bacterias aisladas más del 80 % estuvo conformada por bacilos Gram positivos, el mismo que se visualiza en la Figura 7. Al respecto, se debe mencionar que este es un común denominador en diferentes investigaciones donde se han aislado bacterias de suelo con fines entomológicos (Morales, 2018; Rafael-Rutte et al., 2020).

Las bacterias nativas con carácter entomopatógeno evidencian su eficacia cuando provocan la muerte del insecto plaga, el mismo que es expresado en porcentajes de muerte o mortalidad. Los insectos plagas desde el punto de vista taxonómico pertenecen a ordenes diversos, pero el estado del ciclo biológico del insecto que más daño provoca a

los cultivos, es cuando este se encuentra a nivel de larva; es por ello que las investigaciones han dirigido su esfuerzo en lograr el control o la eliminación de estas larvas con el uso de bacterias que causen su muerte (Alcántara, 2022; Quiliche, 2021). En nuestro caso, según lo registrado en la Figura 8, del total de cepas bacterianas nativas aisladas (36) aproximadamente el 90 % demostraron tener actividad entomopatógena sobre las larvas del insecto plaga *Margaronia*; en las tablas 9, 10, 11, 12 y 13 se muestran los diferentes porcentajes de mortalidad que causaron las cepas nativas a las larvas de la *Margaronia* a diferentes niveles de tiempo, donde se puede apreciar que las bacterias nativas pueden provocar porcentajes de mortalidad que van desde un 10 a 100 %, a diferentes intervalos de tiempo (24, 48, 72 y 96 horas), resultados similares fueron reportados por Vargas (2019), cuando enfrentó *Bacillus thuringiensis* frente al gusano perforador que al igual que la *Margaronia* pertenece a los lepidópteros. Adicionalmente, podemos indicar que cuando se le aplicó el estadístico de prueba se encontró que existe relación significativa entre el tiempo de exposición y la actividad entomopatógena de las bacterias ya que se obtuvo un valor de $P = 0,00$ con un 95 % de confianza (anexo 1). Por otro lado, para evaluar el potencial entomopatógeno de las cepas nativas solo se seleccionaron a las cepas que provocaron una mortalidad igual o mayor al 50 % (Pérez et al., 2017) de las larvas de la *Margaronia*, las mismas que se muestran en la Tabla 12; de esta misma tabla se puede resaltar que la dosis a la cual las bacterias nativas presentan mayor actividad entomopatógena es la dosis 1 ($1,5 \times 10^9$ ufc/ml), esta dosis es menor a la empleada por Tesen (2019), ya que en nuestro caso los ensayos fueron realizados a nivel de laboratorio y no a nivel de campo. Así mismo, cuando se aplicó el estadístico de prueba ANOVA para saber si existía diferencias significativas ($P=0,00$), entre los porcentajes de mortalidad de cada una de las 3 dosis trabajadas, se obtuvo que sí existe diferencias significativas y que los porcentajes de mortalidad que resultaron de la dosis 1 son diferentes según el estadístico de Tukey, con respecto a los de las dosis 2 y 3, en los que sus resultados son iguales estadísticamente (anexo 2).

Es importante, señalar que para comparar la actividad entomopatógena de las cepas nativas con la cepa del producto biológico comercial, se consideró la concentración del producto comercial y dos dosis adicionales, las mismas que fueron producto de

diluciones hechas a la concentración del producto comercial; quien fue identificado también como cepa control para los bioensayos. En la Tabla 12 se muestra la actividad entomopatígena de la cepa patrón, según dosis de aplicación, donde se puede notar que la cepa patrón en su concentración original (dosis1) provoca siempre en cada uno de los ensayos el 100 % de mortalidad, no siendo así en las dosis 2 y 3 ya que no logra provocar más de un 20 % de mortalidad en las larvas. Por otro lado, cuando se aplicó el estadístico de prueba de Mann-Whitney para comparar los porcentajes de mortalidad obtenidas de cada una de las dosis tanto de las bacterias nativas como del patrón se reporta que existe diferencias significativas entre ellas (anexo 3). Adicionalmente, si se visualiza en forma simultánea las Tablas 12 y 13 se observa que los porcentajes de mortalidad generados cuando se aplica las dosis 2 y 3, en la cepa patrón y cepas nativas, la actividad entomopatígena de las cepas nativas es mayor. Esto es importante resaltar porque podría ser una de las razones por las cuales los productos biológicos comerciales no alcanzan la efectividad que promocionan; así mismo, cabe señalar que si bien las cepas nativas no superan en efectividad a la cepa patrón en su concentración original, estas mantienen su potencial aun cuando estas sufran diluciones, procedimiento o práctica que es común que suceda cuando los agricultores realizan la preparación de sus productos de control biológico.

Finalmente, se elaboró un árbol filogenético para la identificación de las cepas con mayor actividad entomopatígena (por encima del 50 %), especies que se observan en la Figura 9, donde se puede encontrar especies de los géneros *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus*. Cabe señalar que para la construcción del árbol se empleó el método de reconstrucción filogenética *Neighbor-Joining* con 1.000 réplicas (Saitou & Nei, 1987). Los valores Bootstrap son mostrados entre las ramas respectivamente. El árbol fue realizado en el programa MEGA v 11.0.13 (2023) (Tamura et al., 2007). Por otro lado, con respecto a los géneros identificados forman parte de las familias Bacillaceae, Paenibacillaceae, quienes han demostrado a través de diversas investigaciones actividad entomopatígena (Jurat-Fuentes & Jackson, 2012; Lacey et al., 2015). Así se tiene a la especie *Lysinibacillus sphaericus*, quien es un bacilo Gram positivo esporulado que produce una toxina altamente tóxica para larvas de mosquitos.

Esta toxina está formada por dos fracciones proteicas BinA y BinB de 41,9 y 51,4 kDa (Charles et al., 1996). Los componentes de esta toxina binaria ejercen actividades de forma individual lo que hacen a *Lysinibacillus sphaericus* que tenga un poder larvicida mejor que *Bacillus thuringiensis israelí* (Charles et al., 1996; Schwartz et al., 2001). Por otro lado, se tiene también identificado a especies de *Paenibacillus*, bacilos gran positivos formadores de esporas y patógenos obligados de larvas de la familia Scarabaeidae (Koppenhöfer et al., 2012) y de otros insectos como los himenópteros (Yoshiyama & Kimura, 2009). Por último, el género más reconocido por su actividad entomopatógena es *Bacillus*, es una bacteria, con forma de bastón, Gram positiva, formadora de esporas que se encuentra generalmente en el suelo, polvo, insectos muertos y agua (Hernández-Fernández, 2016). De este género la especie más reconocida como entomopatógena es *B. thuringiensis*, por ser la más usada en la formulación de biopesticidas (López & Cerón, 2010) gracias a su alta especificidad, a su mínima incidencia de fenómenos de resistencia y por no afectar o dañar al hombre (Lacey et al., 2015) ni a la entomofauna benéfica del ambiente (Schnepf et al., 1998). *B. thuringiensis* a lo largo de los años ha sido motivo de diversos estudios para dar a conocer su potencial entomopatógeno en diversos insectos plagas (Hernández-Fernández, 2016; Palma, 2018; Vargas, 2019).

CONCLUSIONES

1. Se demostró la actividad entomopatógena de bacterias nativas aisladas de los suelos de cultivo de olivo sobre la Margaronia (*Palpita persimilis*) de la zona agrícola La Yarada - Los Palos.
2. Se logró estimar la actividad de control, a nivel de laboratorio de bacterias nativas con carácter entomopatógeno ya que, del total de bacterias nativas aisladas, aproximadamente el 90 % presentan actividad entomopatógena y que de ellas 15 cepas provocaron un porcentaje de mortalidad de las larvas por encima del 50 % y que el tiempo necesario para lograr la mayor actividad entomopatógena fue de 72 horas.
3. Se logró comparar la actividad entomopatógena de las bacterias nativas con un producto comercial biológico, demostrándose que la cepa del producto comercial solo mantenía su potencialidad cuando se aplicaba en su concentración original no siendo así en las otras dosis de ensayo, actividad que si demostró las bacterias nativas en todas las dosis ensayadas.
4. Se logró identificar a las bacterias nativas con actividad entomopatógena utilizando marcadores del gen ARN 16S, es así que se identificaron a especies del género *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus* y *Paenibacillus*

RECOMENDACIONES

Basados en el desarrollo de este trabajo se puede hacer las siguientes recomendaciones, los mismos que contribuirán a mejorar los cultivos de la zona agrícola de La Yarada – Los Palos.

1. Realizar estudios posteriores para demostrar la actividad entomopatógena de las bacterias nativas sobre la Margaronia a nivel de campo.
2. Realizar un inventario de las principales plagas que dañan a cultivos diferentes al olivo de la zona agrícola de La Yarada – Los Palos, por estaciones del año.
3. Realizar estudios que demuestren la actividad entomopatógena en plagas, de cultivos diferentes al olivo de la zona agrícola de La Yarada – Los Palos, que también son de importancia económica.
4. Realizar estudios a nivel molecular que permitan la aplicación de las bacterias nativas desde un punto de vista agrobiotecnológico

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba, M. I. (2012). *Bacillus thuringiensis, el ingrediente activo de bioinsecticidas*. Año 17, número 63, enero—marzo 2012 en este número. *Comprendamos*, 17, 17–19. [Http://www.comptechdoc.org/basic/basicut/osintro.html](http://www.comptechdoc.org/basic/basicut/osintro.html)
- Alcántara, E. L. M. (2022). *Eficacia de control de Bacillus thuringiensis var. Kurstaki sobre Spodoptera frugiperda en espárrago y su efecto residual en invernadero*. Universidad Nacional de Trujillo. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3162012>
- Altamira, P. F. (2020). *Microorganismos con actividad entomopatógena*. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/6899>
- Anahis, Y., Aguilar, S., Cornejo, M., Torre, L., Regard, J. P., Louis, E., & Matonnier, M. (2019). *Caracterización molecular de bacterias cultivables y no cultivables procedentes de pozas de lixiviación con cianuro*. *Revista Peruana de Biología*, 26(2), 275–282. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i2.16383>
- Arango, J. A., Romero, M., & Orduz, S. (2002). *Diversity of Bacillus thuringiensis strains from Colombia with insecticidal activity against Spodoptera frugiperda (Lepidoptera:Noctuidae)*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(3), 466–474. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2002.01545.X>
- Belda, J. E., Cabello García, T., Barranco Vega, P., & Alcázar Alba, M. D. (2000). *Lucha integrada en cultivos hortícolas bajo plástico en Almería*. *Vida Rural*, ISSN 1133-8938, N° 118, 2000, Págs. 51-55, 118, 51–55. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=183421>
- Berón, C. M., & Salerno, G. L. (2006). *Characterization of Bacillus thuringiensis isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control*. *BioControl*, 51(6), 779–794. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10526-006-9018-4>
- Bilgo, E., Lovett, B., St Leger, R. J., Sanon, A., Dabiré, R. K., & Diabaté, A. (2018). *Native entomopathogenic Metarhizium spp. from Burkina Faso and their virulence against the malaria vector Anopheles coluzzii and non-target insects*. *Parasites and Vectors*, 11 (1), 1–6. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2796-6>

- Blibech, I., Ksantini, M., Chaieb, I., Jlassi, B., Rhouma, A., Jaoua, S., & Aifa, S. (2012). *Isolation of entomopathogenic Bacillus from a biodynamic olive farm and their pathogenicity to lepidopteran and coleopteran insect pests*. *Crop Protection*, 31(1), 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.09.020>
- Bobrowski, V. L., Pasquali, G., Bodanese-Zanettini, M. H., & Fiuza, L. M. (2001). *Detection of cryI genes in Bacillus thuringiensis isolates from South of Brazil and activity against Aanticarsia gemmatalis (Lepidoptera:Noctuidae)*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32(2), 105–109. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822001000200006>
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S., & Soberón, M. (2004). *Oligomerization triggers binding of a Bacillus thuringiensis CryIAb pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1667(1), 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2004.08.013>
- Bucher, G. E. (1981). *Identification of bacteria found in insects*. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases, 1970-1980*. <https://doi.org/10.3/jquery-ui.js>
- Bustillos, A. E. (2001). *Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia*. https://www.researchgate.net/publication/275462138_hongos_en_insectos_y_posibilidades_de_uso_en_el_control_biologico_de_plagas_en_colombia
- Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M., & Ratcliffe, N. A. (2016). *Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions*. *Advances in Genetics*, 94, 307–364. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- Caballero, P., Williams, T., & López-Ferber, M. (2001). *Los Baculovirus y sus aplicaciones como bioinsecticidas en el control biológico de plagas.*, 15–46. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=654028>
- Calcagnile, M., Tredici, M. S., Pennetta, A., Resta, S. C., Talà, A., De Benedetto, G. E., & Alifano, P. (2022). *Bacillus velezensis MT9 and Pseudomonas chlororaphis MT5 as biocontrol agents against citrus sooty mold and associated insect pests*. *Biological Control*, 176, 105091. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105091>

- Casanova, N. M. D. (2022). *Guía Técnica del Cultivo de Olivo en la Región Tacna*. Instituto Nacional de Innovación Agraria-INIA, Perú. <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1655>
- Chandrakasan, G., Ayala, M. T., García Trejo, J. F., Marcus, G., Maruthupandy, M., Kanisha, C. C., Murugan, M., AL-mekhlafi, F. A., & Wadaan, M. A. (2022). *Bio controlled efficacy of Bacillus thuringiensis cry protein protection against tomato fruit borer Helicoverpa armigera in a laboratory environment*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 119, 101827. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101827>
- Charles, J. F., Nielsen-LeRoux, C., & Delécluse, A. (1996). *Bacillus sphaericus* toxins: *molecular biology and mode of action*. *Annual Review of Entomology*, 41(1), 451–472. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002315>
- Charnley, A. K. (1992). *Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordid=gb9124433>
- Chávez, L. D., Arata, P. A., & Farfán, L. O. (2008). *El cultivo del Olivo en los valles de Caravelí*. Centro de Estudios y Promoción del Desarrollo - Desco. www.desco.org.pe
- Choque, M. A. V., Berrios, espejo Y. del C., Florez, S. J. L. T., Soto, G. H. H., González, A. J., & Argente, M. L. (2021). *Biopesticides: Mechanisms of biocidal action in pest insects*. *Research, Society and Development*, 10(7), e42010716893–e42010716893. <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I7.16893>
- Debach, P. (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. *Biological Control of Insect Pests and Weeds*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19640501191>
- De Melo, N. R., Abdrahman, A., Greig, C., Mukherjee, K., Thornton, C., Ratcliffe, N. A., Vilcinskis, A., & Butt, T. M. (2013). *Myriocin Significantly Increases the Mortality of a Non-Mammalian Model Host during Candida Pathogenesis*. *PLOS ONE*, 8(11), e78905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078905>
- Dirección Regional de Agricultura-Tacna. (2019). *Producción y Exportación Aceitunas - 2018*. <https://www.agritacna.gob.pe/>

- Dodd, S. J., Hurst, M. R. H., Glare, T. R., O'Callaghan, M., & Ronson, C. W. (2006). *Occurrence of sep insecticidal toxin complex genes in Serratia spp. and Yersinia frederiksenii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10), 6584–6592. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1610329/>
- Donzelli, B. G. G., Krasnoff, S. B., Churchill, A. C. L., Vandenberg, J. D., & Gibson, D. M. (2010). *Identification of a hybrid PKS-NRPS required for the biosynthesis of NG-391 in Metarhizium robertsii*. *Current Genetics*, 56(2), 151–162. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20355253/>
- Dos Santos, H. R. M., Argolo, C. S., Argôlo-Filho, R. C., & Loguercio, L. L. (2019). *A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information*. *BMC Microbiology*, 19(1), 1–14. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-019-1446-2>
- Fargues, J. (1984). *Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity*. <https://doi.org/10.3/jquery-ui.js>
- Federici, B. A. (1999). *A Perspective on Pathogens as Biological Control Agents for Insect Pests*. *Handbook of Biological Control*, 517–548. <https://doi.org/10.1016/b978-012257305-7/50065-5>
- Feldhaar, H., & Gross, R. (2008). *Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists*. *Microbes and Infection*, 10(9), 1082–1088. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.010>
- Ffrench-Constant, R., & Waterfield, N. (2005). *An ABC guide to the bacterial toxin complexes*. *Advances in Applied Microbiology*, 58, 169–183. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(05\)58005-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(05)58005-5)
- Flores, A., Egúsquiza Ch., R. M., Alcarraz C., M., Woolcott H., J. C., Benavides R, E., Godoy A., J., Huerta C., D., Jesus M., Y., & Patiño G., A. (2011). *Biodiversidad de Bacillus thuringiensis aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida*. *Ciencia e Investigación*, 14(1), 30–35. <https://doi.org/10.15381/ci.v14i1.3235>
- Fraser, M. J. (1986). *Ultrastructural observations of virion maturation in Autographa californica nuclear polyhedrosis virus infected Spodoptera frugiperda cell cultures*.

- Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research, 95(1–3), 189–195.
[https://doi.org/10.1016/0889-1605\(86\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0889-1605(86)90040-6)
- Freimoser, F. M., Grundschober, A., Tuor, U., & Aebi, M. (2003). *Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus Entomophthora thripidum in vitro*. FEMS Microbiology Letters, 222(2), 281–287.
[https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00315-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00315-x)
- Fuchs, T. M., Bresolin, G., Marcinowski, L., Schachtner, J., & Scherer, S. (2008). *Insecticidal genes of Yersinia spp.: Taxonomical distribution, contribution to toxicity towards Manduca sexta and Galleria mellonella, and evolution*. BMC Microbiology, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-214/tables/3>
- García, M. E. C., Angulo, M. J. B., Mamani, N. C., & Chaparro-Aguilar, E. (2021). *Varietades de Olivo (Olea europaea L.) de importancia económica de los departamentos Tacna y Moquegua*. Ciencia & Desarrollo, 20(1), 87–95.
<https://doi.org/10.33326/26176033.2021.1.1112>
- Girano Flores, R. M. (2004). *Eficiencia de bacillus thuringiensis en el control de spodoptera frugiperda en el cultivo de maíz (zea mays) en el Bajo Mayo*. Repositorio - UNSM. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2841793>
- Griko, N. B., Rose-Young, L., Zhang, X., Carpenter, L., Candas, M., Ibrahim, M. A., Junker, M., & Bulla, L. A. (2007). *Univalent binding of the CryIAb toxin of Bacillus thuringiensis to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1*. Biochemistry, 46(35), 10001–10007.
<https://doi.org/10.1021/bi700769s/asset/images/medium/bi700769sn00001.gif>
- Guevara, Á. Y. (2020). *Control biológico del cogollero (Spodoptera frugiperda) en el cultivo de maíz (Zea mays L.), en la comunidad de Santiago, Aymaraes – 2018*. Universidad Tecnológica de los Andes.
<https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3175381>
- Gutierrez, E., & Medina, F. (2017). *Control biológico de cogollero (spodoptera frugiperda) y mazorquero (heliiothis zea) en el cultivo de maíz amiláceo (zea mays L.), en la localidad de maucacalle Abancay – Apurímac*. Universidad Tecnológica de los Andes. <https://repositorio.utea.edu.pe/handle/utea/43>

- Haines, F. J., Griffiths, C. M., Possee, R. D., Hawes, C. R., & King, L. A. (2009). *Involvement of lipid rafts and cellular actin in AcMNPV GP64 distribution and virus budding*. *Virologica Sinica*, 24(4), 333–349. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12250-009-3055-y>
- Hajek, A. E., & Leger, R. J. (2003). *Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts*. <https://doi.org/10.1146/Annurev.En.39.010194.001453>, 39, 293–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
- Harrison, R., & Hoover, K. (2012). *Baculoviruses and Other Occluded Insect Viruses*. *Insect Pathology, Second Edition*, 73–131. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384984-7.00004-x>
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2008). *New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function.*, 54, 285–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>
- Hernández-Fernández, J. (2016). *Bacillus thuringiensis: a natural tool in insect pest control*. *The Handbook of Microbial Bioresources*, 121–139. <https://doi.org/10.1079/9781780645216.0121>
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2014). *Metodología de la investigación*. *Metodología de la Investigación Social Cuantitativa*, 35. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=775008&info=resumen&idioma=SPA>
- Holder, D. J., & Keyhani, N. O. (2005). *Adhesion of the entomopathogenic fungus Beauveria (Cordyceps) bassiana to Substrata*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260–5266. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16151112/>
- Horton, H. M., & Burand, J. P. (1993). *Saturable attachment sites for polyhedron-derived baculovirus on insect cells and evidence for entry via direct membrane fusion*. *Journal of Virology*, 67(4), 1860–1868. <https://doi.org/10.1128/jvi.67.4.1860-1868.1993>
- Huarcusi, C. A. A. (2016). *Fenología del olivo (Olea europea L.) var. Sevillana en una campaña productiva en La Yarada - Tacna*. <https://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/1983>

- Jackson, T. A., & McNeill, M. R. (2010). *Premature Death in Parasitized *Listronotus bonariensis* Adults Can be Caused by Bacteria Transmitted by the Parasitoid *Microctonus hyperodae**.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09583159830199>
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). *On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision*. *Archives of Virology*, 151(7), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Jiang, H., Vilcinskas, A., & Kanost, M. R. (2010). *Immunity in lepidopteran insects*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708, 181–204. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_10/cover
- Jiménez, E., (2009). *Métodos de control de plagas*.
<http://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2457>
- Ji, X., Sutton, G., Evans, G., Axford, D., Owen, R., & Stuart, D. I. (2010). *How baculovirus polyhedra fit square pegs into round holes to robustly package viruses*. *The EMBO Journal*, 29(2), 505–514. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.352>
- Jurat-Fuentes, J. L., & Jackson, T. A. (2012). *Bacterial Entomopathogens*. *Insect Pathology, Second Edition*, 265–349. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384984-7.00008-7>
- Kalha, C. S., Singh, P. P., Kang, S. S., Hunjan, M. S., Gupta, V., & Sharma, R. (2014). *Entomopathogenic Viruses and Bacteria for Insect-Pest Control*. *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective*, 225–244. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-398529-3.00013-0>
- Kelly, D. C., Brown, D. A., & Ayres, M. D. (1983). *Properties of the major nucleocapsid protein of *Heliothis zea* singly enveloped nuclear polyhedrosis virus*. *Journal of General Virology*, 64(2), 399–408. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-2-399/cite/refworks>
- Koppenhöfer, A. M., Jackson, T. A., & Klein, M. G. (2012). *Bacteria for use against soil-inhabiting insects*. *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 129–149. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386899-2.00005-1>

- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). *Insect pathogens as biological control agents: Back to the future*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lazarte, J. N., Valacco, M. P., Moreno, S., Salerno, G. L., & Berón, C. M. (2021). *Molecular characterization of a Bacillus thuringiensis strain from Argentina, toxic against Lepidoptera and Coleoptera, based on its whole-genome and Cry protein analysis*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 183, 107563. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107563>
- López, P. S. A., & Cerón, J. (2010). *Proteínas Cry de Bacillus thuringiensis y su interacción con coleópteros*. *Nova*, 8(14), 183–194. <https://doi.org/10.22490/24629448.449>
- Loulou, A., Mastore, M., Caramella, S., Bhat, A. H., Brivio, M. F., Machado, R. A. R., & Kallel, S. (2023). *Entomopathogenic potential of bacteria associated with soil-borne nematodes and insect immune responses to their infection*. *PLOS ONE*, 18(1), e0280675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280675>
- Mau, S., Vega, K., & Araya, M. (2011). *Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales*. *Revista de Ciencias Ambientales*, 42(2), 45. <https://doi.org/10.15359/rca.42-2.4>
- Miguel, V. (2019). *Uso de entomopatógenos en el control de (Leptophobia aripa y brevicoryne brassicae) en col (Brassica oleracea var. capitata) en CIFO UNHEVAL, 2019*. Universidad Nacional Hermilio Valdizán. <http://repositorio.unheval.edu.pe/handle/20.500.13080/4993>
- Monnerat, R. G., Batista, A. C., de Medeiros, P. T., Martins, É. S., Melatti, V. M., Praça, L. B., Dumas, V. F., Morinaga, C., Demo, C., Gomes, A. C. M., Falcão, R., Siqueira, C. B., Silva-Werneck, J. O., & Berry, C. (2007). *Screening of Brazilian Bacillus thuringiensis isolates active against Spodoptera frugiperda, Plutella xylostella and Anticarsia gemmatalis*. *Biological Control*, 41(3), 291–295. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2006.11.008>
- Morales, N. M. D. (2018). *Aislamiento de bacterias esporulantes y su eficacia entomopatógena frente a las etapas larvarias de Aedes aegypti*. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/17098>

- Munshid, H., Simon, S., & Lal, A. A. (2013). *Antagonistic potential of Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens on Meloidogyne incognita of green onion (Allium fistulosum)*. International Journal of Botany and Research, 3, 15–22. <https://www.researchgate.net/publication/316994877>
- Ohkawa, T., Volkman, L. E., & Welch, M. D. (2010). *Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface*. Journal of Cell Biology, 190(2), 187–195. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001162>
- Ortiz-Urquiza, A., & Keyhani, N. O. (2013). *Action on the Surface: Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle*. Insects, 4(3), 357–374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- Palma, L. (2018). *Protocol for the fast isolation and identification of insecticidal Bacillus thuringiensis strains from soil*. Bt Research, 6(7), 1–3. <https://doi.org/10.5376/bt.2015.06.0007>
- Palza, C. C. A. (2014). *Efecto de Beauveria bassiana (bálsamo) y Bacillus thuringiensis var. kurstaki (berliner) para el control de polilla de las crucíferas (Plutella xylostella L.) en el cultivo de brócoli (Brassica oleracea itálica)*. Repositorio Institucional - UNJBG. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2803564>
- Park, H.-W., Federici, B. A., & Sakano, Y. (2006). *Inclusion Proteins from other Insecticidal Bacteria*. Inclusions in Prokaryotes, 321–330. https://doi.org/10.1007/3-540-33774-1_13
- Pedrini, N., Crespo, R., & Juárez, M. P. (2007). *Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 146(1–2), 124–137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.003>
- Peng, K., Wu, M., Deng, F., Song, J., Dong, C., Wang, H., & Hu, Z. (2010). *Identification of protein-protein interactions of the occlusion-derived virus-associated proteins of Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus*. Journal of General Virology, 91(3), 659–670. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017103-0/cite/refworks>
- Pérez, M. P., Sauka, D. H., Onco, M. I., Berretta, M. F., & Benintende, G. B. (2017). *Selection of Bacillus thuringiensis strains toxic to cotton boll weevil (Anthonomus grandis, Coleoptera: Curculionidae) larvae*. Revista Argentina de Microbiología, 49(3), 264–272. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.12.010>

- Pigott, C. R., & Ellar, D. J. (2007). *Role of Receptors in Bacillus thuringiensis Crystal Toxin Activity*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255–281. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1899880/>
- Pijlman, G. P., Pruijssers, A. J. P., & Vlak, J. M. (2003). *Identification of pif-2, a third conserved baculovirus gene required for per os infection of insects*. *Journal of General Virology*, 84(8), 2041–2049. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12867634/>
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & de la Torre, M. (2006). *Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos*. *Interciencia*, 31(12), 856–860. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0378-18442006001200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Puedmag, R. J. F., & Hernández Rosero Manuel Arnulfo. (2007). *Eficiencia de nematocidas biológicos en el control de Meloidogyne incógnita en tomate de mesa (Lycopersicon esculentum mili.) Bajo invernadero, en socapamba ímbabura*. <https://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/819>
- Quiliche, D. J. P. J. (2021). *Toxicidad de cepas nativas de Bacillus thuringiensis sobre Dione juno (Gusano defoliador) a nivel laboratorio*. Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. <https://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/20.500.14067/5649>
- Rafael-Rutte, R., Aguilar, R., Maldonado, E. A., Ruiz, M., Rafael-Rutte, R., Aguilar, R., Maldonado, E. A., & 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. <https://doi.org/10.29393/chjaas36-2s30002>
- Raiyani, N. M., George, J. J., Herma, T. H., & Singh, S. P. (2020). *Designing and Evaluation of Metagenomics 16S rRNA Gene Primers*. *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/SSRN.3567789>
- Razaq, M., & Shah, F. M. (2022). *Biopesticides for management of arthropod pests and weeds*. *Biopesticides: Volume 2: Advances in Bio-Inoculants*, 7–18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823355-9.00005-5>
- Roberts, D. W., & Humber, R. A. (1981). *Entomogenous Fungi*. *Biology of Conidial Fungi*, 201–236. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-179502-3.50014-5>

- Rohrman, G. F. (2019). *Baculovirus molecular biology, 4th edition*. <https://ir.library.oregonstate.edu/concern/defaults/7d279043k?locale=en>
- Romero, B. N., Saadi, L., Jorratti de Jiménez, M., & Andrada, C. (2012). *Estudios morfológicos de variedades de olivo (Olea europaea L.) del valle central de la provincia de Catamarca*. *Biología En Agronomía*, 2(1).
- Sabbahi, R., Hock, V., Azzaoui, K., Saoiabi, S., & Hammouti, B. (2022). *A global perspective of entomopathogens as microbial biocontrol agents of insect pests*. *Journal of Agriculture and Food Research*, 10. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100376>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Salama, H. S., Abd El-Ghany, N. M., & Saker, M. M. (2015). *Diversity of Bacillus thuringiensis isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.10.001>
- Samuels, R. I., Paula, A. R., Carolino, A. T., Gomes, S. A., Op Moraes, C., Cypriano, M. B., Ei Silva, L., Ribeiro, A., Santos, J. W., Silva, C. P., & Samuels, R. I. (2016). *Entomopathogenic organisms: conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control*. *Open Access Insect Physiology*, 6, 25–31. <https://doi.org/10.2147/OAIP.S68850>
- Santi, L., Beys da Silva, W. O., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2010). *Conidial surface proteins of Metarhizium anisopliae: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis*. *Toxicon*, 55(4), 874–880. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.012>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R., & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis and Its Pesticidal Crystal Proteins*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775–806. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98934/>
- Schwartz, J. L., Potvin, L., Coux, F., Charles, J. F., Berry, C., Humphreys, M. J., Jones, A. F., Bernhart, I., Dalla Serra, M., & Menestrina, G. (2001). *Permeabilization of model lipid membranes by Bacillus sphaericus mosquito-cidal binary toxin and its*

- individual components*. The Journal of Membrane Biology, 184(2), 171–183. <https://doi.org/10.1007/S00232-001-0086-1>
- SENASA. (2017a). *Tacna: Inspección fitosanitaria de cultivos de olivo en predios seleccionados - SENASA al día*. <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/tacna-inspeccion-fitosanitaria-de-cultivos-de-olivo-en-predios-seleccionados/>
- SENASA. (2019). *Informe del monitoreo de residuos químicos y otros contaminantes en alimentos agropecuarios primarios, año 2018*.
- SENASA, P. (2017b). *Tacna: La Margaronia Palpita persimilis insecto que ataca los brotes del olivo - SENASA al día*. SENASA CONTIGO. <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/tacna-la-margaronia-palpita-persimilis-insecto-que-ataca-los-brotes-del-olivo/>
- Skinner, M., Parker, B. L., & Kim, J. S. (2014). *Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management*. Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspective, 169–191. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-398529-3.00011-7>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Molecular Biology and Evolution, 24(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
- Tan, B., Jackson, T. A., & Hurst, M. R. H. (2006). *Virulence of Serratia Strains against Costelytra zealandica*. Applied and Environmental Microbiology, 72(9), 6417–6418. <https://doi.org/10.1128/aem.00519-06>
- Télez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., & Arana-Cuenca, A. (2009). *Action and response mechanisms in relation of entomopathogenic fungi and insects*. Revista Mexicana de Micología, 30, 73–80. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v30/v30a7.pdf>
- Tesen, V. A. J. P. (2019). *Tratamiento químico y biológico en el control de Trichoplusia ni en el cultivo del repollo (Brassica oleracea var capitata) Carabayllo, 2019*. Repositorio Institucional - UCV. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2930878>

- Uchida, R., Imasato, R., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Shiomi, K., Tomoda, H., & Omura, S. (2005). *New Insecticidal Antibiotics, Hydroxyfungierins A and B, Produced by Metarhizium sp. FKI-1079*. *The Journal of Antibiotics* 2005 58:12, 58(12), 804–809. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.107>
- Vachon, V., Laprade, R., & Schwartz, J. L. (2012). *Current models of the mode of action of Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: A critical review*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>
- Vanarsdall, A. L., Okano, K., & Rohrmann, G. F. (2006). *Characterization of the Role of Very Late Expression Factor 1 in Baculovirus Capsid Structure and DNA Processing*. *Journal of Virology*, 80(4), 1724–1733. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16439529/>
- van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., & Urbaneja, A. (2018). *Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities*. *BioControl*, 63(1), 39–59. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10526-017-9801-4>
- Vargas, G. M. L. (2019). *Tratamiento combinado a base de esporas y cristales de Bacillus thuringiensis en la mortalidad de Heliothis virescens F “gusano perforador” del Asparagus officinalis L. “espárrago verde.”* Repositorio Institucional - URP. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/3214070>
- Vega, F. E., & Kaya, H. K. (2012). *Insect Pathology, Second Edition*. In *Insect Pathology, Second Edition*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384984-7.01001-0>
- Ventura Guanilo, M. A. (2016). *Control de spodoptera frugiperda en asparagus officinalis l.cv. uc 157 f1 aplicando bacillus thuringiensis var. kurstaki e insecticidas en huancaquito alto, La Libertad*. Universidad Nacional de Trujillo. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4161>
- Wang, C., & St. Leger, R. J. (2006). *A collagenous protective coat enables Metarhizium anisopliae to evade insect immune responses*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), 6647–6652. <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.0601951103>

- Wang, P., & Granado, R. R. (1997). *An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(13), 6977–6982. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.13.6977>
- Wu, W., Liang, H., Kan, J., Liu, C., Yuan, M., Liang, C., Yang, K., & Pang, Y. (2008). *Autographa californica Multiple Nucleopolyhedrovirus 38K Is a Novel Nucleocapsid Protein That Interacts with VP1054, VP39, VP80, and Itself*. Journal of Virology, 82(24), 12356–12364. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18922869/>
- Xu, C., Wang, B. C., Yu, Z., & Sun, M. (2014). *Structural Insights into Bacillus thuringiensis Cry, Cyt and Parasporin Toxins*. Toxins 2014, Vol. 6, Pages 2732-2770, 6(9), 2732–2770. <https://doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Yoshiyama, M., & Kimura, K. (2009). *Bacteria in the gut of Japanese honeybee, Apis cerana japonica, and their antagonistic effect against Paenibacillus larvae, the causal agent of American foulbrood*. Journal of Invertebrate Pathology, 102(2), 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.005>
- Zegarra, F. R. C. (2012). *Influencia de dos bioinsecticidas comerciales a base Bacillus thuringiensis y un inhibidor de quitina en el control de cogollero (Spodóptera frugiperda) en el cultivo del maíz (Zea mays L.) opaco malpaso en la zona de La Yarada – Región Tacna*. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. <https://renati.sunedu.gob.pe/handle/sunedu/2803690>

ANEXOS

ANEXO 1: Estadístico para saber si existe relación entre el tiempo y el porcentaje de mortalidad

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	44,106 ^a	3	,000
Razón de verosimilitud	50,026	3	,000
Asociación lineal por lineal	34,978	1	,000
N de casos válidos	144		

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 15,75.

ANEXO 2: ANOVA para saber si existía diferencias entre los porcentajes de mortalidad de cada una de las dosis

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

$H_0: \mu_{\text{DOSIS 1}} = \mu_{\text{DOSIS 2}} = \mu_{\text{DOSIS 3}}; P > 0,05$

$H_i: \mu_{\text{DOSIS 1}} \neq \mu_{\text{DOSIS 2}} \neq \mu_{\text{DOSIS 3}}; P < 0,05$

ANOVA					
% mortalidad con las dosis aplicadas					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	10360,000	2	5180,000	20,219	,000
Dentro de grupos	10760,000	42	256,190		
Total	21120,000	44			

% mortalidad con las dosis aplicadas			
Tukey B ^a			
Tipos de dosis bacteriana	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
dosis 3	15	36,67	
dosis 2	15	46,67	
dosis 1	15		72,67
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.			
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 15 000.			

ANEXO 3: Prueba para comparar el efecto de las dosis de las bacterias nativas con el producto comercial biológico (cepa patrón)

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
d1	,344	30	,000	,747	30	,000
a. Corrección de significación de Lilliefors						

PARA LA DOSIS 1

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

$$H_0: \mu_{\text{nativa D1}} = \mu_{\text{patron D1}} ; P > 0,05$$

$$H_i: \mu_{\text{nativa D1}} \neq \mu_{\text{patron D1}} ; P < 0,05$$

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de d1 es la misma entre las categorías de % mortalidad de nativas versus patron	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,000 ¹	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

PARA LA DOSIS 2

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

$H_0: \mu_{\text{nativa D2}} = \mu_{\text{patrón D2}} ; P > 0,05$

$H_i: \mu_{\text{nativa D2}} \neq \mu_{\text{patrón D2}} ; P < 0,05$

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
d2	,168	30	,030	,910	30	,015
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de d2 es la misma entre las categorías de % mortalidad de nativas versus patrón	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,000 ¹	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

PARA LA DOSIS 3

PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

$H_0: \mu_{\text{nativa D3}} = \mu_{\text{patrón D3}} ; P > 0,05$

$H_1: \mu_{\text{nativa D3}} \neq \mu_{\text{patrón D3}} ; P < 0,05$

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
d3	,176	30	,019	,904	30	,011
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Resumen de prueba de hipótesis

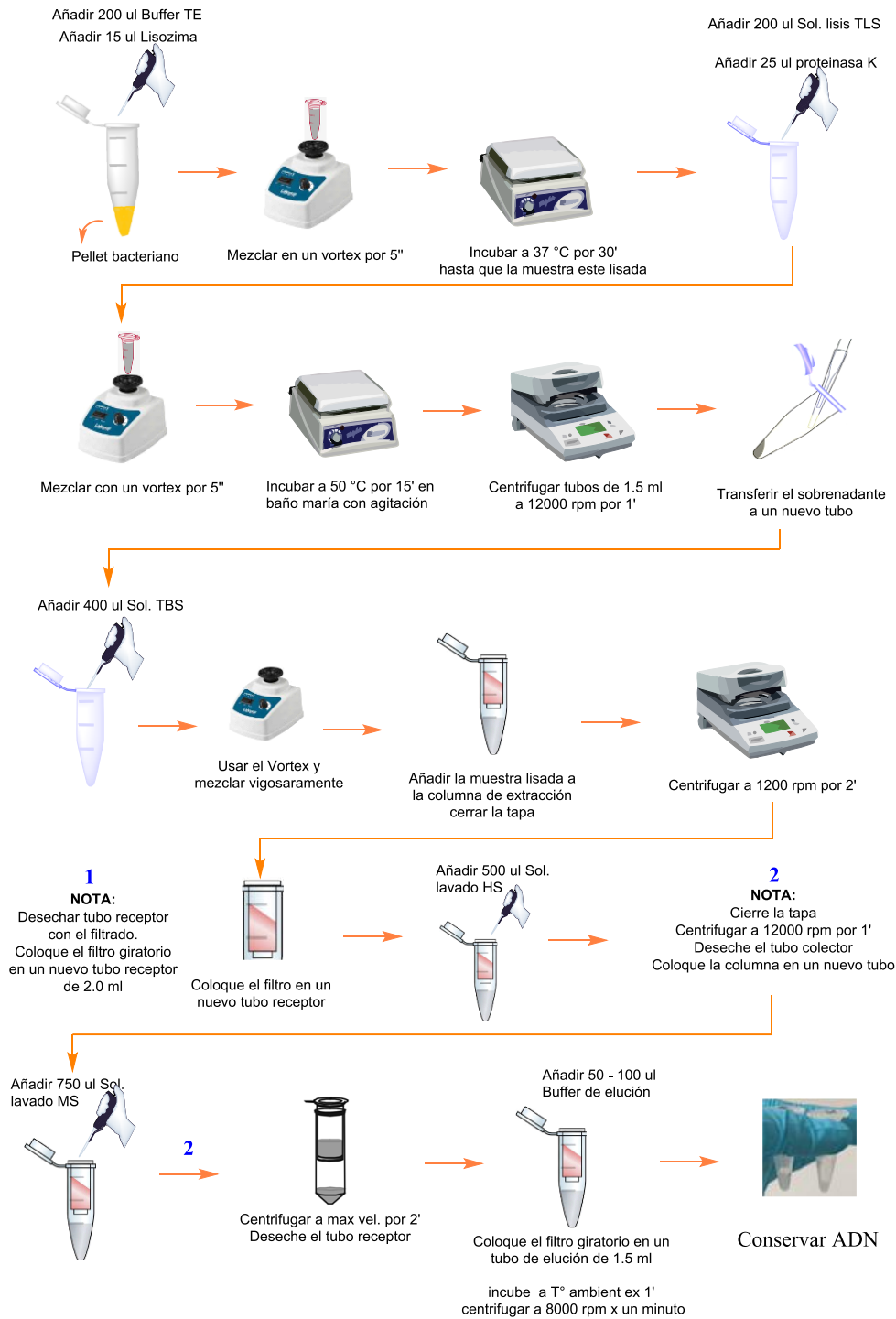
	Hipótesis nula	Prueba	Sig.	Decisión
1	La distribución de d3 es la misma entre las categorías de % mortalidad de nativas versus patrón	Prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes	,000 ¹	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,05.

¹Se muestra la significación exacta para esta prueba.

ANEXO 4: Extracción de ADN

Kit de extracción y purificación de ADN (ANALITIK JENA) - innuPREP Bacteria DNA Kit



ANEXO 5: Matriz de consistencias

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	ESTADÍSTICA
<p>GENERAL</p> <p>¿Cuál será la actividad de control a nivel de laboratorio de bacterias nativas entomopatógenas, contra la plaga Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos?</p>	<p>GENERAL</p> <p>Demostrar la actividad de control, a nivel de laboratorio de bacterias entomopatógenas nativas sobre la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos.</p>	<p>GENERAL</p> <p>Las bacterias nativas entomopatógenas ejercen una actividad de control eficaz a nivel de laboratorio, sobre la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos.</p>	<p>INDEPENDIENTE</p> <p>Concentración o dosis (cel/ml o esporas/ml) de microorganismos nativos de la zona agrícola de la Yarada – Los Palos.</p> <p>Indicadores</p> <p>Bacterias (Munshid et al., 2013)</p> <p>10⁷ cel/ml</p>	<p>Para el tratamiento de los resultados se aplicará el ANDEVA, para determinar si existe diferencia entre la actividad del control de los microorganismos nativos y el producto comercial biológico.</p>
<p>ESPECÍFICOS</p> <p>¿Existirá actividad de control contra la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>), de bacterias nativas de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada - Los Palos?</p> <p>¿Cuál será la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas en comparación con bacterias de uso comercial contra la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>)?</p>	<p>ESPECÍFICOS</p> <p>Estimar la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas contra la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>).</p> <p>Evaluar la actividad de control, a nivel laboratorio, de bacterias entomopatógenas nativas en comparación con bacterias de uso comercial contra la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>).</p> <p>Identificar las bacterias nativas con actividad entomopatógena contra la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>), utilizando marcadores del gen ARN 16S.</p>	<p>ESPECÍFICOS</p> <p>Las bacterias nativas entomopatógenas ejercen una actividad de control superior a las bacterias de tipo comercial sobre la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>) a nivel de laboratorio.</p>	<p>DEPENDIENTE</p> <p>Actividad de control sobre la Margaronia (<i>Palpita persimilis</i>) de los cultivos de olivo, de la zona de agrícola de La Yarada – Los Palos (%)</p> <p>Indicadores</p> <p>La actividad se determinará mediante la fórmula propuesta por (Puedmag & Hernández, 2007):</p> $Pfa / Pia \times Pib / Pfb \times 100,$ <p>Donde: Pia = población inicial del tratamiento, Pfa = población final del tratamiento, Pib = población inicial del testigo 2, sin control, Pfb = población final del testigo 2, sin control</p>	

Anexo 6: Artículo científico

Research, Society and Development, v. 10, n. 7, e42010716893, 2021
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16893>

Bioplaguicidas: Mecanismos de acción biocida en insectos plaga

Biopesticides: Mechanisms of biocidal action in pest insects

Biopesticidas: Mecanismos de ação biocida em insetos-praga

Recibido: 07/06/2021 | Revisado: 11/06/2021 | Acepto: 13/06/2021 | Publicado: 27/06/2021

Angela Verónica Choque Miranda

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1637-8246>
Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú
E-mail: achoquem@unjbg.edu.pe

Yemile del Carmen Berrios Espejo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9706-9949>
Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Perú
E-mail: yberriose@unjbg.edu.pe

Jorge Luis Tomas Florez Salas

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3533-2956>
Universidad Nacional de Moquegua, Perú
E-mail: jlflorezs@hotmail.com

Hebert Hernan Soto Gonzales

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9936-1943>
Universidad Nacional de Moquegua, Perú
E-mail: hsotog@unam.edu.pe

Jorge González Aguilera

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7308-0967>
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasil
E-mail: j51173@yahoo.com

Leandris Argente Martínez

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0353-2251>
Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui, México
E-mail: oleinismora@gmail.com

Resumen

Las plagas de insectos son la principal preocupación de los agricultores, ello los ha llevado a ejercer prácticas inadecuadas de control; provocando un uso indiscriminado de los plaguicidas químicos; lo que ha traído como consecuencia el deterioro y desarmonización del ambiente y la salud humana. En los últimos años, se tiene como una alternativa saludable para el control de los insectos plaga, a los bioplaguicidas; cuyos mecanismos de acción biocida, motivó la presente revisión. En este artículo de revisión se utilizó 63 artículos científicos de investigación en entomopatógenos, de los cuales 20 corresponden a temas desde un enfoque genético (genes de virulencia), 23 artículos detallan los mecanismos de acción por hongos entomopatógenos, 08 explican los mecanismos de acción que ejerce la bacteria *Bacillus thuringiensis* y 12 artículos sobre características de los bioinsecticidas microbianos comerciales. Con lo cual podemos concluir que los hongos y bacterias son los microorganismos entomopatógenos más empleados en la formulación de los bioplaguicidas, siendo las especies *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis* las especies más utilizadas. De este último su efectividad biocida se fundamenta en la acción de la proteína Cry y de los primeros su efectividad depende de la adhesión de la espora a la cutícula del insecto plaga.

Palabras claves: Control biológico; Entomopatógeno; Adhesina; Toxina cry.

Abstract

Insect pests are the main concern of farmers, this has led them to use inadequate control practices; causing an indiscriminated use of chemical pesticides which has resulted in the deterioration and disharmonization of the environment and human health. In recent years, biopesticides have been used as a healthy alternative for the control of pest insects whose biocidal action mechanisms motivated this review. In this article, 63 scientific research articles on entomopathogens were used from which 20 correspond to topics from a genetic approach (virulence genes), 23 articles detail the mechanisms of action by entomopathogenic fungi, 08 explain the mechanisms of action that exerts the bacterium *Bacillus thuringiensis* and 12 articles on characteristics of commercial microbial bioinsecticides. It can be concluded that fungi and bacteria are the most entomopathogenic microorganisms used in the formulation of biopesticides, being the species *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* the most used species. From this last, its biocidal effectiveness is based on the action of the Cry protein and of the first mentioned its effectiveness depends on the adhesion of the spore to the cuticle of the pest insect.

Keywords: Biological control; Entomopathogenic; Adhesin; Cry toxin.

Resumo

As pragas de insetos são a principal preocupação dos agricultores, o que os leva a exercer práticas de controle inadequadas; causando um uso indiscriminado de pesticidas químicos; o que resultou na deterioração e desarmonização do meio ambiente e da saúde humana. Nos últimos anos, os biopesticidas têm sido utilizados como alternativa saudável para o controle de insetos-praga; cujos mecanismos de ação biocida motivaram a presente revisão. Neste artigo de revisão, foram utilizados 63 artigos de pesquisa científica sobre entomopatógenos, dos quais 20 correspondem a tópicos de uma abordagem genética (genes de virulência), 23 artigos detalham os mecanismos de ação dos fungos entomopatogênicos, 08 explicam os mecanismos de ação que exerce a bactéria *Bacillus thuringiensis* e 12 artigos sobre características de bioinseticidas microbianos comerciais. Com isso podemos concluir que fungos e bactérias são os microrganismos entomopatogênicos mais utilizados na formulação de biopesticidas, sendo as espécies *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Bacillus thuringiensis* as espécies mais utilizadas. Destas últimas, sua eficácia biocida baseia-se na ação da proteína Cry e, das primeiras, sua eficácia depende da adesão do esporo à cutícula do inseto praga.

Palavras-chave: Controle biológico; Entomopatogênico; Adhesin; Toxina cry.

1. Introdução

Los bioplaguicidas son la alternativa saludable para controlar las plagas de los cultivos agrícolas, por el hecho de que sus formulaciones están compuestas por organismos vivos completos, sus partes o productos proteicos. Estos organismos vivos son también llamados agentes de control biológico, entre los que figuran las bacterias, los hongos, los parásitos y los virus (Ibarra, 2006).

Los bioplaguicidas compuestos con hongos entomopatógenos más utilizados son los que contienen a los hongos microscópicos de los géneros *Metarhizium* y *Beauveria* (Butt et al., 2016) ya que estos dos géneros presentan diferentes formas de acción que no solo actúan eliminando al insecto plaga sino también estableciendo relaciones benéficas con las plantas (Litwin et al., 2020). Diversas investigaciones han demostrado que los hongos entomopatógenos a diferencia de las bacterias y virus infectan a los insectos por penetración directa de la cutícula (Bilgo et al., 2018), en la cual se evidencia en un primer momento la acción de fuerzas hidrófobas y electrostáticas seguido de una actividad dirigida por hidrofobinas (Skinner et al., 2014).

Adicionalmente, podemos mencionar que, si bien los hongos se demoran en relación al uso de químicos entre una a tres semanas para eliminar al insecto plaga, su efectividad como controlador biológico se expresa desde el momento en que infecta al insecto ya que este deja de alimentarse de la planta (Pucheta et al., 2006).

Por otro lado, los bioplaguicidas basados en bacterias, en especial aquellos compuestos por *Bacillus thuringiensis*, se encuentran representando aproximadamente el 90% del mercado de bioplaguicidas (Sanchis y Bourguet, 2009), debido a que *B. thuringiensis* presenta una actividad larvicida rápida pero sostenida, además es de fácil aplicación ya que se emplea equipos estándar y por si fuera poco sus efectos sobre los insectos benéficos y organismos no objetivos son insignificantes (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Los bioplaguicidas con *B. thuringiensis*, deben su efectividad a la acción que ejerce la proteína Cry, la cual es sintetizada por la bacteria durante su proceso de esporulación, la misma que es tóxica para distintas larvas de insectos (Lacey et al., 2015).

Teniendo en consideración todo lo antes mencionado podemos afirmar que la principal fortaleza de los bioplaguicidas está basada en los diferentes mecanismos de acción que ejercen estos microorganismos sobre los insectos plagas. Motivo por el cual en la presente revisión se realiza una descripción de la acción biocida que ejercen los hongos y bacterias entomopatógenas, por ser estos los agentes de control biológico más empleados en las formulaciones de los bioplaguicidas comerciales

2. Metodología

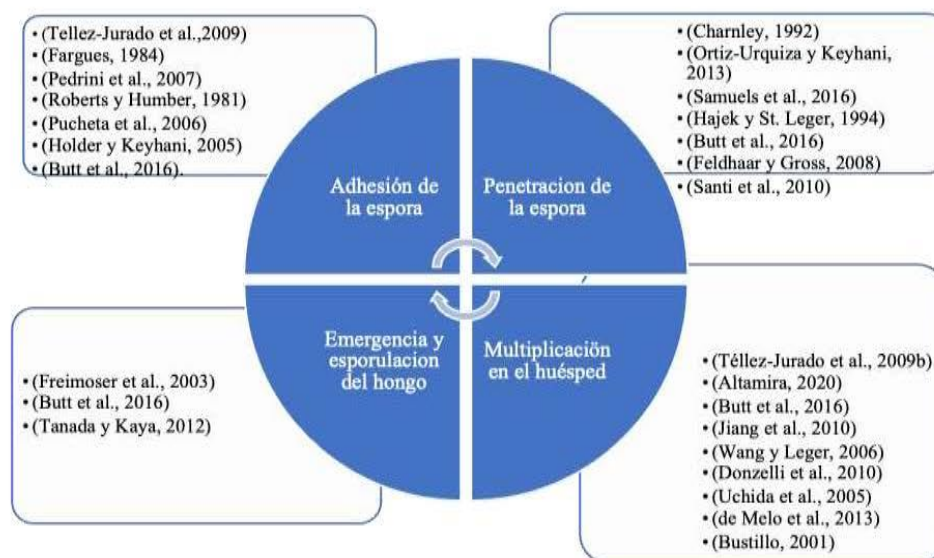
Esta investigación es una revisión de literatura narrativa (Rother, 2007). Se seleccionaron 63 artículos científicos de investigación en entomopatógenos, en donde: i) 20 corresponden a temas desde un enfoque genético (genes de virulencia), ii) 23 artículos detallan los mecanismos de acción por hongos entomopatógenos, iii) 08 explican los mecanismos de acción que ejerce la bacteria *Bacillus thuringiensis* y iv) 12 artículos sobre características de los bioinsecticidas microbianos comerciales. Para tal efecto se eligieron artículos publicados entre los años 1981 al 2021, en los que se incluyeron artículos de investigación que evidencian actividades de bioplaguicidas, de los que se excluyeron los trabajos de finalización del curso, monografías, disertaciones y tesis.

3. Resultados y Discusión

3.1 Mecanismo de acción de hongos entomopatógenos

Diversas investigaciones han demostrado que los mecanismos de acción insecticida de los hongos a diferencia de bacterias y virus, inicia cuando el hongo infecta a los insectos por penetración directa sobre la cutícula (Bilgo et al., 2018), en la cual participan diversas enzimas así como la acción de fuerzas hidrófobas y electrostáticas seguido de una actividad dirigida por hidrofobinas (Skinner et al., 2014). (ver Figuras 1 y 2).

Figura 1. Investigaciones relacionadas con los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos descritos en la literatura.



Fuente: Autores.

3.1.1 Adhesión de la espora

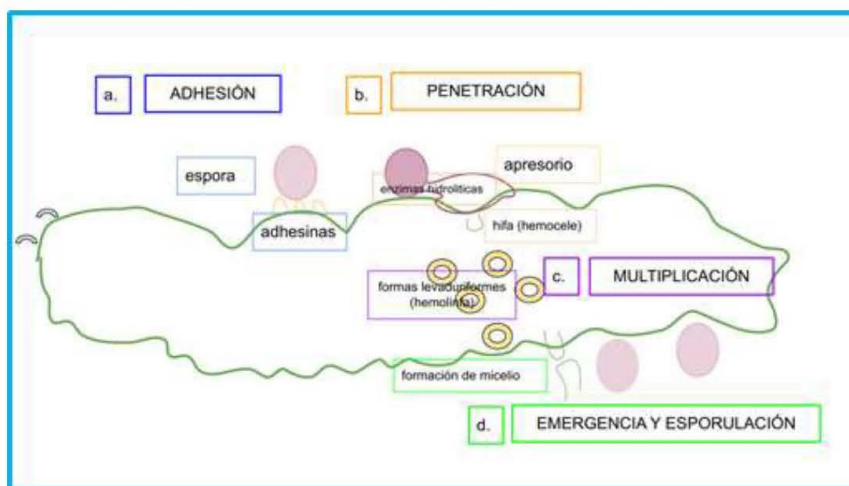
La adhesión de los hongos entomopatógenos sobre la cutícula de los insectos implica mecanismos tanto físicos como químicos (Fargues, 1984). Es así, que todo inicia cuando la espora se deposita en la superficie del insecto (Téllez-Jurado et al., 2009), para luego continuar con la adsorción de la espora, en el cual se da el reconocimiento de receptores específicos (glicoproteínas) en el insecto (Pedrini et al., 2007), seguido de la activación de enzimas por parte del huésped como del hongo (Roberts y Humber, 1981) para luego germinar y formar el apresorio (Pucheta et al., 2006).

Por otro lado, es importante señalar que cuando sucede la adhesión de la espora del hongo en la cutícula, participan proteínas tipo adhesinas las que son sintetizadas por el hongo (Holder y Keyhani, 2005). Finalmente, cabe resaltar que la etapa de adhesión es un condicionante importante, ya que el éxito de la muerte del insecto depende del número de esporas que se adhieren a la cutícula (Butt et al., 2016).

3.1.2 Penetración de la espora

Existen características de la cutícula del huésped, que condicionan este proceso como son el grosor, la esclerotización y la presencia de sustancias antifúngicas y nutricionales (Charnley, 1992). Así mismo esta cutícula es rica en lípidos, quitina y proteínas esclerotizadas (Ortiz-Urquiza y Keyhani, 2013). Terminada la adhesión de la espora (Figura 2), se inicia la fase de penetración, con la degradación de la cutícula, por acción de enzimas que se sitúan en el apresorio (Samuels et al., 2016), ello conlleva a la ruptura de la cutícula, para luego continuar con la penetración de las hifas a través de la rajaduras (Hajek y St. Leger, 1994). Durante esta etapa de la penetración además de actuar enzimas hidrolíticas también participan moléculas que inhabilitan las respuestas inmunitarias del huésped (Butt et al., 2016); sin embargo, el huésped puede expresar su defensa con antimicrobianos, entre péptidos y especies reactivas de oxígeno, que muchas veces puede suprimir al hongo (Feldhaar y Gross, 2008). Por otro lado, para que el hongo finalmente ingrese al hemocele e infecte sus tejidos, este secreta fosfolipasa C para hidrolizar los enlaces fosfodiéster que se encuentran en la membrana celular del huésped (Santi et al., 2010). Por último, es importante señalar que las diferentes enzimas y moléculas están codificadas por genes, los mismos que se presentan en la Tabla 1.

Figura 2. Etapas que ilustran el mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos: a. Adhesión, la espora se deposita en la superficie del insecto y allí participan proteínas “adhesinas” producidas por el hongo; b. Penetración, formación del apresorio y ruptura de la cutícula y penetración de hifas al hemocele; c. Multiplicación, transformación de la forma micelial a levaduriforme, bajo la cual se multiplica, absorbe nutrientes, provoca cambios fisiológicos y la muerte del insecto; d. Emergencia y esporulación, el hongo vuelve a su forma micelial, emerge del insecto y esporula.



Fuente: Autores.

Tabla 1. Genes que se expresan en los mecanismos de acción de hongos y bacterias entomopatógenas.

Función entomopatógena	Genes de virulencia	Función de las Proteínas	Especie	Citas bibliográficas
Adhesión a la cutícula	MAD1, MAD2	Adhesinas	<i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Metarhizium brunneum</i> , <i>Beauveria bassiana</i>	(Shang et al., 2015)
	Hyd1, Hyd2, Hyd3	Hidrofobinas	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium brunneum</i>	(Sevim et al., 2012)
	SsgA	Hidrofobinas	<i>Metarhizium anisopliae</i>	(Li et al., 2010)
	CWP10	Incrementa la hidrofobicidad de las esporas	<i>Metarhizium anisopliae</i>	(Li et al., 2010)
Degradación de cutícula	Pr1, Pr2, Pr4	Subtilisina, tripsina, cisteína proteasa	<i>Metarhizium anisopliae</i>	(Rosas-García et al., 2014; Wang et al., 2002)
	chi 1, chi 2, chi 3, chi 4	Quitinasas	<i>Metarhizium anisopliae</i>	(Baratto et al., 2006)
	Bbchit1, Bbchit2	Quitinasas	<i>Beauveria bassiana</i>	(Fang et al., 2005)
	Vlchit1	Quitinasas	<i>Verticillium lecanii</i>	(Zhu et al., 2008)
Manejo del estrés	HSP25, HSP30, HSP70, HSP90	Proteínas de shock térmico	<i>Beauveria bassiana</i>	(Zhou et al., 2018; Wang et al., 2020)
	Hog1, Pmr1	Quinasa activada por mitógeno	<i>Beauveria bassiana</i>	(Zhang et al., 2009)
Adaptación a la hemolinfa/inmunomodulación	Mos1	Osmosensor	<i>Beauveria bassiana</i>	(Lee et al., 2018)
	Mcl1	Colágeno	<i>Metarhizium brunneum</i> <i>Metarhizium acridum</i> <i>Metarhizium robertsii</i>	(Aw y Hue, 2017; Xie et al., 2019)
	Mr-npc2a	Carrier de esterol	<i>Beauveria bassiana</i>	(Sharma et al., 2020)
	dtxS1-dtxS4	Biosíntesis de dextrinas	<i>Metarhizium robertsii</i> <i>Metarhizium anisopliae</i>	(Wang et al., 2012)
Multifactorial (Factores de transcripción)	MrpacC	Regula la esporulación, la penetración de cutículas y la evasión inmune	<i>Metarhizium robertsii</i>	(Huang et al., 2015)
	MrSkn7	Controla la esporulación, la integridad de la pared celular, la autólisis y la virulencia	<i>Metarhizium robertsii</i>	(Shang et al., 2015)
	cag8	Involucrado en la síntesis de conidiación, virulencia e hidrofobina.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	(Fang et al., 2007)
Formación de poro	Cry	Delta toxina (proteína paraesporal)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(Deng et al., 2014)
	Vip	Proteínas insecticidas vegetativas	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(Güney et al., 2019)
Receptor proteico de las toxinas	Cyt	Proteínas hemolíticas y citolíticas	<i>Bacillus thuringiensis</i>	(Bravo et al., 2017)

Fuente: Autores.

3.2 Multiplicación en el huésped

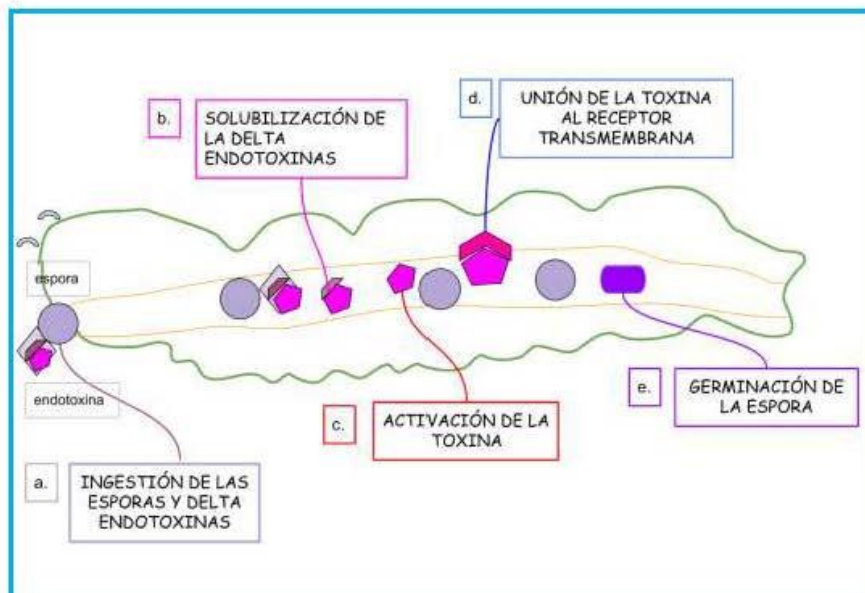
Cuando el hongo llega al hemocele e invade la hemolinfa, muchos de ellos pasan de su forma micelial a la forma levaduriforme (Téllez-Jurado et al., 2009). Bajo esta forma se multiplica y con ella adquiere una gran ventaja, con respecto a superficie/volumen, en la absorción de nutrientes (Altamira, 2020). Sin embargo, ello provoca la expresión y secreción de

receptores de reconocimiento de patógenos del insecto a nivel de la hemolinfa, superficie de hemocitos, cuerpo graso y membranas de las células epidérmicas (Butt et al., 2016). También a modo de defensa producen moléculas (lectinas, inhibidores de fenoloxidasa, péptidos antimicrobianos) y radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno (Jiang et al., 2010). Por su parte, los hongos tratan de minimizar las defensas inmunes del huésped, a través de la producción de toxinas, cambios estructurales en su pared celular y resistencia a péptidos antimicrobianos (Wang y Leger, 2006). También se sabe de la existencia de metabolitos secundarios, que sirven para evitar la defensa del insecto y la propagación de oportunistas (Donzelli et al., 2010), actuando como inmunomoduladores (aumenta la producción de conidios) y antimicrobianos, entre los que figura las hidroxifungerinas (Uchida et al., 2005) y la miriocina (de Melo et al., 2013), los mismos que favorecen la permanencia eficaz del hongo (Altamira, 2020). Finalmente, la multiplicación del hongo provoca cambios fisiológicos anormales en el insecto sobreviniendo la muerte de este (Bustillo, 2001)

3.3 Emergencia y esporulación

Con la muerte del insecto, los nutrientes se agotan (fuentes de nitrógeno) ello provoca nuevamente que el hongo adquiera su forma micelial (Freimoser et al., 2003) y de esta forma emerge del insecto y en condiciones de humedad y temperatura se produce la esporulación en la superficie del cadáver (Butt et al., 2016). En secuencia sucede la dispersión de la espora y su adhesión en un nuevo huésped (Tanada y Kaya, 2012)

Figura 3. Etapas del mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis* en la larva del insecto: a. Ingestión de las esporas y delta endotoxinas, tanto la espora como la delta endotoxina (Cry) llegan al intestino medio; b. Solubilización de la delta endotoxina, liberación en forma de protoxinas en pH alcalino; c. Activación de la toxina, por acción de proteasas del intestino la cual provoca la liberación del fragmento tóxico; d. Unión de la toxina al receptor transmembrana, la toxina se une al receptor transmembranaral “caderina”, ingresa a través de ella, lo cual provoca la formación de un poro lítico, gracias al cual se da un desequilibrio osmótico; e. Germinación de la espora, bajo esta forma invade en su totalidad al insecto provocando septicemia y daño en los tejidos

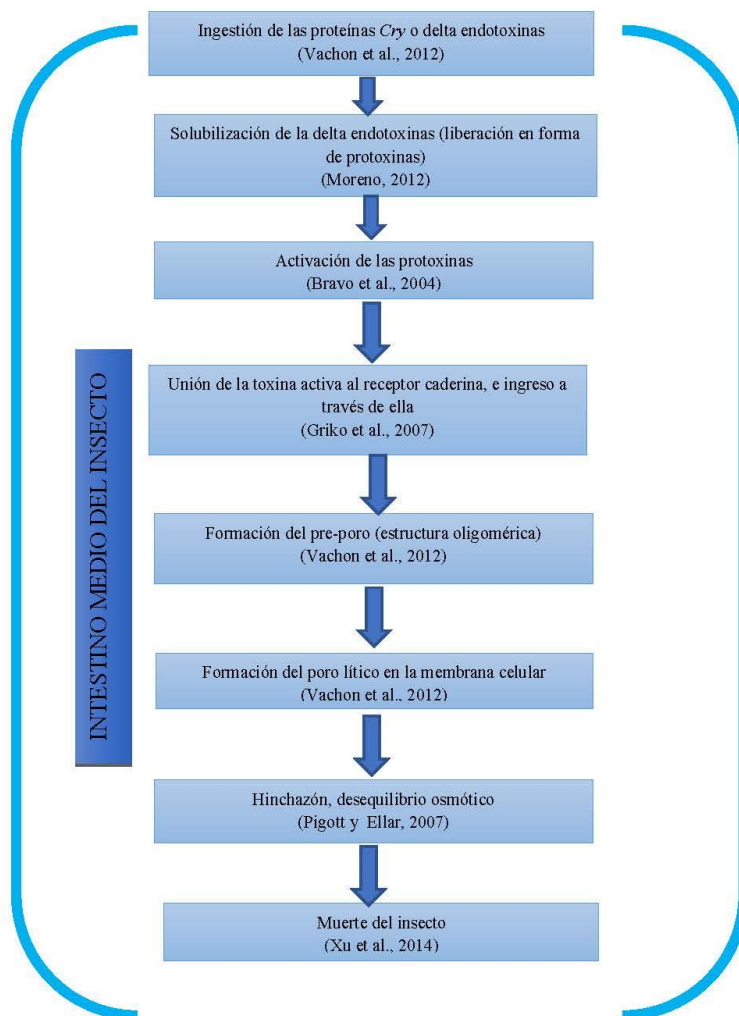


Fuente: Autores.

3.4 Mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis es una bacteria entomopatógena, con forma de bastón, Gram positiva, formadora de esporas se encuentra generalmente en el suelo, polvo, insectos muertos y agua (Hernandez-Fernandez, 2016). *B. thuringiensis*, es la más usada en la formulación de biopesticidas (López-Pazos y Cerón, 2010) gracias a su alta especificidad, a su mínima incidencia de fenómenos de resistencia y por no afectar o dañar al hombre (Lacey et al., 2015) ni a la entomofauna benéfica del ambiente (Schnepf et al., 1998). Otra de las razones importantes por las cuales es la más empleada en la formulación de biopesticidas, es que *B. thuringiensis* posee una inclusión paraesporal de naturaleza proteica que resulta ser tóxico para las larvas de insectos plagas (Xu et al., 2014), conocida como proteína *Cry*. (Figura 3).

Figura 4. Resumen del mecanismo de acción de *Bacillus thuringiensis* en el insecto.



El mecanismo de acción insecticida de *B. thuringiensis* (Figura 3), inicia cuando las proteínas *Cry* o delta endotoxinas son ingeridos por las larvas (Vachon et al., 2012). Ya en el intestino medio de la larva estas delta endotoxinas son solubilizadas

(liberación en forma de protoxinas) gracias al pH alcalino que existe (Moreno, 2012), seguidamente sucede la activación de las protoxinas provocada por proteasas del intestino, estas cortan la protoxina liberándose de esta manera el fragmento tóxico, las mismas que serán las responsables de la muerte del insecto (Bravo et al., 2004), esta toxina activa se une al receptor caderina (proteína transmembranal), localizado a nivel de la microvellosidades (Griko et al., 2007), e ingresa a través de ella e inmediatamente se da una cascada de señalización provocando la formación de una estructura oligomérica, primero como un pre-poro para terminar en un poro lítico (Vachon et al., 2012) a través del cual ocurre el paso de iones y agua, lo que provoca hinchazón y desequilibrio osmótico (Pigott y Ellar, 2007). Finalmente sucede la muerte del insecto debido a que se dan condiciones para la germinación de las esporas y de esta forma *B. thuringiensis* invade en su totalidad al huésped provocando septicemia y daño en los tejidos (Figura 4) (Xu et al., 2014).

3.5 Importancia de los microorganismos nativos entomopatógenos en la fabricación de bioinsecticidas comerciales

Aun cuando se sabe que los bioinsecticidas pueden demostrar eficacia y cuidar el ambiente, su comercialización es muy baja con respecto a los insecticidas químicos, en el Perú por ejemplo, del total de productos registrados para control de plagas (Tabla 2), en el año 2019, solo un 20% aproximadamente corresponde a bioplaguicidas (SENASA, 2021). Esta demanda es limitada ya que muchas de las formulaciones no mantienen su viabilidad y virulencia (Moreno, 2012) debido a que los agentes biológicos con los que han sido formulados se ven afectados por los factores abióticos (temperatura, radiación UV, humedad) en donde son aplicados (Fernández y Juncosa, 2002). Es así, que los bioinsecticidas demuestran alta efectividad en ambientes similares al lugar del que fueron obtenidos (Muñoz, 2018). Por ello es importante, el desarrollo de bioinsecticidas que incluya formulaciones con principios activos (microorganismos) propios (nativos) del lugar donde va ser aplicado, para una mayor efectividad.

Tabla 2. Bioinsecticidas microbianos comerciales distribuidos en Perú.

Nombre comercial	Empresa Biotecnológica / país de origen	Ingrediente activo	Concentración	Especificidad	Cultivos de aplicación	Dosis
TURINCOL®	FUNGICOL DEL PERU S.A.C / PERU	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> .	32.000.000 unidades internacionales por cm ³ de producto formulado.	Larvas de insectos del orden Lepidóptera de primero y segundo instar.	Col, coliflor, brócoli, melón, pepino, sandía, caña de azúcar, sorgo, maíz, alfalfa, papa, frijol, fresa, palma, tomate, tabaco, ajonjolí	250 a 500 cm ³ por cada 200 litros de agua
INSECBIOL	FUNGICOL DEL PERU S.A.C / PERU	<i>Metarhizium anisopliae</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Paecilomyces lilacinus</i> <i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	1 x 10 ⁸ UFC/g de producto	Diferentes plagas chupadoras, desfoliadores, picudos	Palma, arroz, café, caña de azúcar, flores, plátano, cítricos	1.000 g/ha por aplicación
BAUBASSIL®	FUNGICOL DEL PERU S.A.C / PERU	<i>Beauveria bassiana</i> .	100 millones (1x10 ⁸) de esporas o conidios / gramo de formulación	Broca del café, Picudo negro del Plátano, Picudo verde-azul de los cítricos y Taladrador de la caña	Algodón, arracacha, papa, plátano, café flores, piñas, pastos, arroz, palma, frutales y hortalizas	Aplicaciones foliares: Usar de 250 a 500 g/cilindro. Aplicaciones edáficas usar 1,000 g/ha
METARIL ^h	FUNGICOL DEL PERU S.A.C / PERU	<i>Metarhizium anisopliae</i>	1x10 esporas / gramo de producto formulado.	Chinches, gallinita ciega, barrenadores, grillos y picudos principalmente	Diferentes Cultivos agrícolas	Aplicación edáfica a razón de 1.000 g/ha. Aplicación foliar a razón de 250 a 500 g/cilindro

FUMOSIL ^h	FUNGICOL DEL PERU S.A.C / PERU	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> o <i>Isaria fumosorosea</i>	1x10 esporas / gramo de producto formulado	Mosca blanca, cochinillas, minadores, pulgones; trips	Diferentes Cultivos agrícolas	Para aplicaciones edáficas usar 1.000 g/ha. Para aplicaciones foliares usar 250-500 g/cilindro de 200 litros de agua.
BAZTHU-32	LAINCO, S.A / ESPAÑA	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i> .	32 millones de U.I./g	Larvas de lepidópteros	Algodón, cítricos, forestales, fresa, hortícolas, manzano, olivo y tomate	0,25 – 0,5 Kg/ha recubriendo bien toda la vegetación
TUREX	CERTIS EUROPE / ESPAÑA	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Aizawai</i> + <i>Kurstaki</i>	25 millones U.I./g	Orugas defoliadoras	Lechuga, hortalizas del género <i>Brassica</i> , olivo, pimiento, tomate y vid	1-2 Kg/ha O 1,5 – 2 Kg/ha
DELFIN	CERTIS EUROPE / ESPAÑA	<i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Kurstaki cepa SA-1</i> .	32 millones de U.I./gr	larvas de lepidópteros	Hortícolas, fresales, cítricos, olivo, vid y algodónero	0,5 – 0,750 kg/ha
FUMOGAN	SOLAGRO / PERU	<i>Isaria fumosorosea</i>	1 x 10 ¹² conidios/kg	orden Díptera, Lepidóptero, Coleóptera, Hemiptera y Homóptero	Palto, arándano, espárrago, pimientos, vid y cítricos	Dosis /200L 1,6 -4 Kg
BEAUVESOL	SOLAGRO / PERU	<i>Beauveria bassiana</i>	1 x 10 ¹² conidios/kg	Lepidóptera, Hemiptera, Coleóptera, Ortóptera y Homóptera	Arándano, Café/Cacao, tomate, tabaco, flores, cítricos, frijol, soya, cucurbitáceas, melón, pepino, sandía, berenjena, ajíes, fresas, frambuesas y palto	10 Kg/ha
Micosplag®	SERFI S.A. / PERU	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Purpureocillium lilacinum</i>	1 x 10 ⁸ esporas/g de producto	Mosquilla del brote	Espárrago	200 g/ha
Bt-2X®	SERFI S.A. / PERU	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>Kurstaki</i>	32 000 UI/mg	Gusano de Hoja, gusano perforador de la bellota, gusano medidor, gusano comedor, cogollero, comedor de follaje, gusano perforador de frutos, gusano del cesto.	Algodón, arándano, frejol, col, maíz, espárrago, mandarina, palto y pecano	0.3-0.5 Kg/ha

Fuente: Los autores.

4. Conclusiones

Los hongos y bacterias son los microorganismos más empleados en la formulación de los bioplaguicidas, con respecto a los hongos las especies que más resaltan son *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana*, en representación de las bacterias la especie más utilizada es *Bacillus thuringiensis*. De este último su efectividad insecticida se fundamenta en la acción de la proteína Cry y de los primeros su efectividad depende de la adhesión de la espора a la cutícula del insecto.

Estos resultados sugieren que el uso de bioplaguicidas continúa siendo una importante herramienta en el control de plagas de los principales cultivos de interés agrícola. Así mismo, que el conocimiento de las diferentes formas y formulados de los productos de bacterias y hongos que están disponibles en el mercado, mejoran la efectividad de las estrategias de control. Es por ahí la importancia de trabajos como éste, que reúnen y precisan toda esta información.

Referencias

- Altamira, P. (2020). Microorganismos con actividad entomopatógena. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. <https://biblioteca.inia.cl/handle/123456789/6899>
- Aw, K. M. S. & Hue, S. M. (2017). Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. *Journal of Fungi*, 3(2), 30. <https://doi.org/10.3390/jof3020030>
- Baratto, C. M., Dutra, V., Boldo, J. T., Leiria, L. B., Vainstein, M. H. & Schrank, A. (2006). Isolation, Characterization, and Transcriptional Analysis of the Chitinase chi2 Gene (DQ011663) from the Biocontrol Fungus *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae*. *Current Microbiology*, 53(3), 217-221. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0078-6>
- Bilgo, E., Lovett, B., St. Leger, R. J., Sanon, A., Dabiré, R. K. & Diabaté, A. (2018). Native entomopathogenic *Metarhizium* spp. From Burkina Faso and their virulence against the malaria vector *Anopheles coluzzii* and non-target insects. *Parasites & Vectors*, 11(1), 209. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2796-6>
- Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S. S. & Soberón, M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1667(1), 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2004.08.013>
- Bravo, Pacheco, S., Gómez, I., García-Gómez, B., Onofre, J. & Soberón, M. (2017). Insecticidal Proteins from *Bacillus thuringiensis* and Their Mechanism of Action. En L. M. Fuiza, R. A. Polanczyk y N. Crickmore (Eds.), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus: Characterization and use in the field of biocontrol* (pp. 53-66). *Springer International Publishing*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56678-8_4
- Bustillo, A. (2001). Hongos e insectos y posibilidades de uso de control biológico de plagas en Colombia. Seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. https://www.researchgate.net/publication/275462138_HONGOS_EN_INSECTOS_Y_POSIBILIDADES_DE_USO_EN_EL_CONTROL_BIOLOGICO_DE_PLAGAS_EN_COLOMBIA
- Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M. & Ratcliffe, N. A. (2016). Chapter Nine - Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions. En B. Lovett y R. J. St. Leger (Eds.), *Advances in Genetics*, 94, 307-364. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- Charnley, A. K. (1992). Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locusts. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9124433>
- de Melo, N. R. de, Abdrahman, A., Greig, C., Mukherjee, K., Thornton, C., Ratcliffe, N. A., Vilcinskis, A. & Butt, T. M. (2013). Myriocin Significantly Increases the Mortality of a Non-Mammalian Model Host during *Candida* Pathogenesis. *PLOS ONE*, 8(11), e78905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078905>
- Deng, C., Peng, Q., Song, F. & Lereclus, D. (2014). Regulation of cry Gene Expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins*, 6(7), 2194-2209. <https://doi.org/10.3390/toxins6072194>
- Donzelli, B. G. G., Krasnoff, S. B., Churchill, A. C. L., Vandenberg, J. D. & Gibson, D. M. (2010). Identification of a hybrid PKS-NRPS required for the biosynthesis of NG-391 in *Metarhizium robertsii*. *Current Genetics*, 56(2), 151-162. <https://doi.org/10.1007/s00294-010-0288-0>
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y. & Pei, Y. (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene Bbchit1 and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 363-370. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.363-370.2005>
- Fang, W., Pei, Y. & Bidochka, M. (2007). A regulator of a G protein signalling (RGS) gene, cag8, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*, 153, 1017-1025. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/002105-0>
- Fargues, J. (1984). Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8719800>
- Feldhaar, H. & Gross, R. (2008). Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualists. *Microbes and Infection*, 10(9), 1082-1088. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.07.010>
- Fernández, C. & Juncosa, R. (2002). Biopesticidas: la agricultura del futuro. *Phytoma*, 141, 14-19. <https://infoxica2.files.wordpress.com/2010/01/1-12-biopesticidas-c2bf-la-agricultura-del-futuro.pdf>
- Freimoser, F. M., Grundschober, A., Tuor, U. & Aebi, M. (2003). Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus *Entomophthora thripidum* in vitro. *FEMS Microbiology Letters*, 222(2), 281-287. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00315-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00315-X)
- Griko, N. B., Rose-Young, L., Zhang, X., Carpenter, L., Candas, M., Ibrahim, M. A., Junker, M. & Bulla, L. A. (2007). Univalent Binding of the Cry1Ab Toxin of *Bacillus thuringiensis* to a Conserved Structural Motif in the Cadherin Receptor BT-R1. *Biochemistry*, 46(35), 10001-10007. <https://doi.org/10.1021/bi700769s>
- Güney, E., Adıgüzel, A., Demirbağ, Z. & Sezen, K. (2019). *Bacillus thuringiensis* kurstaki strains produce vegetative insecticidal proteins (Vip 3) with high potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0180-2>
- Hajek, A. E. & St. Leger, R. J. (1994). Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 293-322. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
- Hernandez-Fernandez, J. (2016). *Bacillus thuringiensis*: A natural tool in insect pest control. *The handbook of microbial bioresources*, 121-139. <https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20163199951>

- Holder, D. J. & Keyhani, N. O. (2005). Adhesion of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to Substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 5260-5266. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5260-5266.2005>
- Huang, W., Shang, Y., Chen, P., Gao, Q. & Wang, C. (2015). MrpacC regulates sporulation, insect cuticle penetration and immune evasion in *Metarhizium robertsii*. *Environmental Microbiology*, 17(4), 994-1008. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12451>
- Ibarra, J. E. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Rev Latinoam Microbiol*, 8 <https://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2006/mi062k.pdf>
- Jiang, H., Vilcinskas, A. & Kanost, M. R. (2010). Immunity in Lepidopteran Insects. *En K. Söderhäll (Ed.), Invertebrate Immunity*, 181-204. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8059-5_10
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M. & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132, 1-41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lee, S. J., Lee, M. R., Kim, S., Kim, J. C., Park, S. E., Li, D., Shin, T. Y., Nai, Y.-S. & Kim, J. S. (2018). Genomic Analysis of the Insect-Killing Fungus *Beauveria bassiana* JEF-007 as a Biopesticide. *Scientific Reports*, 8(1), 12388. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30856-1>
- Li, J., Ying, S.-H., Shan, L.-T. & Feng, M.-G. (2010). A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of *Metarhizium anisopliae* enhances conidial hydrophobicity when expressed in *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(4), 975-984. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2083-8>
- Litwin, A., Nowak, M. & Różalska, S. (2020). Entomopathogenic fungi: Unconventional applications. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 19(1), 23-42. <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09525-1>
- López-Pazos, S. A. & Cerón, J. (2010). Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. *NOVA*, 8(14), Article 14. <https://doi.org/10.22490/24629448.449>
- Moreno, I. M. A. (2012). *Bacillus thuringiensis*, el ingrediente activo de bioinsecticidas. 17(63). <http://www.comprendamos.org/alephzero/63/aleph63.pdf>
- Muñoz T., P. A. (2018). Microorganismos como una alternativa al uso de agroquímicos. *Idesia (Arica)*, 36(1), 3-5. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292018000100003>
- Ortiz-Urquiza, A. & Keyhani, N. O. (2013). Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357-374. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462424/>
- Pedrini, N., Crespo, R. & Juárez, M. P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1), 124-137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.08.003>
- Pigott, C. R. & Ellar, D. J. (2007). Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(2), 255-281. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>
- Pucheta, M., Flores-Macias, A., Rodríguez-Navarro, S. y Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 31(12), 856-860. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33901204.pdf>
- Roberts, D. W. & Humber, R. A. (1981). *Entomogenous fungi. Biology of conidial fungi*, 2(201), e236. [https://www.scirp.org/\(S\(351jmbtvnsjt1aadkpszje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1535851](https://www.scirp.org/(S(351jmbtvnsjt1aadkpszje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1535851)
- Rother, E. T. (2007). Revisão sistemática x Revisão Narrativa. *Acta Paulista de Enfermagem*, 20(2).
- Rosas-García, N. M., Avalos-de-León, O., Villegas-Mendoza, J. M., Mireles-Martínez, M., Barboza-Corona, J. E. & Castañeda-Ramírez, J. C. (2014). Correlation between Pr1 and Pr2 gene content and virulence in *Metarhizium anisopliae* strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 1495-1502. <https://doi.org/10.4014/jmb.1404.04044>
- Samuels, R., Paula, A., Carolino, A., Gomes, S., Paula, C., Cypriano, M., Silva, L., Ribeiro, A., Bastos, J. & Peres, C. (2016). Entomopathogenic organisms: Conceptual advances and real-world applications for mosquito biological control. *Open Access Insect Physiology*, 25. <https://doi.org/10.2147/OAIP.S68850>
- Sanchis, V. y Bourguet, D. (2009). *Bacillus thuringiensis*: Applications in Agriculture and Insect Resistance Management - A Review. En E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique y C. Alberola (Eds.), *Sustainable Agriculture*, 243-255. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_16
- Santi, L., Beys da Silva, W. O., Berger, M., Guimarães, J. A., Schrank, A. & Vainstein, M. H. (2010). Conidial surface proteins of *Metarhizium anisopliae*: Source of activities related with toxic effects, host penetration and pathogenesis. *Toxicon*, 55(4), 874-880. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.012>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Rie, J. V., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. & Dean, D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.3.775-806.1998>
- SENASA (2021). Lista de productos biológicos formulados registrados. <https://www.senasa.gob.pe/senasa/insumos-inocuidad-organica-semillas/>
- Sevim, A., Donzelli, B., Wu, D., Demirbag, Z., Gibson, D. & Turgeon, G. (2012). Hydrophobin genes of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium brunneum*, are differentially expressed and corresponding mutants are decreased in virulence. *Current Genetics*, 58, 79-92. <https://doi.org/10.1007/s00294-012-0366-6>
- Shang, Y., Chen, P., Chen, Y., Lu, Y. & Wang, C. (2015). MrSkn7 Controls Sporulation, Cell Wall Integrity, Autolysis, and Virulence in *Metarhizium robertsii*. *Eukaryotic Cell*, 14(4), 396-405. <https://doi.org/10.1128/EC.00266-14>

- Sharma, A., Srivastava, A., Shukla, A. K., Srivastava, K., Srivastava, A. K. & Saxena, A. K. (2020). Entomopathogenic Fungi: A Potential Source for Biological Control of Insect Pests. En M. K. Solanki, P. L. Kashyap y B. Kumari (Eds.), *Phytobiomes: Current Insights and Future Vistas*, 225-250. https://doi.org/10.1007/978-981-15-3151-4_9
- Skinner, M., Parker, B. L. & Kim, J. S. (2014). Chapter 10—Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. En D. P. Abrol (Ed.), *Integrated Pest Management*, 169-191. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398529-3.00011-7>
- Tanada, Y. & Kaya, H. K. (2012). *Insect Pathology. Academic Press*. <https://www.sciencedirect.com/book/9780123849847/insect-pathology>
- Téllez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A. & Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30, 73-80. https://www.researchgate.net/publication/237041725_Mecanismos_de_accion_y_respuesta_en_la_relacion_de_hongos_entomopatogenos_e_insectos
- Uchida, R., Imasato, R., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Shiomi, K., Tomoda, H. & Ōmura, S. (2005). New Insecticidal Antibiotics, Hydroxyfungerins A and B, Produced by *Metarhizium* sp. FKI-1079. *The Journal of Antibiotics*, 58(12), 804-809. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.107>
- Vachon, V., Laprade, R. & Schwartz, J.-L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., Santos-Villalobos, S. de los, Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I. & Santos-Villalobos, S. de los. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L. & Wang, C. (2012). Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1287-1292. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115983109>
- Wang, C. & Leger, R. J. S. (2006). A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6647-6652. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601951103>
- Wang, C., Typas, M. A. & Butt, T. M. (2002). Detection and characterisation of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*, 213(2), 251-255. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11314.x>
- Wang, J., Chen, J., Hu, Y., Ying, S.-H. & Feng, M.-G. (2020). Roles of six Hsp70 genes in virulence, cell wall integrity, antioxidant activity and multiple stress tolerance of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology*, 144, 103437. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103437>
- Xie, T., Wang, Y., Yu, D., Zhang, Q., Zhang, T., Wang, Z. & Huang, B. (2019). MrSVP, a secreted virulence-associated protein, contributes to thermotolerance and virulence of the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*. *BMC Microbiology*, 19(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1396-8>
- Xu, C., Wang, B.-C., Yu, Z. & Sun, M. (2014). Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and Parasporin Toxins. *Toxins*, 6(9), 2732-2770. <https://doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Zhang, Y., Zhao, J., Fang, W., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., Fan, Y. & Pei, Y. (2009). Mitogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3787-3795. <https://doi.org/10.1128/AEM.01913-08>
- Zhou, G., Ying, S.-H., Hu, Y., Fang, X., Feng, M.-G. & Wang, J. (2018). Roles of Three HSF Domain-Containing Proteins in Mediating Heat-Shock Protein Genes and Sustaining Asexual Cycle, Stress Tolerance, and Virulence in *Beauveria bassiana*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01677>
- Zhu, Y., Pan, J., Qiu, J. & Guan, X. (2008). Isolation and characterization of a chitinase gene from entomopathogenic fungus *Verticillium lecanii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(2), 314-320. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822008000200022>