

**PROSPECCIÓN DE PATÓGENOS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DE LA POLILLA GUATEMALTECA DE LA PAPA (*Tecia solanivora*,
FAM Gelechiidae)**

**KARINA BENÍTEZ BOHÓRQUEZ
ANDREA DEL PILAR DUARTE BARRERO**

**UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
TRABAJO DE GRADO**

2016

**PROSPECCIÓN DE PATÓGENOS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DE LA POLILLA GUATEMALTECA DE LA PAPA (*Tecia solanivora*,
FAM Gelechiidae)**

KARINA BENÍTEZ BOHÓRQUEZ
ANDREA DEL PILAR DUARTE BARRERO

Trabajo de Grado presentado para optar al título de Ingenieras Ambientales

Director
FRANCOIS HERRERA JACQUELIN
Biólogo

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
TRABAJO DE GRADO
2016

Nota de aplicación:

Firma del jurado

Firma del jurado

Bogotá D.C, _____

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en cada una de las adversidades de la vida ayudándome a superar cada obstáculo de la mejor manera.

A mi madre Luz Norbey y a mi esposo Diego Duarte por su apoyo incondicional, comprensión, ayuda en los momentos difíciles, por darme los recursos necesarios para estudiar, por todos los sacrificios y sobre todo por el amor que me brindan día a día. A mi madre le agradezco todos los valores y principios que ha forjado en mí ayudándome a fortalecer mi carácter, perseverancia y luchar por conseguir mis metas y objetivos.

A mi hija Ana Karina por ser la motivación e inspiración, por darme un motivo más para salir adelante, por todas las felicidades que me ha dado y cariño que me demuestra todos los días.

A mi familia: Hermanas Yuly y Sharon, tías y demás familiares que se sienten orgullosos de quien soy, por sus consejos, apoyo, por ver en mí una persona con muchas capacidades.

A mis suegros por la ayuda incondicional, por la confianza depositada y por acogerme como una hija más en su hogar.

Karina Benítez Bohórquez

“Todos tenemos sueños. Pero para convertir los sueños en realidad, se necesita una gran cantidad de determinación, dedicación, autodisciplina y esfuerzo.”-Jesse Owens.

DEDICATORIA

Agradecer a Dios quien supo guiarme por el buen camino y darme el don de la perseverancia para alcanzar la meta.

Mi tesis la dedico a mi familia quienes por ellos lucho por ser una mejor persona. Para mis padres por su apoyo, comprensión, amor, consejos y ayuda en los momentos difíciles. Principalmente a mi madre por creer en mí y depositar sus recursos en mi futuro. A mi amigo compañero y futuro esposo por ni un segundo dudar en este logro, y siempre estar a mi lado para brindarme su apoyarme incondicional.

Andhea Duarte Barrero

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos especialmente a nuestro tutor François Herrera, por su dedicación, compromiso y ayuda con este trabajo de investigación, por todo su tiempo dedicado y por brindarnos la confianza para realizar la investigación en conjunto con él.

También agradecemos el aporte realizado a esta investigación por parte de nuestros docentes de la facultad de Ingeniería Ambiental de nuestra universidad, el interés y el tiempo prestado para cumplir los objetivos planteados en el documento.

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	13
2. INTRODUCCIÓN	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL	16
5. JUSTIFICACIÓN	17
6. OBJETIVOS.....	17
6.1 GENERAL	18
6.2 ESPECÍFICOS	18
7. MARCO TEÓRICO	19
7.1 CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS.....	19
7.1.1 El control biológico clásico.....	19
7.1.2 El control biológico conservativo.....	19
7.1.3 El control biológico aumentativo.....	20
7.2 <i>Gallería mellonella</i>	23
7.3 <i>Tecia solanivora</i>	23
7.3 CONTROL BIOLÓGICO DE LA POLILLA DE LA PAPA.....	24
7.4 PROSPECCIÓN BIOLÓGICA DE PATÓGENOS DE INSECTOS	25
7.5 REINFECCIÓN SEGÚN LOS POSTULADOS DE KOCH	25
8. METODOLOGÍA	27
8.1 CRÍA DE <i>Tecia solanivora</i>	29
8.2 CRÍA DE <i>Gallería mellonella</i>	30
8.3 MUESTREO DE SUELOS	32
8.4 AISLAMIENTO DE LOS PATÓGENOS EN MUESTRAS DE SUELOS.....	32
8.5 AISLAMIENTO DE LOS PATÓGENOS EN LABORATORIO	33
8.6 AISLAMIENTO DE LOS NEMÁTODOS ENTOMÓFAGOS.....	34
8.7 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS	34
8.8 REINFECCIÓN SEGÚN LOS POSTULADOS DE KOCH	36
8.9 EVALUACIÓN DE LOS PATÓGENOS EN <i>T. SOLANIVORA</i>	36
8.10 DESCRIPCIÓN DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	36
9. RESULTADOS	38
9.1 RESULTADO DE LA CRÍA DE <i>Tecia solanivora</i>	38

Esta especie requirió de menos tiempo así que se logró mantener esta cría con menores inconvenientes y el aumento de la población fue exitoso en un periodo de tiempo más corto.....	38
9.2 RESULTADO DE LA CRÍA DE <i>Galleria Mellonela</i>	38
9.3 RESULTADO DEL PROCESO DE AISLAMIENTO	40
9.4 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS CON <i>Galleria mellonella</i>	45
9.4.2 Ensayos de las cepas II, IV, V y VI en <i>G. mellonella</i>	46
9.4.3 Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas VII, III, II y VI	48
9.4.4 Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas <i>Metarhizium</i> y <i>Beauveria</i> comerciales	50
9.4.5 Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de Nematodos <i>steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i> comerciales	51
9.5 ENSAYO FINAL CON <i>tecia solanivora</i>	53
9.5.1 Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de cepas V y VII aisladas, hongos <i>Metarhizium</i> y <i>Beauveria</i> comercial, Nematodo <i>steinernema</i> comercial	53
10. CONCLUSIONES	57
11. RECOMENDACIONES	58
12. BIBLIOGRAFÍA	59
12. Anexos	64
12.1 Resultados estadísticos ensayos de las cepas I y II en <i>G. mellonella</i>	64
12.3 Resultados estadísticos Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas VII, III, II y VI	68
12.4 Resultados estadísticos ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas <i>Metarhizium</i> y <i>Beauveria</i> comerciales	71
12.6 Resultado estadístico ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de cepas V y VII aisladas, hongos <i>Metarhizium</i> y <i>Beauveria</i> comercial, Nematodo <i>steinernema</i> comercial	73
12.7 Resultados estadísticos ensayo de patogenicidad en larvas de <i>Tecia solanivora</i> de cepas V y VII aisladas, hongos <i>Metarhizium</i>, <i>Beauveria</i> comercial y Nematodo <i>steinernema</i> comercial	79

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Tecia solanivora en el tubérculo	24
Ilustración 2. Cría de Gallería mellonela en la dieta.....	31
Ilustración 3. Larva Gallería mellonela vista al estereoscopio	31
Ilustración 4. Montaje aislamiento de hongos-cámara húmeda	33
Ilustración 5. Aislamiento hongos en el medio de cultivo	35
Ilustración 6. Preparación de soluciones con las conidias esporuladas de los hongos aislados.....	35
Ilustración 7. Montaje cría Gallería.....	40
Ilustración 8. Montaje cría de Tecia Solanivora	29
Ilustración 9. Montaje cría de Tecia Solanivora	30
Ilustración 10. Montaje trampa Bedding	41

Lista de tablas

Tabla 3. Numero de larvas infectadas de cada repetición de ensayos	42
Tabla 4. Descripción cepas aisladas.....	44
Tabla 5. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas I y II (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).	45
Tabla 6. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas II, IV, V y VI aisladas (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).....	46
Tabla 7. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas VII, III, II y VI (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental)	48
Tabla 8. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas <i>Metarhizium</i> y <i>Beauveria</i> comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).	50
Tabla 9. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de Nematodos <i>steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i> comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).	51
Tabla 10. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de cepas V y VII aisladas, hongos <i>Metarhizium</i> y <i>Beauveria</i> , Nematodo <i>steinernema</i> comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).	53
Tabla 11. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>Tecia solanivora</i> de cepas V y VII aisladas, hongos <i>Metarhizium</i> , <i>Beauveria</i> y Nematodo <i>steinernema</i> comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).	55

Lista de gráficas

Grafica 1. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas I y II (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)	45
Grafica 2. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas II, IV, V y VI aisladas (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)	47
Grafica 3. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas VII, III, II y VI aisladas (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)	49
Grafica 4. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de las cepas <i>Metarhizium</i> y <i>Beauveria</i> comerciales (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada).....	50
Grafica 5. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de <i>Nemátodos steinernema</i> y <i>Heterorhabditis</i> comerciales (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada).....	52
Grafica 6. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>G. melonella</i> de cepas V y VII aisladas, hongos <i>Metarhizium</i> , <i>Beauveria</i> comercial y <i>Nematodo steinernema</i> comercial (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada).	54
Grafica 7. Ensayo de patogenicidad en larvas de <i>Tecia solanivora</i> de cepas V y VII aisladas, hongos <i>Metarhizium</i> , <i>Beauveria</i> comercial y <i>Nematodo steinernema</i> comercial (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada).	55

Lista de diagramas

Diagrama 1. Flujograma de la metodología	28
--	----

PROSPECCIÓN DE PATÓGENOS CON POTENCIAL PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA POLILLA GUATEMALTECA DE LA PAPA (*Tecia solanivora*, FAM Gelechiidae)

1. RESUMEN

En este trabajo de investigación se buscaron patógenos, naturalmente presentes en el suelo, con potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*. Se usó el método de colecta de patógenos desarrollado por Bedding con larvas de la polilla de la cera *Galleria mellonella* y muestras de suelo provenientes de sistemas agrícolas de Cundinamarca. Para el aislamiento de hongos se usaron cámaras húmedas para inducir la esporulación y medio PDA para sembrarlos. No se trabajó con virus ni con bacterias por la complejidad en cuanto a búsqueda y manejo. Con los patógenos (nematodos y hongos) se hizo una primera evaluación de patogenicidad usando larvas de *G. mellonella*. Las cepas que mostraron mortalidades superiores al 80% fueron evaluadas en un ensayo de patogenicidad sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora*. Se logró determinar las condiciones (de humedad, temperatura y material de recipientes), adecuadas para el montaje y evaluación de cepas de patógenos en bioensayos con *Galleria mellonella* y de *Tecia solanivora*. Las cepas V (USTATENJO I-15) y VII (USTABOYACA II-15) mostraron una alta mortalidad en larvas de *Galleria mellonella* y de *Tecia solanivora* siendo promisorias para el desarrollo de investigaciones posteriores que lleven al desarrollo de bioplaguicidas.

2. INTRODUCCIÓN

El continuo crecimiento de la población humana requiere la búsqueda de nuevos caminos para incrementar la producción de alimentos. Una forma de conseguir este objetivo es la reducción de las pérdidas en cultivos provocadas por organismos causantes de enfermedades o daños en las plantas [1]. Uno de los métodos que más se utilizan para contrarrestar estas pérdidas es el uso de agroquímicos, los cuales representan un papel muy importante en la reducción de los daños económicos en los cultivos, pero la toxicidad elevada de algunos de ellos ocasionan daños a la salud de productores, consumidores y produce enfermedades como el cáncer, trastornos endocrinos y problemas neurológicos, debido a los residuos tóxicos [2]. Por otra parte su persistencia en el medio genera resistencia a los pesticidas en las plagas y daños ambientales por la contaminación de suelo, de agua, afectación de las redes tróficas, reducción de la biodiversidad y desbalances en los mecanismos naturales de control biológico de las plagas entre otros [3].

Una de las plagas objeto de control es la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* (Fam. Gelechiidae), por su importancia económica en Colombia. Esta plaga afecta la calidad del tubérculo no solo en su apariencia que reduce su valor comercial, si no en una afectación total que hace que el tubérculo no se pueda utilizar para semilla, ni para su comercialización puesto que no sirve para su consumo humano, ni animal. *T. solanivora* causa grandes pérdidas económicas, tanto por las pérdidas en la cosecha como por los gastos que implica su control. Efectivamente el manejo exclusivamente con insecticidas químicos supera el 10% de los costos de producción, reduciendo la ganancia para los productores [4].

La polilla guatemalteca de la papa es una plaga lepidóptera del suelo que en su fase de larva ataca el tubérculo dejando exuvias y excremento causando daño directo y facilitando la entrada de organismos saprofitos. Esta plaga fue registrada por primera vez en Colombia en el año 1985 en cultivos de papa en el norte de Santander en donde ocasionó pérdidas en un 50% a finales de los años 80, en el resto del país se han registrado pérdidas hasta el 100% de la cosecha [5]. En consecuencia los agricultores aplican grandes cantidades de insecticidas para su manejo [4] y con frecuencia este control químico es poco eficiente [5]. Frente a las dimensiones del impacto económico de la polilla de la papa, a la baja eficacia y a los altos costos ambientales de las alternativas químicas para su control, se hace necesario investigar opciones de control biológico. Este trabajo de investigación pretende entonces buscar patógenos naturalmente presentes en el suelo, evaluar su patogenicidad y su potencial como controlador biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La polilla de la papa es probablemente la peor plaga entomológica de este cultivo ya que causa pérdidas que alcanzan, bajo ciertas condiciones, hasta el 100% lo que se traduce en miles de millones de pesos de pérdida a nivel nacional. Esta plaga se combate principalmente mediante la aplicación de insecticidas químicos, sin embargo estos muestran poca eficacia, principalmente cuando la larva ya penetró el tubérculo ya que los insecticidas no pueden traslocarse a este tejido. El manejo de estos insecticidas químicos tiene serias implicaciones sobre el ambiente y la salud de productores y consumidores. Frente a esta situación es necesario desarrollar alternativas tecnológicas más eficaces desde el punto de vista agronómico y menos nocivo desde lo ambiental. En este contexto se pretende hacer una búsqueda de patógenos que tengan un potencial como biocontroladores para la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*.

4. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL

Los suelos del área andina (agrícolas y no agrícolas) contienen patógenos de insectos con potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*.

5. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto es necesario ya que si se logra identificar patógenos en suelos andinos con potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora* se podría llegar a utilizar como instrumento para la implementación de un control biológico en zonas donde se cultiva papa y son afectadas por la plaga causando pérdidas e impactos al ambiente y la salud humana. Al ser un tema de investigación que no se ha efectuado antes en la universidad Santo Tomas, servirá como base para nuevas investigaciones y para el desarrollo futuro de tecnologías de control biológico.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Aislar cepas de patógenos (nematodos y hongos) con potencial para el control biológico de la polilla guatemalteca de la papa.

6.2 ESPECÍFICOS

- Establecer una cría de larvas de *Gallería mellonella* como insecto trampa para la prospección biológica.
- Dar mantenimiento a la cría de *Tecia solanivora* de la Universidad Santo Tomás.
- Evaluar muestras de suelo provenientes de diferentes regiones agrícolas de Cundinamarca para aislar patógenos de insectos.
- Determinar las condiciones experimentales adecuadas para la realización de bioensayos que permitan establecer la efectividad de los patógenos de interés.
- Realizar bioensayos para comprobar la patogenicidad de las cepas aisladas en larvas de *Gallería mellonella*.
- Hacer pruebas preliminares para evaluar la patogenicidad de las cepas aisladas en *Tecia solanivora*.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS

El control biológico es un método que emplea organismos vivos o sus derivados para reducir la densidad de la población de organismos plaga lográndose con ello un equilibrio poblacional. Este método natural compite con los métodos convencionales de origen sintético aunque los agroquímicos por su alta eficiencia y bajo precio siguen siendo preferidos por muchos agricultores a pesar de los daños ambientales que puedan causar. Para lograr un desarrollo sostenible en el cultivo aparte de implementar un controlador de origen natural se debe capacitar al agricultor y brindar la protección total en el momento de manipular el producto para finalmente mantener un ambiente sano y con menor riesgos ambientales a las personas [6], [7], [8], [9].

Entre controles naturales de plagas se puede distinguir la lucha microbiológica donde se utilizan microorganismos entomopatógenos (virus, bacterias, hongos, nematodos, etc.) y lucha microbiológica si se usan enemigos naturales artrópodos (insectos, ácaros, arañas), todos estos se encuentran de manera espontánea en la naturaleza, por lo que son capaces de hacer disminuir los niveles de población de sus presas hasta valores más bajos de los que alcanzarían sin su presencia [7], [6].

Básicamente hay tres tipos de control biológico de acuerdo a la estrategia de manejo del controlador: Conservativo, Clásico y Aumentativo.

7.1.1 El control biológico clásico

En este sistema los microorganismos antagonistas se obtienen en un medio natural y se utilizan en otro, donde ellos no existían antes. En este lugar la plaga o enfermedad se había establecido porque ha vencido a los microorganismos autóctonos que existían y ya no tiene enemigos naturales. El controlador biológico introducido logrará, en el largo plazo reducir la población de la especie plaga. Por lo tanto este método es especialmente adecuado para los casos en que una especie se establece en áreas fuera de su rango nativo donde no están presentes los enemigos naturales que la regulan normalmente [7], [8], [10].

7.1.2 El control biológico conservativo

Consiste fundamentalmente en favorecer la abundancia de los enemigos naturales de las plagas, mediante medidas para proteger, aumentar la abundancia y mejorar las actividades de estos controladores biológicos ya presentes en el área. Para esto, es importante identificar cuáles son los factores que limitan a la población de enemigos naturales o que influyen de manera negativa en su actividad. De este modo se busca proporcionar hábitats alternativos para que los enemigos naturales tengan alimentación y un lugar para reproducirse. [7], [8], [10].

7.1.3 El control biológico aumentativo

Tiene como objetivo inmediato aumentar la abundancia de los enemigos naturales que ya están presentes en un área afectada por una plaga, aunque en un número tan bajo que no alcanzan un control efectivo. Para lograrlo se pueden seguir dos tácticas el control inoculativo y el control inundativo. El control inundativo consiste en favorecer la llegada y el desarrollo de los enemigos naturales de las plagas. Se pueden introducir estos agentes biológicos a lo largo del ciclo de cultivo para prevenir daños. Por otro lado la estrategia inundativa consiste en liberar en grandes cantidades y en forma repetitiva los enemigos naturales durante el ciclo de cultivo [7], [8], [10].

Para el control biológico existen diferentes grupos de agentes, los artrópodos que pueden ser depredadores (insectos y arácnidos), que atrapan a su presa devorándolas; o los parasitoides, que de forma interna o externa se alimentan de un hospedante (la plaga) y limitan su estabilidad. Los entomopatógenos que pueden ser hongos, bacterias, virus, nematodos u otros microorganismos, provocan enfermedades en los insectos. No obstante, actualmente se señalan dos tipos adicionales: los antagonistas, que interfieren con otros microorganismos patógenos, limitando su desarrollo y por tanto, limitando su capacidad para generar enfermedades; y el grupo de los promotores de crecimiento y los inductores de resistencia sistémica, siendo los microorganismos antagonistas los que comprenden cualquier organismo que interfieren en la supervivencia o desarrollo de los patógenos [10], [7], [8].

Los artrópodos depredadores constituyen uno de los grupos más importantes de enemigos naturales, se conoce que la mayor parte de ellos son carnívoros. En el caso de plagas de artrópodos controladas por otros artrópodos, el control es llevado a cabo mediante dos procesos fundamentales: la depredación y el parasitismo. Los artrópodos depredadores se alimentan de todos los estados de la presa: huevos, larvas (o ninfas), pupas y adultos. Además, la variedad de presas que pueden llegar a consumir cambia mucho en función de la especie que se trate, pueden alimentarse tanto de la planta como de presas, lo que se conoce como zoofitofagia [8], [11], [12].

Los parasitoides son insectos que en su estado inmaduro se alimenta y desarrolla dentro o sobre el cuerpo de un solo insecto hospedante al cual mata lentamente para completar su desarrollo aunque también se desarrolla dentro de los huevecillos de este. Sin embargo pasan inadvertidos por su pequeño tamaño, este grupo de organismos posee una tremenda importancia económica, ya que actúan como reguladores poblacionales de sus hospedadores, representando herramientas útiles para el manejo de insectos plaga. Por su localización en el hospedante, se clasifican en ectoparasitoides, aquellos que se ubican y alimentan en el exterior del hospedante [13], [8], [14].

Los entomopatógenos son cualquier agente biótico que puede ser infeccioso o no infeccioso, normalmente son microscópicos y causantes de enfermedades, por lo que limitan la actividad de su hospedero o lo matan, liberando posteriormente millones de esporas u otros propágulos que son dispersados por el agua, viento u otros insectos causando en muchos casos epizootias. Dentro de este grupo se encuentran los hongos, los nemátodos, las bacterias, los protozoos y los virus [15], [16], [8], [17], [18].

Las bacterias son microorganismos simples con células procariontes individuales que se reproducen por fisión binaria. Algunas bacterias son patógenos obligados, aunque se han reportado pocas especies que atacan insectos. El potencial patogénico de las bacterias sobre insectos ha despertado el gran interés para su uso en plagas agrícolas, las especies más reconocidas pertenecen a las familias: *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* y *Streptococcaceae*. Prosperan en ambientes aerobios y anaerobios; en condiciones cálidas o frías, lugares oscuros o luminosos, secos o húmedos. Hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas para el control de plagas, alternativas a los insecticidas químicos. Esto estimula considerablemente el interés en usar patógenos como agentes de biocontrol. El patógeno más exitoso en cumplir este objetivo, que además mantiene potencial para seguir desarrollándose, es la bacteria con cualidades insecticidas *Bacillus thuringiensis*, un bacilo Gram positivo, aerobio facultativo, esporulado, cuyo tamaño oscila entre 1 a 1.2 micrómetros de ancho y de 3 a 5 micrómetros de largo (2, 3), nativo del suelo y catalogado como cosmopolita (4-6) la cual se ha aislado de ecosistemas como bosques tropicales y templados, zonas desérticas, sabanas, archipiélagos, frutales, suelos agrícolas, arena y cuevas en los cinco continentes. Esta bacteria posee una toxicidad selectiva alta debido a la producción de endotoxinas que tienen un estrecho rango de especificidad lo que reduce su daño ambiental en especies no blanco [19], [20].

Los hongos son microorganismos unicelulares o multicelulares que constan de células alargadas provistas de una pared que contiene celulosa y quitina, además de otros carbohidratos y proteínas. Estas estructuras vegetativas son llamadas hifas, también los hongos poseen una gran variabilidad genética y un amplio rango de hospederos. Dentro de este grupo, destacan los hongos entomopatógenos por lo que son microorganismos capaces de infectar y provocar enfermedades en insectos causándoles finalmente la muerte. Esta característica los convierte en una herramienta con gran potencial como agente de control biológico. Existen en el mundo más de 700 especies de hongos entomopatógenos, y en los hábitats más variados, destacamos los géneros *Beauveria* y *Metarhizium* de numerosas plagas en el mundo. El ciclo de desarrollo de un hongo entomopatógeno comienza con la adhesión de las conidias (esporas asexuales) a la cutícula del insecto, para luego germinar, formar un haustorio y penetrar al interior del cuerpo del insecto huésped. Posteriormente comienza la colonización y reproducción del hongo lo que causa la muerte y momificación del insecto. La presencia de hongos y otros patógenos de insectos plaga dentro de la biodiversidad natural de los ecosistemas silvestres también puede ser considerada como un servicio de gran utilidad para la humanidad, ya que de estos ecosistemas se pueden aislar patógenos con un alto potencial de regulación de las plagas agrícolas. [16], [17], [21], [22].

Para el aislamiento de los hongos se utiliza el agar de agua el cual es un medio pobre en el cual el micelio crece en forma muy rala. Es especialmente usado para hacer aislamientos de punta de hifa. De acuerdo a la consistencia que se quiera dar al medio, se puede hacer con mayor o menor cantidad de agar [23], [24], [25]. Sin embargo otro muy utilizado es el **(PDA)** papa dextrosa agar el cual es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) y *Metarhizium*, los más importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los

parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio. Cuando se aíslan hongos a partir de insectos colectados del suelo, es recomendable acidificar el medio con ácido láctico al 25% [23], [25], [26] [18].

Los nematodos entomopatógenos son organismos pseudocelomados vermiformes muy similares a los que parasitan plantas y que pueden asociarse con los insectos de tres formas: forecia (adherencia pasiva y transporte), parasitismo obligado y parasitismo facultativo. Por lo general presentan una estrecha asociación (simbiosis) con bacterias específicas, las cuales son los agentes primarios que inician la infección en el hospedante. Los nematodos transportan internamente bacterias específicas que son liberadas en el interior del cuerpo del insecto después de que el nematodo penetra a través de aberturas naturales como boca, espiráculos y ano. Estas bacterias se multiplican dentro del insecto y lo matan al causarle septicemia (infección generalizada). Los principales grupos de nematodos de interés pertenecen al orden *Rhabditida*, y dentro de éste a las familias Steinernematidae y Heterorabditidae [21], [27], [28], [17], [29].

Las familias Steinernematidae y Heterorabditidae de los nematodos entomopatógenos son parásitos obligados de un gran número de especies de insectos que se caracterizan por vivir asociados en mutualismo con bacterias de la familia Enterobacteriaceae, del género *Xenorhabdus* y *Photorhabdus* respectivamente, que llevan en su intestino. El ciclo de las dos familias de nematodos entomopatógenos es similar. El único estadio que vive fuera del insecto es el tercer estado juvenil, forma infectiva juvenil o larva "dauer". Durante este periodo tiene boca y ano cerrados y no se alimenta. El tercer estadio juvenil, también conocido como juvenil infectivo (JI) es el responsable de la localización e infección de los insectos hospedadores. Estos juveniles buscan los hospederos activamente en el suelo atraídos principalmente por un rastro de CO₂. Las formas infectivas juveniles llevan células de la bacteria simbiote en su interior, formando lo que se conoce como complejo nematodo-bacteria. La infección por nematodos entomopatógenos causa un cambio de color en los cadáveres producido por la bacteria asociada. Generalmente los insectos parasitados por especies de la familia Steinernematidae adquieren una coloración marronosa, que va desde el ocre al casi negro, mientras que los parasitados por Heterorabditidos toman un tono rojizo, naranja, amarillo o verde. Por otra parte se han identificado los nematodos de forma natural en todo el mundo, se han utilizado tradicionalmente contra parásitos de suelo porque son sensibles a la luz ultravioleta y sequedad, por lo tanto son utilizados como controles biológicos en los cultivos agrícolas [21], [27], [28], [17], [30].

Los virus son entidades microbiológicas, no celulares, que tienen un genoma con capacidad de replicarse y adaptarse a los cambios ambientales. Sin embargo, los virus se caracterizan por no poder capturar y almacenar energía libre y no ser funcionalmente activos fuera de las células de sus huéspedes. Los virus entomopatógenos tienen partículas cuya morfología es muy variable tanto en forma como en tamaño y pueden ser de DNA o RNA de hebra simple o doble. La familia *Baculoviridae* ha evolucionado de forma independiente como un mecanismo de protección contra la degradación ambiental, que les confiere una gran ventaja como bioplaguicidas, por lo tanto estos son especialmente útiles para la agricultura, pues son muy seguros y eficientes en el control de plagas [31], [17].

7.2 *Gallería mellonela*

La polilla de la cera se desarrolla en panales de abejas alimentándose de la cera. Tiene metamorfosis completa, donde pasa por cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto. La larva de *G. mellonella* pasa, a su vez, por cuatro instares. El último instar es el óptimo para ser hospedero de NEPs y ser utilizado en la multiplicación de estos controladores biológicos, [32] , [33].

7.3 *Tecia solanivora*

Tecia solanivora o polilla guatemalteca pertenece a la familia *Gelechiidae*, orden Lepidóptera, suborden *Dytrisia*, *superfamilia Tinoidea*, genero *Tecia* [34]. Se desarrolla en un ciclo de vida de 4 fases pasando por huevo, larva, pupa y polilla en donde se demora el ciclo aproximadamente 60-65 días dependiendo de las condiciones ambientales [35]. La polilla guatemalteca es originaria de América central, ha sido introducida en varias zonas gracias a la comercialización de productos entre países. El primer reporte fue registrado en Venezuela en 1983, seguido por la introducción en Colombia en 1985, en el departamento de Norte de Santander y de ahí se dispersó al resto de las zonas paperas del país. En 1996 la polilla se propago hacia el Ecuador [36], [37], [38]. El daño causado al cultivo de papa se presenta en estado larval de la plaga, en donde apenas eclosiona entra al tubérculo por un orificio muy pequeño y va haciendo galerías, dejando su excremento al interior de la misma y que junto con patógenos secundarios ayudan a la pudrición del tubérculo [35], [36], [39].

La plaga causa picaduras al tubérculo bajando la calidad del producto reduciendo su valor comercial y en los peores casos cuando el tubérculo está muy afectado no sirve para semilla ni para la venta, ocasionando pérdidas hasta en un 100%. Años atrás el porcentaje afectado del tubérculo en campo fue entre el 0 y 43%, pero en condiciones de almacenamiento el daño apareció entre 0 y 37,5% [5]. Como medida de control históricamente se han utilizado agroquímicos, que básicamente son de fácil acceso en el mercado como los plaguicidas que son sustancias químicas que son utilizadas para combatir, destruir, controlar o prevenir una plaga; en donde se incluyen los insecticidas, nematicidas, fungicidas, bactericidas entre otros [40], [41], [42]. Pero al realizar un control químico se afecta el medio ambiente por su grado de toxicidad tanto en el aire porqué al aplicarse se liberan partículas que quedan suspendidas en el causando contaminación y deterioro de la capa de ozono, también el agua se ve afectada por la contaminación de las fuentes hídricas, incluidas las subterráneas al filtrarse el plaguicida, por lo tanto el suelo se deteriora ya que causa pérdidas de fertilidad, nutrientes, reducen la biodiversidad y la fijación de nitrógeno , alterando el equilibrio ecológico y su incorporación a la cadena de alimentos causando daño a la salud de los seres humanos [43], [44], [45].

Ilustración 1. *Tecia solanivora* en el tubérculo



Fuente: las autoras

7.3 CONTROL BIOLÓGICO DE LA POLILLA DE LA PAPA

Debido a la contaminación ambiental que producen los insecticidas químicos se ha originado el uso de insecticidas microbiológicos, dentro del grupo de los patógenos controladores de plagas como bacterias, hongos y virus, quizás los que más interés han generado son los baculovirus, debido a que poseen la capacidad de controlar varias especies de insectos plaga sin ocasionar daños a otras especies que no son el blanco, ya que tienen un estrecho rango de huéspedes. Además el daño ambiental que generan es mínimo y hasta el momento no existe ningún reporte de resistencia.

Los baculovirus son una familia de virus de ADN de doble cadena que infectan específicamente insectos y algunos crustáceos. Por lo tanto pueden actuar como enemigos naturales de las mismas plagas. En Colombia, los baculovirus se usan para controlar cultivos de la papa, el algodón y la palma de aceite, ya que constituyen un grupo diverso de virus específicos que infecta solo invertebrados, particularmente insectos, al igual que los demás virus, los baculovirus necesitan obligatoriamente de un huésped para multiplicarse, no pueden replicarse en medios sintéticos y requieren células vivas como hospederos. Los baculovirus se caracterizan por ser altamente seguros y potencialmente efectivos. Pero un gran inconveniente es que algunos son relativamente lentos en matar a su insecto hospedante. Dependiendo de la edad del insecto, las condiciones ambientales, la dosis viral, la especie de virus y la susceptibilidad del huésped, entre otros, el virus puede tardar de días a semanas para matar el insecto [46], [47], [48], [49].

Se encuentra otro insecticida microbiológico para control de plagas, el cual es el uso de hongos entomopatógenos para la exterminación de insectos que atacan a las plantas cultivadas presentándose como enemigos naturales que parasitan y matan durante su permanencia en el tubérculo una vez cosechado, produciendo así una reducción considerable en su población. Los principales hongos que se conocen *Beauveria* spp., *Metarhiziumanisopliae*, *Lecanicillium* (*Verticillium*) *lecanii* y *Paecilomycesspp.*, son comunes en el campo [22]. Estos hongos tienen un amplio rango de hospedantes y han sido utilizados para controlar diversas plagas en diferentes lugares. Los hongos

entomopatógenos poseen características que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición por lo tanto son los que han recibido mayor atención por la gran variedad de especies y amplio rango de hospedantes así como por su crecimiento microscópico sobre la superficie de su huésped [22], [23], [24], [16].

La utilización de los nematodos entomopatógenos es otro método de lucha biológica para el control de plagas de insectos. Estos presentan una combinación de características intermedias entre los depredadores y parásitos, y los patógenos de insectos. Por una parte poseen la capacidad de búsqueda del huésped de los depredadores y parásitos, pero además se pueden producir de forma masiva, almacenar y aplicar de forma semejante a los demás patógenos microbianos de insectos. Las dos principales especies que se utilizan son *Heterorhabditis* y *Steinernema* demoran 10 a 16 días descomponiendo el cadáver del insecto, el tiempo necesario para que ocurran tres generaciones del nematodo. Al agotarse el alimento los individuos en el tercer estado juvenil abandonan el cadáver, emergiendo en forma paulatina durante dos a tres semanas, para ir en la búsqueda de nuevos hospedantes [25], [50], [21].

7.4 PROSPECCIÓN BIOLÓGICA DE PATÓGENOS DE INSECTOS

La prospección biológica de insectos plaga del cultivo de la papa pretende obtener el máximo número de especies y referencias de patógenos para aumentar la biodiversidad ecológica por medio de la detección de este, teniendo en cuenta que se deben limitarse a los ciclos de vida de las principales plagas de insectos y enfermedades autóctonas de una zona determinada para asegurar una adecuada sincronización de las prospecciones en coincidencia con la aparición de la plaga o su daño correspondiente. Esta actividad consistirá en la búsqueda de patógeno en zonas donde ésta no ocurre a fin de demostrar permanentemente su no-ocurrencia, o donde existe información no confirmada de su ocurrencia [51], [52], [53].

Se realizó una prospección biológica de patógenos de insectos con la biodiversidad de Ecuador. Finalmente se manifestó la presencia de microorganismos como los nematodos entomopatógenos, donde se encontraron 28 aislamientos de NEPs correspondientes a los géneros *Heterorhabditis* y *Steinernema*. Estos aislamientos han sido caracterizados y utilizados en pruebas de control de plagas en los cultivos de papa y frutales andinos [33].

7.5 REINFECCIÓN SEGÚN LOS POSTULADOS DE KOCH

Los postulados de Koch plantean la necesidad de la asociación constante de un agente biótico con el hospedero enfermo, para proceder luego a su aislamiento, su caracterización y su cultivo in vitro. Una vez lograda esta segunda fase bajo condiciones axénicas, la inoculación de un hospedero sano con microorganismo (células, esporas, etc.) debe reproducir y desencadenar el mismo cuadro patológico inicial, es decir, el mismo síndrome de la enfermedad con su típica sintomatología y alteraciones en el hospedero y, finalmente, los dos aislamientos del agente biótico –el natural y el cultivado

deben coincidir en sus rasgos morfológicos y biológicos relevantes. En síntesis, son cuatro los elementos críticos en este proceso probatorio: asociación específica del microorganismo putativo con la enfermedad; concordancia científica entre las evidencias microbiológicas, patológicas y clínicas; su aislamiento en medios de cultivo artificiales y, finalmente, la reproducción de la enfermedad por inoculación del organismo cultivado en un hospedero sano [54], [55], [56].

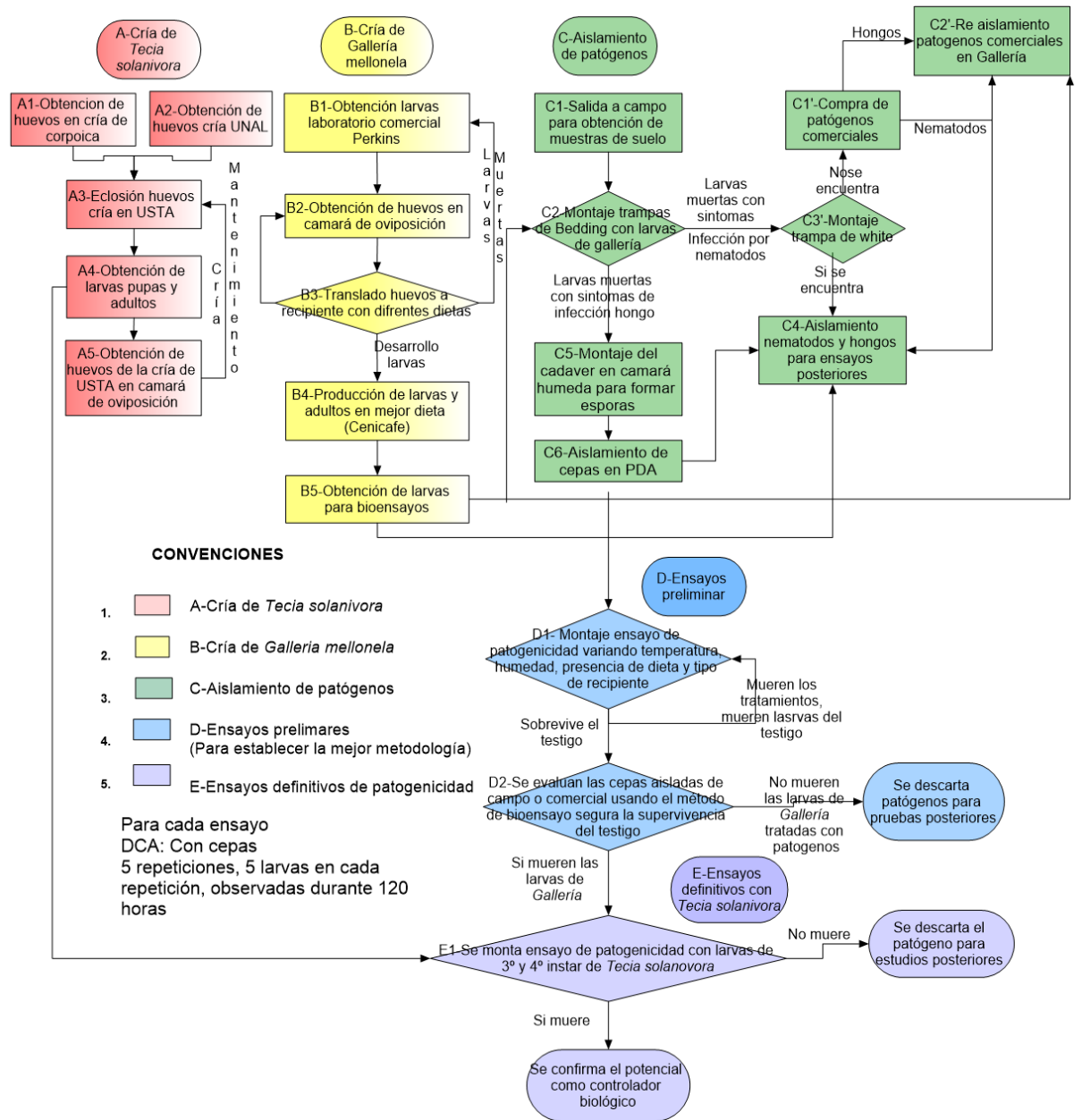
8. METODOLOGÍA

Para esta investigación el diseño experimental que se usó fue un DCA (diseño completo al azar) en el cuál los tratamientos se asignaron al azar entre las unidades experimentales, suele presentarse en experimentos de laboratorio donde casi todos los factores están controlados. Este diseño no impone ninguna restricción en cuanto a las unidades experimentales, estas deberán ser, en todo caso, homogéneas [69].

La metodología que se siguió fue la de aislamiento de patógenos de insectos de **Bedding & Akhurst** (1975), que según lo que reporta la literatura especializada es un método estandarizado para este tipo de aislamiento. Este consistió en tomar muestras de suelo de Cundinamarca para ser expuestas a las larvas de *Gallería mellonella* como trampa para la obtención de patógenos (*G. mellonella* es altamente susceptible a los patógenos), las larvas fueron criadas para obtener una abundancia de larvas de tercer instar. Posteriormente las muestras de suelo se introdujeron en cajas de petri cerradas junto con las larvas de *G. mellonella* para encontrar el patógeno y se incubaron a temperatura ambiente hasta la muerte de las larvas. Las larvas muertas fueron puestas en cámara húmeda durante una semana y luego trasferidas a trampa de White para la colección de infectivos juveniles cuando se encontraron nematodos y cuando se encontraron hongos se mantuvieron en cámara humedad para inducir la esporulación [57], [58], luego se sembraron en cajas de petri con agar de dextrosa de papa (PDA) para aislar el hongo puro, para su posterior evaluación de patogenicidad primero en larvas de *Galleria mellonella* y posteriormente con las cepas que causaron más mortalidad se evaluaron en larvas de la polilla guatemanteca de la papa *Tecia solanivora* [59].

La metodología se encuentra representada en diagrama de flujo el cual se presenta a continuación y posterior a él se presenta en detalle la explicación de cada paso de dicha metodología.

Diagrama 1. Diagrama de flujo de la metodología



Fuente: las autoras

8.1 CRÍA DE *Tecia solanivora*

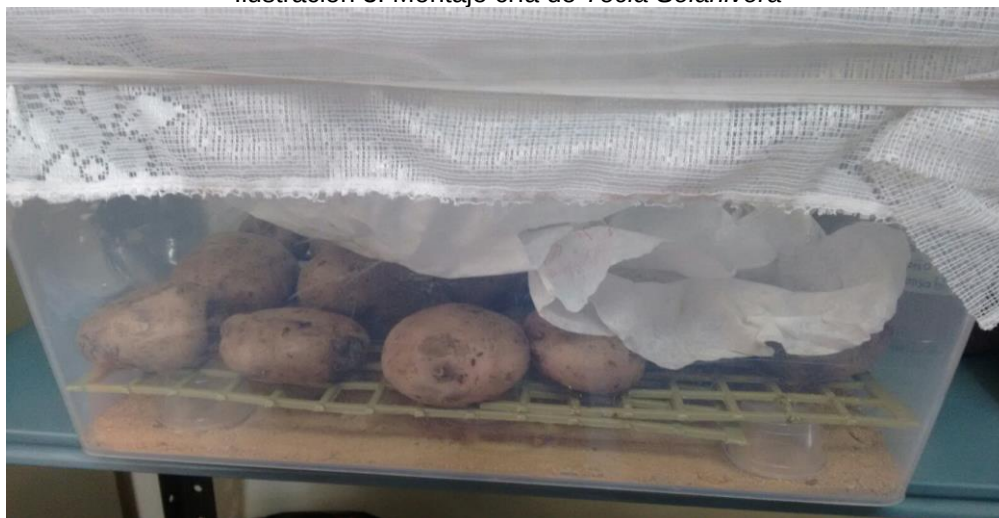
La cría de la polilla de la papa *tecia solanivora* se inició a partir de huevos provenientes de una cría de CORPOICA Tibaitatá. En unas cajas plásticas de 50 cm de largo 40 de ancho y 15 de profundidad se colocó una capa de arena cernida de un centímetro, una reja plástica y sobre el mismo tubérculo para cubrir toda el área de la caja. Sobre los tubérculos se colocaron trozos de papel en donde estaban las posturas de la polilla. Una vez eclosionan los huevos, las larvas de primer instar se introducen al tubérculo para alimentarse. La larva de cuarto instar salían del tubérculo hacia la arena en donde formaban un capullo, en pupa la larva no se mueve ni se alimenta y al cabo de 10 días se evidenciaban polillas adultas. Las polillas, de 1.5 mm de largo, eran capturadas con la ayuda de viales de vidrio usando el dedo índice para atraparlas dentro del vial. Los adultos capturados fueron transferidos a tarros de vidrio de medio litro (tarro de mermelada) como cámara de oviposición. Las polillas se alimentaron con un algodón humedecido con agua miel y usando como tapa un papel filtro con el propósito de que la polilla ovipositará en el. Para nuevamente iniciar el ciclo de reproducción sacando el papel y poniéndolo en el tubérculo nuevamente.

Ilustración 2. Montaje cría de *Tecia Solanivora*



Fuente: las autoras

Ilustración 3. Montaje cría de *Tecia Solanivora*



Fuente: las autoras

8.2 CRÍA DE *Gallería mellonella*

Inicialmente se compraron 200 larvas de *Gallería mellonella* (al laboratorio de insumos agrícolas Perkins, Palmira, Valle del Cauca) para iniciar el proceso de crianza y reproducción. El tiempo de metamorfosis de la larva dependió de algunas variables como la humedad, dieta y temperatura que fue un factor importante ya que según ella fue variando el tiempo de crianza, donde con una temperatura aproximada a 20°C tardó en pasar a polilla de veinte a treinta días, pero con temperaturas superiores a 30°C el tiempo fue aproximado de quince días. También se debió controlar la humedad relativa la más recomendada fue de 80% la cual disminuyó la mortalidad de los individuos, otro factor que alteró el desarrollo fue la dieta que se le proporcionaba a la larva. Se realizó de la siguiente manera, para obtener un kilogramo de la dieta se inició con una mezcla de los siguientes ingredientes 464 gramos de salvado de maíz y 69 gramos de levadura seca. Aparte se derritieron 67 gramos de cera de abejas para adicionar a la primera mezcla. También se agregó 207 gramos de glicerina y 193 gramos de miel de abejas, para finalmente obtener una mezcla homogénea como alimento para la cría de las larvas de la *galleria* [60], [61]. Las larvas se ubicaron en recipientes plásticos con la dieta descrita anteriormente dentro de un cuarto caliente manteniendo la temperatura a 30°C, se usó un calentador ambiental. Las larvas permanecieron en estas condiciones hasta que alcanzaron el estado de pupa [33], [44]. Cuando la larva comenzó su estado de pupa dejó de alimentarse, en este estado los individuos se trasladaron a recipientes plásticos diferentes pero manteniendo las condiciones de temperatura y humedad. El capullo de color blanco se mantuvo en estas condiciones por alrededor de 20 días para formar el adulto [44], [62].

Ilustración 4. Cría de *Gallería mellonela* en la dieta



Fuente: las autoras

Durante la fase adulta los individuos se trasladaron a otros recipientes de mayor tamaño con una cubierta de tul, en donde se colocó algodón empapado de agua-miel (disolución concentrada de azúcar) como fuente de alimento. También se introdujo un pedazo de papel encerado, el cual estaba doblado varias veces en forma de acordeón y engrapado en varios sitios, para que sirviera como sitio de oviposición. Finalmente se mantuvieron aproximadamente en cada recipiente unas 60 polillas adultas. Posteriormente los papeles con los huevos fueron trasladados a recipientes con la dieta previamente preparada para continuar con una nueva generación en el desarrollo de la cría [33], [62], [59].

Ilustración 5. Larva *Gallería Mellonela* vista al estereoscopio



Fuente: las autoras

8.3 MUESTREO DE SUELOS

El aislamiento de patógenos estuvo determinado por la posibilidad de salir a campo para recolectar muestras de suelo y la capacidad del laboratorio para procesarlas. No respondió a un muestreo estadísticamente diseñado, debido a que el propósito de esta investigación no fue comparar la riqueza de patógenos entre los sitios muestreados. El objeto del muestreo fue aislar patógenos en diferentes condiciones para luego evaluarlos en bioensayos. El muestreo consistió en una mezcla de porciones de suelo tomadas al azar de un terreno homogéneo, siendo seleccionadas con diferentes rangos de elevación, texturas y variedad de ecosistemas como campos, bosques, pastizales, parques, zonas ribereñas etc. En cada terreno muestreado se tomaron tres sub-muestras del suelo a dos profundidades 1-10 cm y 10-25 cm en una área de $10m^2$, utilizando una pala o de mano para la extracción, se mezclaron en un recipiente hasta homogenizarla. El volumen de la muestra fue de 1 kg de suelo, se almacenaron en una bolsa plástica doble para evitar filtraciones, también se mantuvieron en un refrigerador de 8-15 °C durante el transporte al laboratorio, entre muestras se debió lavar las herramientas de recogida con agua y cuidadosamente desinfectar frotándolo con alcohol o solución de cloro al 0.5 % para evitar la contaminación de la siguiente unidad de muestra [32], [63].

Los materiales básicos que se utilizaron fueron el machete, pala, balde, Bolsas plásticas limpias, marcadores y hojas para identificar las muestras. Por otra parte se tuvo en cuenta la siguiente información de cada sitio muestreado: La ubicación del sitio incluyendo localidad, área, nombre del sitio y la de información GPS coordenadas, la fecha, el tipo de ecosistema, la vegetación asociada y la elevación [64], [65].

8.4 AISLAMIENTO DE LOS PATÓGENOS EN MUESTRAS DE SUELOS

En todos los ensayos los tratamientos se repitieron cinco veces para obtener una precisión en las medidas siendo manejables en terminos del espacio ocupado y en el número de organismos requeridos para el montaje de dichos ensayos. Tener menos repeticiones hubiera implicado disminuir precisión en las medidas y tener mas hubiera producido una dimensión de ensayos difíciles de manejar en términos de espacio y materiales. Cada unidad experimental contó con 5 organismos, esto se debe a que las unidades experimentales fueron pequeñas y de acuerdo a observaciones preliminares asignar más larvar en un espacio pequeño hubiera generado que se atacarían entre si e incluso matar. Cinco es el número máximo de larvas que se pudieron colocar dentro de un recipiente pequeño en los cuales se montaron las unidades experimentales.

Inicialmente para realizar el aislamiento de patógenos en las muestras de suelo se tuvo que retirar los residuos como rocas, trozos de madera, corteza, hojas, o cualquier otro residuo orgánico de la muestra, para eliminar y evitar la contaminación con microorganismos saprófagos. También a la muestra se le debió añadir agua, para conservar la humedad de origen.

Se colocó aproximadamente 250 a 500 cm de suelo húmedo en un recipiente limpio y se añadió 5 larvas de *G. mellonella* en el último estadio sobre la superficie del suelo de cada muestra con tapa cada recipiente por 5 días, a una temperatura ambiente, por lo general de 22 a 24 °C. Aunque se debió tener en cuenta la temperatura de origen y por lo general una temperatura más fría en las zonas templadas (por ejemplo, 15 °C) y uno más cálido en la zona tropical (por ejemplo, 30 °C). Después se retiraron los insectos muertos de la tierra cada 2-3 días, en donde las larvas sanas se añadieron nuevamente a la muestra de suelo para extraer más patógenos de él. [64], [65].

8.5 AISLAMIENTO DE LOS PATÓGENOS EN LABORATORIO

Las larvas muertas encontradas en las muestras de suelo con sospecha de patógeno fueron puestas en cámaras húmedas durante una semana y después transferidas a la trampa de White para la colección de infectivos juveniles cuando se sospechaba que el patógeno era un nematodo. En el caso de los hongos se mantuvieron en las cámaras húmedas para inducir la esporulación [58]. Se procedió a realizar el aislamiento mediante la esterilización de las cajas de Petri en una autoclave, al mismo tiempo se introdujo en ella un Erlenmeyer con 500ml de agua destilada más 19.5 gr de medio de cultivo con agar de dextrosa de papa para ser repartido en las cajas de Petri, llevándose a cabo este proceso en la cámara de flujo laminar hasta su estado sólido para proceder con la siembra de los hongos aislados en el laboratorio. Se observó su crecimiento durante una semana logrando el aislamiento de cada sepa luego de varios reaislamientos de los hongos, eliminando impurezas [32], [63].

Ilustración 6. Montaje aislamiento de hongos-cámara húmeda



Fuente: las autoras

8.6 AISLAMIENTO DE LOS NEMATODOS ENTOMÓFAGOS

El aislamiento de los nematodos entomófagos se hizo por medio de una trampa de White (con suelo). La trampa de White con suelo consistió en un plato Petri grande (15 cm de diámetro) en el que se puso en 35 mililitros de agua destilada y otro plato Petri más pequeño (9 cm de diámetro), dentro del cual se colocó un papel filtro húmedo y sobre este 10gr del suelo de la muestra, fue importante mantener la humedad de las muestras de suelo. Los nematodos entomopatógenos, retenidos en el agua, fueron observados a los 20 días para verificar su existencia [32], [63].

Al encontrar en las trampas de Bedding cadáveres con evidencia de haber sido muertos por nematodos, el cadáver presentó una coloración café rojiza estos fueron colocados en una trampa de White modificada. Esta es muy similar a la descrita en el párrafo anterior pero en lugar de poner la muestra de suelo en la caja de petri del interior se colocó el cadáver de la larva que se deseó evaluar. Todas las larvas que se sospechó que contenían nematodos se sometieron a este procedimiento [32], [63], [58].

Si las larvas muertas tenían olores fuertes y desagradables, era posible que estuvieran contaminadas con bacterias no deseadas, en este caso no se hizo ningún aislamiento. Si las larvas tenían un aspecto duro, era probable que se encontraran infectadas con hongos u otro tipo de organismos de descomposición [32], [66], [67].

8.7 AISLAMIENTO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Cuando se tuvo evidencia que una larva de la trampa de Bedding fue infectada y muerta por un hongo el cadáver presento una apariencia de color verde y blanco, esta se colocó en una cámara de humedad para inducir el desarrollo del hongo y su posterior esporulación. Dicha cámara consistió en una caja de Petri pequeña (de 5 cm de diámetro) en cuyo fondo se colocó papel filtro humedecido. Esta tapa/fondo de caja de Petri se colocó dentro de una caja de Petri más grande en el fondo donde se agregaron 4 ml de agua destilada y se selló con parafilm. Las cámaras de humedad fueron colocadas en el laboratorio a temperatura ambiente durante una semana al cabo de la cual se observó el desarrolló del micelio y las conidias. Una vez esporuladas las larvas se les asignaron un código a la cepa aislada y se sembró en 5 cajas de Petri con PDA por cada aislamiento. Dichas cajas se incubaron para inducir la esporulación. Las esporas fueron removidas del medio de crecimiento y transferidas a envases de vidrio previamente esterilizadas para almacenar las esporas en un congelador. Parte de las esporas producidas de esta manera fueron usadas para las pruebas de patogenicidad siguiendo los postulados de Koch [32], [56], [55], [26].

Para conseguir un medio solido se agrego una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal). El cual no tuvo valor nutritivo sino que sirvio simplemente para mantener la humedad por un tiempo mas o menos prolongado. La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, dedido que cuando comienza a disminuir, la formacion de micelio tambien disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas y conidias) y de conservación

(clamidosporas). El agar empieza a derretirse a los 80°C y soporta temperaturas altas sin descomponerse, solidificándose entre los 35 °C y 50°C [23], [24], [25], [26].

Una vez logrado el cultivo puro del hongo de interés se extrajeron las esporas para introducirlas en tarros de vidrio con tapa de 100 ml adicionando 50 ml de agua destilada y esterilizada más una gota de tween 80, de la caja Petri se raspo el hongo con un asa microbiológica para sumergir las esporas y agitar manualmente por 3 minutos para homogenizar. Para hacer el conteo de esporas se adicionó una gota de la suspensión en la lámina neubauer tapándola con el cubre objetos y observándola en el microscopio, iniciando el conteo por la parte superior izquierdo en forma de espiral hasta llegar a la zona inferior izquierda, al ser una cuadrícula de cuatro secciones se contó la cantidad de conidias en cada una de ellas, luego se sacó el promedio de esporas por cada solución. Las concentraciones obtenidas se multiplicaron por 10.000 [68].

Ilustración 7. Aislamiento hongos en el medio de cultivo



Fuente: las autoras

Ilustración 8. Preparación de soluciones con las conidias esporuladas de los hongos aislados



Fuente: las autoras

8.8 REINFECCIÓN SEGÚN LOS POSTULADOS DE KOCH

La metodología de inoculación de los patógenos aislados en bioensayos consistió en la reinfeksi3n seg3n los postulados de Koch . Se tom3 una suspensi3n de nematodos o de conidias (en el caso de los hongos) en concentraciones muy altas y con ellas se infectaron larvas limpias de tercer estadío de *G. mellonella*. Se colocaron cinco larvas infectadas en una caja de petri con papel filtro en el fondo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 d3as. Este procedimiento se repiti3 cinco veces, correspondientes a las repeticiones, por cada pat3geno evaluado. Para cada ensayo se mont3 un testigo que tuvo las mismas condiciones experimentales pero que no se inocul3 con pat3genos. Durante el tiempo de observaci3n se anot3 cada 24 horas el n3mero de larvas muertas.

8.9 EVALUACI3N DE LOS PAT3GENOS EN *T. SOLANIVORA*

Del ensayo descrito en la secci3n anterior se seleccionaron los pat3genos m3s promisorios, es decir los que causaron una mortalidad de por lo menos el 80% en las larvas de *G. mellonella*. Estos pat3genos fueron evaluados en altas concentraciones en un bioensayo con *Tecia solanivora*, de acuerdo con lo reportado en la literatura especializada. En estos ensayos cada cepa promisorio constitu3a un tratamiento y se tuvo un testigo y cada tratamiento se repiti3 cinco veces. La unidad experimental consisti3 en tarros pl3sticos dentro de cada uno de los cuales se introdujo las larvas de *T. solanivora* de tercer o cuarto instar. Sobre la larva se aplicaron tres gotas de la suspensi3n del pat3geno (hongo o nematodo) a una concentraci3n aproximada de 500 conidias/NEPS por ml. Esta alta concentraci3n tuvo el prop3sito de maximizar la probabilidad de infecci3n. Se observ3 las larvas diariamente durante cinco d3as y se anot3 la mortalidad de los individuos. Los cad3veres se trasladaron a una trampa White en caso de los nematodos o a una c3mara humedad, en el caso de los hongos, para re-aislar los pat3genos y completar los postulados de Koch como ya se describi3 en los apartados anteriores [54], [55], [56].

8.10 DESCRIPCI3N DE LOS AN3LISIS ESTAD3STICOS

Este proceso se inici3 con los c3lculos de las 3reas bajo la curva de los datos de mortalidad de los ensayos, usando el programa OriginPro 2016. Con el fin de obtener el total de mortalidad en todo el periodo de tiempo del experimento y no en uno espec3fico. Es decir que para cada una de las cinco repeticiones de cada ensayo se traz3 una curva determinada por el tiempo (24, 48, 72, 96 y 120 horas) y el porcentaje acumulado de mortalidad para cada periodo de evaluaci3n. Ya que no nos interesaba cuantos individuos se mor3an en cada fase del tiempo sino maximizar la mortalidad para evaluar la efectividad de los pat3genos en los cinco d3as. Este n3mero de d3as se estableci3 teniendo en cuenta que las larvas se ten3an en condiciones artificiales dif3ciles de superar a los cinco d3as, al tener condiciones adversas tampoco se puede asegurar la supervivencia del testigo a m3s de este tiempo . Al calcular el 3rea bajo la curva se obtuvo un solo dato num3rico que agrupo la tendencia de la mortalidad en el tiempo.

Con estos datos se continuó con los análisis estadísticos en el programa SPSS Statistics, en donde se empezó haciendo un análisis de varianza de una vía. Con el fin de medir la discrepancia entre los grupos y la media global, de forma que si no hay había diferencia entre ellos (la hipótesis nula es cierta) se obtendría variabilidades pequeñas, si por el contrario la hipótesis nula es falsa se esperó que la variabilidad entre los grupos fuera grande. siendo la mortalidad el único factor a evaluar. Porque el objetivo de este proyecto es evaluar mortalidad con ensayos homogéneos. Cuando se encontraron diferencias significativas (valor de probabilidad de F mayor al error alfa) se hizo prueba de comparación múltiple Tukey que permitió comparar entre parejas de tratamientos para verificar cuales fueron estadísticamente diferentes [56], [55], [70].

El valor de significancia utilizado fue de 0.05 el cual se tuvo de referencia porque las condiciones de los ensayos estuvieron controladas en laboratorio y las unidades experimentales fueron recipientes pequeños con micro condiciones ambientales.

En el caso que la significancia en el ANDEVA tuviera un valor mayor a 0.05 (que es el valor de α), se aceptó la hipótesis nula que indica que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos aplicados. En estos casos se dio por terminado el análisis estadístico. En el caso que la significancia tuviera un valor menor a 0.05 se aceptó la hipótesis alternativa que indica que sí existe una diferencia significativa entre los tratamientos [70], [71], [72]. Posteriormente se procedió a verificar la homogeneidad de varianza usando la prueba de Levene. En el caso que la significancia fuera menor a 0.05 se rechazó la hipótesis de igualdad de varianza y se usó una prueba de Dunnett que permitió comparar todos los tratamientos entre sí y con el testigo [71]. Si en la prueba de Levene la significancia era mayor a 0.05 se aceptó la hipótesis que indica que las varianzas son homogéneas. En este caso para la comparación múltiple se utilizó una prueba de Tukey que permite comparar las medias de los tratamientos después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de varianzas [70], [71], [72].

9. RESULTADOS

9.1 RESULTADO DE LA CRÍA DE *Tecia solanivora*

Esta especie requirió de menos tiempo así que se logró mantener esta cría con menores inconvenientes y el aumento de la población fue exitoso en un periodo de tiempo más corto.

9.2 RESULTADO DE LA CRÍA DE *Galleria Mellonela*

Se inició la cría comprando el material biológico en el laboratorio comercial Perkins (Palmira, Valle del Cauca). Para lograr establecer la cría de larvas de *Galleria mellonella* se tuvo que repetir por cuatro ocasiones la compra de 200 larvas, ya que esta especie requiere de condiciones específicas de temperatura, humedad y una alimentación adecuada para su óptimo desarrollo. Inicialmente la temperatura fue el problema debido a que las larvas provenían de una región de clima cálido y por esta razón se debía aumentar la temperatura ambiente de su hábitat, se pensó en la adaptación de una caja con un bombillo pero como resultado en pocas horas se obtuvo la pérdida total de la cría por el excesivo aumento de calor en la caja. Luego se adaptó una mesa con una cubierta oscura para conservar el calor del bombillo en la zona, aumentando la distancia de las larvas a la fuente de calor, como resultado se presentó nuevamente la pérdida total de la cría al cabo de una semana. Finalmente se adaptó un pequeño laboratorio como cuarto de cría donde se utilizó como fuente de calor un calentador doméstico el cual funcionó perfectamente y se logró obtener una condición estable de 26° C con una humedad relativa de 40%, condiciones que favorecen a esta especie. Para aumentar la humedad se mantuvieron baldes con agua [32], [60].

Durante el establecimiento de la cría se probó una dieta a base de cereal para bebés como 187g nestum 5 cereales, 187g nestum miel, 120g de germen de trigo, 148g azúcar granulado, 219cc glicerina líquida y 138cc agua destilada para obtener un kilogramo de dieta [61]. Esta dieta tenía el inconveniente de secarse rápidamente y tomar una textura demasiado dura, deteriorando el crecimiento de las larvas y aumentando su muerte, principalmente en los primeros estadios. Finalmente se utilizó la dieta reportada por CENICAFE [60] a base de salvado de trigo (esto se cambió con respecto a la dieta original que usa salvado de maíz), glicerina, cera de abejas, miel y levadura. Con esta dieta se logró mantener la cría de *Galleria mellonella* exitosamente pasando por todas las etapas del ciclo de vida de la especie obteniéndose una gran cantidad de larvas para los ensayos. Las larvas de último instar obtenidas eran notablemente más grandes que las adquiridas como pie de cría [61], [32], [60].

Se mantuvieron aproximadamente 5000 larvas en un kilogramo de dieta distribuida en tarros plásticos iniciando desde la oviposición con un conteo inicial de la cantidad aproximada de huevos. La cría se distribuyó en 9 cajas plásticas rectangulares de 30x20cm y 10 cm de alto con tapa hermética. En cada caja se introdujo 500 gramos de dieta, en la medida que las polillas adultas ovipositaban en el papel filtro provisto

para este fin, se introducían los trozos de papel con las posturas dentro de las cajas, de manera a que cuando las larvas de primer instar emergieran se introdujeran directamente en la dieta. El ciclo total de la *Galleria* dura dos meses aproximadamente con las condiciones descritas anteriormente, cuando pasan a la etapa adulta de polilla su tiempo de vida es de una semana aproximadamente mientras ovipositan nuevamente y continúa su desarrollo [60], [32] .

Se dio seguimiento al crecimiento de las larvas dentro de las cajas anteriormente descritas. Al necesitar larvas para los ensayos se extraían de las cajas de cría. Las larvas restantes se dejaron en las cajas para que completaran su ciclo de crecimiento. Las larvas de último instar empuparon en las paredes de los recipientes. Una vez emergía el adulto de la pupa se transfería a un recipiente de oviposición. Este recipiente es un tarro plástico de aproximadamente un litro y medio con una boca ancha. Se proveyó a las polillas adultas agua miel como fuente de alimento, empapando bolitas de algodón sostenidas dentro del tarro con alambre dulce. Dentro del tarro de oviposición se introdujeron trozos de papel de 12 cm x 6 cm doblados en forma de acordeón y sujeto con una grapa. El recipiente de oviposición se tapó con una papel filtro (de café) sostenido por una banda elástica. Después de dos días se recogían tanto los acordeones de papel como la tapa de papel filtro para recolectar los huevos. Al inicio del proceso de cría se hizo un conteo de huevos para tener una idea de la cantidad y la velocidad de reproducción. Se recortaron las porciones de papel con las posturas para ser introducidas posteriormente a las cajas con dieta [60], [32].

Tabla 1. Ciclo de *Galleria*

Tarro	Huevos	Oviposición	Eclosión	Pupa	Polillas
1	2408	10/jul/2015	21/jul/2015	18/ago/0215	04/sep/2015
2	1661	10/jul/2015	21/jul/2015	18/ago/0215	04/sep/2015
3	2995	10/jul/2015	21/jul/2015	18/ago/0215	04/sep/2015
4	4064	13/jul/2015	24/jul/2015	22/ago/0215	10/sep/2015
5	3868	13/jul/2015	24/jul/2015	22/ago/0215	14/sep/2015
6	1990	15/jul/2015	29/jul/2015	27/ago/0215	18/sep/2015
7	3280	21/jul/2015	31/jul/2015	31/ago/2015	22/sep/2015
8	2980	24/jul/2015	03/ago/0215	01/sep/2015	26/sep/2015
9	2337	29/jul/2015	06/ago/0215	05/sep/2015	01/oct/2015

Fuente: las autoras

Ilustración 9. Montaje cría *Gallería*



Fuente: las autoras

9.3 RESULTADO DEL PROCESO DE AISLAMIENTO

Las muestras de suelo traídas de campo referidas en la tabla 2 se pusieron en recipientes transparentes plásticos con tapa de forma circular de diámetro 6 cm y altura 5cm como se describe en la metodología de Bedding introduciendo cinco larvas de *G. melonella* [59]. Para cada muestra de suelo se hicieron 5 repeticiones identificadas por el nombre del lugar y el número consecutivo de repetición del 1 al 5 de la respectiva muestra de suelo, se mantuvieron en observación durante 5 días para identificar síntomas de infección por patógenos del suelo, [22], [16], se reconoce la larva infectada por sospecha de hongo debido a los cambios de coloraciones rojizas, verdosas, blancas y negras, en la tabla 3 referida más adelante se muestra la mortalidad encontrada en las trampas de Bedding [59].

Tabla 2. Muestra de suelos

Nombre del lugar	Fecha de la muestra	Descripción	Coordenadas geográficas
Huerta Multiparque vía Chía	12/mayo/15	Es un lugar que cuenta con poco terreno y espacio pero donde se encuentra gran variedad de cultivos en pequeñas proporciones y suelos nutridos con abono orgánico sin ningún control químico.	4°48'25.58"N -74° 2'11.20"O
Nacedero de agua Multiparque	10/julio/15	Es una área limitada y encerrada con bastante humedad, la cual es considerada una zona de conservación ambiental por ser un nacedero de agua dulce donde se observa variedad de vegetativa tanto acuática como terrestre.	4°48'23.67"N 74° 2'4.19"O
Vía Tocancipa	05/agost/15	Es zona de llanura con poco flujo de personas con bastante presencia de pasto pero con pocas plantaciones de árboles y flores.	4°59'5.90"N 73°54'8.20"O
Drenaje embalse Tomine	05/agost/15	Área densamente poblada de vegetación con poco acceso a personas y con alta humedad en el ambiente, también con plantas acuáticas y terrestres.	5° 3'18.16"N 73°49'9.40"O
Quebrada vía Choconta	05/agost/15	Es un lugar bastante boscoso y con mucha humedad debido a la quebrada del terreno, con gran variedad de vegetación e insectos, pero acceso limitado a personas por la pendiente inclinada y la montaña que la cubre.	5° 5'0.63"N 73°44'24.20"O
Montaña vía Villapinzon	05/agost/15	Es un lugar un poco árido con mediana afluencia de personas con poca presencia de árboles y variedad de vegetación, con pendiente medianamente empinada.	5°12'28.10"N 73°36'9.80"O
Cultivo de papa Villapinzon	05/agost/15	Es una zona que presenta en los alrededores ganado y cosechas de papa, una vivienda familiar y con poca variedad de vegetación.	5°14'26.40"N 73°35'25.80"O
Cultivo de papa vía puente de Boyacá	05/agost/15	Es una área con actividad ganadero en pequeños terrenos y en donde hay cultivos de papa sin gran variedad vegetativa.	5°14'26.40"N 73°35'25.80"O

Bosque Pacho Cundinamarca	30/mayo/15	Es una zona con bastante presencia de vegetación e insectos y con alta afluencia de personas aunque cercano a un área de montaña.	5° 8'3.49"N 74° 9'11.26"O
Samacá	07/oct/14	Es un terreno aislado de la población que cuenta con diversidad animal y vegetal en cuanto a pequeñas especies, pero con poca afluencia de actividades humanas.	5°29'54.79"N 73°28'14.28"O
Finca agrícola Pacho	30/mayo/15	Es un lugar húmedo con presencia de biodiversidad animal y vegetación, con zonas boscosas aledaña al río Batán y con pequeñas actividades agrícolas.	5° 8'46.27"N 74° 8'10.03"O
Huerta casera Tenjo	02/sept/15	Es un área con poco terreno y espacio pero donde se encuentra gran variedad de cultivos en pequeñas proporciones y suelos nutridos con abono orgánico sin ningún control químico y muy cerca una vivienda familiar.	4°52'49.65"N 74° 7'20.90"O
Bosque peaje Chía	02/sept/15	Es un terreno árido con poca humedad pero a sus alrededores bastantes árboles con alturas elevadas y poca diversidad de plantaciones en suelo, sin ninguna actividad agrícola cerca pero con lugares de recreación a la población.	4°51'59.67"N 74° 2'26.25"O
Quebrada vía al peaje de Chía	02/sept/15	Es un suelo con alta humedad debido a la quebrada y la gran biodiversidad de la zona, teniendo a pocos metros un cultivo de calabazas rodeado por múltiples árboles de gran tamaño, sin presencia de actividades humanas cercanas.	4°50'3.88"N 74° 2'39.90"O
Humedal Tibanica	23/agost/15	Es un área protegida debido a su riqueza natural con biodiversidad acuática y terrestre, aunque se encuentra cerca de zonas residenciales, pero con bastante zonas verdes y presencia de ganado	4°36'18.54"N 74°12'29.50"O
Quebrada la vieja Bogotá	16/sept/15	Es un lugar con zonas residenciales aledañas que cuenta con diversa cobertura vegetal siendo una zona húmeda pero con un terreno limitado por la presencia de la población y el pequeño flujo de agua que corre por la quebrada.	4°39'2.91"N 74° 2'58.66"O

Fuente: las autoras

Ilustración 10. Montaje trampa Bedding



Fuente: las autoras

Tabla 1. Numero de larvas infectadas de cada repetición de ensayos

Muestra de suelo (Ensayo)	Nº de Larvas infectadas por repetición (I a V)				
	I	II	III	IV	V
Huerta Multiparque vía Chía	2	0	4	2	0
Nacedero Multiparque	2	3	3	4	0
Vía Tocancipá	0	4	0	4	4
Drenaje embalse Tominé	0	0	3	4	0
Quebrada vía Chocontá	0	0	2	3	2
Montaña vía Villapinzón	0	0	0	4	0
Cultivo de papa Villapinzón	4	0	5	0	4
Cultivo puente de Boyacá	2	4	2	5	4
Bosque de Pacho Cundinamarca	0	0	0	0	0
Samacá	0	0	0	0	0
Finca agrícola Pacho	0	0	0	0	0
Huerta casera Tenjo	5	3	0	2	3
Bosque peaje Chía	2	1	0	2	4
Quebrada peaje de Chía	3	2	4	0	2
Humedal Tibanica	2	0	3	0	0
Quebrada la vieja Bogotá	0	0	0	0	0

Fuente: las autoras

Las larvas con síntomas de infección se pasaron a cámara húmeda por medio de caja petri grande con papel filtro humedecido con agua destilada y en su interior una caja petri de menor tamaño con la larva infectada para finalmente sellarla con papel vinipel dejándolas en observación durante una semana para evolución del patógeno y producir la esporulación del hongo [32], [55].

Después de varias repeticiones en la cámara húmeda solamente se pudieron aislar hongos, no se logró aislar ningún nemátodo entomopatógeno. Se encontró un individuo que presentaba síntomas de infección por nematodos (coloración rojiza) pero al tratar de aislarlos el cadáver se secó y se infectó por hongos saprófitos por lo que no se logró la extracción de nematodos. Por esta razón se compró una cepa del nemátodo *Heterorhabditis* (Cepa Tumaco) y otra de *Steinernema feltiae* sp en el laboratorio de insumos biológicos Perkins, Palmira, Valle del Cauca. Los resultados de los ensayos con estos nemátodos se reporta más adelante en esta sección. En el caso de los hongos sí se obtuvieron cadáveres momificados en donde se formaron las esporas características de *Beauveria* spp (espora blanco perlado) y *Metarhizium* spp. (Espora verde). Se logró el aislamiento de dichas esporas en cajas de Petri con agar de dextrosa de papa (PDA). Se hicieron varios reaislamientos para limpiar las cajas de Petri de contaminantes (bacterias y hongos saprófitos) [68], [18]. Una vez logrado el cultivo puro del hongo de interés se extrajo las esporas para hacer las pruebas de patogenicidad sobre larvas de *Galleria melonella*. En total se obtuvieron siete cepas de hongos 5 de *Metarhizium* spp y 2 de *Beauveria* spp, como se muestra en la tabla 4 a continuación. Para confirmar los signos de la infección por hongos y para tener un testigo comercial, se adquirió una cepa comercial de *Beauveria bassiana* y otra de *Metarhizium anisopliae* [16], [48].

Tabla 2. Descripción cepas aisladas

Hongo	Descripción	Suelo	Imagen	Código
1	Su forma es circular con tonalidad verde pálido con pliegues denotando el crecimiento de adentro hacia fuera	Huerta granja Multiparque		USTABOGMULTIPARQUE I-15
2	Presenta forma irregular que tienden a ser circular con un aspecto esponjoso y diferentes tonalidades de verde con un borde blanco	Villa pinzon		USTAVILLAPINZON I-15
3	Se aprecian pequeños círculos separados, con coloración verde y borde amarillo mostaza en comparación a los demás hongos su tamaño es menor.	Choconta		USTACHOCONTA I-15
4	Predomina una formación blanca de aspecto esponjoso y traslucido con forma irregular que recubre unas pequeñas áreas verdes del centro.	Chia		USTACHIA I-15
5	Se nota una mezcla de colores de tonalidad pastel con apariencia cristalina y cobertura blanca delimitando la parte beis.	Tenjo		USTATENJO I-15
6	Su forma es irregular de apariencia arenosa con pliegues crecientes de colores verde grisáceo y borde beis pálido.	Boyaca 3		USTABOYACA I-15
7	Su apariencia es totalmente fragmentada con aspecto granular de coloración curuba distribuido uniformemente.	Boyaca 2		USTABOYACA II-15

Fuente: las autoras

9.4 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS CON *Galleria mellonella*

9.4.1 Ensayos de las cepas I y II en *G. mellonella*

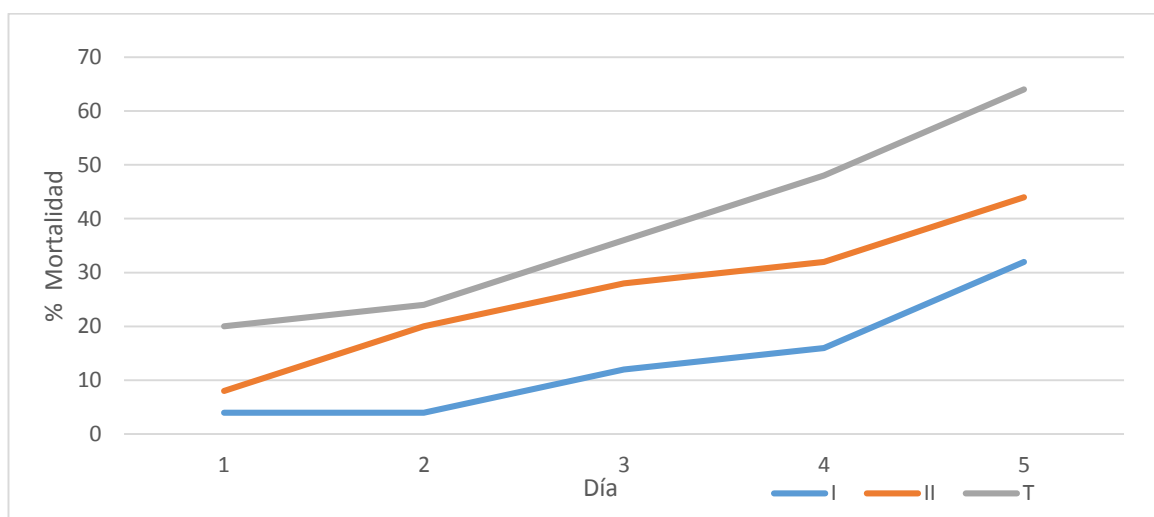
Tabla 3. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. mellonella* de las cepas I y II (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).

Repetición	Primer día			Segundo día			Tercer día			Cuarto día			Quinto día		
	I	II	T	I	II	T	I	II	T	I	II	T	I	II	T
A	0	0	0	0	1	0	0	1	2	0	1	3	1	2	4
B	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	2	1	2
C	0	0	1	0	1	1	0	2	2	1	2	2	1	2	2
D	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	2	2	3
E	0	1	3	0	2	4	1	3	4	1	3	5	2	4	5

Tratamientos: I: USTABOGMULTIPARQUE I-15, II: USTAVILLAPINZON I-15, T: TESTIGO

Fuente: las autoras.

Gráfica 1. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. mellonella* de las cepas I y II (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)



Tratamientos: I: USTABOGMULTIPARQUE I-15, II: USTAVILLAPINZON I-15, T: TESTIGO

Fuente: las autoras

En la gráfica 1 se pudo apreciar que el testigo tuvo una mortalidad de más del 60%, mientras que el tratamiento I solo alcanzó una mortalidad aproximada de 30% y el II 44%. La alta mortalidad del testigo invalidó los resultados de este bioensayo, ya que es imposible distinguir el efecto de la variable independiente de interés (la presencia de esporas de patógenos) de los efectos de las condiciones experimentales sobre la mortalidad de los individuos. Estos efectos pudieron presentarse por un exceso de humedad dentro de las cajas plásticas y la falta de aireación. En la gráfica se nota visualmente una aparente diferencia entre los tratamientos.

Los resultados en ANDEVA mostraron que las diferencias en los tratamientos I, II y el testigo no son estadísticamente significativas por el valor de probabilidad de F fue de 0.137.

Esto pudo deberse a que fueron los primeros diseños de bioensayos y probablemente las condiciones experimentales no favorecieron la supervivencia de las larvas evaluadas. Además en la manipulación de las larvas se montaron de último las unidades experimentales correspondientes al testigo, por lo tanto los organismos fueron los que tuvieron condiciones más difíciles lo que pudo haber afectado su supervivencia. En este ensayo la concentración de las conidias fue baja en comparación de los ensayos posteriores (2.7×10^6 conidias/ml vs aproximada de 6×10^6 conidias/ml).

9.4.2 Ensayos de las cepas II, IV, V y VI en *G. mellonella*

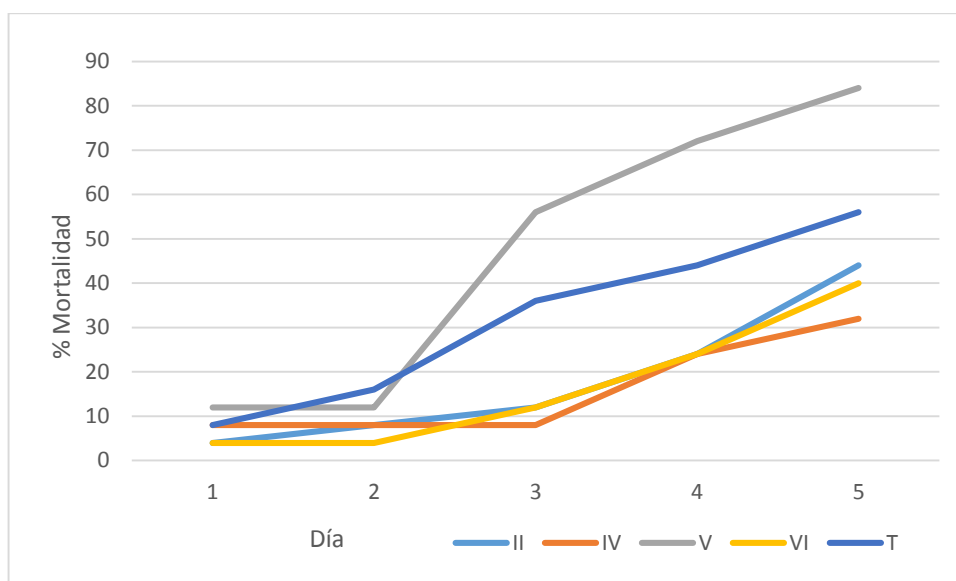
Tabla 4. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. mellonella* de las cepas II, IV, V y VI aisladas (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).

Repetición	Primer día					Segundo día					Tercer día					Cuarto día					Quinto día				
	II	IV	V	VI	T	II	IV	V	VI	T	II	IV	V	VI	T	II	IV	V	VI	T	II	IV	V	VI	T
A	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	2	3	1	1	1	2	3	2	3
B	0	0	1	1	3	0	0	1	1	4	0	0	5	3	4	0	0	5	3	4	1	1	5	3	5
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	3	0	5	2	1	3	1	5	3	1	4	3	5
D	0	0	1	0	1	1	0	1	0	2	1	0	4	0	5	1	2	5	0	5	2	3	5	1	5
E	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	2	1	2	1	2	4	1	4	1	2

Tratamientos: II: USTAVILLAPINZON, IV: USTACHIA I-15, V: USTATENJO I-15, VI: USTABOYACA I-15, T: TESTIGO

Fuente: las autoras

Grafica 2. Ensayo de patogenicidad en larvas de G. melonella de las cepas II, IV, V y VI aisladas (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)



Tratamientos: II: USTAVILLAPINZON, IV: USTACHIA I-15, V: USTATENJO I-15, VI: USTABOYACA I-15, T: TESTIGO

Fuente: las autoras

En la gráfica 2 la cepa V visualmente presento un comportamiento diferente a los demás tratamientos debido a que su porcentaje de mortalidad acumulada al quinto día es mayor al 84%, mientras que el testigo alcanzo el 56% y los demás tratamientos (El III un 44%, el IV un 32% y el VI un 40%) muestran un comportamiento similar. Al igual que en el ensayo anterior la mortalidad del testigo es inaceptablemente alta, lo que indica que las condiciones experimentales siguen siendo un factor importante en la mortalidad de las larvas.

La prueba ANDEVA muestro un valor de significancia de 0.010 que estableció que sí existen diferencias entre la mortalidad de los tratamientos analizados. Al aplicar la prueba de Levene se encuentra una homogeneidad de varianza (la significancia del estadístico fue de 0.349). Al realizar el análisis de Tukey para comparación múltiple se encontraron dos grupos estadísticamente diferentes entre sí. En el primer grupo están el testigo y el tratamiento V, estadísticamente iguales entre sí pero diferentes al segundo grupo (tratamientos II, IV y VI) [55], [70].

A pesar de que los análisis estadísticos muestran diferencias entre los tratamientos no se puede determinar si el porcentaje de mortalidad es a causa del patógeno o condiciones experimentales debido al alto porcentaje de mortalidad del testigo. La mortalidad del testigo pudo ser causada por la humedad en el interior del recipiente ya que las larvas en el momento del montaje fueron humedecidas con la solución dentro de la caja dejando una condensación en el recipiente alterando su entorno habitual. A pesar de la invalidez de este segundo ensayo se detecta que el tratamiento V sí tiene un efecto sobre la mortalidad por lo que esta cepa se volvió a evaluar con mejores condiciones experimentales en otro ensayo. Los dos primeros ensayos fueron valiosos ya que permitieron descartar algunas condiciones experimentales que incidieron sobre la mortalidad: el exceso de humedad, el cierre hermético del recipiente, la temperatura ambiente (los primeros ensayos se realizaron en un laboratorio a la temperatura

ambiente de Bogotá ($19 \pm 2^\circ\text{C}$, los siguientes ensayos con *G. melonella* se realizaron dentro del cuarto de cría que tiene una temperatura constante de 24°C).

9.4.3 Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de las cepas VII, III, II y VI

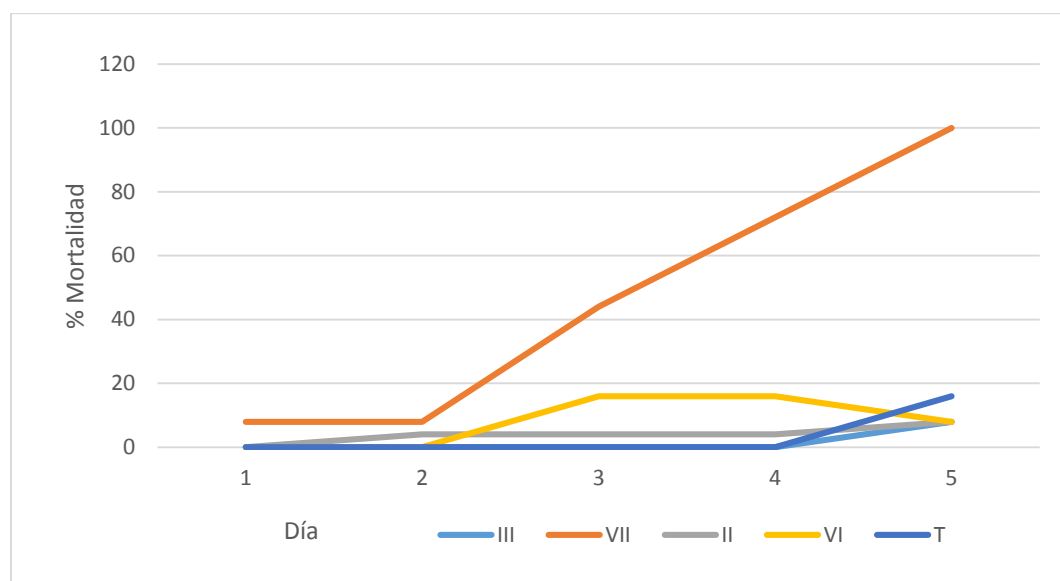
Tabla 5. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de las cepas VII, III, II y VI (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental)

R	Primer día					Segundo día					Tercer día					Cuarto día					Quinto día				
	VII	III	II	VI	T	VII	III	II	VI	T	VII	III	II	VI	T	VII	III	II	VI	T	VII	III	II	VI	T
A	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	1	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	3	0	0	3	0	5	1	0	0	3
C	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	3	0	1	0	0	5	0	1	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	4	0	0	0	0	5	0	0	1	0
E	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	1	0	4	0	0	1	0	5	1	0	1	1

Tratamientos: VII: USTABOYACA II-15, III: USTACHOCONTA I-15, II: USTAVILLAPINZON I-15, VI: USTABOYACA I-15, T: TESTIGO

Fuente: las autoras

Grafica 3. Ensayo de patogenicidad en larvas de G. melonella de las cepas VII, III, II y VI aisladas (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)



Tratamientos: VII: USTABOYACA II-15, III: USTACHOCONTA I-15, II: USTAVILLAPINZON I-15, VI: USTABOYACA I-15, T: TESTIGO
Fuente: las autoras

La gráfica 3 resalta un comportamiento más favorable debido a que la mortalidad del testigo es mínima y la mortalidad de la cepa VII es muy alta con el 100%, lo que evidencia que las condiciones del ensayo son favorables para las larvas, ya que las demás cepas mostraron mortalidades similares a las del testigo, de 8 a 16%.

Esta observación se verificó con la prueba de varianza que dio un valor de significancia menor a 0.0001, que indicó que todos o algunos de los tratamientos son diferentes entre sí. Se identificó con la prueba de Levene que los datos no tienen varianzas homogéneas con un valor de 0.018. Por esta razón se realizó la prueba de T3 Dunnett para comparar entre tratamientos. Esta prueba mostró que el tratamiento VII es diferente de los demás con valores de significancia menores a 0.05 y los demás tratamientos (II, III, VI y testigo) son estadísticamente iguales entre sí. Estos resultados evidencian que la cepa VII (USTABOYACA II-15) tiene una alta patogenicidad, además las condiciones del bioensayo fueron adecuadas porque el testigo tuvo una mortalidad baja. Esto pudo deberse a que se controló la humedad cambiando la manera de inoculación del hongo. A partir de este ensayo, y en los siguientes, la inoculación se hizo por inmersión de las larvas en la suspensión de conidias durante 20 segundos y luego se dejaron secar a temperatura ambiente para ser depositadas en cajas de petri. En los ensayos anteriores se usaban recipientes plásticos pero las larvas de *Galleria* los perforaban y se salían de los mismos. Finalmente en este ensayo se dejaron las unidades experimentales dentro del cuarto de cría con el fin de continuar con las condiciones de temperatura adecuadas para el desarrollo de las larvas [71], [72], [55].

9.4.4 Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de las cepas *Metarhizium* y *Beauveria* comerciales

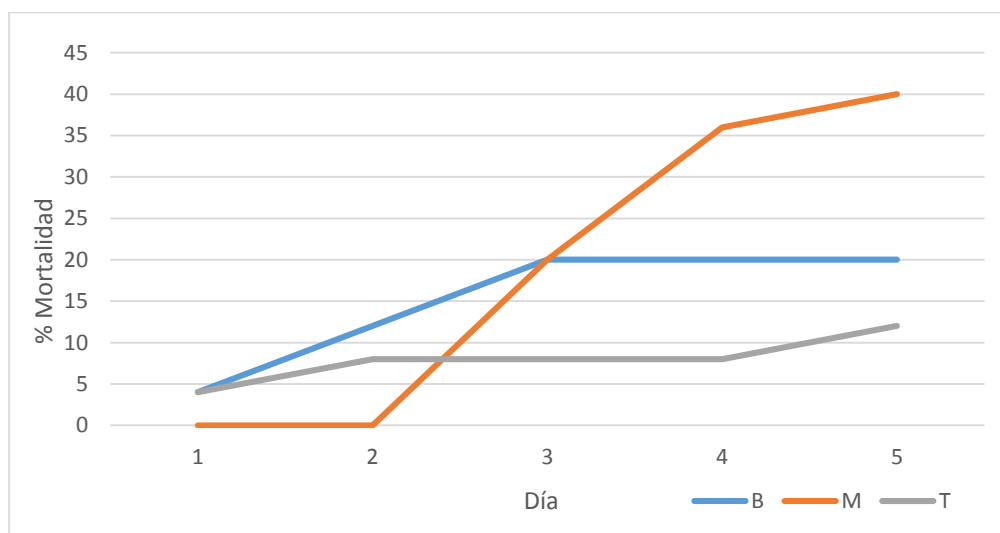
Tabla 6. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de las cepas *Metarhizium* y *Beauveria* comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).

R	Primer día			Segundo día			Tercer día			Cuarto día			Quinto día		
	B	M	T	B	M	T	B	M	T	B	M	T	B	M	T
A	0	0	0	2	0	0	2	1	0	2	1	0	2	0	1
B	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	4	0
C	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0
D	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1
E	1	0	0	1	0	1	2	1	1	2	3	1	2	3	1

Tratamientos: M: *Metarhizium*, B: *Beauveria*, T: Testigo

Fuente: las autoras

Grafica 4. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de las cepas *Metarhizium* y *Beauveria* comerciales (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)



Tratamientos: M: *Metarhizium*, B: *Beauveria*, T: Testigo

Fuente: las autoras

En la gráfica 4 se observan mortalidades acumuladas al quinto día de 40% y de 20% para la cepa comercial de *Beauveria* y *Metarhizium* respectivamente, mientras que el testigo mantiene su mortalidad baja lo que indica que las condiciones del ensayo son las adecuadas. Es sorprendente encontrar mortalidades tan bajas en hongos que se distribuyen comercialmente y que deberían provocar mortalidades altas.

Al aplicar un ANDEVA se presentó un valor de significancia de 0.436, donde los tratamientos son iguales entre ellos, por lo tanto no fue necesario hacer una prueba de comparación múltiple. Este ensayo no muestra diferencias estadísticas a pesar que gráficamente sí se pueden apreciar diferencias, esto pudo deberse a que los valores de diferentes repeticiones para el mismo tratamiento son muy distintos [72], [56].

Las tendencias en los resultados, al ser analizados visualmente y estadísticamente, pudieron deberse a que los hongos comerciales pierden la eficiencia al ser

almacenados por ser organismos vivos. No se conocen las condiciones del almacenamiento y aunque no se había pasado la fecha de vencimiento, los resultados sugieren que muchas de las esporas ya no eran viables. Es por esta razón que se decidió sembrar en medio de cultivo esta formulación comercial con el fin que las esporas que sí fueran viables produjeran micelio y conidias frescas para volver a usarlas en otro ensayo y determinar la verdadera patogenicidad de las cepas comerciales.

9.4.5 Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de Nematodos *steinernema* y *Heterorhabditis* comerciales

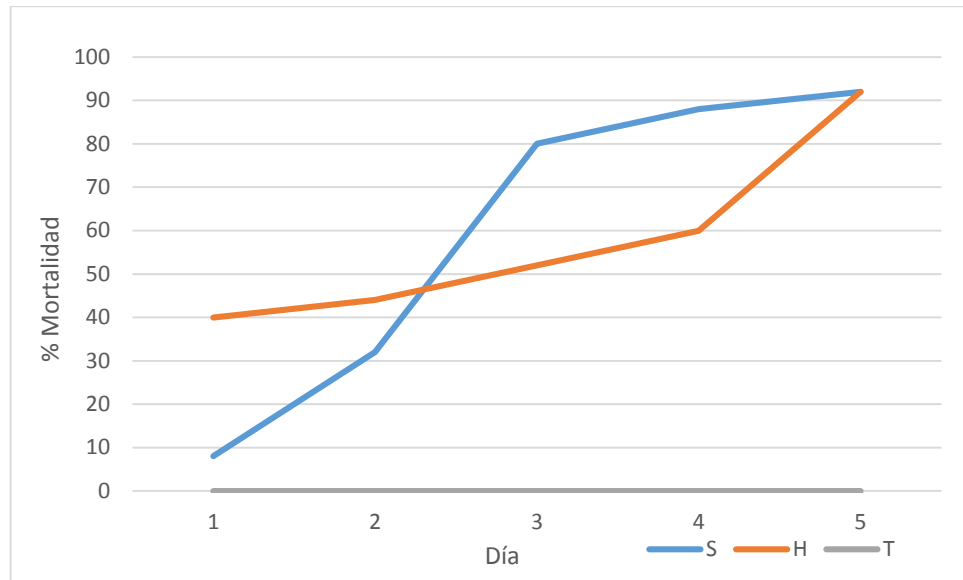
Tabla 7. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de Nematodos *steinernema* y *Heterorhabditis* comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).

<i>R</i>	<i>Primer día</i>			<i>Segundo día</i>			<i>Tercer día</i>			<i>Cuarto día</i>			<i>Quinto día</i>		
	S	H	T	S	H	T	S	H	T	S	H	T	S	H	T
<i>A</i>	0	3	0	2	3	0	5	4	0	5	4	0	5	5	0
<i>B</i>	0	3	0	3	3	0	5	4	0	5	4	0	5	5	0
<i>C</i>	1	0	0	2	0	0	4	0	0	4	0	0	5	5	0
<i>D</i>	1	1	0	1	2	0	2	1	0	4	1	0	3	3	0
<i>E</i>	0	3	0	0	3	0	4	4	0	4	4	0	5	5	0

Tratamientos: S: *steinernema*, H: *Heterorhabditis*, T: Testigo

Fuente: las autoras

Grafica 5. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de *Nemátodos steinernema* y *Heterorhabditis* comerciales (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada)



Tratamientos: S: *steinernema*, H: *Heterorhabditis*, T: Testigo

Fuente: las autoras

En la gráfica 5 se evidencia la efectividad de los nematodos ya que la mortalidad fue de 92% al quinto día del total de individuos experimentales. Pero el tratamiento de *steinernema* acelera la mortalidad de las larvas en menor tiempo. Mientras *Heterorhabditis* el más lento en el proceso, aunque finalmente consiguieron la misma efectividad. El testigo tuvo una mortalidad una mortalidad de 0% lo cual verifica que el bioensayo cumple las condiciones óptimas.

La prueba de ANDEVA tiene un valor de significancia menor a 0.0001, que indica que los tratamientos son diferentes entre sí. La prueba de homogeneidad de varianza (Levene) indicó que los tratamientos no tienen varianzas iguales (significancia de 0.03). Al no tener homogeneidad entre las varianzas se hizo prueba de T3 Dunnett mostrando que el testigo es diferente a los tratamientos (*Steinernema* y *Heterorhabditis*) pero entre ellos son iguales [56], [55], [70].

La alta eficacia de estos nemátodos probablemente está asociada a su capacidad de búsqueda, que no tienen los hongos. Además en los ensayos se aplican los nemátodos en altas concentraciones para asegurar el contacto con la larva objetivo. No es de extrañarse que se encuentren altas tasas de mortalidad ya que estas dos cepas de nemátodos son usadas comercialmente para el control de plagas entomológicas en el cultivo de caña de azúcar. Estas observaciones, así como el hecho que el nematodo *Steinernema* es más efectivo en corto tiempo que el nematodo *Heterorhabditis*, coinciden con lo encontrado por Baquero y Suarez (2014) en larvas de *Tecia solanivora*.

9.5 ENSAYO FINAL CON *tecia solanivora*

Finalmente se realizó un último ensayo con todas las cepas que fueron exitosas en los ensayos anteriores más las cepas y nematodos comerciales. Esto se hizo debido a que algunas cepas habían sido evaluadas en condiciones experimentales poco adecuadas para la supervivencia del testigo, por lo que se podía tener una sospecha de la eficacia de las cepas evaluadas pero no una certeza. Este ensayo se desarrolló al mismo tiempo que otro en donde se evaluaron los mismos patógenos sobre las larvas de *Tecia solanivora*, que es la plaga a controlar en el proyecto del cual esta tesis de investigación hace parte. Los resultados de este ensayo con *Tecia solanivora* se muestran más adelante.

9.5.1 Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium* y *Beauveria* comercial, Nematodo *steinernema* comercial.

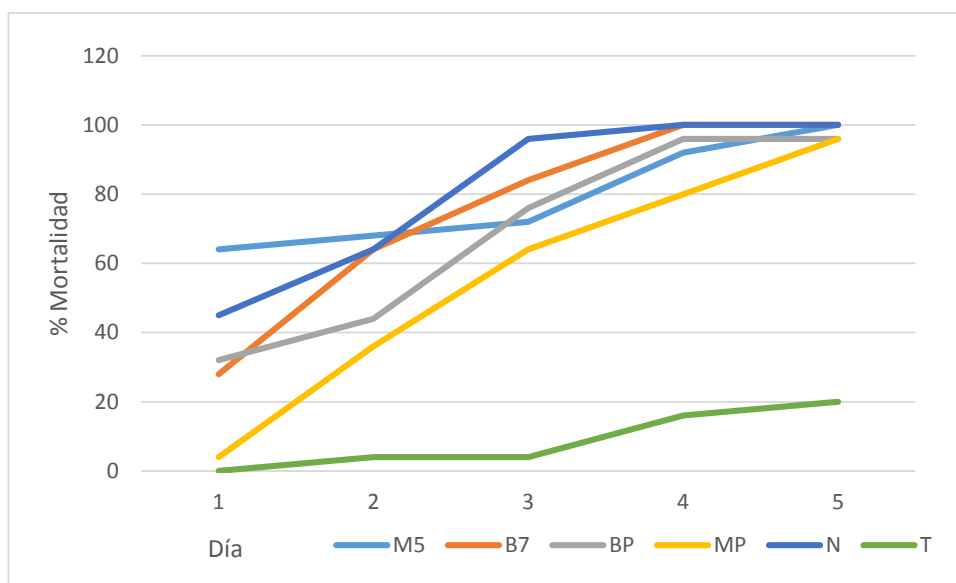
Tabla 8. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium* y *Beauveria*, Nematodo *steinernema* comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).

R	Primer día						Segundo día						Tercer día						cuarto día						Quinto día					
	V	VI	B	M	N	T	V	VI	B	M	N	T	V	VI	B	M	N	T	V	VI	B	M	N	T	V	VI	B	M	N	T
A	4	2	2	0	0	0	4	3	2	0	4	0	4	4	5	1	5	0	5	5	5	2	5	1	5	5	5	4	5	2
B	2	1	2	0	1	0	2	3	4	1	4	0	3	5	5	2	5	0	4	5	5	4	5	1	5	5	5	5	5	1
C	3	1	0	0	0	0	3	3	0	2	1	0	3	4	0	4	4	0	5	5	4	5	5	0	5	5	4	5	5	0
D	4	2	2	1	0	0	5	5	3	3	4	0	5	5	5	4	5	0	5	5	5	4	5	0	5	5	5	5	5	0
E	3	1	2	0	0	0	3	2	2	3	3	1	3	3	4	5	5	1	4	5	5	5	5	2	5	5	5	5	5	2

Tratamientos: R: Repetición V: USTATENJO I-15, VII: USTABOYACA II-15, N: steinernema, MP: Metarhizium, BP: Beauveria T: Testigo

Fuente: las autoras

Grafica 6. Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. mellonella* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium*, *Beauveria* comercial y Nematodo *steinernema* comercial (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada).



Tratamientos: M5: USTATENJO I-15, B7: USTABOYACA II-15, N: *steinernema*, MP: *Metarhizium*, BP: *Beauveria* T: Testigo

Fuente: las autoras

En el grafico 6 se observan mortalidades en un rango de 95% a 100% con todos los patógenos evaluados y una mortalidad acumulada en cinco días de 20% en el testigo. Lo cual favorece los resultados buscados biológicamente en donde la mortalidad de los individuos infectados con las diferentes cepas sea efectiva y la mortalidad del testigo sea mínima.

Al aplicar el ANEVA se encontró un valor de significancia de 0.0001, para la cual los tratamientos son diferentes entre sí. La prueba de homogeneidad de varianza muestra que los datos tienen varianzas iguales entre ellos ya que en la prueba de Levene se encontró una significancia de 0.228. Por lo tanto se realiza prueba de comparación múltiple por el método de Tukey en la que se encontraron dos grupos estadísticamente diferentes entre sí. En el primer grupo está el testigo y el segundo todos los tratamientos (V, VII, *Metarhizium*, *Beauveria* y *Steinernema*), diferentes al testigo pero iguales entre sí. Estos resultados nos muestran que las dos cepas aisladas en el presente trabajo (la V y la VII) son tan efectivas como las cepas comerciales de *Metarhizium*, *Beauveria* y *Steinernema*. Sin embargo hay que tener en cuenta que las larvas de *Galleria mellonella* son altamente susceptibles al ataque de cualquier patógeno. Es decir que si *G. mellonella* presenta altas mortalidades esto no significa por fuerza que vaya a ser tan efectiva cuando se aplica a otras especies blanco. Es por este motivo que se realizó un bioensayo sobre larvas de tercer instar de *Tecia solanivora*, que es la especie plaga que nos interesa controlar. Se tiene que tener en cuenta que las altas mortalidades obtenidas en este bioensayo con las cepas comerciales de *Metarhizium* y *Beauveria* se explican en gran medida porque las conidias utilizadas fueron las reaisladas y producidas por nosotras mismas en el laboratorio, es decir que no se usó el producto comercial en su formulación original ya que en ensayos previos se detectó la baja viabilidad de las conidias.

9.5.2 Ensayo de patogenicidad en larvas de *Tecia solanivora* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium*, *Beauveria* comercial y Nematodo *steinernema* comercial.

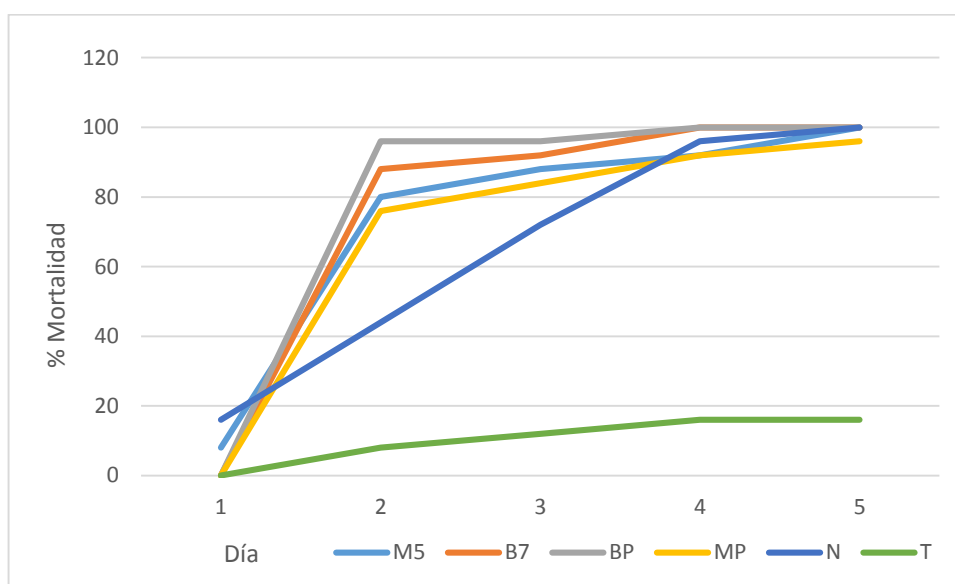
Tabla 9. Ensayo de patogenicidad en larvas de *Tecia solanivora* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium*, *Beauveria* y Nematodo *steinernema* comerciales (La cifra corresponde al número acumulado de larvas muertas a partir de las cinco que conforman la unidad experimental).

R	Primer día						Segundo día						Tercer día						cuarto día						Quinto día					
	V	VII	BP	MP	N	T	V	VII	BP	MP	N	T	V	VII	BP	MP	N	T	V	VII	BP	MP	N	T	V	VII	BP	MP	N	T
A	1	0	0	0	0	0	3	4	4	2	0	0	5	5	4	2	2	0	5	5	5	3	4	0	5	5	5	4	5	0
B	0	0	0	0	1	0	4	4	5	3	3	0	4	4	5	4	4	0	4	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5	0
C	1	0	0	0	1	0	4	5	5	4	4	0	4	5	5	5	5	1	5	5	5	5	5	2	5	5	5	5	5	2
D	0	0	0	0	2	0	5	5	5	5	3	2	5	5	5	5	5	2	5	5	5	5	5	2	5	5	5	5	5	2
E	0	0	0	0	0	0	4	4	5	5	1	0	4	4	5	5	2	0	4	5	5	5	5	0	5	5	5	5	5	0

Tratamientos: R: Repetición V: USTATENJO I-15, VII: USTABOYACA II-15, N: *steinernema*, MP: *Metarhizium*, BP: *Beauveria* T: Testigo

Fuente: las autoras

Grafica 7. Ensayo de patogenicidad en larvas de *Tecia solanivora* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium*, *Beauveria* comercial y Nematodo *steinernema* comercial (expresado en porcentaje de mortalidad acumulada).



Tratamientos: M5: USTATENJO I-15, B7: USTABOYACA II-15, N: *steinernema*, MP: *Metarhizium*, BP: *Beauveria* T: Testigo

Fuente: las autoras

En el grafico se observa que los resultados en la mortalidad de larvas de *T. solanivora* en el tiempo tienen exactamente las mismas tendencias que lo observado en larvas de *G. melonella*. Efectivamente se identifica que los datos están divididos en dos grupos, siendo el testigo el que presenta menores porcentajes de mortalidad llegando a un máximo 16%. Mientras que los tratamientos (M5, B7, BP y N tiene un porcentaje del 100%, pero el MP de 96%). Los tratamientos muestran una alta mortalidad desde el segundo día superando el 50% de los individuos experimentales siendo este efecto

mortal más rápido incluso que el encontrado en *G. melonella*. Esto probablemente se deba a que para este ensayo se usaron larvas de *T. solanivora* de tercer instar, más pequeñas que las usadas por Suarez y Baquero (2014) [73]. Que usaron larvas de cuarto instar. Se podría suponer entonces que las larvas más jóvenes y de menor tamaño son más propensas a morir por una infección por patógenos. En el ANDEVA se encontró una significancia menor a 0.0001 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, donde todos o algunos de los tratamientos son diferentes entre sí. Se identificó con la prueba de homogeneidad que los datos no tienen varianzas homogéneas (significancia de 0.03) por esta razón se realizó la prueba de T3 Dunnett que confirma la formación de dos grupos estadísticamente distintos: por un lado el testigo y por el otro todos los patógenos, sin que se encuentre diferencias estadísticas entre sí.

El alcance de este estudio fue identificar nuevas cepas, aislada en campo, con potencial para el control biológico de *Tecia solanivora*. Esto se logró con las cepas V (*USTATENJO I-15*), y VII (*USTABOYACA II-15*) sin embargo este es un esfuerzo que está muy lejos aún de una aplicación en campo o de una formulación comercial de estos patógenos. Se deben realizar aún muchos estudios en condiciones controladas en laboratorio, en invernadero, en campo bajo condiciones controladas y en campo bajo condiciones de producción agrícola. Esta es una consideración muy importante si se ven la experiencia de otros proyectos para encontrar patógenos de *Tecia solanivora* en donde los organismos promisorios fueron descartados antes de tiempo al pasar directamente de experimentos de laboratorio a aplicaciones en campo en condiciones de producción agrícola [73], [74].

10. CONCLUSIONES

- Se pudieron establecer crías exitosas de *Gallería mellonela* y de *Tecia solanivora* con el fin de prospección y pruebas biológicas, en las condiciones de los laboratorios de la USTA con recursos financieros y de equipamiento modestos.
- La *Gallería mellonela* requiere para su óptimo desarrollo un cuarto de cría con una temperatura de 24°C y una humedad relativa de 36%, más una dieta de salvado de trigo, con miel y cera de abejas como se describió en la metodología ya que es un alimento que permitió el crecimiento adecuado de las larvas en grandes números.
- En la prospección de patógenos de insectos se debe considerar un número más grande de sitios visitados y de muestras tomadas. Ya que de las dieciséis muestras tomadas en esta investigación se encontraron siete cepas de las cuales dos fueron eficaces.
- En este estudio se logró determinar las condiciones (de humedad, temperatura y material de recipientes), adecuadas para el montaje y evaluación de cepas de patógenos en bioensayos con *Gallería mellonela* y de *Tecia solanivora*.
- Las cepas V (USTATENJO I-15) y VII (USTABOYACA II-15) mostraron una alta mortalidad en larvas de *Gallería mellonela* y de *Tecia solanivora* siendo promisorias para el desarrollo de investigaciones posteriores que lleven al desarrollo de bioplaguicidas.
- Las mejores cepas encontradas V (USTATENJO I-15) y VII (USTABOYACA II-15) son igual de eficaces en el control de *Gallería mellonela* y de *Tecia solanivora* que las cepas comerciales de nematodos y hongos evaluadas en esta investigación.

11. RECOMENDACIONES

- En el corto plazo se sugiere que se hagan evaluaciones para determinar los mejores métodos para la conservación de los patógenos encontrados en las condiciones de los laboratorios de la USTA. Además se pueden hacer ensayos controlados para determinar la concentración letal 50 de las dos cepas aisladas. Se podría evaluar la eficacia de las cepas a diferentes concentraciones, en diferentes estadíos de la larva. Otros posibles estudios incluirían la aplicación de los hongos para evitar la infección de Teca en papa almacenada.
- Un propósito inicial de este estudio que no se logró alcanzar fue el aislamiento de nematodos entomófagos (los que se usaron provinieron de un laboratorio comercial), esto no significa que este grupo de organismos no se encuentre en los suelos agrícolas colombianos, simplemente que por errores experimentales, inexperiencia en la identificación de síntomas e incluso por mala suerte. Por este motivo se recomienda perseverar en los esfuerzos de prospección en campo para encontrar nuevas cepas tanto de hongos como de nemátodos y virus que tengan un potencial para el desarrollo de bioplaguicidas.

12. BIBLIOGRAFÍA

- [1] C. Guédez, C. Castillo y L. Cañizales, Control Biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable sostenible., Venezuela: Escuela Técnica Agropecuaria, 2008.
- [2] M. H. Badii y L. Abreu, Control biológico una forma sustentable de control de plagas, México: International Journal of Good Conscience, 2006.
- [3] Corley y J. Villacide, Introducción a la teoría del control biológico de plagas, Bariloche: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 2012.
- [4] Corpoica, Manual integrado de la polilla Guatemalteca de la papa Teci Solanivora, Bogotá D.C: PRONATTA, 1999.
- [5] SIPSA, «Polilla guatemalteca (Teci solanivora), plaga de gran impacto económico en el cultivo de la papa,» SIPSA, Bogota D.C, 2014.
- [6] L. Hilje y J. Saunders, Manejo integrado de plagas en mesoamerica, Costa rica: Tecnológica de costa rica, 2008.
- [7] J. Villacide y J. Corley, Introducción a la teoría del control biológico de plagas, Argentina: INTA EEA Bariloche, 2012.
- [8] J. Jacas, P. Caballero y J. Avilla, El control biológico de plagas y enfermedades, Castellon, España: Universidad jaume, 2005.
- [9] s. Hazir, H. Kaya, P. Stock y N. Keskin, Entomopathogenic Nematodes (Steinernematidae and Heterorhabditidae) for Biological Control of Soil Pests, Tucson: Tubitak, 2004.
- [10] Ezziyyani, Sid Ahmed, Perez sanchez, Requena y Candela, Control biológico por microorganismos antagonistas, España: Universidad de murcia, 2006.
- [11] A. Urbaneja, Ripollés, Abad, Calvo, Vanaclocha, Tortosa, Jacas y Castañeda, Importancia de los artrópodos depredadores de insectos y ácaros en España, España: Universidad jaime, 2005.
- [12] D. Paredes, Campos y Cayuela, El control biológico de plagas de artrópodos por conservación: técnicas y estados del arte, España: Asociación española de ecología terrestre, 2013.
- [13] m. Caballero, Manejo de insectos mediante parasitoides, Costa rica: CATIE, 2002.
- [14] a. Salvo y G. Valladares, parasitoides de minadores de hojas y manejo de plagas, Córdoba, argentina: Universidad nacional de córdoba, 2007.
- [15] B. Carreras, «aplicaciones de la bacteria entomopatógena a bacilius thuringiensis en el control de fitopatógenos,» *Corpoica - ciencia y tecnologia agropecuaria*, pp. 129-133, 2011.

- [16] E. Sepúlveda, M. Gerding y a. France, Control de plagas con Hongos Entomopatógenos, Quilamapu: centro tecnológico de control biológico, 2005.
- [17] T. Cabello Garcia, Control biologico de plagas, España: Universidad de almería, 2007.
- [18] P. A. Motta Delgado y B. Murcia Ordoñez , Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas, Taubaté, Brasil: Universidad de Taubaté, 2011.
- [19] D. Sauka y G. Benintende, Bacillus thuringiensis: generalidades. un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agricolas, Buenos aires, Argentina: INTA, 2008.
- [20] D. D. Portela Dussan , A. Chaparro Giraldo y S. A. López Pazos, La biotecnología de Bacillus thuringiensis en la agricultura, Bogotá: Universidad colegio mayor de cundinamarca, 2013.
- [21] A. Moino y r. Sousa Cavalcanti, «Manual de biología de suelos tropicales,» de *Hongos y nematodos entomopatógenos*, México, Instituto nacional de ecología, 2012, pp. 289-294.
- [22] V. Cañedo, «manual de laboratorio para el manejo de hongos Entomopatogenos,» Centro Internacional de la Papa, Lima , Perú, 2004.
- [23] Acosta y J. Armando, Evaluación de Hongos Entomopatogenos, Bogota.D.C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2006.
- [24] Organizacion de las naciones unidas para la agricultura, Manual tecnico ,menejo integrado de enfermedades de cultivos hidropnicos, Universidad de Talca, 2004.
- [25] F. Garcia, los Nematodos entomopatogenos, Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona, 1994.
- [26] P. Gómez Pereira y J. Mendoza Mora , Guia para la produccion de Metarhizium anisopliae, Guayas, Ecuador : CINCAE, 2004.
- [27] A. Morton Juaneda, Los nematodos entomopatógenos (Rhabditida: Steinernematidae y Heterorhabditidae) para el control del gusano cabezudo, Capnodis tenebrionis (Coleoptera: Buprestidae), Barcelona: Universidad autónoma de Barcelona, 2009.
- [28] A. Cruz reyes , Aspetos generales de los nemátodos, México: Méndez editores, 2003.
- [29] E. Lewis , J. Campbell, C. Griffin, H. Kaya y A. Peters, Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes, Germany : SCIENCEDIRECT, 2006.
- [30] L. Pundt, Control biológico: Usando nematodos beneficiosos, Massachusett: Universidad de Massachusett, 2011.
- [31] P. Caballero y W. Trevor, «Virus entomopatógenos,» de *Control biológico de plagas agricolas*, Veracruz, México, CSIC, 2008, pp. 121-125.

- [32] C. Castillo, P. Gallegos, C. Isaquibay y Oña, Guía de prospección y multiplicación de nematodos entomopatógenos para el control biológico de plagas del Ecuador, Quito, Ecuador: Departamento nacional de protección vegetal, 2010.
- [33] Guerrero y M. Rosero, Evaluación de la virulencia de nematodos entopatógenos para el control del salivazo de la caña de azúcar *Aeneolamiavaria* (F) (HEMIPTERA: CERCOPIDAE), Palmira: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, 2011.
- [34] D. F. Rincon y Garcia, «Frecuencia de cópula de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*,» *Revista Colombiana de Entomología*, vol. 33, nº 2, pp. 133-140, 2007.
- [35] Rueda y D. F. Rincón, Detección y evaluación de volátiles para la atracción de la polilla guatemalteca de la papa *Tecia solanivora*, Bogotá, D. C.: Pontificia Universidad Javeriana, 2005.
- [36] F. Herrera, «La polilla guatemalteca de la papa,» CORPOICA, Boyacá-Cundinamarca, 1998.
- [37] D. Rios Mesa, Informe "La polilla guatemalteca de la papa (*Tecia solanivora*) en tenerife", 2012.
- [38] D. Villanueva y C. Saldamando, *Tecia solanivora*, povony (Lepidoptero: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico, Medellín, Colombia: Universidad de Colombia, 2013.
- [39] CORPOICA, «Detección de la polilla de la papa,» Fondo de emergencia sanitaria, Antioquia, 1999.
- [40] AUGURA, «Uso seguro de plaguicidas e insumos agrícolas,» Comunicaciones Augura, Medellín, 2009.
- [41] CATIE, «Guía para el manejo de plagas del cultivo de maíz,» CATIE, Turrialba, Costa Rica, 1990.
- [42] J. Villadiego y C. Cardona, «Valoración de los impactos ambientales totales generados por el uso de plaguicidas,» *Revista de didáctica ambiental*, vol. 2, nº 10, pp. 62-80, 2011.
- [43] M. Martín y J. Sánchez, Los plaguicidas. Adsorción y evaluación en el suelo, Salamanca: Instituto de recursos naturales y agrobiología, 1984.
- [44] Estrada y C. Ines, Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico, Antioquia: Universidad de Antioquia, 2008.
- [45] B. I. Vargas, S. A. Rubio y A. López Avila, «Estudios de hábitos y comportamiento de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en la papa almacenada,» *Revista Colombiana de entomología*, vol. 30, nº 2, 2004.
- [46] Z. Z. Ojeda, Baculovirus como insecticida biológico, 2002.
- [47] INVITROGEN, «Guide to Baculovirus,» INVITROGEN, 2004.

- [48] Z. Z. Ojeda, P. Rocha y H. Calvache, Baculovirus como insecticida biológico, Bogotá, Colombia: Universidad Javeriana, 2002.
- [49] D. Weber, «Biological control of potato insect pests,» de 400, Beltsville, Copyright, 2013, p. Invasive Insect Biocontrol and Behavior Laboratory .
- [50] CENICAÑA, control biológico del salivazo, Cali, Colombia: CENICAÑA, 2011.
- [51] W. M. Ciesla, la detección de plagas de insectos y enfermedades forestales, Madrid, España, 1976.
- [52] S. E. M. Sanchez, prospección de hongos entomopatógenos para el control natural de insectos en Bahía ,Brazil, Bahía,Brazil: Universidade Estadual de Santa Cruz,, 2002.
- [53] SENASA, Manual de procedimientos para la protección de Stenoma catenifer Walsingham, Perú: SENASA, 2006.
- [54] C. Volcy, Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología, Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2008.
- [55] C. Castillo Fuentes, los postulados de Koch: Revisión histórica y actual, Dpto. de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. UCM, 2007.
- [56] A. Caicedo, Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología, Medellín, Colombia: Universidad nacional de Colombia, 2008.
- [57] R. Campos Herrera, M. Escuer, S. Labrador y C. Gutierrez , Aislamiento, identificación y caracterización ecológica de nematodos entomopatógenos de la rioja, Madrid, España: Longroño, 2006.
- [58] A. M. Caicedo, reconocimiento de nematodos entomopatógenos asociados a *Cyrtomenus bergi* en tres localidades de Colombia, Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 2004.
- [59] R. A. Bedding y R. J. Akhurst, A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. Nematologica, Nematologicas, 1975.
- [60] F. Realpe Aranda, A. Bustillo Pardey y J. C. López Nuñez , Optimización de la cría de *Galleria mellonella* (L) para la producción de nematodos entomopatógenos parásitos de la broca del café, Manizales: Cenicafé, 2007.
- [61] D. E. Zamorano Neumann, Uso de *Cacillius thuringiensis* L. como agente de larvas de la polilla mayor de la cera *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, 2009.
- [62] M. Carballo, control biológico de plagas agrícolas, Managua: INPASA, 2004.
- [63] H. Goodrich Blair y P. Stock, «Nematode parasites, pathogens and associates of insects and invertebrates of economic importance,» de *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology (Second Edition)*, Washington, Lawrence A. Lacey, 2012.

- [64] N. W. Osorio y O. Ruiz Villadiego, Guía para el muestreo laboratorio de suelos, Medellín, Colombia: Universidad Nacional, 2001.
- [65] J. p. Siegel, «Testing the pathogenicity and infectivity of entomopathogens to mammals,» de *Manual of techniques in invertebrate pathology*, Yakima, USA, Consulting international, 2012.
- [66] Caicedo, Trujillo, Quintero, Clatuyud y Bellotti, Reconocimiento de nematodos entomopatógenos asociados a *Cyrtomenus bergi* en tres localidades de Colombia, Cali, Colombia: Centro internacional de agricultura tropical, 2004.
- [67] v. Bezooijen , *METHODS AND TECHNIQUES FOR NEMATOLOGY*, Wageningen, 2006.
- [68] F. Herrera Jackelin, Evaluación de hongos entomopatógenos para el control microbiano de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), Turrialba, Costa Rica: Centro agronomico tropical de investigación y enseñanza , 1995.
- [69] M. Badii, M. Castillo y A. Rodríguez , Diseños experimentales e investigación científica, México: UANL, 2007.
- [70] R. Steel y J. Torrie, Bioestadística principios y procedimientos, México: Mc GRAW-HILL/interamerica de México, 1988.
- [71] J. Delgado Sánchez, «Algunos problemas básicos del análisis de varianza,» Universidad de Salamanca, Salamanca, España, 1992.
- [72] C. Dytham, *Choosing and Using Statistics A Biologist's Guide*, Oxford: Osney Mead, 1999.
- [73] B. M. Lenguízamo, J. C. Parada y W. Piedrahita, Evaluación de *steinernema fertiae*, cepa Colombia, escalado por fermentación sobre *Tecia Solanivora*, en condiciones de cultivo.,» de *Nematodos Entomoparasitos Experiencias y Perspectivas*, Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2006.
- [74] M. Garzon y B. Aza, Potencial del nematodo (*steinernema spp*) para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*, Bogotá: Universidad nacional de Colombia, 1994, pp. 166-174.
- [75] Sinergia, *Impactos Ambientales en Agricultura*, Sinergia, 2006.
- [76] M. Carballo, *Manejo de insectos mediante parasitoides*, Costa Rica, 2002.
- [77] S. E. M. Sanchez, Prospección de hongos entomofítorales para el control natural de insectos de Bahía, Brasil, Costa rica: DCAA, 2002.

12. Anexos

12.1 Resultados estadísticos ensayos de las cepas I y II en *G. mellonella*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,749	2	12	,216

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14430720,000	2	7215360,000	2,359	,137
Dentro de grupos	36702720,000	12	3058560,000		
Total	51133440,000	14			

Comparaciones múltiples

						95% de intervalo de confianza	
	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Límite inferior	Límite superior
	,00	1,00	2400,00000	1106,08499	,117	-550,8839	5350,8839

HSD	2,00		1296,00000	1106,08499	,491	-1654,8839	4246,8839
Tukey	1,00	,00	-2400,00000	1106,08499	,117	-5350,8839	550,8839
	2,00		-1104,00000	1106,08499	,592	-4054,8839	1846,8839
	2,00	,00	-1296,00000	1106,08499	,491	-4246,8839	1654,8839
	1,00		1104,00000	1106,08499	,592	-1846,8839	4054,8839
DMS	,00	1,00	2400,00000	1106,08499	,051	-9,9522	4809,9522
		2,00	1296,00000	1106,08499	,264	-1113,9522	3705,9522
	1,00	,00	-2400,00000	1106,08499	,051	-4809,9522	9,9522
		2,00	-1104,00000	1106,08499	,338	-3513,9522	1305,9522
	2,00	,00	-1296,00000	1106,08499	,264	-3705,9522	1113,9522
		1,00	1104,00000	1106,08499	,338	-1305,9522	3513,9522

Subconjuntos homogéneos

			Subconjunto para alfa = 0.05
	Tratamiento	N	1
HSD Tukey ^a	1,00	5	1200,0000
	2,00	5	2304,0000
	,00	5	3600,0000
	Sig.		,117

12.2 Resultados estadísticos ensayos de las cepas II, IV, V y VI en *G. mellonella*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,183	4	20	,349

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	36255744,000	4	9063936,000	4,388	,010
Dentro de grupos	41310720,000	20	2065536,000		
Total	77566464,000	24			

Comparaciones múltiples

			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
	(I) Tratamiento	(J) Tratamiento				Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	,00	2,00	1440,00000	908,96337	,524	-1279,9589	4159,9589
		4,00	1632,00000	908,96337	,403	-1087,9589	4351,9589
		5,00	-1440,00000	908,96337	,524	-4159,9589	1279,9589
		6,00	1584,00000	908,96337	,432	-1135,9589	4303,9589
	2,00	,00	-1440,00000	908,96337	,524	-4159,9589	1279,9589
		4,00	192,00000	908,96337	1,000	-2527,9589	2911,9589
		5,00	-2880,00000*	908,96337	,035	-5599,9589	-160,0411
		6,00	144,00000	908,96337	1,000	-2575,9589	2863,9589
	4,00	,00	-1632,00000	908,96337	,403	-4351,9589	1087,9589
		2,00	-192,00000	908,96337	1,000	-2911,9589	2527,9589
		5,00	-3072,00000*	908,96337	,022	-5791,9589	-352,0411
		6,00	-48,00000	908,96337	1,000	-2767,9589	2671,9589
	5,00	,00	1440,00000	908,96337	,524	-1279,9589	4159,9589
		2,00	2880,00000*	908,96337	,035	160,0411	5599,9589
		4,00	3072,00000*	908,96337	,022	352,0411	5791,9589

		6,00	3024,00000*	908,96337	,025	304,0411	5743,9589
	6,00	,00	-1584,00000	908,96337	,432	-4303,9589	1135,9589
		2,00	-144,00000	908,96337	1,000	-2863,9589	2575,9589
		4,00	48,00000	908,96337	1,000	-2671,9589	2767,9589
		5,00	-3024,00000*	908,96337	,025	-5743,9589	-304,0411
DMS	,00	2,00	1440,00000	908,96337	,129	-456,0644	3336,0644
		4,00	1632,00000	908,96337	,088	-264,0644	3528,0644
		5,00	-1440,00000	908,96337	,129	-3336,0644	456,0644
		6,00	1584,00000	908,96337	,097	-312,0644	3480,0644
	2,00	,00	-1440,00000	908,96337	,129	-3336,0644	456,0644
		4,00	192,00000	908,96337	,835	-1704,0644	2088,0644
		5,00	-2880,00000*	908,96337	,005	-4776,0644	-983,9356
		6,00	144,00000	908,96337	,876	-1752,0644	2040,0644
	4,00	,00	-1632,00000	908,96337	,088	-3528,0644	264,0644
		2,00	-192,00000	908,96337	,835	-2088,0644	1704,0644
		5,00	-3072,00000*	908,96337	,003	-4968,0644	-1175,9356
		6,00	-48,00000	908,96337	,958	-1944,0644	1848,0644
	5,00	,00	1440,00000	908,96337	,129	-456,0644	3336,0644
		2,00	2880,00000*	908,96337	,005	983,9356	4776,0644
		4,00	3072,00000*	908,96337	,003	1175,9356	4968,0644
		6,00	3024,00000*	908,96337	,003	1127,9356	4920,0644
	6,00	,00	-1584,00000	908,96337	,097	-3480,0644	312,0644
		2,00	-144,00000	908,96337	,876	-2040,0644	1752,0644
		4,00	48,00000	908,96337	,958	-1848,0644	1944,0644
		5,00	-3024,00000*	908,96337	,003	-4920,0644	-1127,9356

Subconjuntos homogéneos

			Subconjunto para alfa = 0.05	
	Tratamiento	N	1	2
HSD Tukey ^a	4,00	5	1440,0000	
	6,00	5	1488,0000	
	2,00	5	1632,0000	
	,00	5	3072,0000	3072,0000
	5,00	5		4512,0000
	Sig.		,403	,524

12.3 Resultados estadísticos Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de las cepas VII, III, II y VI

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
3,826	4	20	,018

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	62217216,000	4	15554304,000	26,320	,000
Dentro de grupos	11819520,000	20	590976,000		
Total	74036736,000	24			

Comparaciones múltiples

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza
	Tratamiento	Tratamiento				

					Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	3,00	96,00000	486,19996	1,000	-1358,8924	1550,8924
	7,00	-4080,00000*	486,19996	,000	-5534,8924	-2625,1076
	2,00	-192,00000	486,19996	,994	-1646,8924	1262,8924
	6,00	-672,00000	486,19996	,645	-2126,8924	782,8924
	3,00	96,00000	486,19996	1,000	-1550,8924	1358,8924
	7,00	-4176,00000*	486,19996	,000	-5630,8924	-2721,1076
	2,00	-288,00000	486,19996	,975	-1742,8924	1166,8924
	6,00	-768,00000	486,19996	,526	-2222,8924	686,8924
	7,00	4080,00000*	486,19996	,000	2625,1076	5534,8924
	3,00	4176,00000*	486,19996	,000	2721,1076	5630,8924
	2,00	3888,00000*	486,19996	,000	2433,1076	5342,8924
	6,00	3408,00000*	486,19996	,000	1953,1076	4862,8924
	2,00	192,00000	486,19996	,994	-1262,8924	1646,8924
	3,00	288,00000	486,19996	,975	-1166,8924	1742,8924
	7,00	-3888,00000*	486,19996	,000	-5342,8924	-2433,1076
	6,00	-480,00000	486,19996	,858	-1934,8924	974,8924
	6,00	672,00000	486,19996	,645	-782,8924	2126,8924
	3,00	768,00000	486,19996	,526	-686,8924	2222,8924
	7,00	-3408,00000*	486,19996	,000	-4862,8924	-1953,1076
	2,00	480,00000	486,19996	,858	-974,8924	1934,8924

DMS	,00	3,00	96,00000	486,19996	,845	-918,1953	1110,1953
		7,00	-4080,00000*	486,19996	,000	-5094,1953	-3065,8047
		2,00	-192,00000	486,19996	,697	-1206,1953	822,1953
		6,00	-672,00000	486,19996	,182	-1686,1953	342,1953
3,00	,00		-96,00000	486,19996	,845	-1110,1953	918,1953
		7,00	-4176,00000*	486,19996	,000	-5190,1953	-3161,8047
		2,00	-288,00000	486,19996	,560	-1302,1953	726,1953
		6,00	-768,00000	486,19996	,130	-1782,1953	246,1953
7,00	,00		4080,00000*	486,19996	,000	3065,8047	5094,1953
		3,00	4176,00000*	486,19996	,000	3161,8047	5190,1953
		8,00	3888,00000*	486,19996	,000	2873,8047	4902,1953
		6,00	3408,00000*	486,19996	,000	2393,8047	4422,1953
2,00	,00		192,00000	486,19996	,697	-822,1953	1206,1953
		3,00	288,00000	486,19996	,560	-726,1953	1302,1953
		7,00	-3888,00000*	486,19996	,000	-4902,1953	-2873,8047
		6,00	-480,00000	486,19996	,335	-1494,1953	534,1953
6,00	,00		672,00000	486,19996	,182	-342,1953	1686,1953
		3,00	768,00000	486,19996	,130	-246,1953	1782,1953
		7,00	-3408,00000*	486,19996	,000	-4422,1953	-2393,8047
		2,00	480,00000	486,19996	,335	-534,1953	1494,1953

Subconjuntos homogéneos

	Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05
--	-------------	---	------------------------------

			1	2
HSD Tukey ^a	3,00	5	96,0000	
	,00	5	192,0000	
	2,00	5	384,0000	
	6,00	5	864,0000	
	7,00	5		4272,0000
	Sig.		,526	1,000

12.4 Resultados estadísticos ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de las cepas *Metarhizium* y *Beauveria* comerciales

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,687	2	12	,226

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3293653,333	2	1646826,667	,890	,436
Dentro de grupos	22211840,000	12	1850986,667		
Total	25505493,333	14			

12.5 Ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de Nematodos *steinernema* y *Heterorhabditis* comerciales

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.

9,936	2	12	,003
-------	---	----	------

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	110645760,000	2	55322880,000	19,209	,000
Intra-grupos	34560000,000	12	2880000,000		
Total	145205760,000	14			

Comparaciones múltiples

	(I) VAR00001	(J) VAR00001	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
Tamhane	,00	1,00	-6048,00000*	549,38511	,001
		2,00	-5424,00000*	1194,22611	,031
		,00	6048,00000*	549,38511	,001
	1,00	2,00	624,00000	1314,53414	,958
		,00	5424,00000*	1194,22611	,031
		1,00	-624,00000	1314,53414	,958
T3 de Dunnett	,00	1,00	-6048,00000*	549,38511	,001
		2,00	-5424,00000*	1194,22611	,026
		,00	6048,00000*	549,38511	,001
	1,00	2,00	624,00000	1314,53414	,948
		,00	5424,00000*	1194,22611	,026
		1,00	-624,00000	1314,53414	,948
Games-Howell	,00	1,00	-6048,00000*	549,38511	,001
		2,00	-5424,00000*	1194,22611	,023

1,00	,00	6048,00000*	549,38511	,001
	2,00	624,00000	1314,53414	,886
2,00	,00	5424,00000*	1194,22611	,023
	1,00	-624,00000	1314,53414	,886

12.6 Resultado estadístico ensayo de patogenicidad en larvas de *G. melonella* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium* y *Beauveria* comercial, Nematodo *steinernema* comercial.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
1,498	5	24	,228

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	169960320,000	5	33992064,000	16,044	,000
Intra-grupos	50849280,000	24	2118720,000		
Total	220809600,000	29			

Comparaciones múltiples

	(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
HSD de Tukey	,00	1,00	-6720,00000*	920,59111	,000
		2,00	-6672,00000*	920,59111	,000

		3,00	-5616,00000*	920,59111	,000
		4,00	-4704,00000*	920,59111	,000
		5,00	-6672,00000*	920,59111	,000
		,00	6720,00000*	920,59111	,000
		2,00	48,00000	920,59111	1,000
	1,00	3,00	1104,00000	920,59111	,833
		4,00	2016,00000	920,59111	,279
		5,00	48,00000	920,59111	1,000
		,00	6672,00000*	920,59111	,000
		1,00	-48,00000	920,59111	1,000
	2,00	3,00	1056,00000	920,59111	,857
		4,00	1968,00000	920,59111	,302
		5,00	,00000	920,59111	1,000
		,00	5616,00000*	920,59111	,000
		1,00	-1104,00000	920,59111	,833
	3,00	2,00	-1056,00000	920,59111	,857
		4,00	912,00000	920,59111	,916
		5,00	-1056,00000	920,59111	,857
		,00	4704,00000*	920,59111	,000
		1,00	-2016,00000	920,59111	,279
	4,00	2,00	-1968,00000	920,59111	,302
		3,00	-912,00000	920,59111	,916
		5,00	-1968,00000	920,59111	,302
		,00	6672,00000*	920,59111	,000
		1,00	-48,00000	920,59111	1,000
	5,00	2,00	,00000	920,59111	1,000
		3,00	1056,00000	920,59111	,857
		4,00	1968,00000	920,59111	,302
DMS	,00	1,00	-6720,00000*	920,59111	,000

2,00	-6672,00000*	920,59111	,000
3,00	-5616,00000*	920,59111	,000

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: porcentaje

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Intervalo de confianza al 95%	
		Límite inferior	Límite superior
HSD de Tukey	1,00	-9566,4044*	-3873,5956
	2,00	-9518,4044*	-3825,5956
	3,00	-8462,4044*	-2769,5956
	4,00	-7550,4044*	-1857,5956
	5,00	-9518,4044*	-3825,5956
	,00	3873,5956*	9566,4044
	2,00	-2798,4044	2894,4044
	3,00	-1742,4044	3950,4044
	4,00	-830,4044	4862,4044
	5,00	-2798,4044	2894,4044
	,00	3825,5956*	9518,4044
	1,00	-2894,4044	2798,4044
	2,00	-1790,4044	3902,4044
	4,00	-878,4044	4814,4044
	5,00	-2846,4044	2846,4044
	,00	2769,5956*	8462,4044
	1,00	-3950,4044	1742,4044
	3,00	-3902,4044	1790,4044
	4,00	-1934,4044	3758,4044
	5,00	-3902,4044	1790,4044
	,00	1857,5956*	7550,4044
	1,00	-4862,4044	830,4044

DMS	5,00	2,00	-4814,4044	878,4044	
		3,00	-3758,4044	1934,4044	
		5,00	-4814,4044	878,4044	
		,00	3825,5956*	9518,4044	
		1,00	-2894,4044	2798,4044	
		2,00	-2846,4044	2846,4044	
		3,00	-1790,4044	3902,4044	
		4,00	-878,4044	4814,4044	
		1,00	-8620,0067*	-4819,9933	
		,00	2,00	-8572,0067*	-4771,9933
		3,00	-7516,0067*	-3715,9933	

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: porcentaje

(I) tratamiento (J) tratamiento			Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.
DMS	,00	4,00	-4704,00000*	920,59111	,000
		5,00	-6672,00000*	920,59111	,000
		,00	6720,00000*	920,59111	,000
		2,00	48,00000*	920,59111	,959
	1,00	3,00	1104,00000*	920,59111	,242
		4,00	2016,00000*	920,59111	,038
		5,00	48,00000	920,59111	,959
		,00	6672,00000	920,59111	,000
	2,00	1,00	-48,00000	920,59111	,959
		3,00	1056,00000	920,59111	,263
		4,00	1968,00000*	920,59111	,043
		5,00	,00000	920,59111	1,000
	3,00	,00	5616,00000	920,59111	,000

	4,00	1,00	-1104,00000	920,59111	,242
		2,00	-1056,00000	920,59111	,263
		4,00	912,00000*	920,59111	,332
		5,00	-1056,00000	920,59111	,263
		,00	4704,00000	920,59111	,000
		1,00	-2016,00000	920,59111	,038
		2,00	-1968,00000	920,59111	,043
		3,00	-912,00000*	920,59111	,332
		5,00	-1968,00000	920,59111	,043
		,00	6672,00000	920,59111	,000
		1,00	-48,00000	920,59111	,959
		2,00	,00000	920,59111	1,000
		3,00	1056,00000*	920,59111	,263
		4,00	1968,00000	920,59111	,043

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: porcentaje

			Intervalo de confianza al 95%	
(I) tratamiento		(J) tratamiento	Límite inferior	Límite superior
DMS	,00	4,00	-6604,0067*	-2803,9933
		5,00	-8572,0067*	-4771,9933
		,00	4819,9933*	8620,0067
		2,00	-1852,0067*	1948,0067
		3,00	-796,0067*	3004,0067
	1,00	4,00	115,9933*	3916,0067
		5,00	-1852,0067	1948,0067
		,00	4771,9933	8572,0067
		2,00	-1948,0067	1852,0067
		3,00	-844,0067	2956,0067

	3,00	4,00	67,9933*	3868,0067
		5,00	-1900,0067	1900,0067
		,00	3715,9933	7516,0067
		1,00	-3004,0067	796,0067
		2,00	-2956,0067	844,0067
		4,00	-988,0067*	2812,0067
		5,00	-2956,0067	844,0067
		,00	2803,9933	6604,0067
		1,00	-3916,0067	-115,9933
		2,00	-3868,0067	-67,9933
	4,00	3,00	-2812,0067*	988,0067
		5,00	-3868,0067	-67,9933
		,00	4771,9933	8572,0067
		1,00	-1948,0067	1852,0067
		2,00	-1900,0067	1900,0067
		3,00	-844,0067*	2956,0067
		4,00	67,9933	3868,0067
	5,00			

Subconjuntos homogéneos

porcentaje

tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
,00	5	816,0000	
4,00	5		5520,0000
3,00	5		6432,0000
HSD de Tukey ^a 2,00	5		7488,0000
5,00	5		7488,0000
1,00	5		7536,0000
Sig.		1,000	,279

12.7 Resultados estadísticos ensayo de patogenicidad en larvas de *Tecia solanivora* de cepas V y VII aisladas, hongos *Metarhizium*, *Beauveria* comercial y Nematodo *steinernema* comercial.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
4,956	5	24	,003

ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	181357066,667	5	36271413,333	21,945	,000
Intra-grupos	39668480,000	24	1652853,333		
Total	221025546,667	29			

Comparaciones múltiples

T3 de Dunnett

(I) VAR00001 (J) VAR00001	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
				Límite inferior	
,00	1,00	-6576,00000*	723,98895	,003	-9941,9806
	2,00	-6856,00000*	719,77774	,002	-10234,6944
	3,00	-7152,00000*	711,95505	,002	-10558,0921
	4,00	-6144,00000*	1028,36569	,004	-10159,0553
	5,00	-5328,00000*	1121,08519	,019	-9768,8504

1,00	,00	6576,00000*	723,98895	,003	3210,0194
	2,00	-280,00000	319,69986	,995	-1525,1029
	3,00	-576,00000	301,67532	,612	-1761,7518
	4,00	432,00000	801,03932	1,000	-3357,7493
	5,00	1248,00000	917,03871	,881	-3175,2987
2,00	,00	6856,00000*	719,77774	,002	3477,3056
	1,00	280,00000	319,69986	,995	-965,1029
	3,00	-296,00000	291,42409	,984	-1435,4330
	4,00	712,00000	797,23522	,990	-3091,4134
	5,00	1528,00000	913,71768	,742	-2909,3716
3,00	,00	7152,00000*	711,95505	,002	3745,9079
	1,00	576,00000	301,67532	,612	-609,7518
	2,00	296,00000	291,42409	,984	-843,4330
	4,00	1008,00000	790,17973	,912	-2823,7559
	5,00	1824,00000	907,56818	,580	-2641,5875
4,00	,00	6144,00000*	1028,36569	,004	2128,9447
	1,00	-432,00000	801,03932	1,000	-4221,7493
	2,00	-712,00000	797,23522	,990	-4515,4134
	3,00	-1008,00000	790,17973	,912	-4839,7559
	5,00	816,00000	1172,32078	,999	-3772,3476
5,00	,00	5328,00000*	1121,08519	,019	887,1496
	1,00	-1248,00000	917,03871	,881	-5671,2987
	2,00	-1528,00000	913,71768	,742	-5965,3716
	3,00	-1824,00000	907,56818	,580	-6289,5875
	4,00	-816,00000	1172,32078	,999	-5404,3476