

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Fundada en 1551

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



Tesis

Digitales UNMSM

**“CARACTERIZACIÓN DE TRES CEPAS DE *BEAUVERIA BRONGNIARTII*
(SACCARDO) PETCH Y SU VIRULENCIA EN *PHTHORIMAEA*
OPERCULELLA (ZELLER) Y *SYMMETRISCHEMA TANGOLIAS* (GYEN)”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Con mención en:

MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

AUTOR

MELISA ELISÉE VARGAS FLORES

**LIMA – PERÚ
2003**

Gracias a mis padres Vilma y Abel, quienes siempre se esforzaron para que alcance mis metas trazadas, acompañaron mis desvelos, comprendieron mis ausencias, me brindaron aliento y confianza y sobretodo, nunca permitieron que me dé por vencida.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Internacional de la Papa (CIP), por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo.

Al Ph.D. Aziz Lagnaoui, Líder del Proyecto MIP, por la confianza y apoyo depositada en mi persona para la realización del presente trabajo, así como por las sugerencias brindadas.

A la Ms.Sc. Maria Palacios, Asistente Investigador, quien en todo momento me brindó su apoyo, enseñanzas y sugerencias, asesorándome en el presente trabajo.

A la Ms.Sc. Verónica Cañedo, Asistente Investigador, por la revisión, corrección y sugerencias realizadas en el presente trabajo.

*Al Biólogo Octavio Zegarra, Asistente Investigador, por su apoyo y sugerencias brindadas para la caracterización molecular de *Beauveria brongniartii*.*

A la Bióloga Genoveva Rossel, Asistente Investigador, por el apoyo y sugerencias brindadas durante la implementación de la técnica RAPD.

Al Sr. Carlos Mendoza, por el apoyo y sugerencias brindadas en la crianza de insectos y bioensayos.

Al Ingeniero Wilmer Pérez, Asistente Investigador, por sus sugerencias para el presente trabajo, así como por su apoyo en la toma de fotografías al microscopio.

A todos mis amigos que siempre me apoyaron con su amistad sincera, quienes con sus palabras me alentaron para no rendirme en mi esfuerzo.

ÍNDICE

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS	25
IV. RESULTADOS	41
V. DISCUSIÓN	55

CONCLUSIONES	67
--------------	----

RECOMENDACIONES	68
-----------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
----------------------------	----

ANEXOS	78
--------	----

RESUMEN

Se realizó la caracterización morfológica, fisiológica y molecular de tres cepas de *Beauveria brongniartii*. CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1), además de evaluar su actividad entomopatógena en *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*.

La cepa CIPCu1(44) presentó conidias redondas, pequeñas y la formación de sinemas, diferenciándose de las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1) que presentaron conidias elipsoidales. El análisis molecular mediante la técnica RAPD permitió determinar que esta cepa estaba genéticamente más relacionada con la cepa de *Beauveria bassiana* CIPLM1 (50.4% de similaridad).

Al evaluar la actividad entomopatógena de las tres cepas en larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias*, se encontró que utilizando 1×10^9 conidias/ml el porcentaje de mortalidad fue hasta del 100%. Se determinó que para *P. operculella* la CL_{50} de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fue 2.71×10^5 , 5.53×10^5 y 5.19×10^5 conidias/ml y la CL_{90} fue 6.81×10^6 , 1.22×10^7 y 5.97×10^6 conidias/ml, mientras que para *S. tangolias* la CL_{50} para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fue 1.16×10^6 , 9.37×10^6 y 4.52×10^6 conidias/ml y la CL_{90} fue 6.01×10^7 , 1.46×10^9 y 2.17×10^8 conidias/ml respectivamente. En ensayos posteriores se determinó que las cepas de *B. brongniartii* necesitaron mayor tiempo (9-10 días) para que las CL_{50} pudieran causar el 50% de mortalidad a las larvas de primer estadio de *S. tangolias* mientras que sólo necesitaron 3 a 5 días para causar el 50% de mortalidad en *P. operculella*.

Posteriormente se evaluó cada CL_{50} y CL_{90} en huevos, larvas de último estadio y pupas de *P. operculella* y *S. tangolias*, encontrándose que todos los estados de desarrollo fueron susceptibles con diferente grado de infección. En todas estas evaluaciones, la cepa CIPCa18(85) presentó la mejor actividad entomopatógena para el control de *P. operculella* y *S. tangolias*.

ABSTRACT

The objective of this research was to carry out morphological, physiological and molecular characterization of three isolates of *Beauveria brongniartii*: CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1). In addition, entomogenous activity was tested in *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*.

Isolate CIPCu1(44) showed shorter and spherical conidia while isolates CIPCa18(85) y CIPH1(1) showed typical elipsoidal conidia. RAPD technique showed a relation between isolates CIPCu1(44) and CIPLM1 (*B. bassiana*) with 50.4% of similarity.

Patogogenicity test showed that isolates were effective to first instar larvae, the use of 1×10^9 conidia/ml caused until 100% mortality for both insects. CL_{50} for isolates CIPCa18(85), CIPCu1(44) and CIPH1(1) obtained in *P. operculella* larvae were 2.71×10^5 , 5.53×10^5 and 5.19×10^5 conidias/ml and CL_{90} for each isolate were 6.81×10^6 , 1.22×10^7 and 5.97×10^6 conidias/ml respectively. CL_{50} for isolates CIPCa18(85), CIPCu1(44) and CIPH1(1) obtained in *S. tangolias* were 1.16×10^6 , 9.37×10^6 and 4.52×10^6 conidias/ml and CL_{90} for each isolate were 6.01×10^7 , 1.46×10^9 and 2.17×10^8 conidias/ml respectively.

In other essays, isolates of *B. brongniartii* needed more time to kill 50% of *S. tangolias* larvae (9 to 10 days) while isolates of *B. brongniartii* needed only 3 to 5 days to kill 50% of *P. operculella*. With CL_{90} , isolates needed about 3 days for both insects.

Finally, each CL_{50} y CL_{90} of three isolates were tested in eggs, last instar larvae and pupae, results showed that all develop stages were susceptible to *B. brongniartii*. Isolate CIPCa18(85) showed the best entomogenous activity to make control of *P. operculella* y *S. tangolias* because it came of the same insect order, we suggest more studies with this isolate in greenhouse.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La papa *Solanum tuberosum* L., considerada entre los cultivos alimenticios de mayor importancia a nivel mundial, constituye en el Perú uno de los componentes básicos en la dieta de la población rural y urbana. La productividad y rentabilidad de este cultivo es seriamente afectada por factores adversos como sequías, heladas y plagas.

Entre las plagas, destacan por el daño que ocasionan “las polillas de la papa” : *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen), ambas especies ya sea en forma conjunta o aislada causan daños severos tanto en campo como en almacén, cuando no se realiza control alguno o el control es deficiente.

Phthorimaea operculella es la plaga de mayor importancia económica en casi todas las áreas cálidas del mundo donde se cultiva papa, tanto por los daños que causa como por la amplia distribución alcanzada. Estudios realizados en Turquía, Túnez y Argelia revelaron un daño en tubérculos hasta del 86% cuando se almacenaron por tres meses (CIP, 1980). En el Perú, se registraron pérdidas hasta de un 50% en campos donde no fueron tomadas medidas de control adecuadas (CIP, 1983) y 90% en tubérculos almacenados durante cuatro meses.

Symmetrischema tangolias ha incrementado su importancia en los últimos años como insecto plaga principalmente en la región Andina del continente Americano: Bolivia, Colombia y Perú (CIP, 1988). En el Perú, Sánchez y Aquino (1986) la citaron como una especie que ha adquirido singular importancia en la sierra central del país, Palacios *et al.* (1999) la encontraron infestando tanto en el campo como en almacén.

El método de control más utilizado por los agricultores es el químico, cuyo costo varía de acuerdo al nivel de toxicidad, siendo los más baratos y los más utilizados por los agricultores (Tenorio, 1996), afectando la salud del hombre y causando efectos adversos en la naturaleza. Debido a esto se ha incrementado el interés por el uso de métodos alternativos de control, entre los cuales los hongos entomopatógenos constituyen una perspectiva promisoriosa ya que causan epizootias que juegan un papel importante en la regulación de poblaciones de insectos.

El hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch tiene actividad patogénica sobre diversos órdenes de insectos como Coleoptera, Homoptera, Lepidoptera y Diptera (Society for Invertebrate Pathology, 1999) y tiene amplia distribución en los Andes del Perú, sobre los 2800 m.s.n.m, donde las bajas temperaturas prevalecen (Alcázar et al., 1990) por lo que se constituye en una alternativa para el control de estas plagas. Se han reportado variaciones entre las diferentes cepas de *B. brongniartii* (Driver y Milner, 1998; Platti et al., 1998) ya que algunos presentan mayor especificidad y eficiencia a ciertas especies de insectos por lo que es importante evaluar las diferentes cepas basándose en criterios morfológicos, fisiológicos y moleculares.

Considerando lo anteriormente mencionado se fijaron los siguientes objetivos para el desarrollo del presente trabajo:

Objetivo General:

Evaluar las características morfológicas, fisiológicas y moleculares así como la actividad entomopatógena de tres cepas de *Beauveria brongniartii* procedentes de hospederos y localidades diferentes.



Objetivos Específicos:

- Evaluar el efecto entomopatógeno de tres cepas de *B. brongniartii* sobre los diferentes estados de desarrollo de *P. operculella* y *S. tangolias* en condiciones de laboratorio.
- Analizar la variabilidad genética de las tres cepas de *B. brongniartii* con marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN polimórfico amplificado al azar).
- Comparar las tres cepas de *B. brongniartii* de acuerdo a sus características morfológicas, fisiológicas, moleculares y entomopatógenas.

Symmetrischema tangolias es una plaga de la papa propia del área andina, se la encuentra en las zonas altas de Perú, Bolivia y Colombia. En el Perú se halla diseminada en el Valle del Mantaro (Alcázar *et al.*, 1982) afectando hasta un 87% de tubérculos en almacén (Raman, 1980). Se la ha reportado en más del 90% de almacenes de papa por debajo de los 3500 m.s.n.m, disminuyendo a mayores altitudes (Ewell *et al.*, 1994).

2.3. Ciclo de vida.

Como todos los lepidópteros, *P. operculella* y *S. tangolias* pasan por cuatro estados de desarrollo: huevo, larva, pupa y adulto.

El huevo de *P. operculella* es de forma oval achatada, presenta una superficie lisa, mide aproximadamente 0.5 mm de largo por 0.4 mm de ancho, mientras que el huevo de *S. tangolias* mide aproximadamente 0.7 mm de longitud y 0.4 mm de diámetro, presentando la superficie del corión esculpida (Figura 1). Para ambas especies, el huevo recién colocado es de color blanco perlado adquiriendo una coloración anaranjada-amarilla y un tono plomizo oscuro cuando se aproxima a la etapa final del desarrollo embrionario.

P. operculella presenta 4 estadíos larvales (Raman, 1980; Sánchez y Vergara, 1991; Palacios, 2001) mientras que *S. tangolias* presenta 5 estadíos larvales (Sánchez y Aquino, 1986). Las larvas de estas polillas presentan un cuerpo blando y una longitud de 1 mm al emerger. En el último estadío larval, la larva de *P. operculella* presenta una coloración que varía de rosada a verdosa alcanzando una longitud máxima de 12 mm, mientras que la larva de último estadío de *S. tangolias* presenta una coloración verde celeste con franjas rojizas bien engrosadas y notorias, alcanzando hasta 13 mm de longitud (Figura 2).

Para ambas especies, la pupa es momificada u obtecta, con una coloración marrón claro casi amarillo y con 5 a 8 mm de longitud para el caso de *P. operculella* y una

coloración bruno claro brillante y con 7.5 mm de longitud para el caso de *S. tangolias* (Figura 3). Al completar su desarrollo, la larva sale del órgano infestado para formar un capullo con hilos de seda, en el caso de *S. tangolias*, la larva puede empupar en el órgano infestado (tallo o tubérculo).

El adulto de *P. operculella* es un microlepidóptero que mide aproximadamente 8 a 10 mm con una envergadura alar promedio de 15 mm (Raman, 1980) y una mancha en el dorso en forma de "X", mientras que *S. tangolias* presenta una expansión alar de 18 mm de longitud, y una mancha triangular marrón oscuro en el margen costal de las alas anteriores (Figura 4).

Según Palacios (2001), *P. operculella* se desarrolla bien entre los 13°C y 35°C. A los 14°C su ciclo de vida dura 92 días, a 25°C dura 27 días y a 35°C dura 16.6 días. En zonas altas del Perú con temperatura promedio de 12 a 13°C, el huevo incuba en 21 días, la larva desarrolla en 71 días y la pupa en 36 días, lo que da como resultado un ciclo de vida de 128 días (4.3 meses). En climas cálidos la hembra puede poner hasta 300 huevos, mientras que en zonas frías pone 137.9 huevos. Los adultos pueden vivir de 6 a 30 días.

En cambio *S. tangolias* posee un período de incubación que varía de 7 días (23°C) a 17 días (12°C) mientras que el período de larva varía de 23 días (23°C) a 57 días (12°C). El estado de pupa varía de 14 días (23°C) a 31 días (12°C). El ciclo completo desde que el huevo fue depositado hasta que emerge el adulto puede durar de 44 días (23°C) a 105 días (12°C) lo que permite a la plaga desarrollar de 3 a 5 generaciones al año. La longevidad de los adultos varía de 11 a 30 días. La hembra puede poner de 90 a 250 huevos.

2.4. Daño.

Tanto en *P. operculella* como en *S. tangolias*, la larva es la que ocasiona los daños. La larva de *P. operculella* mina las hojas y barrena los tubérculos. Debido a los

daños ocasionados, los tubérculos se deshidratan ocurriendo invasión de bacterias que causan su pudrición (Sánchez y Vergara, 1991).

En el caso de *S. tangolias* la larva ocasiona daños barrenando tallos y tubérculos (Calvache, 1982). Externamente, se observa el excremento característico en los puntos de entrada en el tallo, marchitando y causando la muerte de la planta. En los tubérculos ocasiona pérdida tanto en peso como en calidad (Figura 5).

2.5. Control microbiano.

El control microbiano consiste en reducir las plagas o mitigar sus efectos por medio de agentes infecciosos como los virus, rickettsias, bacterias, protozoarios, hongos y nemátodos que causan enfermedades o epizootias entre las plagas (De Bach, 1985; Cisneros, 1995). Estos patógenos existen en la naturaleza como una forma natural de mantener el equilibrio de las poblaciones de la flora y fauna (Torres et al., 1993).

Como ventajas, el control microbiano presenta poca o ninguna patogenicidad para los animales benéficos y para el hombre y poca destrucción del balance natural ya que son específicos. Además, los patógenos pueden persistir en la naturaleza sin aplicación adicional (Kuno *et al.*, 1981). Como desventajas, los patógenos tienen un efecto lento, además de la dificultad de mantener la virulencia por largo tiempo ya que dependen de las condiciones ambientales (Kuno *et al.*, 1981; Cisneros, 1995).

2.6. Hongos entomopatógenos.

Los hongos son microorganismos eucariontes, sin clorofila, pueden ser unicelulares o pluricelulares. Son filamentosos y con paredes celulares que contienen quitina y/o celulosa. Se reproducen sexual o asexualmente con o sin esporas. La reproducción asexual es la más frecuente, involucrando la formación de esporas microscópicas de paredes delgadas llamadas conidias, los cuales se desarrollan en los conidióforos (Pelczar *et al.*, 1982) y se diseminan por el viento, agua u otros agentes (Kuno *et al.*, 1981). El ciclo de vida de un hongo puede dividirse en dos fases: la fase de

crecimiento, constituido por el micelio vegetativo, el cual es el más conveniente para un crecimiento rápido y colonización del ambiente, siendo por ello la fase más vulnerable (Bartnicki-García, 1984) y la fase de reposo o latencia constituida por las esporas.

Los hongos entomopatógenos a diferencia de las bacterias y virus entomopatógenos no requieren ser ingeridos para infectar a sus hospederos, ya que su mecanismo de acción es la penetración directa a través del integumento además de poseer un amplio rango de hospederos y de infectar diferentes estados de desarrollo y edades del hospedero (Ferron, 1978). Constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de los insectos plagas ya que la mayoría de los insectos son susceptibles a estos hongos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos, entre los géneros más importantes están *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* (Monzón, 2001).

2.6.1. Modo de acción de los hongos entomopatógenos.

El proceso del desarrollo de la enfermedad puede ser dividido en 10 pasos (Roberts y Humber, 1984; Hajek y St Leger, 1994):

1. Adherencia de la conidia a la cutícula del insecto. Para penetrar el integumento externo del hospedero la conidia debe adherirse a la superficie cuticular. La interacción entre la conidia y la cutícula depende de las sustancias mucilaginosas que rodean la conidia, las enzimas, además de la conformación morfológica del integumento que favorece la germinación de la conidia. Las conidias pueden adherirse al azar de acuerdo a los pliegues intersegmentales o a la rugosidad de la superficie de la cutícula (Fargues, 1984).

2. Germinación de la conidia en la cutícula del insecto. La germinación ocurre dentro de un mínimo de 12 horas siendo necesaria una humedad relativa alta (mayor al 90%). Fisiológicamente, la germinación de la conidia es el retorno de la actividad o metabolismo vegetativo (Bartnicki-Garcia, 1984). Morfológicamente, la germinación es la emergencia de la célula vegetativa de una conidia, en forma de un tubo germinativo que crece sobre la superficie cuticular formándose un apresorio o penetrando directamente a la cutícula (Fargues, 1984; Bartnicki-García, 1984). La célula apresoria le permite adherirse a la superficie cuticular.

3. Penetración de la cutícula. La penetración se produce por un sistema enzimático de lipasas, proteasas y quitinasas liberadas al comienzo de la germinación de la espora (Roberts y Humber, 1984; González *et al.*, 2001). Las enzimas tienen un efecto específico sobre cada uno de los componentes de la cutícula, así la epicutícula o capa mas externa, formada por lípidos (ácidos grasos y parafina) es desintegrada por las lipasas, la quitinasa desintegra la quitina, sustancia que confiere resistencia y dureza a la cutícula. Así mismo, las proteínas presentes en la cutícula son desintegradas por enzimas proteolíticas producidas por el hongo (Torres *et al.*, 1993).

4. Crecimiento del hongo en el hemocele. El hongo crece en el hemocele como cuerpos hifales levaduriformes o blastosporas, que se multiplican por gemación (Roberts y Humber, 1984; Hajek y St Leger, 1994).

5. Producción de toxinas. Las toxinas producidas por los hongos entomopatógenos son las responsables de la mortalidad del hospedero. Según Hajek y St Leger (1994), el rápido desarrollo del

hongo indica que la muerte del insecto ocurre por el crecimiento vegetativo (ruptura de áreas membranosas o esclerotizadas) produciéndose altos niveles de micosis, mientras que la muerte rápida (48 horas o menos) es atribuida a la producción de toxinas (Roberts y Humber, 1984), permitiendo que otros organismos oportunistas invadan el hemocele resultando en un crecimiento reducido del hongo dentro del hospedero (Roberts y Humber, 1984; Kershaw *et al.*, 1999).

6. Muerte del insecto. Esto puede ser antecedido por cambios en el comportamiento del insecto, como contracciones y pérdida de coordinación (Roberts y Humber, 1984).

7. Desarrollo de la fase micelial. En esta fase aparecen pequeñas manchas melanizadas en los sitios de infección, observándose en algunos casos una coloración rojiza en el insecto hospedero. Estos insectos sirven de reservorio para los hongos durante períodos de condiciones adversas.

8. Emergencia del micelio hacia el exterior. En condiciones de baja o moderada humedad relativa, el hongo continúa en el insecto sin embargo, con alta humedad el hongo crece a través de la cutícula.

9. Producción de unidades infectivas. El metabolismo del hongo se reduce, formándose las unidades infectivas o conidias.

10. Dispersión de las unidades infectivas. Esto sucede por medio del agua o el viento.

2.7. Mecanismos de defensa de los insectos contra los hongos entomopatógenos.

2.7.1. Barreras de resistencia.

Las barreras estructurales constituyen la defensa primaria de los insectos contra los patógenos y endoparásitos. Las principales barreras son el rígido exoesqueleto (cutícula) y la membrana peritrófica (Borror *et al.*, 1981) que rodea el bolo alimenticio y protege a las paredes del epitelio intestinal. Los microorganismos que atraviesan estas estructuras y llegan hasta el hemocele deben de superar las defensas activas secundarias como la fagocitosis, encapsulación y melanización, además de la actividad de la enzima lisozima que hidroliza las paredes de las bacterias y de proteínas antibacterianas bloquean el crecimiento de bacterias y hongos (Kuno *et al.*, 1981, Dunn, 1986).

2.7.2. Estado fisiológico del insecto.

La habilidad del hongo para infectar a un insecto puede estar influenciada por el estado fisiológico del hospedero, ya que muchos hongos pueden infectar específicamente a un particular estado de desarrollo como huevos, larvas, pupas o adultos (Boucias y Pendland, 1984). Se cree que la cutícula posee sustancias de inactivación y que algunos de los estados de desarrollo podrían presentar condiciones fisiológicas desfavorables para el hongo (Kuno *et al.*, 1981). Boucias y Pendland (1984) indican que existe una edad de maduración de la respuesta inmune, debido a esto, los primeros estadíos larvales son susceptibles a bajas dosis del hongo (Kuno *et al.*, 1981).

Conforme el insecto desarrolla realiza varias mudas, siendo este proceso un mecanismo importante de defensa (Vandenberg *et al.*, 1998), sin embargo, la cutícula recién mudada es considerada vulnerable al ataque fúngico (Boucias y Pendland, 1984). Hajek y St Leger (1994) demostraron que la baja

patogenicidad de un hongo se debe a la naturaleza de la cutícula, es decir su densidad y grosor además del grado de esclerotización.

2.8. Género *Beauveria*.

2.8.1. Clasificación taxonómica.

Agostino Bassi fue el primer científico en demostrar en 1835 que *Beauveria bassiana* afectaba al “gusano de seda” *Bombix mori*. A partir de ese momento se han descrito varias especies de *Beauveria*, según sus características morfológicas y genéticas, tales como *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. amorpha*, *B. vermiconia*, *B. velata* y *B. calendonica* (Glare e Inwood, 1998).

La clasificación de *Beauveria brongniartii* según Barnett y Hunter (1998), es la siguiente:

Reino:	: FUNGI
División:	: MYCOTA
Subdivisión	: EUMYCOTINA
Clase	: DEUTEROMYCETES
Subclase	: HYPHOMYCETES
Orden	: MONILIALES
Familia:	: MONILIACEAE
Género:	: <i>Beauveria</i> Vuillemin
Especie	: <i>Beauveria brongniartii</i> (Saccardo) Petch (1926)

2.8.2. Descripción morfológica.

Beauveria brongniartii (Saccardo) Petch posee conidias hialinas, ovoides o cilíndricas, de 2,5–4,5(6) μm de longitud, a veces con base apiculada (Brady, 1979b; Torres *et al.*, 1993; Lacey, 1997) (Figura 6). Kuno *et al.* (1981) indican

que el 98% de las esporas son ovales, con el raquis largo (25 μm) con células conidióforas alargadas, solitarias de base subglobosa o cilíndrica de 3 a 18 μm de largo por 1.5 a 4 μm de ancho (Brady, 1979b). Según McLeod (1954), el aspecto de la colonia es aterciopelado o pulverulento, inicialmente presenta un color blanquecino pero a medida que la colonia envejece se torna de color amarillo pálido.

Este hongo es agente causal de la muscardina blanca en muchos insectos (Ferron, 1978; Brady, 1979b; Lacey, 1997).

2.8.3. Distribución en el Perú.

En el Perú, Torres *et al.* (1993), colectaron cepas de *Beauveria* provenientes de diferentes zonas. En la costa (0 a 800 m.s.n.m.) colectaron adultos del "gorgojo del camote" *Euscepes postfaciatus*, en la sierra alta (3000 a 4000 m.s.n.m.) colectaron adultos del "gorgojo de los Andes" *Premnotrypes* spp y en la selva alta (0 a 800 m.s.n.m.) colectaron adultos de *Diabrotica* sp, todos infectados con *Beauveria* spp. Los mismos autores identificaron las cepas y demostraron que todas las que provenían de la sierra alta de Perú pertenecían a *B. brongniartii*, mientras que las que provenían de la Costa y Selva alta pertenecían a la especie *B. bassiana*.

2.9. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular del género *Beauveria*.

La forma y tamaño de las conidias -esféricas para *Beauveria bassiana* y elipsoidales para *Beauveria brongniartii*- así como las características de las células conidiógenas, es el criterio morfológico más utilizado para la clasificación de ambas especies. Sin embargo, debido a la variabilidad entre las cepas de *Beauveria* y a la especificidad que muestran hacia diferentes órdenes de insectos, se recurren a técnicas complementarias para su identificación. Actualmente se aplican técnicas moleculares tales como los estudios de isoenzimas, secuenciamiento de RNAr (RNA ribosomal), análisis de RFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de

restricción), análisis de AFLP (Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados), análisis de RAPD (Polimorfismo de ADN amplificado arbitrariamente) con el fin de agrupar e identificar a las especies de *Beauveria*.

En el presente trabajo, se aplicó la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o ADN polimórfico amplificado al azar) la cual es una variación del protocolo de PCR con dos características distintivas: la primera es que utiliza un iniciador único en vez de un par de iniciadores ("primers") y la segunda característica es que el único iniciador tiene una secuencia arbitraria y por lo tanto la secuencia del segmento que se amplifica es desconocida (Weising *et al.*, 1995; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

2.10. Antecedentes de la caracterización morfológica, fisiológica, molecular y de la actividad entomopatógena de los hongos entomopatógenos.

Varela y Morales (1996) caracterizaron 6 cepas de *Beauveria bassiana* (8505, 8906, 8911, 8905, 8904, 9006) sobre *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) para lo cual evaluaron las variaciones morfológicas (macroscópicas y microscópicas), fisiológicas (viabilidad de la colonia, esporulación, tasa de crecimiento de la colonia, germinación, virulencia) y bioquímicas (producción de lipasa, isoenzimas), tratando de establecer una correlación de las variables estudiadas con la virulencia de las cepas. Encontraron que las características macroscópicas mostraron amplia variación por lo que no pudieron ser consideradas como único criterio para la caracterización. Se obtuvieron 6 perfiles electroforéticos diferentes para cada cepa analizada sin embargo, las cepas 8505, 8904 y 9006 provenientes del mismo orden de insecto (Coleoptera) presentaron bandas en común, deduciéndose que las cepas provenientes del mismo hospedero estaban más relacionadas que aquellas que provenían de orígenes geográficos diferentes. La cepa 8906 presentó el porcentaje de mortalidad más alto (75%) y un TL_{50} de 6,25 días. Las cepas derivadas de coleópteros (8911, 8904, y 9006) mostraron menor virulencia contra *H. hampei*. Con

estos resultados no pudieron demostrar una correlación entre las características evaluadas y la virulencia.

Driver y Milner (1998) realizaron una serie de revisiones acerca del uso del PCR para estudios de taxonomía del género *Beauveria*, concluyendo que existe una considerable diversidad genética en las dos principales especies: *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii*. Las técnicas moleculares actuales como el RAPD y RFLP permiten establecer diferencias entre cepas. También concluyeron que las características morfológicas no son lo suficientemente confiables para establecer diferencias entre *B. bassiana* y *B. brongniartii*.

Platii *et al.* (1998) caracterizaron 58 cepas de *Beauveria brongniartii* aisladas de *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) procedentes de Valle d'Aosta-Italia, utilizando la técnica RAPD-PCR. Basándose en las bandas variables halladas elaboraron un dendograma conformado por 5 grupos, los cuales contenían cepas patogénicas y no patogénicas demostrando que no había correlación entre la patogenicidad y las agrupaciones realizadas por la técnica RAPD-PCR. Asimismo, encontraron que las cepas conformaban 2 grupos, es decir, había una relación de los grupos con la distribución geográfica. Concluyeron que el Valle d'Aosta posee una población heterogénea de *B. brongniartii* conformado por dos posibles grupos de cepas según su origen geográfico.

Luz *et al.* (1998) caracterizaron 10 cepas de *Beauveria bassiana*: CG14 (Hemiptera), CG16 (Lepidoptera), CG19 (Hemiptera), CG21 (Hemiptera), CG24 (Hemiptera), CG136 (Hemiptera), CG261 (Hemiptera), CG306 (Hemiptera), CG474 (Hemiptera) y CG516 (Hemiptera), las que previamente se evaluó su efecto sobre ninfas de tercer estadio de *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). El resultado del RAPD evidenció alta similitud entre las cepas a pesar de las diferencias en virulencia contra *T. infestans*. Las cepas más virulentas fueron más homogéneas y no pudieron ser diferenciadas mediante marcadores moleculares. Concluyeron que la alta similitud

en las bandas podría estar relacionada con que las cepas provenían del mismo grupo de insectos hemípteros, por lo que no se pudo relacionar las bandas con la patogenicidad.

Glare e Inwood (1998) compararon diversas cepas de *Beauveria* spp. provenientes de Nueva Zelanda con cepas de otros países utilizando criterios morfológicos (medición de conidias) y moleculares. Basándose en las dimensiones de la conidia clasificaron a las cepas en dos grupos. Las cepas con conidias mayores de 3 µm de diámetro fueron clasificadas como *B. brongniartii* mientras que las cepas con conidias esféricas y menor de 3 µm de diámetro fueron *B. bassiana*. Realizaron un análisis de RAPD utilizando 10 iniciadores al azar obteniéndose 330 bandas, que permitieron clasificar las cepas en 4 grandes grupos: un grupo heterogéneo *B. bassiana/B. brongniartii* procedentes de Nueva Zelanda y otros lugares, un segundo grupo conteniendo solo cepas de *B. bassiana* procedentes de Nueva Zelanda, un tercer grupo conteniendo solo cepas de *B. brongniartii* procedentes de Nueva Zelanda y otros países y un cuarto grupo conformado por otras especies de *Beauveria* (*B. velata*, *B. caledonica*, *B. amorpha* y *B. vermiconia*). La digestión enzimática del DNA ribosomal respaldó la existencia de una diferencia genómica entre las cepas de *B. bassiana* de Nueva Zelanda separándolos del grupo heterogéneo *B. bassiana/B. brongniartii*.

Vélez *et al.* (2000) caracterizaron 17 cepas multiespóricas de *B. bassiana* según variables fisiológicas (patogenicidad a la broca del café, producción de esporas, germinación, tasa de crecimiento diario de las colonias y tamaño de esporas) y variables moleculares a través de la técnica RAPDs mediante el uso de iniciadores universales. El dendograma obtenido basándose en el análisis de variables moleculares permitió la clasificación en dos grandes grupos mientras que los resultados de las pruebas fisiológicas permitieron la clasificación de 4 grupos. Posteriormente al comparar el dendograma de variables moleculares con variables fisiológicas la única variable que mostró diferencias significativas fue la producción

de esporas. Estos resultados sugirieron que deberían seleccionarse entre los grupos de cepas clasificadas -por el criterio molecular- aquellas que en forma individual presenten altos porcentajes de patogenicidad, germinación, producción de esporas, tasa diaria de crecimiento entre otros.

Valderrama *et al.* (2000) utilizaron la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico para analizar la variabilidad genética de 10 cepas de *Beauveria bassiana* (Bals. Vuillemin) procedentes de diversos insectos, localidades y con diferentes porcentajes de patogenicidad sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). En el análisis de RAPD incluyeron una cepa de *Beauveria brongniartii* y otra de *Paecilomyces lilacinus*. Obtuvieron dos grupos principales de cepas, en uno de ellos se agrupaba el 90% de las cepas de *B. bassiana* y pudo distinguirse una asociación de acuerdo con su origen geográfico. En contraste no encontraron una clara agrupación de las cepas con respecto a su hospedero debido probablemente a que el hongo tiene bajo grado de especialización hacia un hospedero en particular. De la misma forma, tampoco hubo agrupación de acuerdo a la patogenicidad contra la broca, debido a que la virulencia y la patogenicidad son características gobernadas por muchos genes, lo que hace difícil encontrar marcadores ligados. La cepa de *B. brongniartii* se agrupó con las cepas de *B. bassiana* posiblemente porque esta cepa está más relacionada con esta última. Un segundo grupo fue conformado por una cepa de *B. bassiana*, que presentó patrones genéticos diferentes a las cepas anteriores. La cepa de *P. lilacinus* se separó completamente en un tercer grupo.

Avis *et al.* (2001) indicaron que una cepa debe ser identificada no solo mediante su morfología, sino también evaluando su actividad enzimática, asimilación de nutrientes, y actividad patogénica. Posteriormente sugieren que se deben realizar pruebas con otras cepas para determinar la diversidad entre las especies comparando su efectividad, de esta manera se selecciona la cepa más eficiente para el biocontrol *in vivo*.

Zúñiga y Redolfi (1981) inocularon *Beauveria bassiana* (un tratamiento en solución y otro tratamiento con espolvoreo) sobre huevos y larvas de tercer estadio de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Observaron que la acción del hongo sobre los huevos próximos a eclosionar generalmente se manifiesta en larvas de primer estadio con un porcentaje de infección de 71.55% para el tratamiento con la solución del hongo y 77.44% para el tratamiento con espolvoreo. En el caso de las larvas de tercer estadio, el porcentaje de infección para el primer tratamiento fue de 33.33% y para el segundo tratamiento fue de 78.88%, presentándose en el testigo y en los tratamientos muerte por bacteriosis pero sin diferencias significativas. La muerte por bacteriosis se debe a que estas larvas provenían de una crianza masal siendo imposible evitar la contaminación. También inocularon pupas con el hongo, muriendo algunas de ellas. Concluyeron que todos los estados de desarrollo son susceptibles al ataque por los hongos.

Maniania y Fargues (1985) determinaron la susceptibilidad de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a 6 cepas de *Nomuraea rileyi* y 10 cepas de *Paecilomyces fumosoroseus*. Las cepas de *P. fumosoroseus* presentaron un TL_{50} entre 2 a 3.7 días y un porcentaje de mortalidad mayor al 50% mientras que las cepas de *N. rileyi* presentaron un TL_{50} entre 5 y 10 días y un porcentaje de mortalidad menor al 25%. Encontraron que las larvas de *S. frugiperda* fueron más susceptibles a *P. fumosoroseus*, concluyendo que este hongo presenta un potencial para el control de este insecto.

Feng y Johnson (1990) evaluaron la virulencia, tasa de crecimiento y esporulación de 6 cepas de *Beauveria bassiana* provenientes de homópteros y coleópteros en *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) (las cepas SGBB8601, BB286, BB344, BB1554, BB717, BB806). Hallaron que todos las cepas infectaron *D. noxia*, presentándose amplias variaciones en su virulencia. Las CL_{50} variaron de 0.57×10^5 a 91.54×10^5 conidias/ml. La cepa SGBB8601 aislada de áfido (*Diuraphis noxia*) presentó la CL_{50} más baja (0.57×10^5 conidias/ml) y fue la más virulenta, mientras

que las otras cepas derivadas de homópteros (excepto la cepa BB1554) fueron las menos virulentas. Las cepas procedentes de coleópteros (BB286 y BB344) causaron virulencia similar a la causada por la cepa SGBB8601. Esto sugeriría que ni el hospedero de origen ni la relación filogenética entre hospederos potenciales es un indicador confiable de la probable virulencia de un hongo. En cuanto a la tasa de crecimiento y de esporulación, la cepa SGBB8601 fue la más virulenta y tuvo una tasa de crecimiento y de esporulación de 23.5 mm y 78.12 conidias/ml respectivamente mientras que la cepa BB717 (aislada de homóptero) fue la menos virulenta y presentó un crecimiento rápido de colonia y una tasa intermedia de producción de conidias, sugiriendo que no hay relación entre la virulencia, tasa de crecimiento y esporulación.

Jiménez (1992) evaluó la patogenicidad de 46 cepas de *Beauveria bassiana* provenientes de 13 países sobre adultos hembras de broca del café *Hypothenemus hampei*, encontrando que 16 cepas de *B. bassiana* mataron en menos de 120 horas al 50% de los insectos tratados y 5 de ellas lo hicieron en cerca de 80 horas. Un bioensayo posterior para determinar la CL_{50} no permitió encontrar diferencias de patogenicidad entre las 5 mejores cepas, por lo que evaluaron el número de cadáveres con esporulación, encontrando que el porcentaje de micosis fue alrededor de 65%.

González *et al.* (1993) compararon una cepa de *Beauveria bassiana*, proveniente directamente de *Diatraea saccharalis* (Bb-9205DS) (Lepidoptera: Pyralidae), frente a la misma cepa reactivada en broca del café (Bb-9205BFC), encontrando que el promedio de mortalidad causado por Bb-9205DS fue de 88,88% y por Bb-9205BFC fue 100%. La diferencia entre las cepas fue atribuida a que el patógeno adquirió mecanismos de agresividad al pasar por el huésped susceptible. El tiempo letal medio fue de 92.4 horas para Bb-9205DS y de 54,72 horas para Bb-9205 BFC. La disminución en el tiempo de mortalidad de las brocas tratadas con Bb-9205 BFC puede también ser debida a la reactivación de la cepa al pasarla por el huésped

susceptible. La mortalidad diaria para la cepa Bb-9205 DS se inició después de 12 horas mientras que para la cepa Bb-9205 BFC se inició antes de las 12 horas. La disminución en el tiempo de mortalidad diaria y en el TL_{50} indicarían una mayor agresividad del hongo hacia el huésped susceptible, es decir, que la reactivación del hongo en el hospedero susceptible influye en una mayor virulencia.

Fuentes y Carballo (1995) evaluaron la patogenicidad de 10 cepas de *Beauveria bassiana* sobre *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Iponomeutidae) utilizando una concentración de 10^9 conidias/ml encontrando que ocho cepas causaron la mayor mortalidad y el menor TL_{50} , sin presentar diferencias significativas entre ellas. En un segundo ensayo determinaron la CL_{50} (2.2×10^5 conidias/ml) y CL_{95} (5.1×10^7 conidias/ml) de la cepa 447. Posteriormente al evaluar las 4 mejores cepas del primer ensayo frente a la cepa 447, usando la CL_{95} de esta última, encontraron que cada cepa respondía de manera diferente pudiéndose diferenciar entre ellas, siendo la cepa 447 la que presentó el menor TL_{50} (3,32 días) y el porcentaje de mortalidad más alto. Finalmente al evaluar la cepa 447 en invernadero, con 10 veces menos la CL_{95} (5.1×10^6 conidias/ml), la CL_{95} (5.1×10^7 conidias/ml), y 10 veces más la CL_{95} (5.1×10^8 conidias/ml) encontraron que las dos últimas concentraciones causaron alta mortalidad (89.17% y 96.67%), demostrando que no era necesario incrementar la dosis para obtener un porcentaje de mortalidad similar al obtenido en el laboratorio. Concluyeron que las concentraciones menores a 10^7 conidias/ml son adecuadas para la diferenciación entre cepas.

García y Carballo (1995) evaluaron la virulencia de cuatro cepas de *Beauveria bassiana* (RL-9, 447, 167 y Coyo1-1) y cuatro cepas de *Metarhizium anisopliae* (M-32, M-37, MTB y M-30) para el control de *Hyalymenus tarsatus* (Hemiptera: Alydidae) usando una concentración de 10^9 conidias/ml. Determinaron que las cepas M-37, M-32, M-30 y RL-9 y 447 causaron el 100% de mortalidad y un TL_{50} de cerca de 2 días para *M. anisopliae* y cerca de 5 días para *B. bassiana*. En un segundo ensayo evaluaron las cepas RL-9 y M37, determinando que la CL_{50} y CL_{95} para la

cepa M-37 fue 1.71×10^6 y 5.5×10^8 conidias/ml y para la cepa RL-9 fue 1.18×10^6 y 2.69×10^8 conidias/ml respectivamente. En un tercer ensayo evaluaron todas las cepas utilizando la CL_{95} hallada en el segundo ensayo sin encontrar diferencias en la mortalidad y en los TL_{50} de las cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, lo que les permitió concluir que la concentración 10^9 conidias/ml permitió diferenciar a las cepas por su virulencia.

González *et al.* (1996) evaluaron 5 cepas de *Beauveria bassiana* (Achi-1, Achi-5, A4, 447 y 167) y su potencial para el control de larvas del tercer estadio de *Ecdyolopha torticornis* (Lepidoptera: Tortricidae), encontrando que no todas las cepas fueron eficientes a pesar de haber utilizado una concentración alta (10^9 conidias/ml) y que el TL_{50} permitió separar a las cepas por su virulencia siendo la cepa 447 la más virulenta (1.78 días). Eligieron la cepa 447 para un segundo ensayo determinando que su CL_{50} fue de 2.44×10^6 conidias/ml. En un tercer ensayo evaluaron la producción de conidias por larva muerta siendo la cepa 447 la que presentó un mayor potencial de inóculo (1.06×10^8 conidias/ml). Concluyeron que la cepa 447 fue la más promisoría para el control de larvas de *E. torticornis*, porque presentó el porcentaje más alto de mortalidad acumulada a los 10 días después de efectuada la inoculación, un TL_{50} menor y mayor producción de conidias con respecto a las demás cepas.

Hafez *et al.* (1997) evaluaron el efecto de 7 concentraciones de *Beauveria bassiana* sobre los diferentes estados de desarrollo de *Phthorimaea operculella*, determinando que la CL_{50} para las larvas era de 4.7×10^8 conidias/ml, el periodo pupal se incrementó hasta en 15 días, el porcentaje de emergencia de los adultos decreció hasta 0% y el número de huevos depositados disminuyó hasta en 103.3 ± 15.8 huevos, concluyendo que este hongo afecta los estados de larva, pupa y adulto.

Huamani (1997) evaluó la patogenicidad de una cepa nativa del hongo *Beauveria bassiana* sobre los estados de huevo, larva y pupa del “cogollero del maíz”

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). Utilizando tres concentraciones (10^7 , 10^8 y 10^9 conidias/ml) determinó que el primer estadio fue el más susceptible (96.67%) y el quinto estadio el menos susceptible (13.33%). El porcentaje de mortalidad para el estado huevo varió de 5.56% a 34.33% y para las larvas eclosionadas la variación fue de 5.56% a 32.22%, siendo el efecto total de 11.12% a 66.55%. Concluyó que todos los estados de desarrollo de *S. frugiperda* son susceptibles a *B. bassiana*.

Vandenberg *et al.* (1998) evaluaron 2 cepas de *Beauveria bassiana* en *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), una proveniente de larvas de *P. xylostella* y la otra un producto comercial. Las CL_{50} determinadas para ambas cepas fueron similares. El tercer y cuarto estadio fueron los más susceptibles a diferencia del primer y segundo estadio. Las larvas inoculadas en el primer y segundo estadio tuvieron un tiempo de sobrevivencia menor a las larvas de tercer y cuarto estadio inoculadas. Estos resultados les permitió conocer la susceptibilidad de *P. xylostella* a *B. bassiana*, además del potencial que presentaba la preparación comercial de *B. bassiana* sobre *P. xylostella* en el campo.

Wraight *et al.* (1998) mediante la determinación de la CL_{50} evaluaron la patogenicidad de 14 cepas de *Beauveria bassiana* sobre ninfas de tercer estadio de *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Solo 4 cepas presentaron la CL_{50} más baja, dos de las cuales no fueron aisladas de *B. argentifolii* ni fueron reactivadas en ella y solo una de las cepas causó una pronunciada pigmentación roja. Demostraron que las cepas de *B. bassiana* de diversos orígenes son igualmente patogénicas a las ninfas de *B. argentifolii*.

Ramos *et al.* (2000) evaluaron la susceptibilidad de huevos y ninfas de primer instar de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) al hongo *Beauveria bassiana* (cepa PL63 y Conidia®). Utilizaron una concentración de 10^8 conidias/ml de cada producto asperjado en hojas. Las aspersiones de entomopatógenos sobre los huevos

retardaron la eclosión pero no la impidieron. Con relación a las ninfas, las cepas PL63 y Conidia® produjeron 78,2% y 89,5% de mortalidad y 62.3% y 71.5% de micosis respectivamente, concluyendo que las ninfas de *B. tabaci* son susceptibles a *B. bassiana* mientras que los huevos son menos susceptibles a la infección.

Gindin *et al.* (2000) evaluaron la patogenicidad de 35 cepas de *Verticillium lecanii* provenientes de diferentes hospederos y distintos orígenes geográficos sobre los estados de desarrollo de *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). Varias cepas que mostraron alta patogenicidad a estas ninfas fueron también evaluadas sobre huevos, pupas y adultos. Como resultado se obtuvo que los huevos fueron inmunes a la infección, pero la mortalidad de las ninfas emergidas fue de 95% a 98%. La patogenicidad de las cepas de *V. lecanii* sobre pupas varió ente 59±12.1% a 72.5±13.1% y la mortalidad sobre adultos estuvo entre 34.1±5.1% y 52.6±3.8%. Las cepas más virulentas provenían de áfidos y presentaban el mismo origen geográfico. La susceptibilidad de los diferentes estados de desarrollo estaría influenciada por la habilidad del patógeno de iniciar la infección y por su especificidad, concluyendo que todos los estados de desarrollo fueron susceptibles excepto el estado de huevo.

Aponte y Uribe (2001) evaluaron 18 cepas de *Beauveria bassiana* provenientes de lepidópteros, coleópteros, dermápteros, himenópteros y homópteros frente a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) encontrando que las cepas presentaron un amplio rango de mortalidad (0% a 93,3%). Realizaron un segundo estudio, en el cual determinaron la CL₅₀ de las 6 mejores cepas. Las cepas IBUN.B-59 (Coleoptera), IBUN.B-76 (Homoptera) y IBUN.B-146 (Coleoptera) presentaron los valores más bajos con un rango de 9.5 x 10⁶ a 1 x 10⁸ conidias/ml. Las cepas IBUN.B-16, IBUN.M-48 y IBUN.B-79 presentaron valores de CL₅₀ en rangos similares pero con límites de confianza muy amplios (9.8 x 10⁵ – 8.9 x 10¹⁰ conidias/ml) sugiriendo inestabilidad de estas cepas en cuanto a su actividad bioplaguicida. Estos resultados les permitió sugerir que la actividad de *B. bassiana* contra *S. frugiperda* depende de las características intrínsecas de cada cepa, tales como el origen geográfico, hospedero de origen, esporulación, capacidad y tiempo



Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). Vargas Flores, Melisa E Iisée

Derechos reservados conforme a Ley

de germinación, actividad enzimática, viabilidad de las conidias entre otras. Las cepas que causaron mayor mortalidad procedían de diferentes órdenes, sugiriendo que fuentes con potencial biocontrolador alto pueden encontrarse en órdenes de insectos diferentes al del insecto plaga.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios e invernaderos del Departamento de Protección de Cultivos (Área de Entomología), pertenecientes al Centro Internacional de la Papa (CIP), La Molina, Lima Perú.

3.1. Material biológico.

- Se utilizaron tres cepas de *Beauveria brongniartii*: la cepa CIPCa18(85) aislada de larvas de último estadio de *S. tangolias* en Cajamarca, la cepa CIPCu1(44) aislada de adultos de *Premnotypes latithorax* en Cuzco y la cepa CIPH1(1) aislada de larvas de *P. suturicallus* provenientes de Huancayo. Además, para las pruebas moleculares se utilizó una cepa de *Beauveria bassiana* CIPLM1 aislada de adultos de *Euscepes postfasciatus* en Lima (Tabla 1).
- *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias* en sus estados de huevo, larva y pupa.
- Larvas de *Premnotypes spp.*
- Tubérculos de papa var “Tomasa Tito Condemayta”. El día anterior al ensayo los tubérculos fueron cortados en rodajas (1 cm de espesor), sumergiéndolas en agua durante 30 minutos. Luego las rodajas fueron colocadas en bandejas de plástico acondicionadas con papel toalla, dejándolas secar en un ambiente fresco.

3.2. Reactivación del patógeno.

Cada una de las tres cepas de *B. brongniartii* fueron reactivadas en sus hospederos originales (Tabla 1). Para este propósito se utilizaron larvas del “gorgojo de los Andes” (*Premnotypes lathitorax* o *P. suturicallus*.) y de “polilla de la papa” (larvas de último estadio de *S. tangolias*), las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto enjuagándolas luego en agua destilada. Posteriormente las larvas fueron sumergidas en la solución conidial correspondiente a su patógeno durante cinco minutos. Los insectos tratados fueron colocados individualmente en placas Petri acondicionadas con un papel filtro (Whatman N°2) en su base humedecido con aproximadamente 0.5 ml de agua destilada estéril y mantenidas a 22°C por 10 días. Al desarrollarse la micosis, el micelio fue sembrado en agar papa dextrosa (APD).

3.3. Mantenimiento de las cepas y obtención del inóculo.

La siembra del hongo se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar. Con una aguja de siembra en ángulo recto se tomó una porción de micelio joven del cultivo reactivado, sembrándose por punción en cinco sectores del medio APD contenido en placas Petri, las que luego fueron selladas con parafilm y mantenidas a 22°C durante 15 días (Figura 7).

De las tres cepas de *B. brongniartii* se obtuvieron los inóculos tomando como punto de partida una solución inicial con una concentración de 10^9 conidias/ml para cada cepa, para ello se agregó 10 ml de agua destilada y 2 gotas de Tween 80 a cada placa Petri, lavándose cada colonia con la ayuda de un hisopo estéril (Figura 7).

Para determinar su concentración se tomó 1 ml de la solución madre obtenida de cada cepa y se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución 0.1 realizándose el recuento en una cámara de Neubauer utilizando un microscopio compuesto con un objetivo de 40x de aumento. Para determinar la concentración de la solución se siguió el método descrito por French y Herbert (1982).

3.4. Establecimiento del módulo de crianza.

Con la finalidad de contar permanentemente con los diferentes estados de desarrollo de *P. operculella* y *S. tangolias* se mantuvo un módulo de crianza de cada una de los insectos para lo cual se siguió la metodología de crianza utilizada en el CIP.

3.4.1. Crianza de *Phthorimaea operculella*.

Para la obtención de huevos se utilizaron vasos de plástico (500 ml) y en cada uno de ellos se colocaron aproximadamente 100 pupas, este recipiente se cubrió con tela de organza, la cual se sujetó con una banda elástica. Posteriormente se colocó un disco de papel filtro y sobre el disco se ubicaron dos placas Petri para asegurar una mayor adherencia de huevos. El disco se cambió diariamente durante cinco días con el fin de obtener huevos de la misma edad. Los adultos fueron alimentados diariamente con una solución de azúcar y agua (1:10), la cual fue depositada sobre la tela organza utilizando un gotero.

Para la crianza de las larvas se utilizaron recipientes de plástico (30cm x 20cm x 9cm). En el fondo de cada uno se colocó arena esterilizada hasta una altura de 1cm depositándose los tubérculos de papa var "Tomasa Tito Condemayta" los cuales fueron infestados con larvas neonatas. Luego los recipientes se taparon y se mantuvieron a 25°C. Luego de 15 días se obtienen las pupas que fueron tamizadas con el fin de separarlas de la arena. Luego fueron lavadas con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos con el fin de disolver el cocon y liberar las pupas, que posteriormente fueron colocadas en una bandeja con papel toalla para eliminar el exceso de agua y dejarlas secar. Finalmente las pupas son colocadas en vasos y mantenidas en refrigeración a 10°C hasta su utilización en las diferentes pruebas (Figura 8).

Las larvas de cuarto estadio utilizadas en algunas pruebas fueron obtenidas antes de la formación de la pupa, es decir a los 12 días después de realizada la infestación en los tubérculos de papa.

3.4.2. Crianza de *Symmetrischema tangolias*.

Para esta especie se siguió una metodología similar a la descrita anteriormente, utilizándose papel toalla en lugar de arena. Los recipientes fueron mantenidos a 18°C. A los 20 días las larvas llegan al quinto estadio y salen del tubérculo, por lo que es necesario colocar cartuchos de papel para permitir que las larvas encuentren un lugar donde empupar. Aproximadamente a los 25 días las pupas se colectaron de los cartuchos colocándolas en vasos para refrigerarlas a 10°C hasta su utilización en las diferentes pruebas (Figura 9).

3.5. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de las cepas de *B. brongniartii*.

Las evaluaciones se llevaron a cabo de acuerdo al flujograma de trabajo (Figura 10).

3.5.1. Caracterización morfológica de las cepas de *B. brongniartii*.

El primer paso fue establecer la identidad del hongo mediante la utilización de la clave taxonómica propuesta por Brady (1979a,b). Adicionalmente se realizaron observaciones del aspecto y color de la colonia, pigmento en el medio de cultivo, formación de sinemas y tamaño de las conidias.

3.5.1.1. Morfología macroscópica.

Se realizaron observaciones en el aspecto, color, crecimiento y superficie del hongo cultivado en medio APD. Con una aguja de siembra en ángulo recto las tres cepas de *B. brongniartii* fueron sembradas por punción en el centro de una placa Petri conteniendo medio APD, incubándose a 22°C durante 15 días. Se realizaron

observaciones en el color de las colonias, aspecto, superficie y crecimiento. Además también se observó si el hongo produce pigmentación en el medio.

3.5.1.2. Morfología microscópica.

La morfología microscópica consistió en determinar el tamaño de las conidias. Con la ayuda de una pipeta se tomó una alícuota de solución conidial (10^6 conidias/ml) para cada una de las tres cepas de *B. brongniartii*. Las alícuotas se colocaron luego en láminas portaobjetos cubiertas con un cubreobjetos a la que se le agregó una gota de aceite de inmersión. Con un micrómetro adaptado al ocular del microscopio y utilizando un objetivo 100x se midió el diámetro mayor y menor de cada conidia. Se midieron un total de 50 conidias por cada cepa de *B. brongniartii*.

También se describió la forma de las células conidióforas. Para ello se realizó un microcultivo en placa Petri cortando pequeños cubos de medio APD, cada cubo fue colocado en laminas portaobjetos estériles ubicadas en placas Petri. Con una aguja de siembra en ángulo recto se sembró una pequeña porción de micelio en cada lado del cubo de agar. Posteriormente se colocó un cubreobjetos sobre el cubo de agar y se selló la placa Petri con parafilm. Las placas fueron mantenidas a 22°C. Al quinto día se retiró el parafilm y el cubreobjetos fue colocado en otra lamina portaobjetos con una gota de azul de lactofenol. Se eliminó el cubo de agar y se colocó una gota de azul de lactofenol en la lamina portaobjetos cubriéndola con un nuevo cubreobjetos. Finalmente, se eliminó el exceso de colorante con un papel absorbente, sellándose cada cubreobjetos con esmalte de uñas. Cada montaje realizado fue observado con un microscopio a 1000x con aceite de inmersión.

3.5.2. Caracterización fisiológica de las cepas de *B. brongniartii*.

La caracterización fisiológica se realizó mediante la evaluación de los parámetros utilizados en el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos: porcentaje de germinación, producción de conidias y crecimiento radial.

3.5.2.1. Porcentaje de germinación (viabilidad).

Para obtener el porcentaje de germinación se repartieron 6 alícuotas de la solución conidial (10^6 conidias/ml) de 5 μ l cada una en placas Petri conteniendo medio APD (cada alícuota representa una repetición para cada cepa de *B. brongniartii*). Las placas fueron mantenidas a 22°C durante 24 horas. Luego se agregó azul de lactofenol para detener la germinación y dar contraste a las conidias. Cada sector de agar que contenía una alícuota fue cortado y colocado en un portaobjeto y posteriormente cubiertas con un cubreobjeto. El porcentaje de germinación se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ germinación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de conidias germinadas}}{\text{N}^\circ \text{ total de conidias}} \times 100$$

Se consideró como conidia germinada aquella cuyo tubo germinativo presente el doble del diámetro mayor de la conidia.

3.5.2.2. Producción de conidias (esporulación).

Se inoculó 10 μ l de la solución conidial con una concentración de 10^6 conidias/ml en placas Petri con APD diseminándose en toda la superficie del medio con la ayuda de una espátula de Drigalsky esterilizada. Las placas fueron mantenidas a 22°C durante 15 días. Para el recuento de conidias se preparó una solución conidial con 10 ml de agua destilada y Tween 80 al 1%, y a partir de esta se realizaron

diluciones sucesivas en un factor de 0.1. Con una cámara de Neubauer se realizaron los conteos de conidias por mililitro, se utilizaron cuatro repeticiones para cada cepa. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los datos obtenidos comparándose los promedios mediante el análisis DLS (diferencia límite de significación) ($P < 0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.2.

3.5.2.3. Crecimiento radial (tasa de crecimiento).

La evaluación del crecimiento radial se efectuó de acuerdo a los metodología seguida por Varela y Morales (1996) y Vélez *et al.* (2000). En el centro de la placa conteniendo medio APD se colocó 10 μ l de solución conidial con una concentración de 10^7 conidias/ml, a partir del segundo día de sembrado se midió el radio mayor y el radio menor partiendo del centro de cada colonia. Se utilizaron diez repeticiones para cada cepa y las mediciones se realizaron diariamente durante 15 días. Con el radio mayor y el radio menor se determinó el radio promedio en cada día para cada cepa y a partir de este dato se realizó un análisis de regresión para cada una de las cepas, determinándose la tasa de crecimiento diario.

3.5.3. Caracterización molecular de las cepas de *B. brongniartii* mediante la técnica RAPD.

3.5.3.1. Obtención del micelio.

La cepa de *B. bassiana* y las tres cepas de *B. brongniartii* fueron sembradas en caldo papa dextrosa, manteniéndose en agitación orbital (300 RPM) a 20°C durante 5 días. El micelio se recuperó por filtración al vacío utilizando papel Whatman No 2, lavándolo dos veces en agua ultrafiltrada estéril.

3.5.3.2. Extracción del DNA.

La extracción de DNA se realizó de acuerdo al método de Aljanabi y Martínez (1997). En tubos eppendorf se colocó 0.05-0.1 g de micelio el cual fue homogenizado en 400 μ l de buffer de extracción (ver anexo) durante 10 a 15 segundos con la ayuda de un homogenizador de tejidos. Luego se agregó 40 μ l de Sodio Dodecil Sulfato (SDS) 20% y 8 μ l de proteinasa K 20 mg/ml. Las muestras fueron incubadas a 55-65°C durante 1 hora o toda la noche, luego del cual se agregó 300 μ l de NaCl 6M (NaCl saturado en agua) a cada tubo. Las muestras se mezclaron con la ayuda de un vortex durante 30 segundos a máxima velocidad para posteriormente centrifugar por 30 minutos a 10000g. El sobrenadante fue transferido a otro eppendorf en el cual se agregó un volumen igual de isopropanol, mezclando suavemente para luego colocar las muestras a -20°C durante 1 hora. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas durante 20 minutos a 10000g. Finalmente el precipitado fue lavado con etanol 70%, secado y resuspendido en 100 μ l de agua estéril libre de nucleasas.

Las extracciones fueron almacenadas a -20°C hasta su uso. Para mejorar la calidad de DNA se agregó 2.5 μ l de RNAsa (10 μ g/ μ l). La calidad del DNA se analizó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, coloreándose con bromuro de etidio y observándose con luz ultravioleta. En todas las separaciones por electroforesis se utilizó 2 μ l del marcador λ PST-I.

3.5.3.3. Aplicación de la técnica RAPD.

Se utilizó la técnica de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) para analizar la variabilidad genética entre las tres cepas de *Beauveria brongniartii* procedentes de diferentes insectos y diferentes

localidades. Se utilizó 5 µl de DNA con una concentración de 5 ng/µl. Para ello se utilizaron 10 iniciadores universales OPM 1, OPM 3, OPM 4, OPM 5, OPM 6, OPM 9, OPM 10, OPM 12, OPM 17 y OPM 19 (Operon Technologies).

Las reacciones se realizaron en un volumen total de 15 µl, conteniendo 4.76 µl H₂O ultrafiltrada, 1.50 µl de buffer PCR 10X, 0.45 µl MgCl₂ 50 mM, 1.20 µl DNTPs 2.5 mM, 2.0 µl del iniciador (10 ng/µl) y 0.09 µl de *Taq* polimerasa. Como control se utilizó la cepa de *Beauveria bassiana* CIPLM1. La amplificación se realizó con un termociclador MJ-Research PTC-100 con el siguiente programa: 94°C por 3 minutos, 94°C por un minuto, 35°C por un minuto, 37°C por 0.4 C/segundo, 72°C por 2 minutos, repetir 40 veces a partir del segundo paso, 72°C por 7 minutos y 10°C por “n” horas para finalizar.

Todas las amplificaciones se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,4% utilizando 1X del buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) a 80V. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. Todas las amplificaciones fueron repetidas mínimo cinco veces con el objetivo de ver la reproducibilidad en los patrones de bandas electroforéticas. Las comparaciones de cada perfil para cada iniciador se realizó en base a la presencia/ausencia (1/0) de las bandas elaborándose una matriz con el cual se calculó el coeficiente de similitud de Jaccard. Las agrupaciones para la elaboración del dendograma se realizaron utilizando el algoritmo UPGMA mediante el programa NTSYS versión 2.2.

3.6. Evaluación de la actividad entomopatógena de las cepas de *B. brongniartii* sobre *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*.

Una vez que la identidad del hongo ha sido establecida se evaluó la patogenicidad de las cepas para seleccionar la más eficiente, mediante el porcentaje de mortalidad y la virulencia hallando el tiempo letal medio (TL₅₀) y la concentración letal media (CL₅₀). Generalmente este tipo de ensayos se realiza *in vitro*. Los bioensayos se organizaron de acuerdo al flujograma adjunto (Figura 11).

3.6.1. Efecto de las cepas de *B. brongniartii* en larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias*.

En estos ensayos, las tres cepas de *B. brongniartii* fueron evaluadas en larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias*. La elección de este estado de desarrollo se debe a que el control debe estar dirigido al estado de desarrollo dañino para el cultivo con el fin de minimizar los daños ocasionados, tal como lo postuló Ignoffo *et al.* (1975) citados por Maniania y Fargues (1985).

3.6.1.1. Patogenicidad.

Este ensayo tuvo como finalidad seleccionar la cepa que ocasione el mayor porcentaje de mortalidad. Para este ensayo se evaluaron 2 tratamientos: una suspensión de *B. brongniartii* con 10⁹ conidias/ml y un testigo, con 10 repeticiones de 10 larvas de primer estadio cada uno, para un total de 100 larvas. En un recipiente de plástico se colocó una población de larvas de primer estadio y se agregó 10 ml de la solución conidial, las larvas permanecieron en contacto con la solución por un minuto, bajo agitación suave. Posteriormente las larvas fueron pasadas a través de una malla fina, eliminándose el exceso de humedad colocando la malla sobre papel toalla.

Las larvas tratadas se colocaron individualmente sobre una rodaja de papa contenida en una placa Petri. Cada placa fue sellada con una cinta de parafilm para evitar que la larva escape de la placa. Al día siguiente, cuando la larva ingresó al tubérculo, se retiró el parafilm (Figura 12). La individualización de las larvas permitió realizar la evaluación de la patogenicidad ocasionada por la acción directa del hongo sobre cada una de ellas y no como consecuencia de la oportunidad de enfermarse por la presencia permanente del inóculo, lo cual ocurre cuando se evalúa la patogenicidad sobre poblaciones en las que un insecto enfermo puede estar afectando la población y servir de vehículo para la infección del grupo (González *et al.*, 1993).

Las observaciones se realizaron con la ayuda de un estereoscopio, pinzas y pinceles. La evaluación se realizó al sexto día registrándose la mortalidad total. Las larvas muertas fueron colocadas en cámaras húmedas para facilitar el crecimiento de micelio, comprobándose así que el individuo estaba infectado. El diseño utilizado fue completo al azar, los datos de mortalidad y micosis fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA). Para la comparación de medias se utilizó la prueba de DLS ($P < 0.05$).

3.6.1.2. Virulencia y determinación de la CL₅₀ y la CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii*

El objetivo de este ensayo fue determinar el TL₅₀ para cada concentración de las tres cepas y determinar la dosis necesaria para matar el 50% y el 90% de la población larval (CL₅₀ y CL₉₀). Se evaluaron seis concentraciones de la solución conidial (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 y 10^3 conidias/ml) y un testigo (sin tratamiento). La metodología utilizada fue similar a la usada en el ensayo anterior. Para cada tratamiento se utilizaron 60 larvas de primer estadio agrupadas

en 6 repeticiones de 10 larvas. Las evaluaciones se realizaron diariamente durante siete días registrándose la mortalidad diaria. Las larvas muertas fueron colocadas en cámaras húmedas para observar el crecimiento de micelio y verificar que la muerte fue por el patógeno.

El diseño fue completo al azar. Se realizó un análisis de varianza a los porcentaje de mortalidad total y miosis, los cuales fueron transformados previamente a $\arcsen\sqrt{x}$, los promedios se compararon mediante un análisis de Waller y Duncan ($P<0.05$). Con los datos de mortalidad diaria de cada concentración se determinó el TL_{50} y sus límites de confianza mediante el análisis de Probit (SAS Institute Inc, 1998). Los datos de mortalidad total acumulada de cada concentración fueron corregidos mediante la fórmula de Abbott, determinándose la CL_{50} , CL_{90} y sus límites de confianza respectivos mediante el análisis de Probit, utilizando el paquete estadístico SAS versión 8.2 (1989).

3.6.1.3. Determinación del tiempo letal medio (TL_{50}) de las CL_{50} y CL_{90} de las cepas de *B. brongniartii*.

El objetivo de este ensayo fue determinar el tiempo necesario para matar el 50% de la población larval con la CL_{50} y CL_{90} de cada una de las tres cepas. Para ambas especies de polilla se evaluaron siete tratamientos: CL_{50} , CL_{90} de las tres cepas y un testigo. La metodología utilizada fue similar al ensayo anterior. Para cada tratamiento se utilizaron 60 larvas agrupadas en 6 repeticiones de 10 larvas individualizadas cada una. Se evaluó diariamente por 12 días registrándose la mortalidad. El porcentaje de mortalidad se comparó mediante la prueba de proporciones Z. Con los datos de mortalidad diaria acumulada se determinó el TL_{50} para cada CL_{50} y CL_{90} con sus

respectivos límites de confianza mediante el análisis de Probit (SAS Institute Inc, 1998).

3.6.2. Efecto entomopatógeno de las cepas de *B. brongniartii* sobre los estados de desarrollo de *P. operculella* y *S. tangolias*.

Se realizaron estudios complementarios del efecto de las CL₅₀ y CL₉₀ de las tres cepas de *B. brongniartii* determinadas en larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias* en los estados de huevo, larva de último estadio y pupa de cada insecto.

3.6.2.1. Huevo.

Para cada especie de polilla se evaluaron siete tratamientos: CL₅₀, CL₉₀ de cada cepa y un testigo. Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones de 10 huevos cada una lo que hizo un total de 100 huevos por tratamiento. Se cortaron porciones de papel filtro conteniendo cada uno 10 huevos de la misma edad (1 día de edad) los cuales fueron sumergidos en 10 ml de la solución conidial durante un minuto. Luego, las porciones de papel filtro fueron colocados sobre papel toalla para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente cada porción de papel filtro se colocó en placas Petri conteniendo papel filtro humedecido para facilitar el desarrollo del hongo. La evaluación se llevó a cabo al eclosionar los huevos del testigo (5 días para *P. operculella* y 7 días para *S. tangolias*).

Los huevos que no eclosionaron se colocaron sobre las rodajas de papa durante 3 días para permitir su eclosión, posteriormente las porciones de papel que contenían huevos no eclosionados fueron colocadas nuevamente en cámara húmeda, para facilitar el crecimiento del micelio. Se efectuó un seguimiento de las larvas, lo que permitió detectar los efectos latentes de las exposiciones de huevos de *B. brongniartii* en la

mortalidad de larvas de primer estadio. Para ello las larvas pertenecientes a cada repetición fueron colocadas en rodajas de papa y evaluadas a los 7 días.

Se registró el número de huevos eclosionados, huevos no viables y el número de huevos que presentaron crecimiento del hongo en su superficie, número de larvas vivas, larvas muertas y larvas infectadas. Las larvas muertas fueron colocadas en cámaras húmedas para constatar la presencia del hongo. Se utilizó un diseño al azar. Los resultados de las variables evaluadas fueron analizados en número para lo cual fueron transformadas a raíz cuadrada \sqrt{x} , sometiéndolas a un análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de promedios mediante la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

3.6.2.2. Larvas de último estadio.

Para cada especie de polilla se evaluaron siete tratamientos: CL₅₀, CL₉₀ de las tres cepas y un testigo. Cada tratamiento constó de 60 larvas agrupadas en 6 repeticiones de 10 larvas de último estadio. La metodología utilizada fue similar al ensayo con larvas. La evaluación se llevó a cabo a los 5 días de instalado el ensayo para *P. operculella* y a los 7 días para *S. tangolias*, registrándose el número de larvas muertas las cuales fueron colocadas en cámara húmeda para permitir el desarrollo del micelio y comprobar su infección.

Se efectuó un seguimiento de las pupas formadas de las larvas tratadas para detectar los efectos latentes. Se registró el número de larvas vivas, larvas muertas, larvas infectadas, adultos emergidos, pupas no viables y pupas con micosis. Se utilizó un diseño al azar. Los resultados de las variables evaluadas fueron transformadas a \sqrt{x} y sometidas a un

análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de promedios mediante la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

3.6.2.3. Pupa.

Para cada especie de polilla se evaluaron siete tratamientos: CL₅₀, CL₉₀ de cada cepa y un testigo. Para cada tratamiento se realizaron 10 repeticiones de 10 pupas de tres días de edad cada una lo que hizo un total de 100 pupas por tratamiento. La evaluación se inició al emerger los adultos del testigo, siendo para *P. operculella* a los 3 días de instalado el ensayo y para *S. tangolias* a los 5 días. Se registró el número de adultos que emergen, pupas pasmadas y pupas infectadas.

Se utilizó un diseño al azar. Los resultados de las variables evaluadas fueron transformadas a \sqrt{x} y sometidas a un análisis de varianza (ANOVA) y a una comparación de promedios mediante la prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

También se evaluaron los adultos obtenidos de las pupas tratadas. Los adultos de cada tratamiento fueron colocados en vasos de oviposición en grupo de dos parejas evaluándose el número total de huevos depositados. Los cadáveres fueron colocados en cámara húmeda para verificar la presencia del hongo. Se evaluaron adultos sanos y adultos infectados. Se determinó el promedio de huevos por hembra proveniente de cada tratamiento.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de las cepas de *B. brongniartii*.

4.1.1. Caracterización morfológica de las cepas de *B. brongniartii*.

4.1.1.1. Morfología macroscópica.

En medio de cultivo APD y a 22°C, las tres cepas presentaron colonias de aspecto algodonoso con superficie semi-elevada y crecimiento moderado. Las colonias presentaron una amplia variación en el color del micelio, siendo blanco durante el crecimiento micelial tornándose crema al comenzar a producir conidias. Al comenzar a producir las conidias la cepa CIPCu1(44) conservó su aspecto algodonoso mientras que las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1) se tomaron pulverulentos con superficie aplanada (Figura 13 a).

La cepa CIPCa18(85) produjo un pigmento rojo que se difundió en el medio de cultivo, la cepa CIPH1(1) también produjo este pigmento pero no en todos los cultivos mientras que la cepa CIPCu1(44) produjo un pigmento amarillo que se difundió en el medio de cultivo (Figura 13 b). Solo la cepa CIPCu1(44) presentó sinemas (estructuras alargadas ramificadas) al ser reactivado en su hospedero original, durante su desarrollo en medio APD y en todos los tratamientos (Tabla 2).

4.1.1.2. Morfología microscópica.

Observaciones realizadas al microscopio permitieron diferenciar a las conidias de las tres cepas de acuerdo al tamaño y forma, separándolas en dos grupos: las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1) que presentaron

conidias elipsoidales, y otro grupo con la cepa CIPCu1(44) que presentó conidias redondas y pequeñas.

El promedio de largo y ancho de las conidias para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fue de 4.02 μm y 3.72 μm , 2.88 μm y 2.61 μm , 3.79 μm y 3.41 μm respectivamente. El índice L/A (proporción entre el largo y ancho de las conidias) fue de 1.09, 1.11 y 1.12 para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) respectivamente (Tabla 3).

Las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) presentaron células conidióforas propias de la especie *B. brongniartii*.

4.1.2. Caracterización fisiológica de las cepas de *B. brongniartii*.

4.1.2.1. Porcentaje de germinación (viabilidad).

Las tres cepas presentaron un alto porcentaje de germinación a las 24 horas, con valores de 99.07%, 99.74% y 95.40% para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) respectivamente, no encontrándose diferencias significativas ($P > 0.05$) por lo que las tres cepas fueron consideradas de buena calidad biológica (Tabla 4).

4.1.2.2. Producción de conidias (esporulación).

Las tres cepas presentaron una alta producción de conidias a los 15 días de sembrado, con valores mayores de 10^7 conidias/ml. El análisis de varianza (ANOVA) determinó diferencias altamente significativas para esta variable ($P < 0.01$). La cepa CIPH1(1) presentó el valor más alto, produciendo 2.1×10^8 conidias/ml en comparación con las cepas CIPCa18(85) y CIPCu1(44) las cuales produjeron 12.7×10^7 y 9.25×10^7 conidias/ml respectivamente (Tabla 5).

4.1.2.3. Crecimiento radial (tasa de crecimiento).

La línea de regresión obtenida con los valores de crecimiento radial diario indica que el crecimiento radial para las tres cepas a los 15 días de sembrados es directamente proporcional al tiempo (Figura 14). Las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) presentaron una tasa de crecimiento de 0.173 ± 0.005 cm/día, 0.183 ± 0.003 cm/día y 0.169 ± 0.003 cm/día respectivamente. Los límites de confianza de estos valores se traslapan, indicando que no hay diferencia significativa en el crecimiento radial de estas cepas (Tabla 6).

4.1.3. Caracterización molecular de las cepas de *B. brongniartii* mediante la técnica RAPD.

Mediante el cultivo en caldo papa dextrosa se obtuvieron entre 2 a 3 g de micelio filtrado para la cepa de *B. bassiana* y para cada una de las tres cepas de *B. brongniartii*. El protocolo de extracción de DNA utilizado permitió obtener una buena calidad de DNA con una concentración de 150 a 200 ng/ μ l. Para el caso de la cepa CIPH1(1), se presentaron 3 bandas adicionales, los cuales están relacionados con la presencia de micovirus (A. Schrank, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Universidad Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002, comunicación personal), sin embargo, estas bandas no interfirieron con la amplificación del DNA.

De los diez iniciadores utilizados, solo seis de ellos produjeron 175 bandas de las cuales 97 fueron polimórficas (Figura 15). Se obtuvo un dendograma que agrupó a la cepa de *B. bassiana* y a las tres cepas de *B. brongniartii* en dos grupos, el primer grupo conformado por las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1), con una similaridad del 62%, mientras que el segundo grupo estuvo conformado por las cepas CIPCu1(44) y CIPLM1 (*B. bassiana*), los cuales presentaron una similaridad del 50.4%. Ambos grupos presentaron un 42% de similaridad (Figura 16).

4.2. Evaluación de la actividad entomopatógena de las cepas de *B. brongniartii* sobre *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*.

4.2.1. Efecto de las cepas de *B. brongniartii* en larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias*.

4.2.1.1. Patogenicidad.

La aparición del micelio ocurre a partir de las 24 horas de la muerte del insecto al ser colocado en condiciones de alta humedad (Figura 17). Las tres cepas de *B. brongniartii* esporularon en los cadáveres de *P. operculella* y *S. tangolias*, adquiriendo un aspecto pulverulento, sin embargo, para el caso de la cepa CIPCu1(44), se observó además la formación de sinemas. La esporulación es un aspecto importante en la formulación de bioinsecticidas con potencial epizootico.

P. operculella. Todas las cepas fueron altamente patogénicas para este insecto con una concentración de 10^9 conidias/ml. Se obtuvo un porcentaje de mortalidad del 2% para el testigo, 100% para CIPCa18(85), 100% para CIPCu1(44) y 95% para CIPH1(1). El análisis de varianza para la variable mortalidad total muestra diferencias significativas ($P < 0.05$), sin embargo, debido a los altos porcentajes las tres cepas fueron utilizadas en ensayos posteriores. El testigo no presentó larvas con micosis mientras que las cepas CIPCa18(85), CIPH1(1) y CIPCu1(44) presentaron 91%, 86% y 74% de micosis respectivamente siendo este último valor significativamente diferente ($P < 0.05$) (Figura 18).

S. tangolias. El testigo presentó 4% de mortalidad mientras que las tres cepas causaron una mortalidad del 95% para cada uno, no presentando diferencias significativas ($P > 0.05$). Las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44)

y CIPH1(1) presentaron 91%, 85% y 93% de micosis respectivamente, valores que tampoco fueron significativos ($P>0.05$). Al no presentarse diferencias significativas en la mortalidad de las tres cepas de *B. brongniartii*, estas fueron utilizadas en ensayos posteriores (Figura 19).

4.2.1.2. Virulencia

P. operculella. Las concentraciones 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 conidias/ml de la cepa CIPCa18(85) superaron el 50% de mortalidad con un porcentaje de mortalidad acumulado de 96.67%, 96.67%, 60% y 53.33% respectivamente y cada concentración presentó un TL_{50} de 1.94, 2.93, 4.68 y 5.56 días respectivamente. El TL_{50} de la concentración 10^8 conidias/ml fue significativamente diferente a los demás TL_{50} debido a que sus límites de confianza no se traslapan con los otros (Tabla 7).

Para la cepa CIPCu1(44), solo las concentraciones 10^8 , 10^7 y 10^6 conidias/ml causaron mortalidades mayores al 50%, siendo el porcentaje de mortalidad de 98.33%, 98.33% y 61.67% para cada concentración respectivamente. Los TL_{50s} de cada concentración fueron significativamente diferentes entre sí con valores de 2.06, 3.9 y 5.67 días respectivamente, valores sin diferencias significativas debido a que sus límites de confianza no se traslapan (Tabla 8).

Las concentraciones 10^8 , 10^7 y 10^6 conidias/ml de la cepa CIPH1(1) causaron una mortalidad mayor al 50%, siendo los valores de las mortalidades acumuladas de 10%, 98.33% y 58.33% respectivamente. El TL_{50} obtenido con la concentración 10^8 conidias/ml fue de 1,45 días, siendo significativamente diferente a los demás valores de TL_{50} debido a que sus límites de confianza no se traslapan con los límites de las otras concentraciones (Tabla 9).

S. tangolias. Al igual que en el caso de *P. operculella*, el TL_{50} aumenta conforme aumenta la concentración. Las concentraciones 10^8 , 10^7 y 10^6 conidias/ml de la cepa CIPCa18(85) superaron el 50% de mortalidad presentando un TL_{50} de 2.54, 4.72 y 5.59 días respectivamente. Las mortalidades acumuladas para las concentraciones 10^8 , 10^7 y 10^6 conidias/ml fueron 96.67%, 68.33% y 58.33% respectivamente. La concentración 10^8 conidias/ml presentó el menor TL_{50} (2.54 días), siendo significativamente diferente a los TL_{50} de las demás concentraciones debido a que sus límites de confianza no se traslapan (Tabla 10).

Para la cepa CIPCu1(44), solo la concentración 10^8 conidias/ml superó el 50% de mortalidad, presentando un TL_{50} de 3.98 días (Tabla 11).

Con la cepa CIPH1(1), solo las concentraciones 10^8 y 10^7 conidias/ml superaron el 50% de mortalidad con un TL_{50} de 3.66 y 3.99 días respectivamente, valores que no presentaron diferencias significativas y una mortalidad acumulada de 81.67% y 71.67% respectivamente (Tabla 12).

4.2.1.3. Determinación de la CL_{50} y CL_{90} de las cepas de *B. brongniartii*.

P. operculella. El porcentaje de mortalidad aumentó conforme se incrementó la concentración. Los porcentajes de mortalidad total y larvas infectadas presentan diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) sin embargo, los tratamientos con 10^4 , 10^3 conidias/ml y el testigo presentaron un porcentaje de mortalidad y micosis sin diferencias significativas según el análisis Waller-Duncan ($P > 0.05$). (Tabla 13).

Los valores de las CL_{50} halladas para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron 2.71×10^5 , 5.53×10^5 y 5.19×10^5

conidias/ml, siendo la cepa CIPCa18(85) la que presentó la menor CL_{50} . Los límites de confianza se traslapan entre sí indicando que no existen diferencias significativas entre estos valores. Los valores para las CL_{90} halladas para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron 6.81×10^6 , 1.22×10^7 y 5.97×10^6 conidias/ml respectivamente, siendo la cepa CIPH1(1) la que presentó la menor CL_{90} . Los valores de las pendientes obtenidas para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron 0.92, 0.95 y 1.21 respectivamente (Tabla 14, Figura 20).

S. tangolias. Al igual que en el caso de *P. operculella*, el porcentaje de mortalidad total fue directamente proporcional a la concentración. Las variables mortalidad total y larvas infectadas presentaron valores altamente significativos ($P < 0.01$) sin embargo, los tratamientos con 10^4 , 10^3 conidias/ml y el testigo de la variable larvas infectadas no presentaron diferencias significativas entre ellos (Tabla 15).

Los resultados del análisis Probit muestran que las CL_{50} halladas para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron 1.16×10^6 , 9.37×10^6 y 4.52×10^6 y conidias/ml respectivamente mientras que las CL_{90} halladas para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron 6.01×10^7 , 1.46×10^9 y 2.17×10^8 conidias/ml respectivamente, siendo la cepa CIPCa18(85) la que presentó la menor CL_{90} . Los valores de las pendientes obtenidas para las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron 0.75, 0.58 y 0.76 respectivamente (Tabla 16, Figura 21).

4.2.1.4. Determinación del tiempo letal medio (TL_{50}) de las CL_{50} y CL_{90} de las cepas de *B. brongniartii*.

P. operculella. Tanto la CL_{50} como la CL_{90} causaron un efecto similar (Figura 22 y 23). Las CL_{50} de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) causaron una mortalidad total del 68.33%, 88.33% y 78.33%

respectivamente, mientras que las CL_{90} de las mismas cepas causaron una mortalidad total del 81.67%, 81.67% y 76.67% respectivamente. Comparando los porcentajes de mortalidad mediante la prueba de proporciones Z, la CL_{50} de la cepa CIPCa18(85) causó el menor porcentaje de mortalidad y fue significativamente diferente a los demás valores de mortalidad. Los valores de TL_{50} obtenidos para las CL_{50} de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron de 5.29, 3.58 y 5.07 días respectivamente. Los valores de los TL_{50} para las CL_{90} de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron de 3.94, 3.62 y 3.98 días respectivamente. Los límites de confianza se traslapan, indicando que no hay diferencias significativas entre todos los valores de TL_{50} (Tabla 17).

S. *tangolias*. Las CL_{50} de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) causaron una mortalidad total del 50%, 46.67% y 48.33% respectivamente, mientras que las CL_{90} causaron una mortalidad total de 76.67%, 81.67% y 50% respectivamente (Figura 24 y 25). Comparando los porcentajes de mortalidad mediante la prueba de proporciones Z, las CL_{90} de las cepas CIPCa18(85) y CIPCu1(44) causaron los mayores porcentajes de mortalidad y fueron significativamente diferentes a los demás porcentajes de mortalidad. Los valores de TL_{50} para las CL_{50} de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) fueron de 9.67, 10.57 y 9.26 días mientras que con las CL_{90} de cada cepa los TL_{50} fueron de 3.86, 3.43 y 8.68 días respectivamente. Los límites de confianza indican que los TL_{50} de las CL_{50} de las tres cepas no presentaron diferencias significativas, mientras que el TL_{50} de la CL_{90} de la cepa CIPH1(1) presentó diferencias significativas con el TL_{50} de las cepas CIPCa18(85) y CIPCu1(44), siendo el menor valor de TL_{50} (Tabla 18).

4.2.2. Efecto entomopatígeno de las cepas de *B. brongniartii* sobre los estados de desarrollo de *P. operculella* y *S. tangolias*.

4.2.2.1. Huevo.

P. operculella. La variables huevos no viables y larvas emergidas presentaron valores no significativos ($P>0.05$) mientras que la variable huevos infectados presentó valores altamente significativos ($P<0.01$) según el análisis de varianza (ANOVA), siendo el tratamiento con la CL₉₀ de la cepa CIPCu1(44) la que causó el mayor número de huevos infectados (6 huevos) siendo este valor significativamente diferente al testigo según la prueba de Dunnett. El testigo no presentó huevos infectados.

Las larvas emergidas de los huevos tratados fueron afectadas por las tres cepas. La variable larvas sanas fue altamente significativa ($P<0.01$), siendo el tratamiento con la CL₉₀ de la cepa CIPCu1(44) el que presentó el menor número de larvas sanas (52), valor que fue significativamente diferente al testigo. La variable larvas muertas presentó valores no significativos ($P>0.05$), sin embargo el tratamiento con la CL₉₀ de la cepa CIPCu1(44) provocó el mayor número de larvas muertas (21 larvas). La variable larvas infectadas fue altamente significativa ($P<0.01$), siendo el tratamiento con la CL₉₀ de la cepa CIPCu1(44) el que causó el mayor número de larvas infectadas (21) y fue significativamente diferente al testigo (Figura 26, Tabla 19).

S. tangolias. La variables larvas emergidas y huevos infectados presentaron valores altamente significativos ($P>0.01$), mientras que la variable huevos no viables sólo presentó valores significativos ($P<0.05$) según el análisis de varianza (ANOVA). El tratamiento con la CL₅₀ de la cepa CIPCu1(44) presentó 27 larvas emergidas y los tratamientos con

las CL₉₀ de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) presentaron 71, 1 y 43 larvas emergidas respectivamente, siendo estos valores significativamente diferentes al testigo según el análisis de Dunnett. El tratamiento con la CL₅₀ de la cepa CIPH1(1) presentó 53 huevos infectados, mientras que la CL₅₀ y CL₉₀ de la cepa CIPCu1(44) causó 52 y 99 huevos infectados, siendo todos estos valores significativamente diferentes al testigo según el análisis de Dunnett.

Las larvas emergidas de los huevos tratados fueron afectadas por las tres cepas. La variable larvas sanas fue altamente significativa ($P < 0.01$), siendo los tratamientos con las CL₉₀ de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) y los tratamientos con la CL₅₀ de la cepa CIPCu1(44) los que presentaron los valores significativamente diferentes al testigo según la prueba de Dunnett. El tratamiento con la CL₉₀ de la cepa CIPCu1(44) no presentó larvas sanas, ya que todos los huevos fueron infectados. La variable larvas infectadas fue altamente significativa ($P < 0.01$), siendo la CL₅₀ de las cepas CIPCa18(85), CIPCu1(44) y CIPH1(1) y la CL₉₀ de la cepa CIPCa18(85) las que presentaron los valores significativamente diferentes al testigo (24, 20, 14 y 45 larvas infectadas respectivamente) (Figura 27, Tabla 20).

4.2.2.2. Larvas de último estadio.

P. operculella. La variables larvas sanas, larvas muertas y larvas infectadas presentaron valores altamente significativos ($P < 0.01$) según el análisis de varianza (ANOVA). Los tratamientos con la CL₅₀ de la cepa CIPCu1(44) y con las CL₉₀ de las cepas CIPCa18(85) y CIPCu1(44) presentaron 30, 27 y 6 larvas sanas respectivamente, valores que fueron estadísticamente diferentes al testigo (Dunnett, $P < 0.05$). Los tratamientos con la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas CIPCa18(85) y CIPCu1(44) presentaron 12, 23, 26 y 35 larvas infectadas, valores que fueron

significativamente diferentes al testigo (Dunnett, $P<0.05$). El testigo no presentó larvas infectadas (Figura 28, Tabla 21).

Según el análisis de varianza (ANOVA), las pupas formadas a partir de las larvas tratadas presentaron valores de infección altamente significativos ($P<0.01$), siendo los tratamientos con la CL_{50} y CL_{90} de la cepa CIPH1(1) los que presentaron 4 pupas infectadas, valores significativamente diferentes al testigo (Dunnett, $P<0.05$). La variable adultos emergidos fue altamente significativa ($P<0.01$) siendo los tratamientos con la CL_{50} de la cepa CIPCu1(44) y la CL_{90} de las cepas CIPCa18(85) y CIPCu1(44) los que presentaron el menor número de adultos emergidos (20, 17 y 2 respectivamente), los cuales fueron significativamente diferentes al testigo (Dunnett, $P<0.05$).

S. tangolias. Según el análisis de varianza (ANOVA), las variables larvas sanas y larvas infectadas presentaron valores altamente significativos ($P<0.01$) mientras que la variable larvas muertas es significativa ($P<0.05$). El tratamiento con la CL_{50} de la cepa QPCa18(85) presentó 51 larvas sanas, valor sin diferencias con el testigo, mientras que los demás tratamientos con todas las cepas presentaron valores significativamente diferentes al testigo (Dunnett, $P<0.05$), siendo los tratamientos con las CL_{50} y CL_{90} de la cepa CIPCu1(44) los que presentaron el menor número de larvas sanas (2 y 3 larvas respectivamente). Para la variable larvas infectadas, sólo el tratamiento con la CL_{50} de la cepa CIPCa18(85) no presentó diferencias con el testigo, mientras que los demás tratamientos presentaron valores significativamente diferentes al testigo, siendo la CL_{50} y CL_{90} de la cepa CIPCu1(44) la que causó el mayor número de larvas infectadas (53 y 45 respectivamente) (Dunnett, $P<0.05$) (Tabla 22).

Las pupas formadas a partir de las larvas tratadas presentaron valores de infección que no fueron significativos ($P>0.05$). La variable adultos emergidos fue altamente significativa ($P<0.01$) siendo sólo el tratamiento con la CL₅₀ de la cepa CIPCa18(85) el que presentó 33 adultos emergidos, valor que no fue significativamente diferente con el testigo a diferencia de los demás tratamientos para todas las cepas que presentaron valores significativamente diferentes al testigo (Dunnnett, $P<0.05$). Con la CL₅₀ y CL₉₀ de la cepa CIPCu1(44) no se obtuvieron adultos ya que todos los insectos fueron afectados en el estado de larva (Figura 29).

4.2.2.3. Pupa.

P. operculella. La variable pupas infectadas no presentó valores significativos ($P>0.05$) según el análisis (ANOVA). Las variables adultos emergidos y pupas muertas presentaron valores altamente significativos ($P<0.01$), siendo los tratamientos con las CL₉₀ de las cepas CIPCa18(85) y CIPCu1(44) los que presentaron valores significativamente diferentes al testigo según el análisis de Dunnnett, presentando el menor número de adultos emergidos (84 y 76 respectivamente) así como el mayor número de pupas no viables (15 y 22 respectivamente) (Figura 30, Tabla 23).

El número de adultos infectados fue mínimo, siendo una variable no significativa ($P>0.05$).

El promedio de huevos por hembra para el testigo fue de 88.1 mientras que los tratamientos con las tres cepas presentaron promedios entre 56 y 99.5 huevos por hembra. El menor valor lo presentó el tratamiento con la CL₅₀ de la cepa CIPCa18(85) y el mayor valor el tratamiento con la CL₉₀ de la cepa CIPH1(1) (Tabla 23).

S. tangolias. Las variables adultos emergidos, pupas no viables y pupas infectadas presentaron valores altamente significativos ($P < 0.01$). Para la variable pupas infectadas, todos los tratamientos con todas las cepas en sus dos concentraciones causaron infección en las pupas, siendo el tratamiento con la CL_{90} de la cepa CIPCu1(44) la que presentó el mayor número de pupas infectadas (97). Todos estos valores fueron significativamente diferentes al testigo (Dunnett, $P < 0.05$). El número de adultos emergidos fue significativamente diferente al testigo, siendo sólo el tratamiento con la CL_{90} de la cepa CIPCu1(44) el que no presentó adultos emergidos.

Las variables adultos sanos y adultos infectados presentaron valores altamente significativos ($P < 0.01$). Sólo el tratamiento con la CL_{90} de la cepa CIPH1(1) presentó adultos infectados (8), siendo este valor significativamente diferente al testigo mientras que los demás tratamientos no presentaron adultos infectados o no se obtuvieron adultos (Figura 31).

El promedio de huevos por hembra para el testigo fue de 21.92 mientras que las hembras provenientes de los tratamientos con las CL_{50} de las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1) presentaron un promedio de 0.75 y 5.125 huevos por hembra respectivamente (Tabla 24). No se obtuvieron datos para el resto de concentraciones debido a que las pupas no fueron viables o no se obtuvieron hembras.

De acuerdo con la prueba de proporciones de Z para la comparación de promedios, las larvas de primer y cuarto estadio de *P. operculella* son los estados de desarrollo más susceptibles a la CL_{50} y CL_{90} de cada una de las tres cepas de *B. brongniartii* (Figura 32). En el caso de *S. tangolias*, todos los estados de desarrollo fueron susceptibles (Figura 33).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1. Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de las cepas de *B. brongniartii*.

5.1.1. Caracterización morfológica de las cepas de *B. brongniartii*.

Las características macroscópicas como aspecto, color, crecimiento, superficie y pigmentación en el medio de cultivo de cada cepa presentaron alta variabilidad, por lo que no pueden ser consideradas como únicos criterios para determinar la especie *B. brongniartii* al igual como lo señalan Varela y Morales (1996) al evaluar las variaciones morfológicas de *B. bassiana*. Las cepas CIPC18(85) y CIPH1(1) presentaron colonias características de *B. brongniartii*, mientras que la cepa CIPC1(44) mantuvo su aspecto algodonoso incluso al comenzar su etapa de producción de conidias. Esta cepa formó sinemas de la misma forma como lo reportaron Vélez y Benavides (1990) para *B. bassiana*. Dado que los sinemas son estructuras para la eficiente dispersión de las conidias (Samson y Evans citados por Vélez y Benavides, 1990) esta cepa aventajaría en campo a las otras dos.

Las cepas CIPC18(85) y CIPH1(1) causaron pigmentación roja en el medio de cultivo. Este pigmento podría ser oosporeína tal como lo sugieren Feng y Johnson (1990), Varela y Morales (1996) y Wraight *et al.* (1998) y ha sido reportado tanto para *B. bassiana* como para *B. brongniartii*.

Según Brady (1979b), las conidias de *B. brongniartii* son hialinas, lisas y elipsoidales a diferencia de *B. bassiana* que presenta conidias hialinas, lisas y globosas (1979a), siguiendo este criterio podría considerarse que la cepa CIPC1(44) es una variante de *B. brongniartii*. Las diferencias de tamaño

encontradas podrían deberse a la variabilidad genética de la cepa, tal como lo indican Varela y Morales (1996) quienes al evaluar seis cepas de *B. bassiana* utilizando estos criterios, las agruparon en tres grupos de acuerdo al tamaño de conidias y dos grupos de acuerdo a la forma de las conidias (globosa y elipsoidal).

Determinar diferencias entre las especies de *Beauveria* siempre ha sido difícil, por lo que Glare e Inwood (1998) sugieren que las conidias con 3 μm de largo y una proporción de largo/ancho (L/A) igual o mayor a 2 pertenecen a *B. brongniartii* y que las conidias con un largo menor de 3 μm y una proporción L/A menor de 2 pertenece a otras especies de *Beauveria*. Para el caso de las cepas estudiadas, las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1) poseen conidias con una longitud promedio mayor de 3 μm (4,02 y 3,79 μm respectivamente) a diferencia de la cepa CIPCu1(44) que presenta una longitud promedio de 2,88 μm . De acuerdo al índice L/A, las tres cepas presentaron un índice menor a 2 (1.09 para CIPCa18(85), 1.11 para CIPCu1(44) y 1.12 para CIPH1(1)). Glare e Inwood (1998), encontraron una excepción a esta regla para la cepa F196 que ellos estudiaron, caracterizándola como *B. brongniartii* a pesar del índice menor a 2, debido a que la longitud que presenta es mayor de 3 μm . Esta excepción podría aplicarse para el caso de las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1), que presentaron un índice L/A menor a 2 y un largo de 3 μm , lo que indicaría que se tratan de cepas de *B. brongniartii*, no así para el caso de la cepa CIPCu1(44), que posee un índice L/A menor de 2 y una largo de conidia menor de 3 μm . Estos resultados inducen a considerar que de acuerdo al criterio largo y ancho de conidia e índice L/A, las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1) son cepas típicas *B. brongniartii* y la cepa CIPCu1(44) es una variante de *B. brongniartii*.

La forma de las células conidióforas coincide con las observaciones realizadas por Brady (1979b) que las describe como células conidióforas solitarias o en pequeños grupos con la parte basal en forma subglobosa o con forma de botella.

5.1.2. Caracterización fisiológica de las cepas de *B. brongniartii*.

Ni el porcentaje de germinación ni el crecimiento radial permitieron establecer diferencias entre estas cepas. La producción de conidias entre las cepas estudiadas mostró diferencias significativas, resultados similares a los obtenidos por Vélez *et al.* (2000) quienes encontraron diferencias significativas de esta variable para *B. bassiana*. Esta observación permitió comparar el dendograma de variables moleculares con variables fisiológicas sin encontrarse relación entre ellas.

5.1.3. Caracterización molecular de las cepas de *B. brongniartii* mediante la técnica RAPD.

Driver y Milner (1998) mencionan que el género *Beauveria* posee una amplia diversidad genética entre las especies *B. bassiana* y *B. brongniartii* y que solo las técnicas moleculares pueden establecer diferencias entre cepas debido a que las características morfológicas como el tamaño de conidias no son confiables para establecer diferencias.

En este estudio, la cepa CIPCu1(44) se diferencia de las cepas CIPCu18(85) y CIPH1(1) por el tamaño y forma de la conidia, siendo estas características similares a las conidias de *B. bassiana*, las diferencias se refuerzan al realizar la caracterización molecular, ya que el dendograma agrupa a las cepas CIPCu1(44) y CIPLM1 en un solo grupo. Estos mismos resultados lo obtuvieron Glare e Inwood (1998), quienes utilizando el criterio tamaño de conidias y marcadores moleculares agruparon diversas cepas de *B. bassiana* y *B. brongniartii* en un solo grupo.

Al comparar la agrupación genética de las cepas con la patogenicidad no se encontró relación entre la agrupaciones y la patogenicidad, ya que la patogenicidad se encuentra gobernada por muchos genes por los que serían muchos los marcadores ligados a la patogenicidad siendo difícil su diferenciación, tal como lo menciona Valderrama *et al.* (2000).

5.2. Evaluación de la actividad entomopatógena de las cepas de *B. brongniartii* sobre *Phthorimaea operculella* y *Symmetrischema tangolias*.

5.2.1. Efecto de las cepas de *B. brongniartii* en larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias*.

La observación de que la invasión del hongo al hemocele produce una parálisis en el insecto explicaría la inmovilidad observada en las larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias*, produciéndose la muerte a partir del segundo día. Las larvas muertas se tornaron rígidas y presentaron una coloración roja en el hemocele coincidiendo con las descripciones de Ferron (1978) y Wraight *et al.* (1998), volviéndose opaca y con gotas de exudado que aparecieron en los sitios de emergencia de la hifa del hongo tal como lo señala Huamaní (1997) al evaluar larvas de *Spodoptera frugiperda* tratadas con *B. bassiana*.

Con la concentración 10^9 conidias/ml las cepas evaluadas causaron una patogenicidad inespecífica, es decir, sin relación con el hospedero de origen de las tres cepas (Coleoptera, Lepidoptera) coincidiendo con los resultados obtenidos por Jiménez (1992) y Gonzáles (1993).

La cepa CIPCa18(85) provocó mortalidades mayores al 50% en las larvas de *P. operculella* aun con la concentración 10^5 conidias/ml, además los TL_{50} de las concentraciones 10^7 , 10^6 y 10^5 conidias/ml no presentaron diferencias significativas entre sí lo que indicaría que la cepa CIPCa18(85) presenta una

virulencia estable aún con concentraciones menores debido a que ha sido reactivada en un lepidóptero (*S. tangolias*), es decir, su efectividad fue mayor al ser reactivada en un huésped susceptible del mismo orden, tal como lo reportan González *et al.* (1993).

La efectividad de las tres cepas disminuyó en *S. tangolias*, solo la cepa CIPC18(85) mantuvo su virulencia y patogenicidad hasta con la concentración 10^6 conidias/ml, reafirmando la idea de que su mayor agresividad se debió a que fue obtenida y reactivada de *S. tangolias*, tal como lo indican González *et al.* (1993). En cambio con la cepa CIPC1(44), se alcanzaron mortalidades mayores al 50% con la concentración 10^8 conidias/ml. Esto indicaría que la efectividad de las cepas disminuye en *S. tangolias*. Esto se debe probablemente a que la crianza masal de *P. operculella* se realizó con individuos provenientes de los campos de cultivo del CIP (La Molina, Lima) en donde su control se realiza mediante el uso de insecticidas y no con un hongo entomopatógeno, siendo más susceptible a la acción de *B. brongniartii*, necesitándose sólo concentraciones menores para causar mortalidades mayores al 50%.

En el caso de *P. operculella*, las altas concentraciones (10^8 y 10^7 conidias/ml) causaron alta mortalidad por lo que no se puede diferenciar entre estas cepas tal como sugieren Fuentes y Carballo (1995) debido a que estas concentraciones son altamente patogénicas. Probablemente las concentraciones menores de 10^7 conidias/ml permitirían diferenciar a las cepas y separarlas por su patogenicidad. Se puede asegurar que estas cepas a concentraciones 10^8 y 10^7 conidias/ml son efectivas y que se podría utilizar la menor concentración para obtener una alta mortalidad de larvas tal como lo mencionan Fuentes y Carballo (1995).

La cepa CIPCa18(85) presentó una mortalidad de 98,33% y una micosis de 90%, en cambio la cepa CIPH1(1) presentó una mortalidad del 100% pero una micosis de 76,67%. Aponte y Uribe (2001) indican la presencia de diferentes estrategias de virulencia, siendo deseable la estrategia donde se desarrolle un mayor crecimiento micelial del hongo dentro del hospedero aumentando las posibilidades de desarrollo de epizootias en el campo.

Cuando el hongo es utilizado en dosis bajas, la concentración de la oosporeína u otro antibiótico producido es menor, por lo que al morir la larva no presentó la coloración rojiza característica, siendo invadido por microorganismos oportunistas que no permitieron que el micelio se desarrolle, esto explicaría los bajos porcentajes de micosis para las concentraciones 10^4 y 10^3 conidias/ml, valores sin diferencias significativas con el testigo. Esta observaciones coinciden con Noma y Strickler (2000) quienes utilizaron una CL_{50} de una cepa de *B. bassiana* en adultos de *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae), no causando esporulación en los cadáveres de este insecto debido al crecimiento extensivo de hongos saprofiticos o bacterias los cuales inhiben el desarrollo de *B. bassiana*.

Las CL_{50} halladas para las tres cepas de *B. brongniartii* en *P. operculella* tuvieron valores entre 2.71×10^5 - 5.53×10^5 conidias/ml, siendo similar al obtenido por Alves *et. al.* (1985), quienes determinaron la CL_{50} de una cepa de *B. bassiana* en prepupas de *Diatrea saccharalis*, el cual fue de 1.27×10^5 conidias/ml, es decir que todos estos valores se encuentran en un rango de 10^5 conidias/ml. Fuentes y Carballo (1995) obtuvieron para la cepa 447 de *B. bassiana* una CL_{50} de 2.2×10^5 conidias/ml y una CL_{90} de 5.1×10^7 conidias/ml determinadas en *Plutella xylostella*, valores que se asemejan con los obtenidos para *P. operculella* en el presente trabajo. Los límites de confianza para las CL_{90} son amplios lo que sugiere inestabilidad de estas

concentraciones en cuanto a su real efectividad tal como lo señalan Aponte y Uribe (2001).

Loa valores de la CL_{50} para *S. tangolias* estuvieron entre 1.16×10^6 a 9.37×10^6 conidias/ml, valores similares a los obtenidos por Gonzáles *et al.* (1996) al evaluar la cepa 447 en *Ecdyolopha torticonis*, obteniendo una CL_{50} de 2.44×10^6 conidias/ml. Sin embargo, Aponte y Uribe (2001) evaluaron cepas de *B. bassiana* en *Spodoptera frugiperda* obteniendo las CL_{50} entre 9.5×10^6 a 1.1×10^8 conidias/ml, valores mayores a los obtenidos en el presente trabajo.

Los valores de las pendientes para ambas especies presentaron valores entre 0.75 a 1.21 a diferencia de los valores obtenidos por Gonzáles *et al.* (1996) que determinaron para las cepas 447 y A4 pendientes con valores de 4.33 y 3.13 respectivamente. En los ensayos con *S. tangolias*, las cepas CIPCa18(85) y CIPH1(1) fueron las más virulentas debido a que presentaron las mayores pendientes con valores similares entre ellas, sin embargo, la cepa CIPCa18(85) tuvo la menor CL_{50} , siendo la más efectiva para el control debido a que presentó las características deseadas en un entomopatógeno como la menor CL_{50} y virulencia alta determinada por la pendiente. Los límites de confianza para las CL_{90} también fueron amplios lo que sugiere inestabilidad de estas concentraciones (Aponte y Uribe, 2001).

S. tangolias presentó CL_{50} en un rango de 10^6 conidias/ml a diferencia de *P. operculella* que presentó sus CL_{50} en un rango de 10^5 conidias/ml. Esto podría deberse a que este insecto proviene de lugares donde se acostumbra a utilizar *B. brongniartii* para el control del “gorgojo de los Andes”, además el módulo de crianza de *S. tangolias* que se mantiene en el CIP es constantemente renovado con polillas provenientes de Huancayo.

Para las larvas del primer estadio de *P. operculella* las CL_{50} de las tres cepas de *B. brongniartii* presentaron valores de TL_{50} similares (entre 3 a 5 días) a diferencia de los obtenidos para *S. tangolias* que presentó un rango de 9-10 días, es decir que se necesitó mayor tiempo para que el hongo provocara un 50% de mortalidad en *S. tangolias*. Esto demostraría que *P. operculella* fue más susceptible que *S. tangolias* debido a que su muerte ocurrió en menor tiempo.

Para ambas especies, la mortalidad se incrementó al aumentar los días alcanzando solo hasta el 50% para el caso de las CL_{50} y solo hasta el 90% para el caso de las CL_{90} . Este comportamiento es típico de un hongo ya que las conidias se desecan o son expulsadas mediante la muda (Vandenberg *et al.*, 1998), es decir, el producto pierde efectividad en el transcurso del tiempo o es expulsado del cuerpo del insecto por medio de los mecanismos de defensa del insecto.

5.2.2. Efecto entomopatígeno de las cepas de *B. brongniartii* sobre los estados de desarrollo de *P. operculella* y *S. tangolias*.

El estado de huevo en ambas especies presenta una corta duración, debido a esto la enfermedad se manifiesta posteriormente en larvas de primer estadio, coincidiendo con las observaciones de Fargues (1973), citado por Zúñiga y Rodolfi (1981). Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos con *P. operculella* ya que las cepas de *B. brongniartii* provocaron un efecto mínimo sobre los huevos y larvas de *P. operculella* emergidas de los huevos tratados. Este efecto también podría estar relacionado con las barreras físicas propias del corión que impidió la colonización del embrión (Ramos *et al.*, 2000).

Utilizando 12.8×10^6 conidias/ml de *B. bassiana*, Zúñiga y Redolfi (1981) obtuvieron un 71.55% de larvas infectadas emergidas de huevos tratados de *Spodoptera frugiperda*, el cual fue un porcentaje alto a diferencia de los

resultados obtenidos para *S. tangolias* que fue de hasta 45% (45 larvas infectadas). Los altos niveles de micosis en huevos de *S. tangolias* se debería a que la superficie esculpida del corión del huevo da lugar a una mayor superficie de acción para el hongo favoreciendo la infección, es decir, mayor área de adherencia para mayor cantidad de conidias, presentándose una alta micosis (Figura 34). La mortalidad de las larvas emergidas estaría causada por la ingestión de esporas frescas que se encuentran entre las ornamentaciones del corión que ofrecerían condiciones favorables para la germinación de la conidia (Fargues, 1984).

El comportamiento de la larva próxima a la formación del estado de pupa cambia, presentando menor movimiento y dejando de alimentarse. Tal vez con estas condiciones, la susceptibilidad del insecto hacia agentes patógenos se incrementa (Figura 35). En ensayos con larvas de primer, segundo, tercer y cuarto estadio de *P. xylostella*, Vandenberg *et al.* (1998) observaron que las larvas de tercer y cuarto estadio fueron más susceptibles a *B. bassiana* que las larvas de segundo estadio coincidiendo con Feng *et al.* (1985) citado por Vandenberg *et al.* (1998) quienes indicaron que esta susceptibilidad se debería probablemente a que los últimos estadios presentan mayor duración y retienen su cutícula por mayor tiempo permitiendo que el patógeno posea mayor tiempo para establecerse e iniciar la infección.

Altre y Vandenberg (2001) encontraron que la cepa 1576 de *Paecilomyces fumosoroseus*, el cual en numerosos ensayos era la menos virulenta, se comportó como la más patogénica y la más virulenta cuando fue inyectado en larvas de último estadio de *Spodoptera frugiperda*, Penland *et al.* (1995) citado por Altre y Vandenberg (2001) hipotetizan que este efecto se debía a la disminución de la función de los hemocitos en el estado de prepupa.

Además, el testigo y todos los tratamientos presentaron una alta mortalidad debido a la contaminación por bacterias ya que las larvas utilizadas para los bioensayos fueron recuperadas directamente de los tubérculos infestados, aumentando las posibilidades de contaminación. Esas observaciones coinciden con Zúñiga y Redolfi (1981) quienes indican que esta muerte por contaminación no se presenta en larvas de primer estadio ya que los huevos son colectados directamente en discos de papel filtro nuevo, permitiendo disminuir la contaminación.

En general las pupas poseen reservas alimenticias acumuladas durante su período de larva, lo que constituiría una fuente de nutrientes para el desarrollo del hongo causando la infección. Las pupas de *S. tangolias* presentaron mayor cantidad de individuos infectados por *B. brongniartii* que las pupas de *P. operculella*. Esta susceptibilidad podría deberse a la duración del estado pupal de *S. tangolias* que permitiría la penetración del hongo a la cámara pupal hasta llegar al insecto y colonizar el hemocele. Para el caso de *P. operculella* la duración del estado pupal fue menor resultando en una baja infección (entre 1 a 2%) emergiendo el insecto adulto sin haber sido infectado. Esta emergencia fue mayor a la obtenida por Hafez *et al.* (1997), quienes utilizando *B. bassiana* con una concentración de 2.6×10^7 conidias/ml obtuvieron un porcentaje de emergencia de 53.3%.

El desarrollo del hongo se inició en la parte posterior de la pupa, invadiendo las estrías abdominales. El crecimiento del micelio se observó en las suturas, regiones intersegmentales y espiráculos (Figura 36), detalles que también fueron observados por Zúñiga y Redolfi (1981) y Huamaní (1997) en pupas de *S. frugiperda*.

El estado adulto presentó porcentajes de infección muy bajos para ambos insectos debido a la presencia de escamas que los protege de la infección a

diferencia de las larvas cuya cutícula es más delgada y frágil. Los adultos infectados presentaron micelio en la cabeza y en las patas delanteras (Figura 37), lo que indicaría que adquirieron la infección durante la emergencia, al colocar sus patas delanteras en la cámara pupal, incluso, algunos adultos ya formados no lograron emerger completamente de la cámara pupal ya que presentaban las alas atrofiadas y micosis coincidiendo con las observaciones de Zúñiga y Redolfi (1981) quienes durante sus ensayos con *S. frugiperda*, observaron que algunas pupas fueron atacadas a la altura de las tecas alares, emergiendo los adultos con las alas atrofiadas.

La oviposición de *S. tangolias* fue menor al testigo, la mayor duración del estado pupal en *S. tangolias* permitió que el hongo invada al insecto y se desarrolle causando mayor efecto en los adultos ya sea produciéndoles micosis antes de salir completamente de la cámara pupal o debilitándolas, comprobándose este efecto durante la oviposición. En el caso del *P. operculella*, el estado de pupa tuvo menor duración por lo que no hubo efecto en la oviposición.

Tanto para *P. operculella* como para *S. tangolias*, cada vaso de oviposición presentó variaciones en la producción de huevos. Esto podría deberse a la deficiencia de nutrientes ya que los adultos no fueron alimentados. Similares observaciones fueron realizadas por Noma y Strickler (2000) quienes encontraron una alta variabilidad en la oviposición de cada individuo de *Lygus hesperus* sugiriendo que si bien la utilización de dietas enriquecidas podrían incrementar la fecundidad de *L. hesperus*, alterarían los resultados de sus experimentos.

En general, todos los estados de desarrollo de ambos insectos fueron susceptibles al ataque del hongo, pero en diferente grado, siendo el estado de larva el estado más susceptible coincidiendo con lo que indica Ferron (1978).



Caracterización de tres cepas de *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch y su virulencia en *Phthorimaea operculella* (Zeller) y *Symmetrischema tangolias* (Gyen). Vargas Flores, Melisa E Iisée

Derechos reservados conforme a Ley

Para el caso de *P. operculella*, los valores de las CL₅₀ de las tres cepas se encontraban en un rango de 10⁵ conidias/ml y los valores de las CL₉₀ se encontraban en un rango de 10⁶ a 10⁷ conidias/ml resultando en una baja infección en los estados de huevo y pupa y en una mayor susceptibilidad en larvas de primer y cuarto estadio, mientras que para *S. tangolias* los valores de las CL₅₀ de las tres cepas se encontraron en un rango de 10⁶ conidias/ml y los valores de las CL₉₀ entre 10⁸ a 10⁹ conidias/ml resultando en una mayor susceptibilidad en todos los estados de desarrollo.

CONCLUSIONES

- La forma, tamaño de las conidias y la formación de sinemas de la cepa CIPCu1(44) difiere de la especie *B. brongniartii* tipo.
- El análisis molecular permite establecer que la cepa CIPCu1(44) está genéticamente más relacionada con la cepa CIPLM1 de *B. bassiana*.
- Con la concentración 10^9 conidias/ml, las tres cepas de *B. brongniartii* fueron altamente patogénicas en larvas de primer estadio de *P. operculella* y *S. tangolias*.
- La cepa CIPCa18(85) fue la más efectiva ya que causó mortalidades mayores al 50% aún con 10^5 conidias/ml.
- Las larvas de *P. operculella* fueron las más susceptibles a *B. brongniartii* debido a que los valores de las CL_{50} y CL_{90} fueron menores.
- La cepa CIPCa18(85) fue más efectiva para ambas especie debido a que presentó el menor valor de CL_{50} , indicando que tiene buena actividad bioinsecticida.
- Las larvas de *P. operculella* fueron las más susceptibles a *B. brongniartii* ya que sus TL_{50} fueron menores.
- Todos los estados de desarrollo de *P. operculella* y *S. tangolias* fueron afectados por las tres cepas de *B. brongniartii* siendo el estado larval el más susceptible.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la cepa CIPCa18(85) en condiciones de invernadero para determinar su efectividad.
- Realizar una caracterización molecular de mayor cantidad de cepas de *B. brongniartii* con el fin de encontrar una relación entre las agrupaciones genéticas, patogenicidad, origen geográfico y hospedero de origen.
- Utilizar la técnica molecular (RNAr) u otra técnica para separar completamente la cepa CIPCu1(44) *B. brongniartii* de CIPLM1 *B. bassiana*.
- Evaluar la actividad entomopatógena de la cepa CIPH1(1) y de otras cepas para determinar si la presencia de micovirus afecta en la virulencia del hongo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÁZAR, J; PALACIOS, M. y RAMAN, K. (1982) *Symmetrischema plaesiosema* (Turner, 1919), Nuevo problema de la papa en el Valle del Mantaro. *Convención Nacional de Entomología. Resúmenes*. Huaraz, Perú. 23pp.

ALCÁZAR, J; RAMAN, K. V; TORRES, H. y YABAR; E. (1990) *Beauveria* spp. hongo amigo del agricultor. *Revista Medio Ambiente* (Lima, Perú) 45: 44-46.

ALJANABI, S. M. y MARTINEZ, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Research*. 25: 4692-4693.

ALTRE, J. A. y VANDENBERG, J. D. (2001) Comparison of blastospores of two *Paecilomyces fumosoroseus* isolates: *In vitro* traits and virulence when injected into fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 78: 170-175.

ALVES, S; DE MOURA, L; MILWARD, E. y DE ALMEIDA, L. (1985) Controle da broca da cana-de-açúcar pelo uso de *Beauveria bassiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 20(4): 403-406.

APONTE, L. y URIBE, D. (2001) Actividad insecticida de aislamientos nativos de *Beauveria* spp. y *Metarhizium* spp., contra larvas de II instar de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidade). *Revista Colombiana de Entomología*. 27(1-2): 67-72.

AVIS, T. J; HAMELIN, R. C. y BELANGER, R. (2001) SYMPOSIUM: Approaches to molecular characterization of fungal biocontrol agents: some case studies. *Can. J. Plant Pathol*. 23: 8-11.

BARNETT, H. L. y HUNTER, B. (1998) *Illustrate Genera of Imperfect Fungi*. 4ta Edición. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota (USA). 217pp.

BARTNICKI-GARCIA, S. (1984) Spore Germination in fungi: Basic concepts. In: Roberts, D; Aist J (Eds) *Infection Proceses of Fungi*. A Bellagio Conference, March 21 – 25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. pp. 111-117.

BORROR, D, LONG, D. y TRIPLEHORN, C. (1981) *An Introduction to the study of insects*. 5ta ed. Saunders College Publishing. USA. 827pp.

BOUCIAS, D. G. y PENDLAND, J. C. (1984) Host Recognition and Specificity of Entomopathogenic Fungi. In: Roberts, D; Aist J (Eds) *Infection Proceses of Fungi*. A Bellagio Conference, March 21–25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. pp. 185-196.

BRADY, B. L. K. (1979a) *Beauveria bassiana*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute. England. N° 602.

BRADY, B. L. K. (1979b) *Beauveria brongniartii*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute. England. N° 603.

CALVACHE, H. (1982) Generalidades sobre la polilla de la papa *Symmetrischema plaesiosema* (Turner). *Instituto Colombiano Agropecuario (ICA)*. 16(1): 10-13.

CIP. (1980) *La polilla de la papa*. Informe Anual del Centro Internacional de la Papa. Lima Perú. pp. 45-48.

CIP. (1983) Control de la palomilla de la papa con feromona. *Circular del Centro Internacional de la Papa (CIP)*. Lima, Perú. 1(1): 1-6.

CIP. (1988) Manejo Integrado de Plagas de la papa en países del Tercer Mundo. *Circular del Centro Internacional de la Papa (CIP)*. Lima, Perú. 16(1): 1-12.

CISNEROS, F. (1995) *Control de Plagas Agrícolas*. 2da Edición. Lima, Perú. 313pp.

DE BACH, P. (1985) Control de las plagas de insectos y malas hierbas. 12da Edición. Ed Continental. Mexico. 949pp.

DRIVER, F. y MILNER, R. J. (1998) *PCR Applications to the Taxonomy of Entomopathogenic Fungi*. En: BRIDGE, P. D; ARORA, D. K; REDDY, C. A; ELANDER, R. P. (Ed) *Applications of PCR in Mycology*. CAB INTERNATIONAL. USA. pp. 153-186.

DUNN, P. (1986) *Biochemical aspects of insect immunology*. Annual Review of Entomology. 31: 321-339.

EWELL, P; FANO, H; RAMAN, K; ALCÁZAR, J; PALACIOS, M. y CARHUAMACA, J. (1994) Manejo de Plagas de la Papa por los Agricultores en el Perú. *Centro Internacional de la Papa (CIP)*. Lima, Perú. 72pp.

FARGUES, J. (1984) Adhesion of the fungal spore to the insect cuticle in relation to pathogenicity. In: Roberts, D; Aist J (Eds) *Infection Proceses of Fungi*. A Bellagio Conference, March 21–25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. pp. 90-110.

FENG, M. y JOHNSON, J. (1990). Relative virulence of six isolates of *Beauveria bassiana* on *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology*. 19(3): 785-790.

FERREIRA, M. E. y GRATTAPAGLIA, D. (1998) *Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético* 1 ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia, D.F. Brasil. 220pp.

FERRON, P. (1978) Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi. *Annual Review of Entomology*. 23: 409-442.

FRENCH, E. y HEBERT, T. (1982). *Métodos de Investigación fitopatológica*. 1ra Edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 290pp.

FUENTES, G. y CARBALLO, M. (1995) Evaluación de aislados de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill, para el control de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Iponomeutidae). *Manejo Integrado de Plagas*. 35: 14-18.

GARCIA, G. y CARBALLO, M. (1995) Evaluación de aislados de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en el control de *Hyalymenus tarsatus* (Hemiptera: Alydidae) en macadamia. *Manejo Integrado de Plagas*. 36: 7-11.

GINDIN, G; GESCHTOVT, N. U; RACCAH, B. y BARASH, I. (2000) Pathogenicity of *Verticillium lecanii* to Different developmental stages of the Silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Phytoparasitica*. 28: 229-239.

GLARE, T. y INWOOD, A. (1998) Morfological and genetic characterisation of *Beauveria* spp. From New Zealand. *Mycological Research*. 102(2): 250-256.

GONZALES, H; CARBALLO, M. y BLANCO, H. (1996) Efecto de tres cepas de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill sobre la mortalidad de *Ecdytolopha torticornis* (Meyrick) (Lep: Tortricidae) en macadamia. *Manejo Integrado de Plagas*. 40: 17-23.

GONZALES, M; POSADA, F. y BUSTILLO, A. (1993) Bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre la broca de café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Revista Colombiana de Entomología*. 19(4): 123-130.

GONZALES, M; VALENCIA, A. y BUSTILLO, A. (2001) Incremento de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*, utilizando integumento del insecto en medio de cultivo. *Manejo Integrado de Plagas*. 60: 31-35.

HAFEZ, M; ZAKI, F. N; MOURSY, A. y SABBOUR, M. (1997) Biological effects of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* on the potato tuber moth *Phthorimaea operculella*. *Anz. Schadlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz* 70: 158-159.

HAJEK, H. A. y St. LEGER, R. J. (1994) Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.

HODGES, R. W. y OSMARK, V. (1990) Nomenclature of some neotropical gelechiidae (Lepidoptera). *Proc. Entomol. Soc. Wash* (92)1: 76-85.

HUAMANI, D. (1997) Evaluación de la patogenicidad del hongo *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) "cogollero del maíz" y su efecto en *Podisus connexivus* (Bergroth) "chinche depredador". Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. 84pp.

JIMÉNEZ, J. (1992) Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. *CENICAFE* 43(3): 84-98.

KERSHAW, M. J; MOORHOUSE, E. R; BATEMAN, R; REYNOLDS, S. E. y CHARNLEY, A. K. (1999) The role of destruxin in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insects. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74: 213-223.

KUNO, G; MULETT, J. y DE HERNÁNDEZ, A. (1981) *Patología de insectos con énfasis en las enfermedades infecciosas y sus aplicaciones en el control biológico*. Universidad del Valle, Cali, Colombia. 75pp.

LACEY, L. (1997) *Manual of Techniques in Insect Pathology*. Biological Techniques Series. Academic Press. California (USA). 409pp.

LUZ, C; TIGANO, M; SILVA, I; CORDEIRO, C. y ALJANABI, S. (1998) Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memoria do Instituto Oswaldo Cruz*. 93(6): 839-846.

MANIANIA, N. K. y FARGUES, J. (1985) Susceptibility of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, to the fungal pathogens *Paecilomyces fumosoroseus* and *Nomuraea rileyi*. *Florida Entomologist*, 68(1): 178-183.

Mc LEOD, D. (1954) Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. *Canadian Journal of Botany*. 32(6): 818-890.

MONZÓN, A. (2001) Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*. 63: 95-103.

NOMA, T. y SRTICKLER, K. (2000) Effects of *Beauveria bassiana* on *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) feeding and oviposition. *Environmental Entomology*. 29(2): 394-402.

OJEDA, P. D. y CASTRO, A. (1972) Introducción al estudio de los gelechidos en el Norte del Perú. *Revista Peruana de Entomología*. 15(1): 125-131.

PALACIOS, M. (2001) La Polilla de la papa. En: *Curso Taller "Manejo Integrado de Plagas (MIP) en el Cultivo de la papa"*. 7 - 18 Mayo. CIP. Lima, Perú. 3pp.

PALACIOS, M; TENORIO, J; VERA, M; ZEVALLOS, F. y LAGNAOUI, A. (1999) Population Dynamics of the Andean Potato Moth, *Symmetrischema tangolias* (Gyen), in Three Different Agro-ecosystems in Perú. En: *Program Report 1997-1998* International Potato Center (CIP).Lima, Perú. 458pp.

PELCZAR, M; REID, R. y CHAN, E. (1982) *Microbiología*. McGraw-Hill. 2da Ed. Mexico. 826pp.

PLATTI, P; CRAVANZOLA, F; BRIDGE, P. y OZINO, O. I. (1998) Molecular characterization of *Beauveria brongniartii* isolates obtained from *Melolontha melolontha* in Valle d'Aosta (Italy) by RAPD-PCR. *Letters in Applied Microbiology*. 26: 317-324.

RAMAN, K. (1980) La polilla de la papa. *Boletín de Información Técnica* 3. Centro Internacional de la papa. Lima, Perú. 14pp.

RAMOS, E; ALVES, S; TANZINI, M. y LOPES, R. (2000) Susceptibilidad de *Bemisia tabaci* a *Beauveria bassiana* en condiciones de laboratorio. *Manejo Integrado de Plagas*. 56: 65-69.

ROBERTS, D. y HUMBER, R. (1984) Entomopathogenic Fungi. In: Roberts, D; Aist J (Eds) *Infection Proceses of Fungi*. A Bellagio Conference, March 21 – 25, 1983. The Rockefeller Foundation. New York. pp. 1-12.



SÁNCHEZ, V. G. y AQUINO, C. (1986) La polilla de la papa *Symmetrischema plaesiosema* (Turner). *Boletín Técnico*. Año V. N° 1. Instituto Nacional de Investigación y Promoción Agropecuaria. Lima, Perú. 21pp.

SÁNCHEZ, V. G. y VERGARA, C. C. (1991) *Plagas del cultivo de la papa*. Universidad nacional Agraria la Molina. Departamento de Entomología. Lima, Perú. 158pp.

SAS Institute Inc., SAS/STAT® User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Volumen 1, Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989. 943pp.

SOCIETY FOR INVERTEBRATE PATHOLOGY (SIP). (1999) Fungi. <http://www.sipweb.org/directorymcp/fungi.html>.

TENORIO, J. (1996) Biología, comportamiento y control de las polillas de la papa *Symmetrischema tangolias* (Gyen) y *Phthorimaea operculella* (Zeller) en Cajamarca. Tesis para optar el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 111pp.

TORRES, H; ORTEGA, A; ALCÁZAR, J; AMES, T. y PALOMINO, L. (1993) Control Biológico del Gorgojo de los Andes (*Premnotrypes* spp.) con *Beauveria brongniartii*. *Guía de Investigación CIP & Centro Internacional de la Papa (CIP)*. Lima, Perú. 43pp.

VALDERRAMA, M. A; CRISTANCHO, M. y CHAVES, B. (2000) Análisis de la variabilidad genética del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* con marcadores RAPD. *Revista Colombiana de Entomología*. 26(1-2): 25-29.

VANDENBERG, J; RAMOS, M. y ALTRE, J. (1998) Dose-Response and Age- and temperature-related susceptibility of the Diamondback moth (Lepidoptera:

Plutellidae) to two isolates of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliaceae). *Environmental Entomology*. 27(4): 1017-1021.

VARELA, A. y MORALES, E. (1996) Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 67: 147-152.

VELÉZ, A. P. y BENAVIDES, G. (1990) Registro e identificación de *Beauveria bassiana* en *Hypothenemus hampei* en Ancuya, Departamento de Nariño, Colombia. *CENICAFE* 41(2): 50-57.

VÉLEZ, A. P; GONZÁLES, M; VALDERRAMA, A; ESTRADA, M; BUSTILLO, A. y MONTOYA, E. (2000) Caracterización morfológica, fisiológica y molecular de aislamientos de *Beauveria bassiana*. *CENICAFE*. 51(3): 196-206.

WRAIGHT, S. P; CARRUTHERS, R. I; BRADLEY, C. A; JARONSKI, S. T; LACEY, L. A; WOOD, P. y GALAINI-WRAIGHT, S. (1998) Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces* spp. and *Beauveria bassiana* against the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 217-226.

WEISING, K; NYBOM, H; WOLF, K. y MEYER, W. (1995) *DNA fingerprinting in plants and fungi*. Ed CRC. USA. 322pp.

ZÚÑIGA, D. y REDOLFI, I. (1981) Infección de *Beauveria bassiana* (Bals) (Deuteromycetes: Moniliales) sobre *Spodoptera frugiperda* (Smith) en laboratorio. *Revista Peruana de Entomología*. 24(1): 103-106.

ANEXOS

MEDIOS DE CULTIVO

Para propagar el hongo *B. brongniartii* se emplearon dos medios de cultivo que de acuerdo a su consistencia son los siguientes:

Caldo papa dextrosa (CPD). Este medio se utilizó para la propagación del hongo por agitación, obteniéndose el micelio con el cual se realizaron las pruebas moleculares. Se cortan papas en trozos y se colocan en una olla con agua, dejándolos cocinar. Luego se colecta el líquido hervido y se filtra a través de algodón con gasa tomándose ½ litro del líquido en un matraz, finalmente se agrega 10 gr de dextrosa. Se coloca un tapón de algodón y se lleva al autoclave a 121°C por 20 minutos a 15 libras de presión. Al enfriar se le agrega 0.5 gr de estreptomicina para evitar que el medio se contamine con bacterias.

Agar papa dextrosa (APD). Este medio de cultivo fue utilizado para la propagación del hongo y la obtención de las conidias que fueron utilizadas en los bioensayos. Se cortan papas en trozos colocándolos en una olla y se deja cocinar. Luego se colecta el líquido a través de un algodón con gasa. El líquido filtrado se coloca en un matraz. Por cada litro se agregan 20 gr de agar y 20 gr de dextrosa. Se coloca un tapón de algodón y se lleva al autoclave a 121°C por 20 minutos a 15 libras de presión. Finalmente el medio es repartido en las placas de Petri en una cámara de flujo.

C. PREPARACIÓN DE REACTIVOS.

Azul de lactofenol.

Para 100 ml

Fenol 20 gr

Ácido láctico 20 ml

Glicerol 40 ml

Cotton blue 0.05 g

D. PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA RAPD

Protocolo de extracción (Aljanabi y Martínez, 1997)

Buffer de extracción:

0.4M NaCl

10mM Tris-HCl pH 8.0

2 mM EDTA pH 8.0

SDS 20%

Proteinaza K 20 mg/ml

NaCl 6M (NaCl saturado en agua)

Etanol 70%.

Buffer Tris-borato;

Tris borato 108 gr

Ácido bórico 55 gr

EDTA 0.5M pH 8.0 40 ml

Diluir en un litro de agua destilada

TABLA 1. Origen de las cepas de *Beauveria* utilizadas en los diferentes ensayos.

Código	Cepa	Fecha de colecta	Procedencia	Hospedero
CIPCa18(85)	<i>Beauveria brongniartii</i> .	Junio 1996	Santa Clotilde, Cajamarca. Perú.	<i>Symmetrischema tangolias</i> (Lepidoptera), larva
CIPCu1(44)	<i>Beauveria brongniartii</i> .	30 Octubre 1995	Cuzco. Perú.	<i>Premnotrypes latithorax</i> (Coleoptera), adulto.
CIPH1(1)	<i>Beauveria brongniartii</i> .	1 Agosto 1994	Huancayo. Perú.	<i>Premnotrypes suturicallus</i> (Coleoptera), larva.
CIPLM1 *	<i>Beauveria bassiana</i> .	15 Noviembre 2001	La Molina, Lima, Perú.	<i>Euscepes postfasciatus</i> (Coleoptera), Adulto.

* Esta cepa fue utilizada en las pruebas moleculares (RAPD) para compararla con las cepas de *B. brongniartii*.

TABLA 2. Morfología macroscópica de tres cepas de *Beauveria brongniartii* sembradas en medio APD a 22°C.

Cepa	Color	Aspecto	Superficie	Pigmento difundido en el medio	Formación de sinemas
CIPCa18(85)	Blanco	Algodonoso	Semi-elevada	Rojo	No
CIPCu1(44)	Blanco	Algodonoso	Semi-elevada	Amarillo	Si *
CIPH1(1)	Blanco	Algodonoso	Semi-elevada	Rojo	No

* La formación de sinemas es característica de *Beauveria bassiana*.

TABLA 3. Promedio de longitud, ancho e índice largo/ancho (L/A) de las conidias de las cepas de *B. brongniartii* cultivadas en medio APD a 22°C (n = 50).

Cepas	Longitud (µm)		Ancho (µm)		Índice L/A	
	$\xi \pm DE$	Rango	$\xi \pm DE$	Rango	$\xi \pm DE$	Rango
CIPCa18(85)	4,02 ± 0,65	2,88-6,24	3,72 ± 0,63	2,88-5,76	1,09 ± 0,13	1,00-1,67
CIPCu1(44)	2,88 ± 0,29	2,40-3,36	2,61 ± 0,38	1,92-3,84	1,11 ± 0,12	1,00-1,50
CIPH1(1)	3,79 ± 0,45	4,80-2,88	3,41 ± 0,53	2,40-4,80	1,12 ± 0,11	1,00-1,40

DE = desviación estándar

TABLA 4. Porcentaje de germinación de las cepas de *B. brongniartii* sembradas en medio APD y evaluadas a las 24 horas de incubación.

Cepa	% Germinación	DE	Rango
CIPCa18(85)	99,07 A	0.54	(100 - 98.0)
CIPCu1(44)	99.74 A	0.29	(99.0 - 100)
CIPH1(1)	95,40 A	0.90	(94.0 - 97.0)

AVOVA ($P > 0.05$)

DE = desviación estándar

TABLA 5. Producción de conidias de las cepas de *B. brongniartii* sembradas en medio APD y mantenidas a 22°C durante 15 días.

Cepas	\bar{x} (10^7 con/ml)		DE (10^7 con/ml)	Rango (10^7 con/ml)
CIPCa18(85)	12,7	B	2,21	[10,1 - 14,6]
CIPCu1(44)	9,25	B	4,93	[5,64 - 16,5]
CIPH1(1)	21,0	A	1,91	[19,0 - 23,6]

Valores con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba DLS ($P < 0.05$)

DE = desviación estándar

TABLA 6. Análisis de la regresión del crecimiento radial (cm/día) de las cepas de *B. brongniartii* sembradas en APD (22°C) y evaluadas durante 15 días.

Cepa	Intercepto \pm DE	Límite de confianza (95%)	Tasa de crecimiento \pm DE	Límite de confianza (95%)	R ²
CIPCa18(85)	0.490 \pm 0.039	0.402 \pm 0.579	0.173 \pm 0.005	0.162 \pm 0.183	0.9932
CIPCu1(44)	0.374 \pm 0.025	0.307 \pm 0.412	0.183 \pm 0.003	0.179 \pm 0.192	0.9972
CIPH1(1)	0.317 \pm 0.029	0.238 \pm 0.365	0.169 \pm 0.003	0.165 \pm 0.178	0.9958

Valores sin diferencias significativas debido al no traslape de los límites de confianza.
DE = desviación estándar

TABLA 7. Análisis Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de seis concentraciones *B. brongniartii* cepa CIPCa18(85) determinado en larvas de primer estadio de *P. operculella*.

Concentración	n	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀		Límites de confianza (95%)	χ ²
10 ⁸	60	-3.09 ± 0.45	10.68 ± 1.15	1.95	A	1.77-2.12	86.22
10 ⁷	60	-8.71 ± 2.51	18.66 ± 5.01	2.93	B	2.23-3.47	13.87
10 ⁶	60	-3.84 ± 0.97	5.72 ± 1.45	4.68	B	3.44-7.07	15.52
10 ⁵	60	-4.63 ± 1.04	6.22 ± 1.50	5.56	B	4.42-8.54	17.12
10 ⁴	60	-3.29 ± 0.49	1.93 ± 0.73	50.57	C	16.98-59420	7.02
10 ³	60	-5.15 ± 1.10	2.38 ± 1.59	144.39	D	-	2.24

* TL₅₀ con la misma letra son iguales entre sí según el traslape de los límites de confianza.
DE = desviación estándar

TABLA 8. Análisis Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de seis concentraciones *B. brongniartii* cepa CIPCu1(44) determinado en larvas de primer estadio de *P. operculella*.

Concentración	n	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀		Límites de confianza (95%)	χ ²
10 ⁸	60	-4.01 ± 1.29	12.80 ± 3.35	2.06	A	1.37-2.58	14.60
10 ⁷	60	-8.13 ± 1.29	13.73 ± 2.06	3.91	B	3.45-4.34	44.35
10 ⁶	60	-4.75 ± 1.10	6.31 ± 1.59	5.67	C	4.49-9.14	15.79
10 ⁵	60	-4.51 ± 0.62	4.42 ± 0.87	10.49	C	8.21-17.48	25.69
10 ⁴	60	-5.90 ± 1.03	5.09 ± 1.39	14.39	C	9.87-46.55	13.45
10 ³	60	-23.38 ± 8.36	25.32 ± 10.07	8.38	C	7.53-18.29	6.32

* TL₅₀ con la misma letra son iguales entre sí según el traslape de los límites de confianza.
DE = desviación estándar

TABLA 9. Análisis Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de seis concentraciones *B. brongniartii* cepa CIPH1(1) determinado en larvas de primer estadio de *P. operculella*.

Concentración	n	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀		Límites de confianza (95%)	χ ²
10 ⁸	60	-2.08 ± 0.39	12.92 ± 1.50	1.45	A	1.31-1.59	73.91
10 ⁷	60	-7.09 ± 1.55	12.21 ± 2.48	3.81	B	3.09-4.48	24.26
10 ⁶	60	-6.80 ± 0.80	8.81 ± 1.11	5.91	C	5.52-6.44	63.44
10 ⁵	60	-4.26 ± 0.59	3.89 ± 0.84	12.38	D	9.03-25.68	21.28
10 ⁴	60	-6.14 ± 1.18	4.92 ± 1.59	17.63	D	10.75-146.54	9.52
10 ³	60	-6.78 ± 1.62	4.87 ± 2.19	24.76	D	11.73-2030388	4.95

* TL₅₀ con la misma letra son iguales entre sí según el traslape de los límites de confianza.
DE = desviación estándar

TABLA 10. Análisis Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de seis concentraciones *B. brongniartii* cepa CIPCa18(85) determinado en larvas de primer estadio de *S. tangolias*.

Concentración	n	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀		Límites de confianza (95%)	χ ²
10 ⁸	60	-4.50 ± 0.98	11.14 ± 2.03	2.54	A	2.00-3.01	29.97
10 ⁷	60	-4.99 ± 0.90	7.41 ± 1.33	4.72	B	3.96-5.72	31.08
10 ⁶	60	-5.58 ± 0.64	7.47 ± 0.91	5.59	B	5.17-6.13	67.47
10 ⁵	60	-3.59 ± 0.51	2.84 ± 0.74	18.41	C	11.04-82.13	14.79
10 ⁴	60	-5.21 ± 0.96	3.55 ± 1.35	29.37	C	13.30-5255	6.95
10 ³	60	-8.93 ± 2.24	7.96 ± 2.88	13.25	C	9.24-99.46	7.61

* TL₅₀ con la misma letra son iguales entre sí según el traslape de los límites de confianza.
DE = desviación estándar

TABLA 11. Análisis Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de seis concentraciones *B. brongniartii* cepa CIPCu1(44) determinado en larvas de primer estadio de *S. tangolias*.

Concentración	n	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀		Límites de confianza (95%)	χ ²
10 ⁸	60	-4.16 ± 0.46	6.94 ± 0.72	3.98	A	3.66-4.31	94.25
10 ⁷	60	-6.69 ± 0.89	7.75 ± 1.20	7.31	B	6.59-8.61	41.42
10 ⁶	60	-6.13 ± 0.91	6.29 ± 1.23	9.40	B	7.83-13.67	26.19
10 ⁵	60	-11.08 ± 2.63	11.09 ± 3.31	9.98	B	8.19-20.15	11.19
10 ⁴	60	-9.33 ± 2.95	7.63 ± 3.80	16.69	B	9.71-2.6 x 10 ²⁰	4.03
10 ³	60	-10.43 ± 4.67	7.93 ± 5.99	20.68	B	-	1.72

* TL₅₀ con la misma letra son iguales entre sí según el traslape de los límites de confianza.
DE = desviación estándar

TABLA 12. Análisis Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de seis concentraciones *B. brongniartii* cepa CIPH1(1) determinado en larvas de primer estadio de *S. tangolias*.

Concentración	n	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀		Límites de confianza (95%)	χ ²
10 ⁸	60	-4.51 ± 0.77	8.00 ± 1.24	3.66	A	3.03-4.27	41.46
10 ⁷	60	-4.10 ± 1.03	6.82 ± 1.61	3.99	A	2.87-5.30	17.98
10 ⁶	60	-4.10 ± 0.53	4.32 ± 0.76	8.92	B	7.30-12.88	32.28
10 ⁵	60	-5.14 ± 0.83	4.32 ± 1.14	15.41	B	10.24-52.04	14.38
10 ⁴	60	-7.35 ± 1.62	6.17 ± 2.14	15.54	B	10.01-139.59	8.32
10 ³	60	-5.00 ± 0.99	2.69 ± 1.14	72.48	B	-	3.62

- TL₅₀ con la misma letra son iguales entre sí según el traslape de los límites de confianza.
DE = desviación estándar

TABLA 13. Porcentaje de mortalidad total y larvas infectadas causada por las cepas de *B. brongniartii* en larvas de primer estadio de *P. operculella*.

Tratamiento	Mortalidad total (%)			Larvas infectadas (%)			Mortalidad corregida (%)		
	CIPCa18(85)	CIPCu1(44)	CIPH1(1)	CIPCa18(85)	CIPCu1(44)	CIPH1(1)	CIPCa18(85)	CIPCu1(44)	CIPH1(1)
10 ⁸	98.33 a	98.33 a	100.00 a	90.00 b	96.67 a	76.67 a	98.15	98.15	100.00
10 ⁷	98.33 a	93.33 a	98.33 a	98.33 a	83.33 b	85.00 a	98.15	92.59	98.15
10 ⁶	60.00 b	61.67 b	58.33 b	55.00 c	53.33 c	48.33 b	55.56	57.41	53.70
10 ⁵	53.33 b	26.67 c	28.33 c	50.00 c	11.67 d	18.33 c	48.15	18.52	20.37
10 ⁴	15.00 c	15.00 cd	13.33 d	3.33 de	0.00 e	5.00 d	5.56	5.56	3.70
10 ³	3.33 de	11.67 cd	5.00 d	1.67 d	1.67 e	1.67 d	-7.41	1.85	-5.56
Testigo	10.00 cd	10.00 d	10.00 d	0.00 d	0.00 e	0.00 d			

Valores con la misma letra no son significativos según el análisis de Waller-Duncan ($P < 0.05$)

TABLA 15. Porcentaje de mortalidad total y larvas infectadas causada por las cepas de *B. brongniartii* en larvas de primer estadio de *S. tangolias*.

Tratamiento	Mortalidad total (%)			Larvas infectadas (%)			Mortalidad corregida (%)		
	Conidias/ml	CIPCa18(85)	CIPCu1(44)	CIPH1(1)	CIPCa18(85)	CIPCu1(44)	CIPH1(1)	CIPCa18(85)	CIPCu1(44)
10 ⁸	96.67 a	78.33 a	81.67 a	90.00 a	78.33 a	66.67 a	96.43	77.97	80.36
10 ⁷	68.33 b	41.67 b	71.67 a	65.00 b	38.33 b	71.67 a	66.07	40.68	69.64
10 ⁶	58.33 b	31.67 bc	31.67 b	50.00 c	20.00 c	26.67 b	55.36	30.51	26.79
10 ⁵	25.00 c	16.67 c	16.67 c	11.67 d	13.33 c	5.00 c	19.64	15.25	10.71
10 ⁴	11.67 d	5.00 d	8.33 cd	3.33 e	1.67 d	0.00 d	5.36	3.39	1.79
10 ³	8.33 d	1.67 d	5.00 d	0.00 e	0.00 d	0.00 d	1.79	0.00	-1.79
Testigo	1.67 e	1.67 d	1.67 d	0.00 e	0.00 d	0.00 d			

Valores con la misma letra no son significativos según el análisis de Waller-Duncan ($P < 0.05$)

TABLA 14. Análisis de probit de la mortalidad obtenida en los bioensayos utilizando las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de *Phthorimaea operculella*.

Cepa	Intercepto \pm DE	Pendiente \pm DE	n	χ^2	P	CL ₅₀ (x 10 ⁵ con/ml)	LC 95% (x 10 ⁵ con/ml)	CL ₉₀ (x 10 ⁶ con/ml)	LC 95% (x 10 ⁶ con/ml)
CIPCa18(85)	-4.97 \pm 1.14	0.92 \pm 0.20	360	20.53	<0.001	2.71	0.19-22.96	6.81	1.05-13446
CIPCu1(44)	-5.48 \pm 0.53	0.95 \pm 0.09	360	109.93	<0.001	5.53	2.70-11.53	12.21	4.86-49.69
CIPH1(1)	-6.90 \pm 0.93	1.21 \pm 0.16	360	55.91	<0.001	5.19	2.01-13.82	5.97	2.05-52.83

Valores sin diferencias significativas debido al traslape de los límites de confianza

n = número de larvas evaluadas

DE = desviación estándar

LC = límites de confianza

TABLA 16. Análisis de probit de la mortalidad obtenida en los bioensayos utilizando las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de *Symmetrischema tangolias*..

Cepa	Intercepto \pm DE	Pendiente \pm DE	n	χ^2	P	CL ₅₀ (x 10 ⁶ con/ml)	LC 95% (x 10 ⁶ con/ml)	CL ₉₀ (x 10 ⁸ con/ml)	LC 95% (x 10 ⁸ con/ml)
CIPCa18(85)	-4.53 \pm 0.49	0.75 \pm 0.08	360	85.12	<0.001	1.16	0.46-3.08	0.60	0.17-4.99
CIPCu1(44)	-4.07 \pm 0.50	0.58 \pm 0.08	360	57.01	<0.001	9.37	2.81-55.10	14.59	1.71-1950
CIPH1(1)	-5.07 \pm 0.39	0.76 \pm 0.06	360	166.01	<0.001	4.52	3.00-6.96	2.17	1.08-5.34

Valores sin diferencias significativas debido al traslape de los límites de confianza

n = número de larvas evaluadas

DE = desviación estándar

LC = límites de confianza

TABLA 17. Análisis de Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* determinado en larvas de primer estadio de *P. operculella*.

Cepa	Tratamiento	n	Mortalidad (%)	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀	L. C. 95%	X ²
CIPCa18(85)	CL ₅₀	60	68.33 *	-2.81 ± 0.53	3.88 ± 0.66	5.29	4.12-6.57	34.91
CIPCu1(44)	CL ₅₀	60	88.33	-3.37 ± 0.74	6.08 ± 1.03	3.58	2.66-4.40	34.51
CIPH1(1)	CL ₅₀	60	78.33	-4.03 ± 0.73	5.72 ± 0.91	5.07	4.08-6.03	39.34
CIPCa18(85)	CL ₉₀	60	81.67	-2.97 ± 0.67	4.99 ± 0.89	3.94	2.83-4.94	31.01
CIPCu1(44)	CL ₉₀	60	81.67	-2.58 ± 0.69	4.61 ± 0.93	3.62	2.36-4.74	24.42
CIPH1(1)	CL ₉₀	60	76.67	-2.27 ± 0.47	3.78 ± 0.61	3.98	2.93-4.98	37.91

* Menor valor y significativamente diferente según la prueba de proporciones Z

** TL₅₀ con diferencias significativas según el traslape de los límites de confianza

n = número de larvas evaluadas

DE = desviación estándar

L.C. = límites de confianza

TABLA 18. Análisis de Probit del tiempo letal medio (TL₅₀) de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* determinado en larvas de primer estadio de *S. tangolias*.

Cepa	Tratamiento	n	Mortalidad (%)	Intercepto ± DE	Pendiente ± DE	TL ₅₀	L. C. 95%	χ ²
CIPCa18(85)	CL ₅₀	60	50.00	-3.71 ± 0.36	3.77 ± 0.41	9.67	8.64-11.15	83.40
CIPCu1(44)	CL ₅₀	60	46.67	-3.45 ± 0.34	3.36 ± 0.39	10.57	9.26-12.65	72.33
CIPH1(1)	CL ₅₀	60	48.33	-3.03 ± 0.45	3.14 ± 0.53	9.26	7.54-12.69	35.00
CIPCa18(85)	CL ₉₀	60	76.67 *	-2.19 ± 0.51	3.73 ± 0.66	3.86	2.69-4.93	31.84
CIPCu1(44)	CL ₉₀	60	81.67 *	-2.18 ± 0.44	4.08 ± 0.59	3.43	2.57-4.21	48.35
CIPH1(1)	CL ₉₀	60	50.00	-3.04 ± 0.55	3.24 ± 0.64	8.68 **	6.87-12.49	25.71

* Valores mayores, sin diferencias significativas entre sí y con diferencias significativas con los demás valores según la prueba de proporciones Z

** TL₅₀ con diferencias significativas según el traslape de los límites de confianza.

n = número de larvas evaluadas

DE = desviación estándar

L.C. = límites de confianza

TABLA 19. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre huevos de *P. operculella* y su efecto posterior sobre las larvas emergidas.

Cepa	Tratamiento	Huevos tratados ^a			Larvas emergidas ^b		
		N° larvas emergidas	N° huevos no viables ^c	N° huevos infectados	N° larvas sanas	N° larvas muertas ^c	N° larvas infectadas
CI P Ca18(85)	CL ₅₀	97	3	0	90	6	1
	CL ₉₀	98	1	1	93	5	0
CIP Cu1(44)	CL ₅₀	97	0	3	74	17	6
	CL ₉₀	94	0	6 ***	52 ***	21	21 ***
CIP H1(1)	CL ₅₀	96	3	1	81	14	1
	CL ₉₀	98	2	0	84	11	3
	Testigo	98	2	0	89	9	0
C.V		2.66	25.34	22.74	8.89	37.29	34.42
ANOVA (<i>P</i> 0.05)		ns	ns	s	s	ns	s

ns = no significativo.

s = significativo.

*** valor significativamente diferente. Prueba de Dunnett $P < 0.05$.

^a número inicial de huevos tratados 100.

^b larvas emergidas a partir del número inicial de huevos tratados.

^c huevos no viables y larvas muertas por otras causas.

TABLA 20. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre huevos de *S. tangolias* y su efecto posterior sobre las larvas emergidas.

Cepa	Tratamiento	Huevos tratados ^a			Larvas emergidas ^b		
		N° larvas emergidas	N° huevos no viables ^c	N° huevos infectados	N° larvas sanas	N° larvas muertas ^c	N° larvas infectadas
CIP Ca18(85)	CL ₅₀	95	1	4	70	1	24 ***
	CL ₉₀	71 ***	15 ***	14	15 ***	11	45 ***
CIP Cu1(44)	CL ₅₀	27 ***	15	52 ***	2 ***	5	20 ***
	CL ₉₀	1 ***	0	99 ***	0 ***	1	0
CIP H1(1)	CL ₅₀	98	2	0	89	5	4
	CL ₉₀	43 ***	4	53 ***	22 ***	7	14 ***
	Testigo	99	1	0	91	8	0
C.V		16.69	45.66	32.11	16.87	37.82	34.92
ANOVA (<i>P</i> <0.05)		s	s	s	s	ns	s

ns = no significativo.

s = significativo.

*** valor significativamente diferente. Prueba de Dunnett *P* < 0.05.

^a número inicial de huevos tratados 100.

^b larvas emergidas a partir del número inicial de huevos tratados.

^c huevos no viables y larvas muertas por otras causas.

TABLA 21. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de último estadio de *P. operculella* y su efecto posterior sobre pupas formadas.

Cepa	Tratamiento	Larvas tratadas ^a			Pupas formadas ^b		
		N° larvas Sanas	N° larvas muertas ^c	N° larvas infectadas	N° adultos emergidos	N° pupas no viables ^c	N° pupas infectadas
CIP Ca18(85)	CL ₅₀	41	7	12 ***	31	10	0
	CL ₉₀	27 ***	7	26 ***	17 ***	10	0
CIP Cu1(44)	CL ₅₀	30 ***	7	23 ***	20 ***	10	0
	CL ₉₀	6 ***	19	35 ***	2 ***	4	0
CIP H1(1)	CL ₅₀	35	17	8	23	8	4 ***
	CL ₉₀	54	2	4	43	7	4 ***
	Testigo	49	11	0	39	10	0
C.V		14.96	35.09	23.29	20.74	35.91	21.60
ANOVA ($P < 0.05$)		s	s	s	s	ns	s

ns = no significativo.

s = significativo.

*** valor significativamente diferente. Prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

^a número inicial de larvas tratadas 60.

^b pupas formadas a partir del número de larvas sobrevivientes al tratamiento.

^c larvas muertas y pupas no viables por otras causas.

TABLA 22. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de último estadio de *S. tangolias* y su efecto posterior sobre pupas formadas.

Cepa	Tratamiento	Larvas tratadas ^a			Pupas formadas ^b		
		Nº larvas sanas	Nº larvas muertas ^c	Nº larvas infectadas	Nº adultos emergidos	Nº pupas no viables ^c	Nº pupas infectadas
CIP Ca18(85)	CL ₅₀	51	8	1	33	18 ***	0
	CL ₉₀	14 ***	16 ***	30 ***	3 ***	11	0
CIP Cu1(44)	CL ₅₀	2 ***	5	53 ***	0 ***	2	0
	CL ₉₀	3 ***	12	45 ***	0 ***	1	2
CIP H1(1)	CL ₅₀	29 ***	11	20 ***	25 ***	4	0
	CL ₉₀	26 ***	20 ***	14 ***	11 ***	14	1
	Testigo	57	3	0	51	6	0
C.V		21.31	32.09	25.59	24.52	30.78	17.31
ANOVA (<i>P</i> <0.05)		s	s	s	s	s	ns

ns = no significativo.

s = significativo.

*** valor significativamente diferente. Prueba de Dunnett (*P*<0.05).

^a número inicial de larvas tratadas 60.

^b pupas formadas a partir del número de larvas sobrevivientes al tratamiento.

^c larvas muertas y pupas no viables por otras causas.

TABLA 23. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre pupas de *P. operculella* y su efecto posterior sobre los adultos emergidos.

Cepa	Tratamiento	Pupas tratadas ^a			Adultos emergidos ^b		
		N° adultos emergidos	N° pupas no viables ^c	N° pupas infectadas	N° adultos sanos	N° adultos infectados	promedio de huevos/hembra
CIP Ca18(85)	CL ₅₀	98	2	0	97	1	56
	CL ₉₀	84 ***	15 ***	1	84 ***	0	90.5
CIP Cu1(44)	CL ₅₀	96	4	0	95	1	85
	CL ₉₀	76 ***	22 ***	2	75 ***	1	60.4
CIP H1(1)	CL ₅₀	96	3	1	96	0	85.5
	CL ₉₀	88	12	0	88	0	99.5
	Testigo	97	3	0	97	0	88.1
C.V		5.22	31.72	16.32	5.54	14.69	
ANOVA (<i>P</i> <0.05)		s	s	ns	s	ns	

ns = no significativo.

s = significativo.

*** valor significativamente diferente. Prueba de Dunnett (*P*< 0.05).

^a número inicial de pupas tratadas = 100.

^b adultos emergidos a partir del número de pupas viables.

^c pupas no viables por otras causas.

TABLA 24. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre pupas de *S. tangolias* y su efecto posterior sobre los adultos emergidos.

Cepa	Tratamiento	Pupas tratadas ^a			Adultos emergidos ^b		
		N° adultos Emergidos	N° pupas no viables ^c	N° pupas infectadas	N° adultos sanos	N° adultos infectados	promedio de huevos/hembra
CIP Ca18(85)	CL ₅₀	40 ***	11	49 ***	40 ***	0	0.75
	CL ₉₀	4 ***	6	90 ***	4 ***	0	0
CIP Cu1(44)	CL ₅₀	6 ***	2	92 ***	6 ***	0	0
	CL ₉₀	0 ***	3	97 ***	0 ***	0	0
CIP H1(1)	CL ₅₀	44 ***	15	41 ***	36 ***	8 ***	5.125
	CL ₉₀	2 ***	31 ***	67 ***	2 ***	0	0
	Testigo	94	6	0	94	0	21.92
C.V		19.62	28.93	10.37	22.59	17.67	
ANOVA ($P < 0.05$)		s	s	s	s	s	

ns = no significativo.

s = significativo.

*** valor significativamente diferente. Prueba de Dunnett ($P < 0.05$).

^a número inicial de pupas tratadas = 100.

^b adultos emergidos a partir del número de pupas viables.

^c pupas no viables por otras causas.

Consultar en formato impreso a partir de la fig.1 hasta el 13

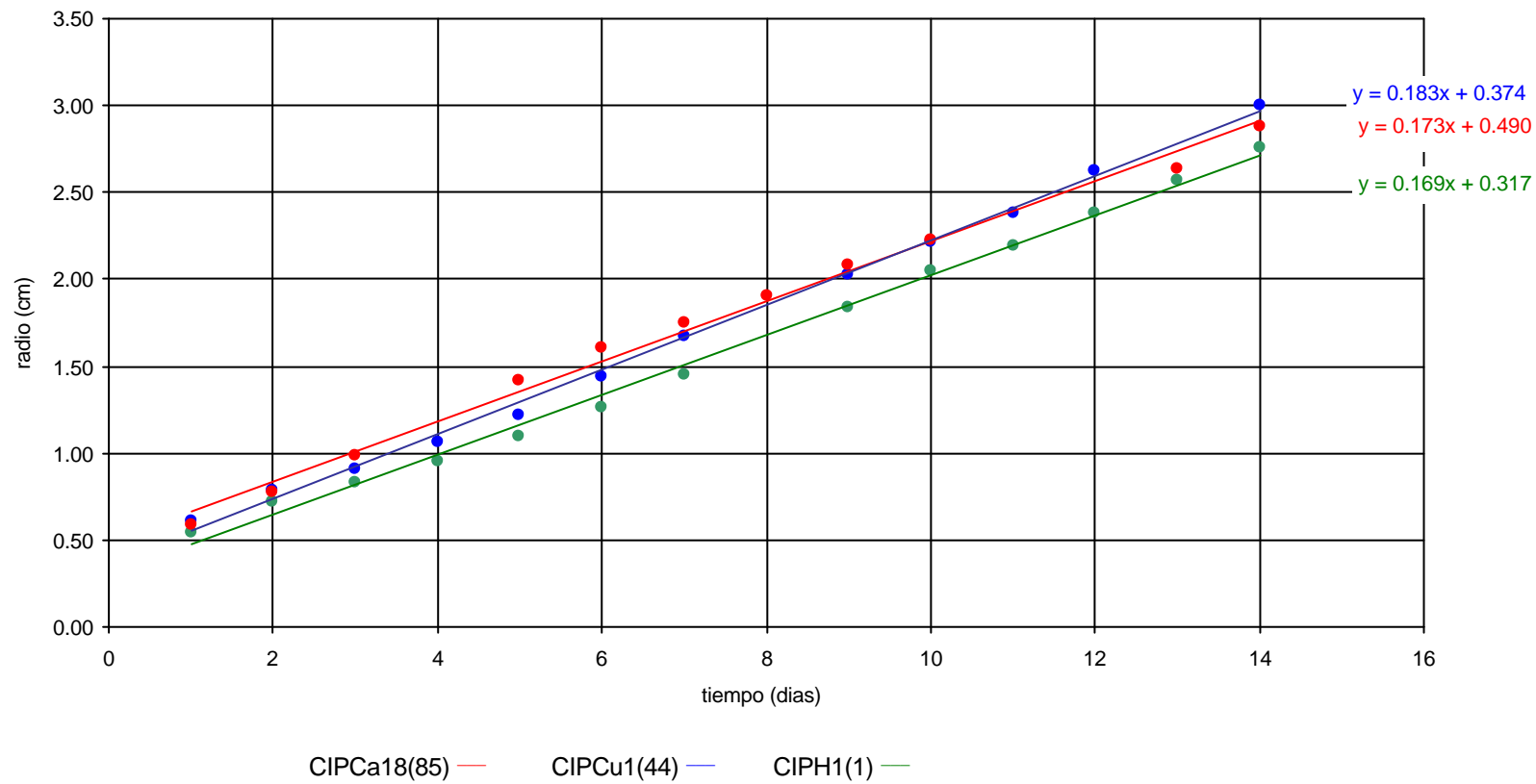


FIGURA 14. Análisis de regresión del crecimiento radial (cm/día) de las cepas de *B. brongniartii* sembradas en APD (22°C) y evaluadas durante 15 días.

Consultar en formato impreso la fig.15 hasta el 17

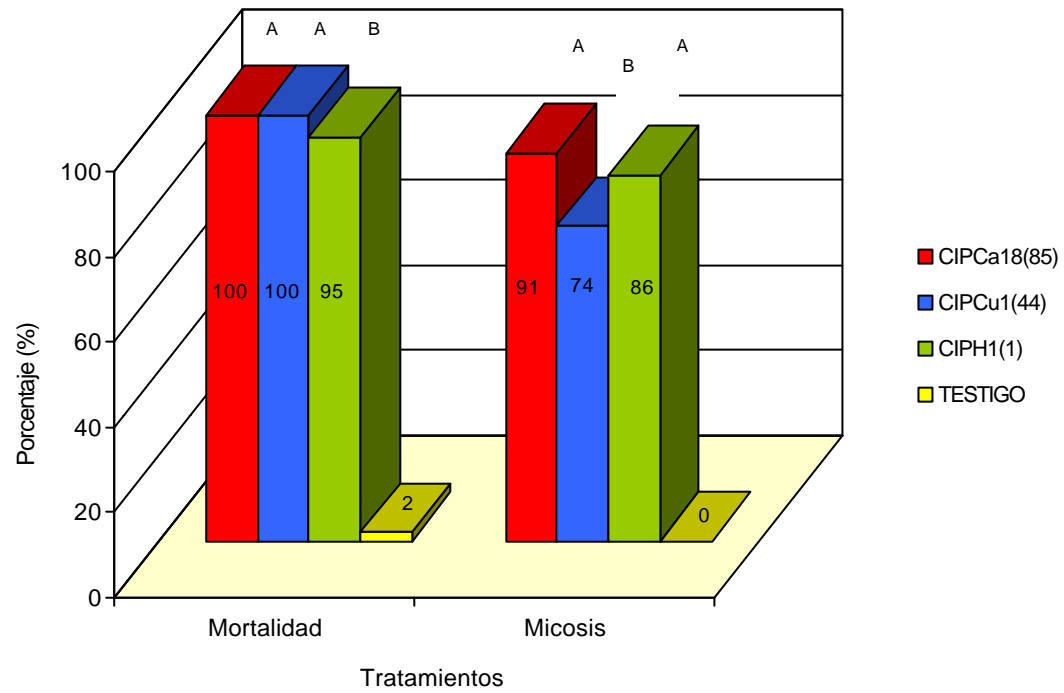


FIGURA 18. Prueba de patogenicidad con las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de primer estadio de *P. operculella*.

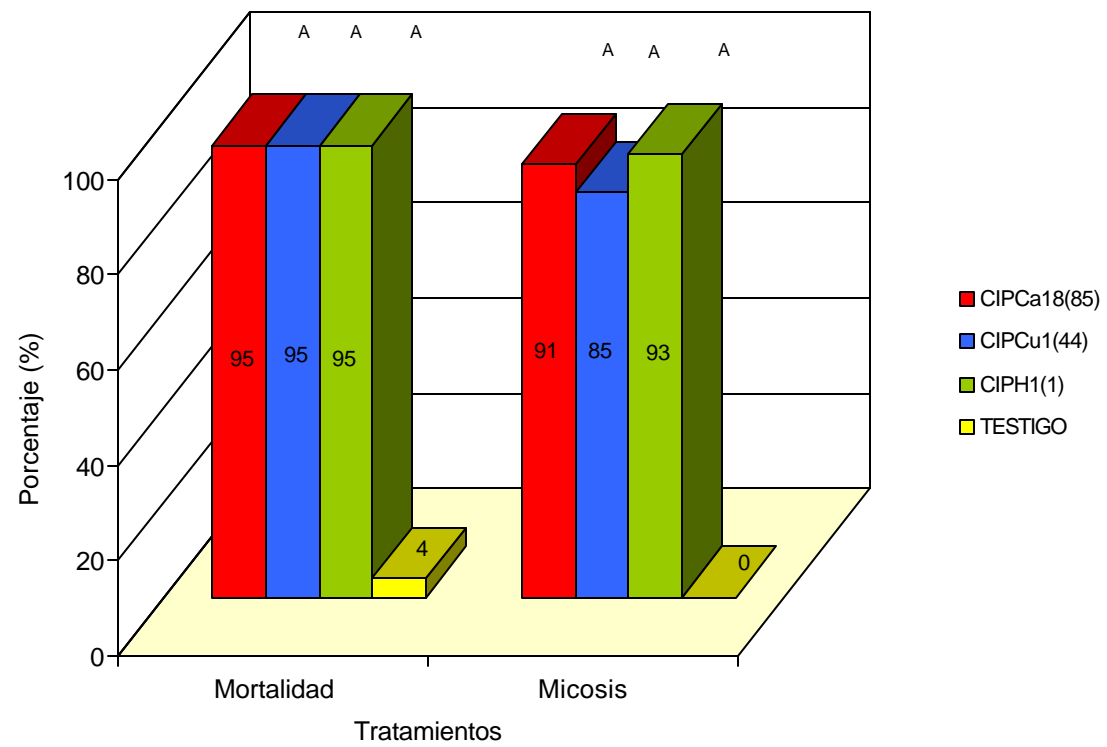


FIGURA 19. Prueba de patogenicidad con las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de primer estadio de *S. tangolias*.

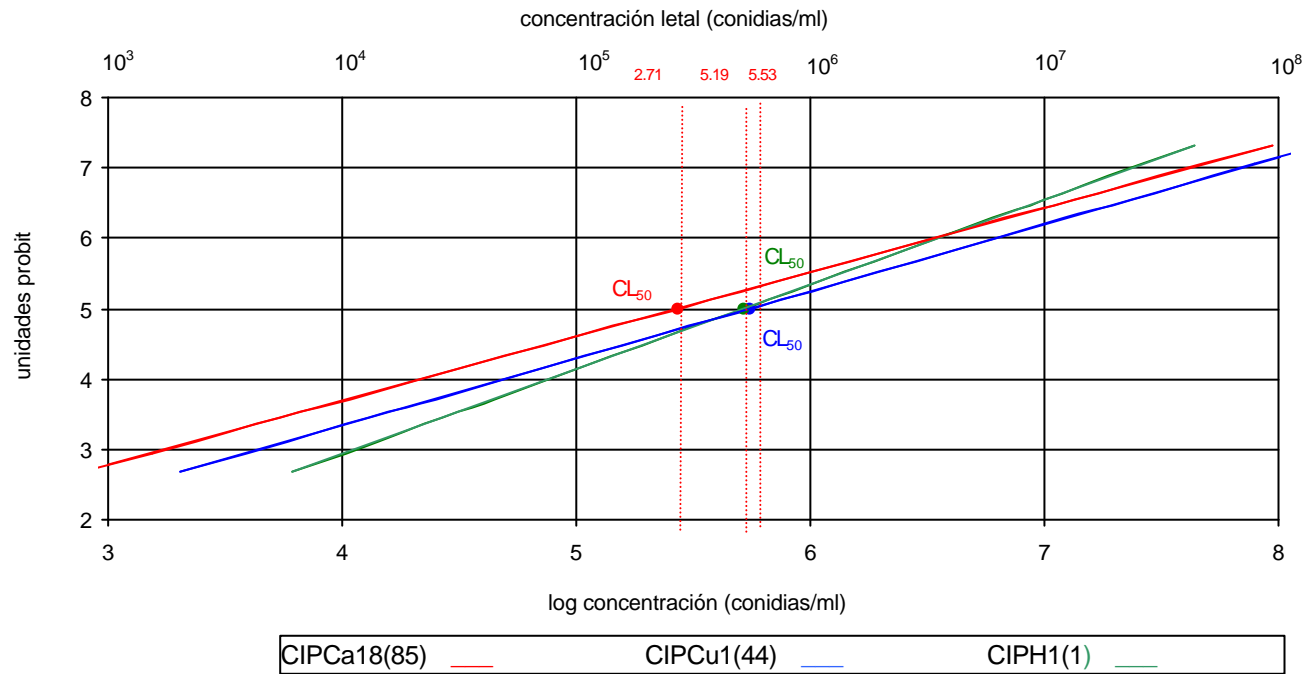


FIGURA 20. Concentración letal media (CL_{50}) de las cepas de *B. brongniartii* para larvas de primer estadio de *Phthorimaea operculella*.

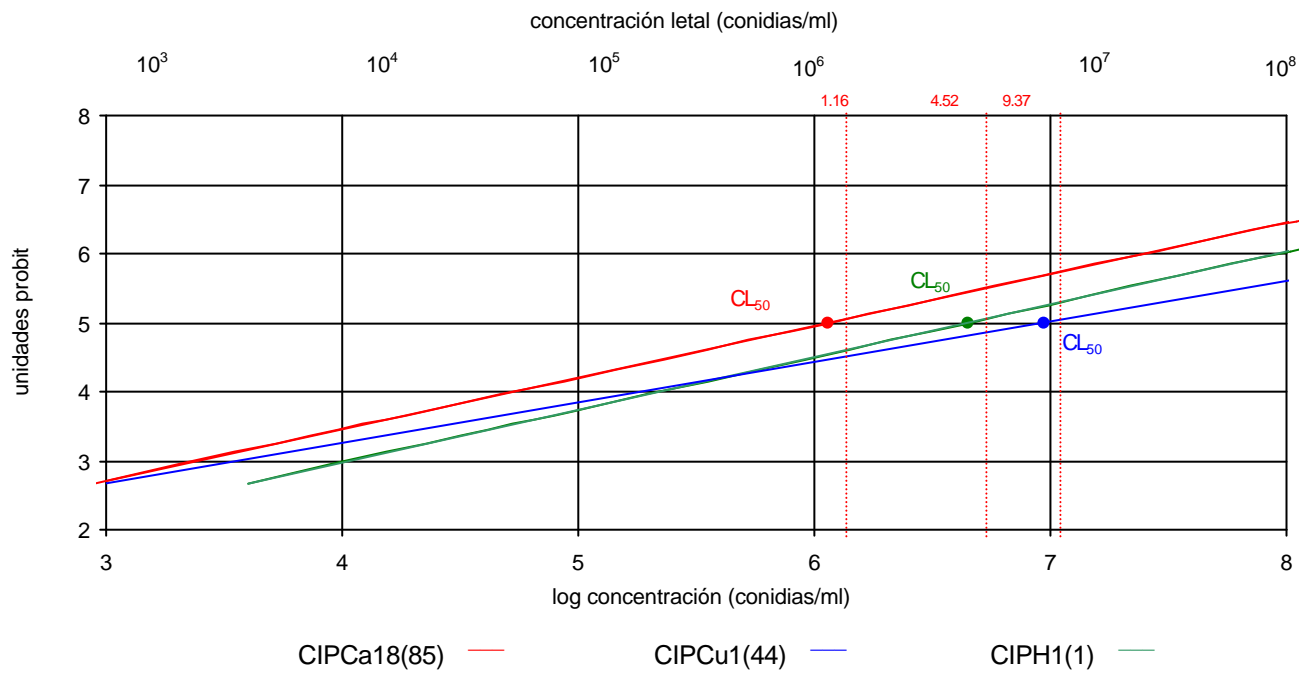


FIGURA 21. Concentración letal media (CL_{50}) de las cepas de *B. brongniartii* para larvas de primer estadio de *Symetriscema tangolias*.

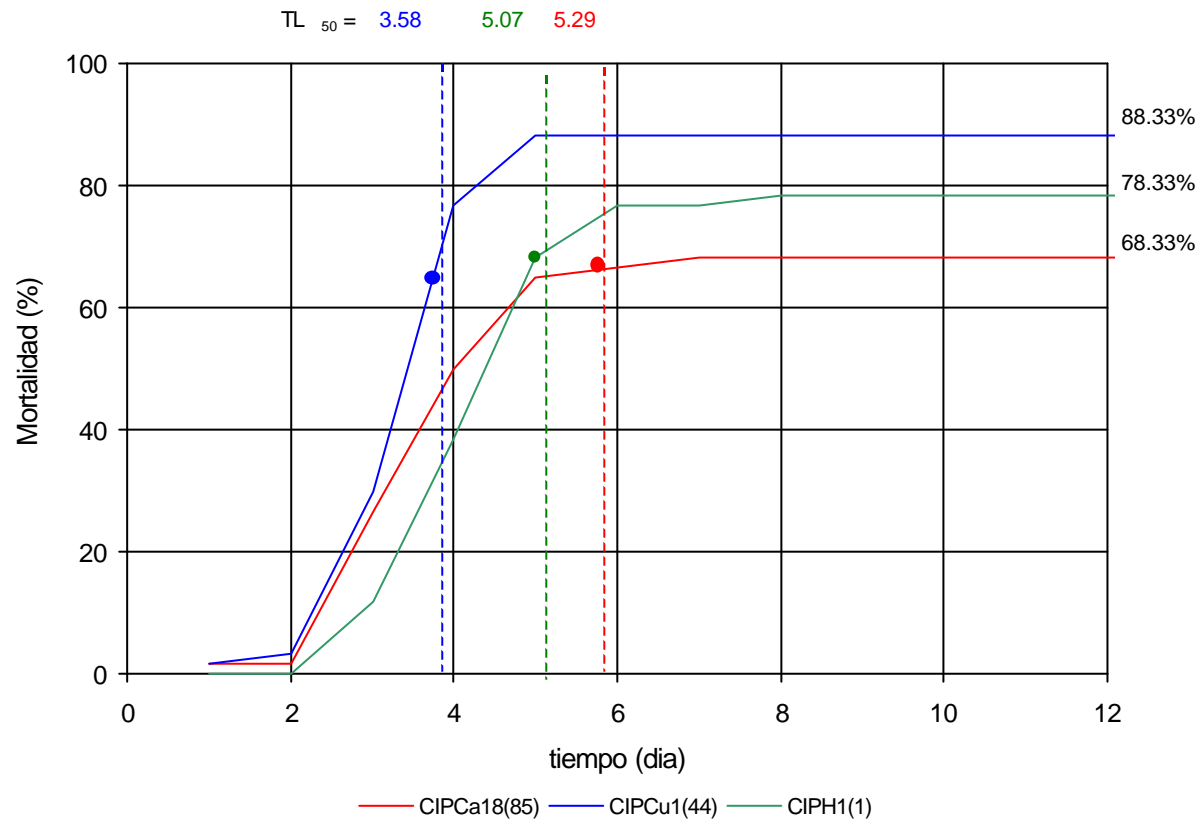


FIGURA 22. Mortalidad acumulada y TL₅₀ para larvas de primer estadio de *Phthorimaea operculella* causada por la CL₅₀ de las cepas de *B. brongniartii*.

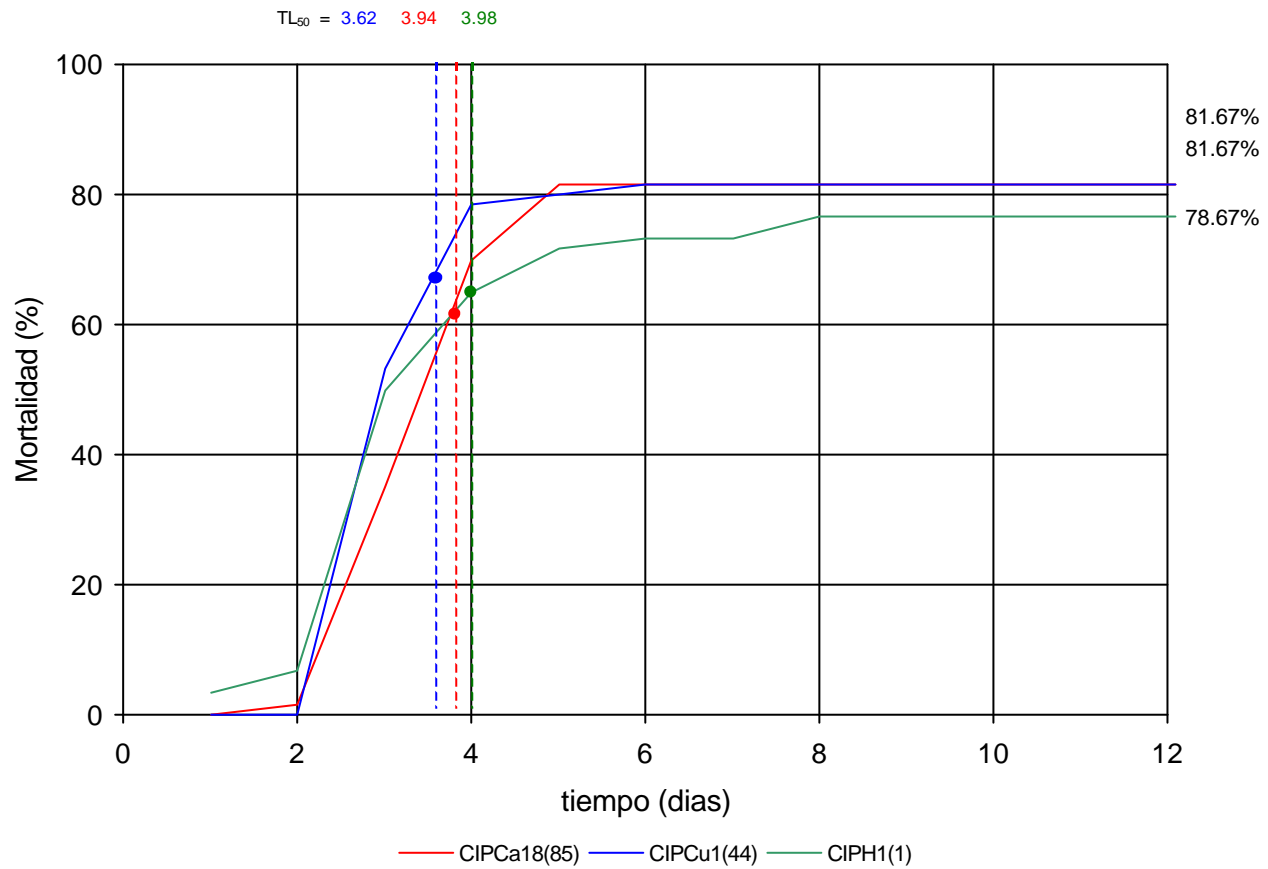


FIGURA 23. Mortalidad acumulada y TL₅₀ para larvas de primer estadio de *Phthorimaea operculella* causada por la CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii*.

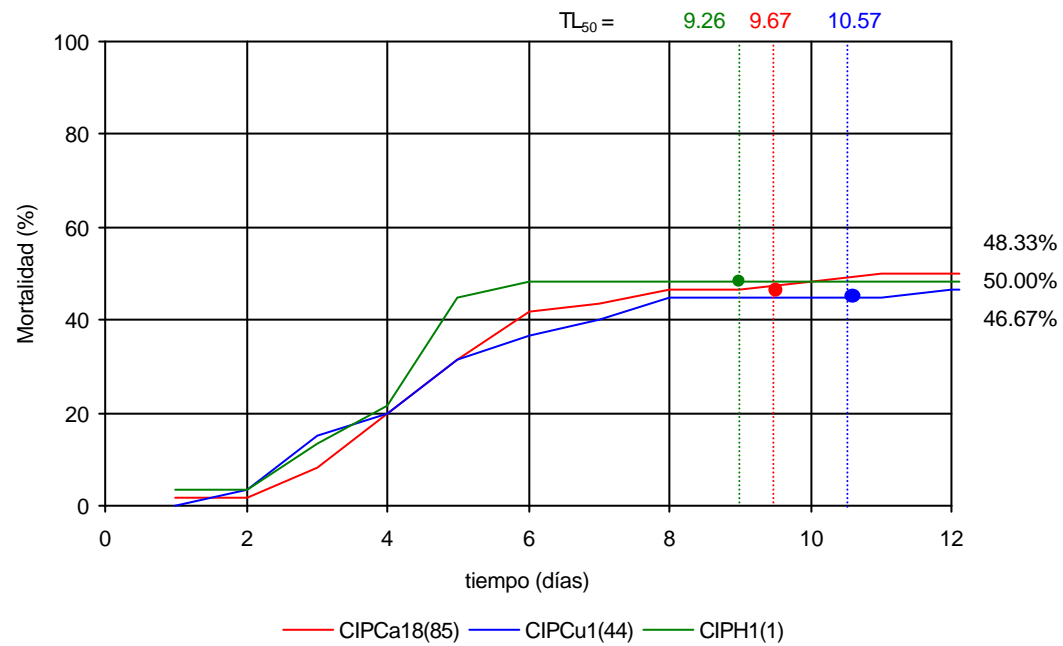


FIGURA 24. Mortalidad acumulada y TL₅₀ para larvas de primer estadio de *S. tangolias* causada por la CL₅₀ de las cepas de *B. brongniartii*.

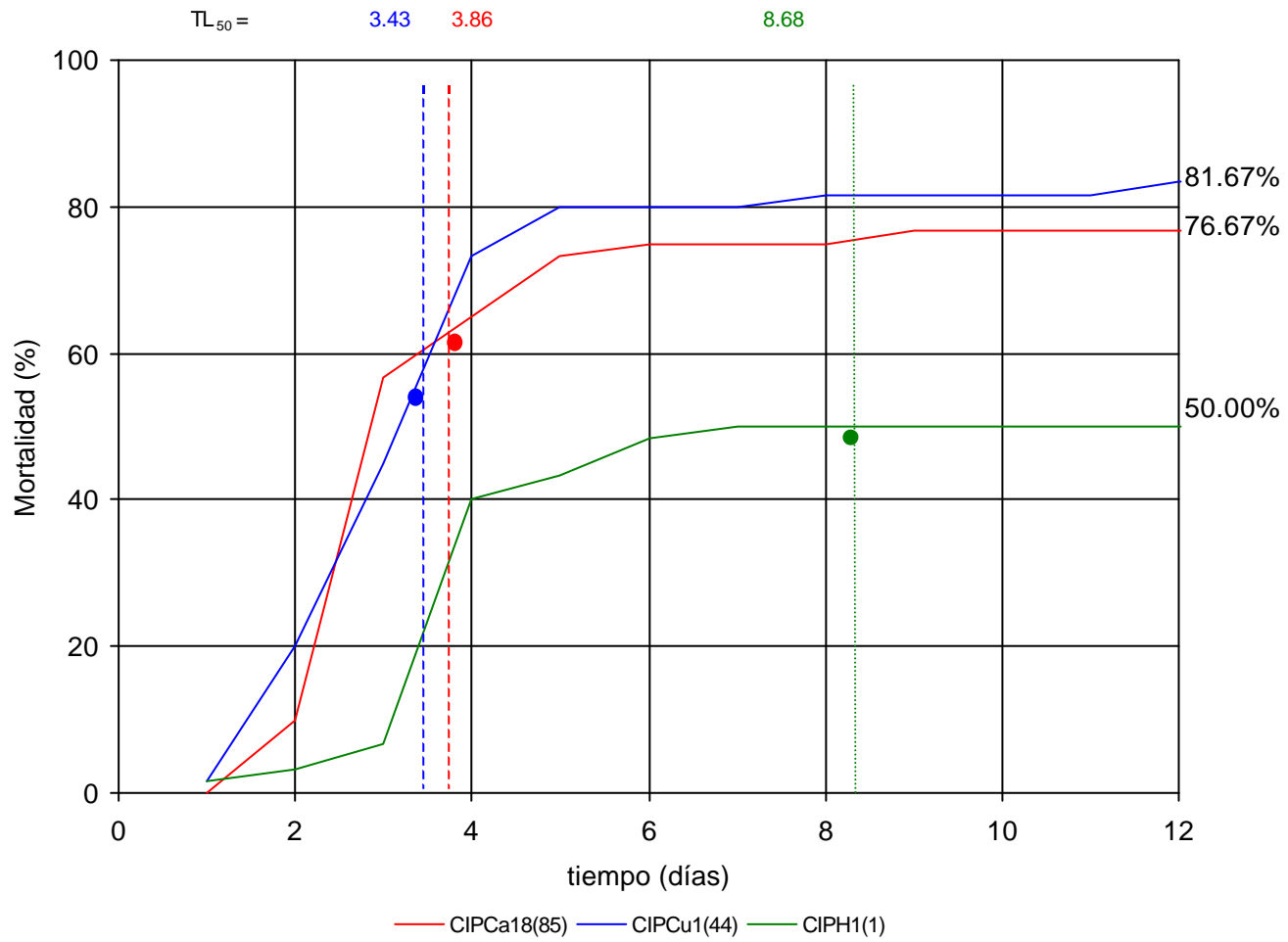
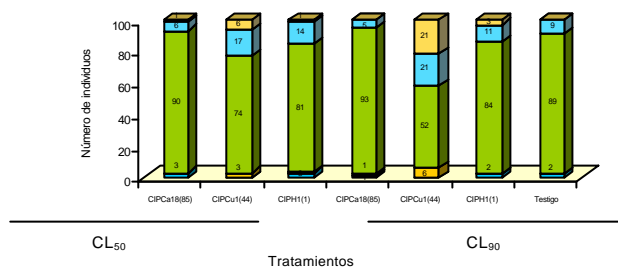
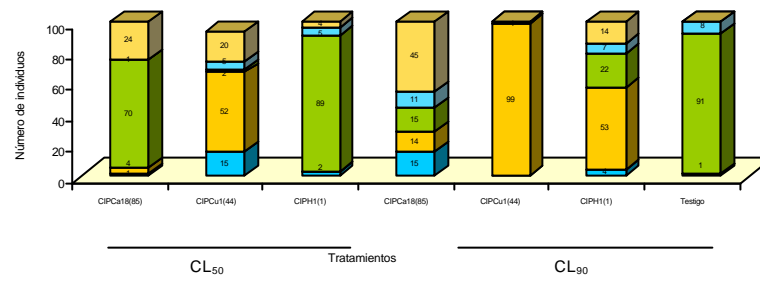


FIGURA 25. Mortalidad acumulada y TL₅₀ para larvas de primer estadio de *S. tangolias* causada por la CL₉₀ de las cepas de *B. bronngiartii*.



■ N° huevos no viables
 ■ N° huevos infectados
 ■ N° larvas sanas
 ■ N° larvas muertas
 ■ N° larvas infectadas

FIGURA 26. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre huevos de *P. operculella* y su efecto posterior sobre larvas emergidas.



■ N° huevos no viables
 ■ N° huevos infectados
 ■ N° larvas sanas
 ■ N° larvas muertas
 ■ N° larvas infectadas

FIGURA 27. Efecto de la CL_{50} y CL_{90} de las cepas de *B. brongniartii* sobre huevos de *S. tangolias* y su efecto posterior sobre larvas emergidas.

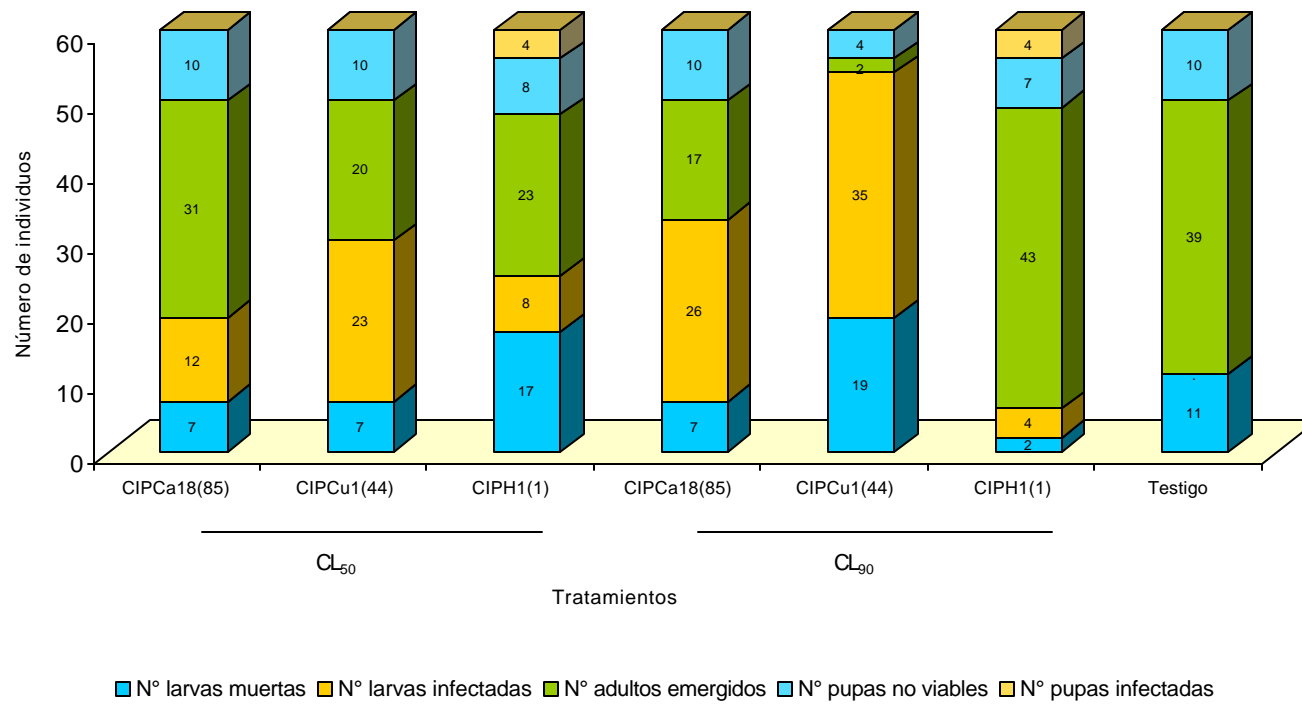
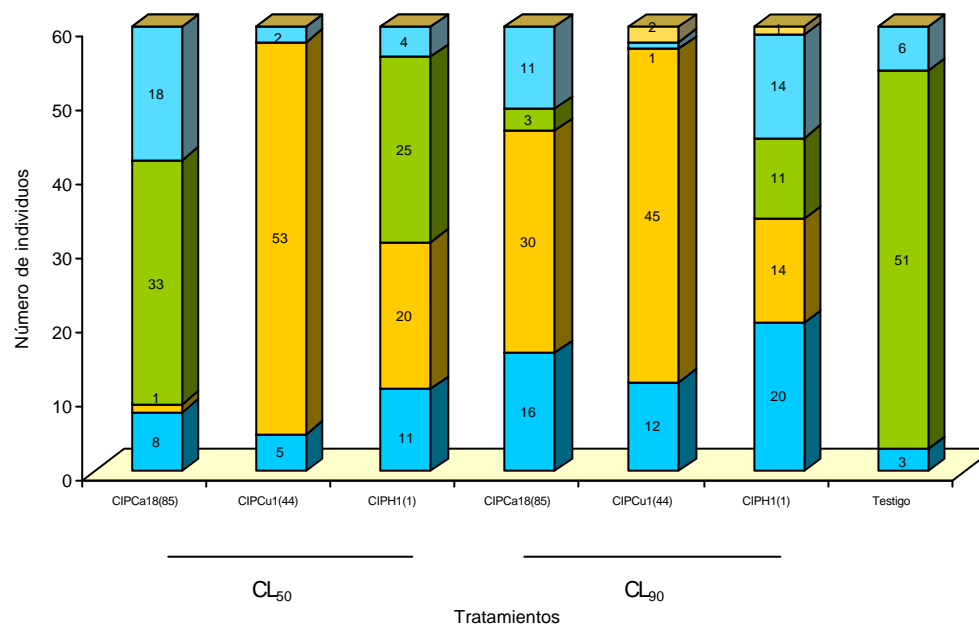


FIGURA 28.

Efecto de la CL_{50} y CL_{90} de las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de último estadio de *P. operculella* y su efecto posterior sobre pupas formadas.



■ N° larvas muertas ■ N° larvas infectadas ■ N° adultos emergidos ■ N° pupas no viables ■ N° pupas infectadas

FIGURA 29. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre larvas de último estadio de *S. tangolias* y su efecto posterior sobre pupas formadas.

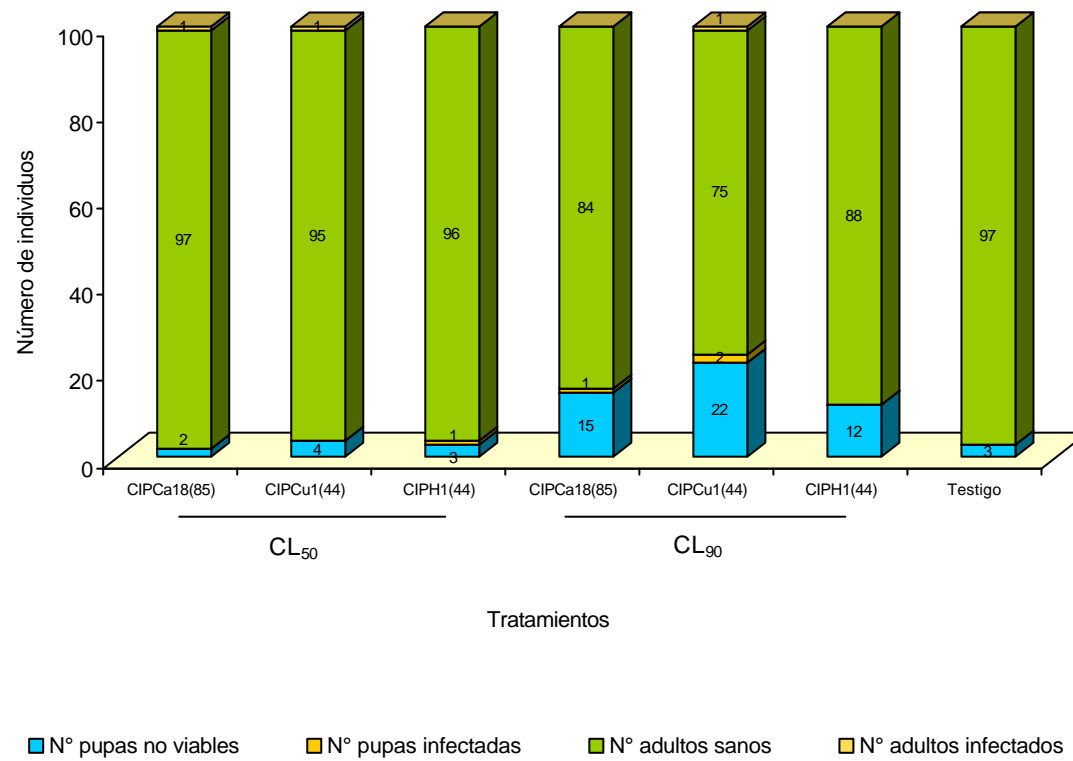


FIGURA 30. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre pupas de *P. operculella* y su efecto posterior en adultos emergidos.

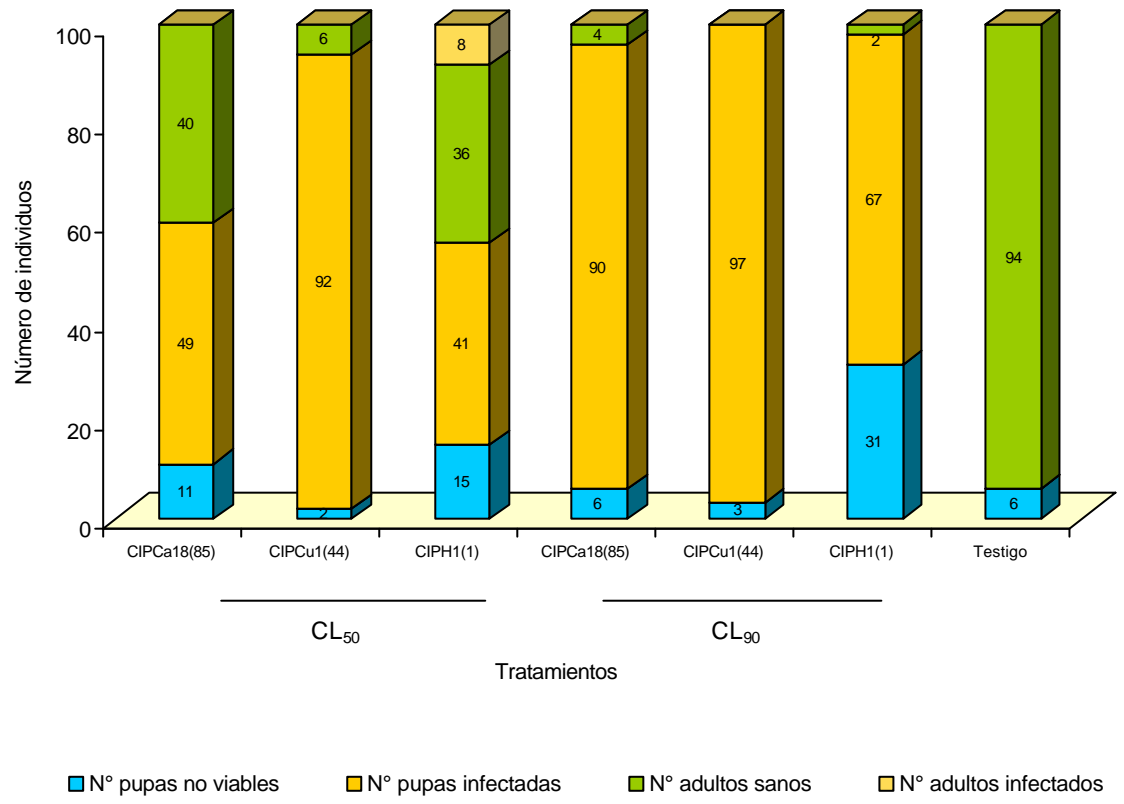


FIGURA 31. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* sobre pupas de *S. tangolias* y su efecto posterior en adultos emergidos.

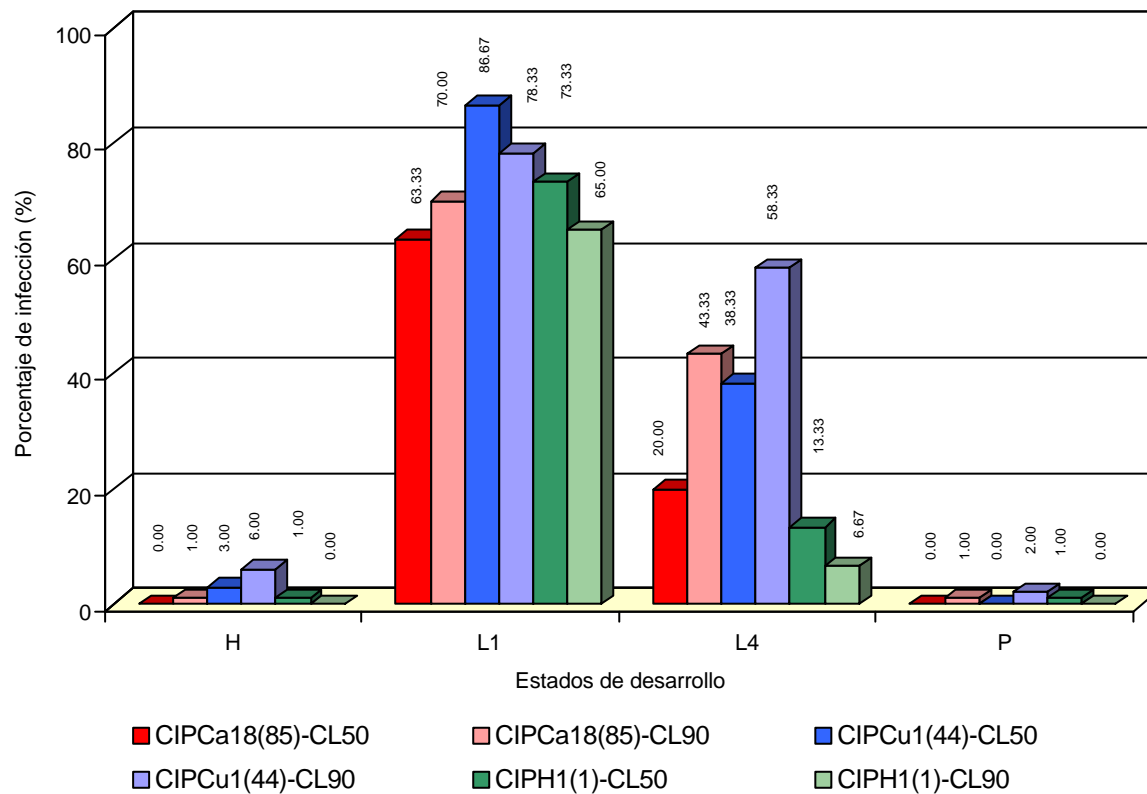


FIGURA 32. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* en los estados de huevo (H), larva de primer estadio (L1), larva de cuarto estadio (L4) y pupa (P) de *P. operculella*.

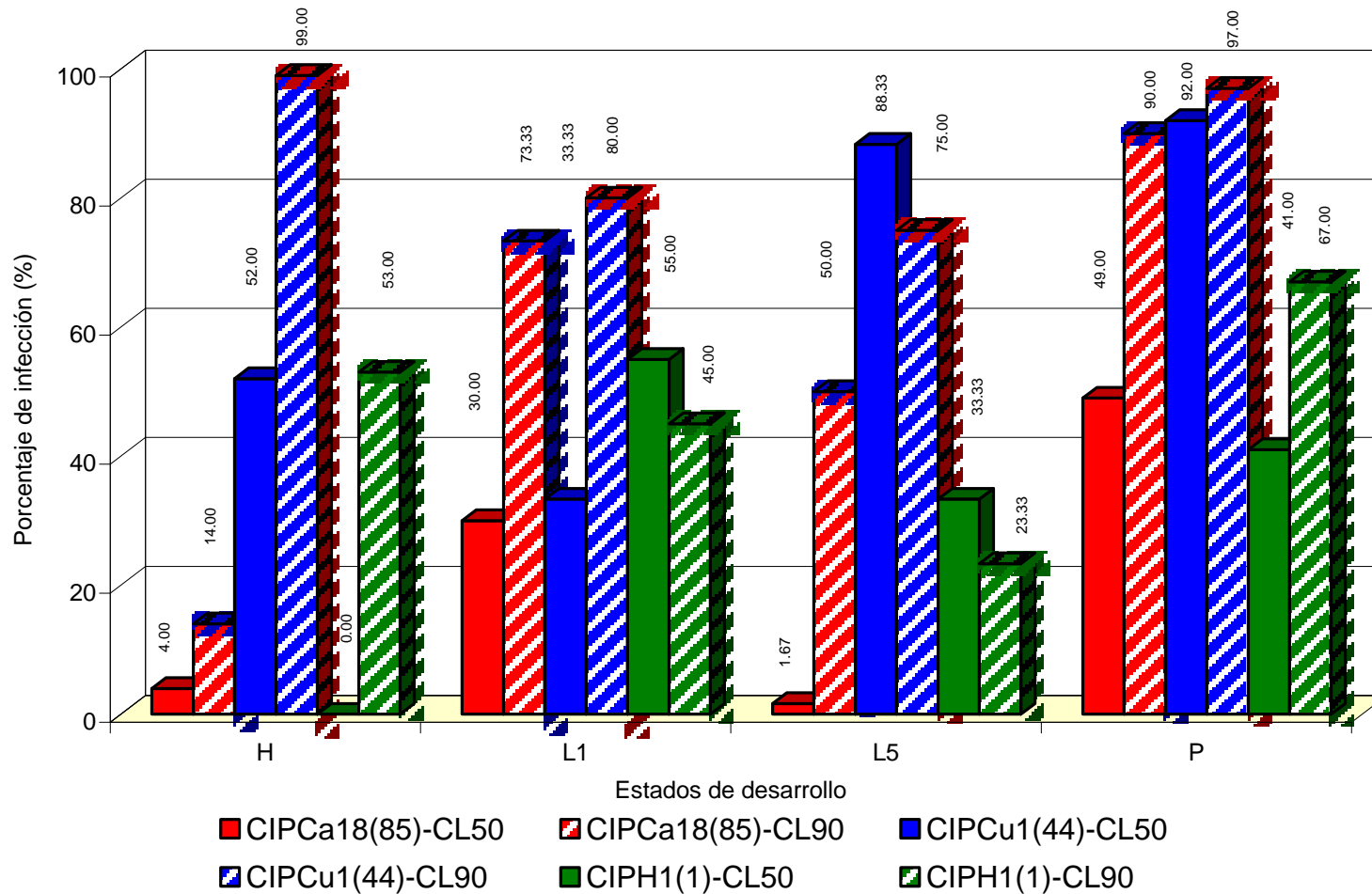


FIGURA 33. Efecto de la CL₅₀ y CL₉₀ de las cepas de *B. brongniartii* en los estados de huevo (H), larva de primer estadio (L1), larva de último estadio (L4) y pupa (P) de *S. tangolias*.

Consultar en formato impreso la fig.34 hasta el 37