

**UNIVERSIDAD NACIONAL
JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN**



ESCUELA DE POSGRADO

TESIS

**TOXICIDAD DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE
Dione juno (Gusano defoliador) A NIVEL LABORATORIO**

PRESENTADO POR:

JEAN PIERRE JESÚS QUILICHE DURAN

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN ECOLOGÍA Y
GESTIÓN AMBIENTAL**

ASESOR:

DR. SERGIO EDUARDO CONTRERAS LIZA

HUACHO

2021

**TOXICIDAD DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE
Dione juno (GUSANO DEFOLIADOR) A NIVEL LABORATORIO**

PRESENTADO POR:

JEAN PIERRE JESÚS QUILICHE DURAN

TESIS

ASESOR:

DR. SERGIO EDUARDO CONTRERAS LIZA

**UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN
ESCUELA DE POSGRADO MAESTRO EN ECOLOGÍA Y GESTIÓN
AMBIENTAL**

HUACHO

2021

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a todas las personas que están a mi lado y las que ya partieron, aquellas que creen en mi esfuerzo y mi pasión a la ciencia, gracias por esa confianza que me brinda día a día.

Jean Piere Jesús Quiliche Duran

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de tesis de maestría me gustaría agradecer a mi madre María Alejandrina Duran Depaz, mi tío Joseph Duran Depaz, mi hermana Sol Quiliche Duran, a mi abuela Alejandría Depaz Lugo y mi abuelo Juan Duran Graciano, por ser mi inspiración de superación en cada momento, siendo las personas que me inculcaron educación y valores con mucho esfuerzo, este trabajo es para ustedes.

Mi cordial agradecimiento al Dr. Sergio Contreras Liza, por el asesoramiento constante en la presente tesis y el apoyo incondicional en temas de investigación científica.

A mi colega el Biólogo Luis Alberto Huayna Dueñas por su visión crítica de muchos aspectos cotidianos de la vida, por su rectitud en su profesión como docente, por sus consejos, que ayudan a formarnos como personas y profesionales, por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, su experiencia y su paciencia formo gran parte de lo que soy ahora, lo considero mi segundo padre, muchas gracias

Agradezco con mucha estima a mi grupo de investigación: Pedro, Juan, Luis, Sofía, Marco, William y Joseph del Laboratorio de Microbiología Agrícola y a la Ing. Thalia Lloclla Tineo por ser una gran motivación en mi vida.

Por último, agradecer a mí alma mater la “Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión”, por haberme brindado formación académica y ética profesional.

Jean Piere Jesús Quiliche Duran

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	X
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 Descripción de la realidad problemática	1
1.2 Formulación del problema	3
1.2.1 Problema general	3
1.2.2 Problemas específicos	3
1.3 Objetivos de la investigación	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos	3
1.4 Justificación de la investigación	3
1.4.1 Justificación científica	3
1.4.2 Justificación Técnico-Económica	4
1.4.3 Justificación Social	4
1.5 Delimitación del estudio	4
1.5.1 Delimitación espacial	4
1.5.2 Delimitación temporal	4
1.5.3 Delimitación teórica	5
1.6 Viabilidad del estudio	5
1.6.1 Viabilidad técnica	5
1.6.2 Viabilidad ambiental	5
1.6.3 Viabilidad financiera	5
1.6.4 Viabilidad social	5

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1 Antecedentes de la investigación	6
2.1.1 Investigaciones internacionales	6
2.1.2 Investigaciones nacionales	8
2.2 Bases teóricas	11
2.2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.2.1.1 Historia	11
2.2.1.2 Ciclo de vida	12
2.2.1.3 Características de las δ -endotoxinas	13
2.2.2.4 Modo de acción de las toxinas	14
2.2.2 <i>Dione juno</i>	16
2.2.2.1 Daño	16
2.2.2.2 Ciclo biológico	16
2.3 Bases filosóficas	20
2.4 Definición de términos básicos	20
2.5 Hipótesis de investigación	22
2.5.1 Hipótesis general	22
2.5.2 Hipótesis específicas	22
2.6 Operacionalización de las variables	22
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	23
3.1 Diseño metodológico	23
3.1.1 Tipo de investigación	23
3.1.2 Nivel de investigación	23
3.1.3 Diseño	23
3.1.4 Enfoque	24
3.2 Población y muestra	24
3.2.1 Población	24

3.2.2 Muestra	24
3.3 Técnicas de recolección de datos	24
3.3.1 Tecnicas a emplear	24
3.4 Técnicas para el procedimiento de la información	26
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	27
4.1 Análisis de resultados	27
4.2 Contratación de hipótesis	30
4.2.1 Contraste de la hipótesis especifica 1	30
4.2.2 Contraste de la hipótesis especifica 2	32
4.2.3 Contraste de la hipótesis especifica 3	35
CAPITULO V: DISCUSION	38
5.1 Discusión de resultados	38
CAPÍTULO VI: CONCLUSION Y RECOMENDACIONES	40
6.1 Conclusiones	40
6.2 Recomendaciones	40
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS	42
7.1 Fuentes documentales	42
7.2 Fuentes bibliográficas	43
7.3 Fuentes hemerográficas	43
7.4 Fuentes electrónicas	48
ANEXOS	50
ANEXO 01. FORMATO PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD	50
ANEXO 02. FIGURAS COMPLEMENTARIAS	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables.....	22
Tabla 2. Bioensayos con larvas de tercer estadio de <i>Dione juno</i>	29
Tabla 3. Prueba de normalidad de diferentes concentraciones de toxinas.....	31
Tabla 4. Resumen de la ANVA de diferentes concentraciones de toxinas.....	31
Tabla 5. Comparaciones múltiples de Tukey de las diferentes concentraciones de toxina...31	
Tabla 6. Prueba de normalidad de los diferentes tipos de cepas de Bt.....	33
Tabla 7. Resumen de la ANVA de las diferentes variedades de cepas nativas de Bt.....	32
Tabla 8. Comparaciones múltiples de Tukey de diferentes variedades de cepas de Bt	34
Tabla 9. Prueba de normalidad de las diferentes formulaciones	36
Tabla 10. Resumen de la ANVA con diferentes formulaciones.....	36
Tabla 11. Comparaciones múltiples de Tukey con diferentes formulaciones.....	36
Tabla 12. Guía de observación de Bioensayos con <i>Dione juno</i>	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del proceso de esporulación en <i>Bacillus thuringiensis</i>	112
Figura 2. Micrografía electrónica de <i>B. thuringiensis</i>	13
Figura 3. Filograma de las proteínas Cry y Cyt	14
Figura 4. Modo de acción de la toxina Cry1A	16
Figura 5. Huevos de <i>Dione juno</i>	17
Figura 6. Larvas de <i>Dione juno</i>	18
Figura 7. Pupa de <i>Dione juno</i>	19
Figura 8. Adulto de <i>Dione juno</i>	20
Figura 9. Colonias aisladas de <i>B. thuringiensis</i>	27
Figura 10. Caracterización microscópica de <i>B. thuringiensis</i>	28
Figura 11. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de la cepa <i>B. thuringiensis</i>	28
Figura 12. Acondicionamiento y mantenimiento de larvas de <i>D. juno</i>	29
Figura 13. Bioensayos con larvas de tercer estadio de <i>D. juno</i> . A. Tratamientos a diferentes concentraciones de toxina. B. Tratamiento con distintas cepas de Bt.	51
Figura 14. Bioensayos con larvas de tercer estadio de <i>D. juno</i> . A. Control negativo. B. Tratamiento con diferentes formulaciones	51
Figura 15. Observacion de larvas de tercer estadio de <i>D. juno</i> . A. Larva viva. B. Larva muerta.	51
Figura 16. Acondicionamiento de adultos de <i>D. juno</i>	52
Figura 17. Estadio de insecto plaga <i>D. juno</i>	52
Figura 18. Trabajo en laboratorio	52

RESUMEN

TOXICIDAD DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* SOBRE *Dione juno* (GUSANO DEFOLIADOR) A NIVEL LABORATORIO

Jean Piere Jesús Quiliche Duran

Sergio Contreras Liza

Objetivo: Determinar si las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influyen en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio. **Materiales y métodos:** La investigación es de tipo aplicativo a nivel explicativo, experimental; para el inicio se activó y caracterizo las cepas Bt-10, Bt-15, Bt-21, Bt-23 y Bt-32 perteneciente al cepario del Laboratorio de Biotecnología de la Producción (N° 309), se realizaron ensayos de toxicidad a diferentes concentraciones de toxinas (0, 0.5, 1 y 2ng/cm²), tipos de cepas de Bt y formulaciones (espora o cristal) para determinar la mortalidad en larvas de tercer estadio de *D. juno*, se analizaron los datos estadísticamente utilizando el ANVA y la comparación múltiples de Tukey al 95% de confianza con el Software IBM SPSS Statistics 25.00. **Resultados:** Se observo morfología en bacilo, Gram+, colonia blanca, borde amorfo, con presencia de espora-cristal con la tinción de verde de malaquita y se evidencio cristal de 130KDa por SDS-PAGE característico de Bt, el análisis estadístico brinda como dato un p-valor de 0.000, por lo tanto se llevaría aceptar a la hipótesis del investigador que indicaría que, si existe diferencia significativa entre los tratamientos analizados, además indica que la mayor mortalidad en larvas de *Dione juno* se mostraron la concentración de 2 ng/cm², con la cepa Bt-23 y con la formulación de espora y cristal. **Conclusiones:** Se concluye que las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influyen significativamente el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio, considerando el control biológico como una alternativa para el control de plagas agrícolas.

Palabras claves: bioensayos, toxicidad, control de plagas.

ABSTRACT

TOXICITY OF NATIVE STRAINS OF *Bacillus thuringiensis* ON *Dione juno* (DEFOLIATOR WORM) AT THE LABORATORY LEVEL

Jean Piere Jesús Quiliche Duran

Sergio Contreras Liza

Objective: To determine if native strains of *Bacillus thuringiensis* influence the control of *Dione juno* (defoliating worm) at laboratory level. **Materials and methods:** The research is of an explanatory and experimental type; for the beginning, strains Bt-10, Bt-15, Bt-21, Bt-23 and Bt-32 were activated and characterized, belonging to the strain collection of the Production Biotechnology Laboratory (N° 309), toxicity tests were carried out at different toxin concentrations (0, 0.5, 1 and 2ng/cm²), types of Bt strains and formulations (spore or crystal) to determine mortality in third instar larvae of *D. juno*, data were analyzed statistically using ANVA and Tukey's multiple comparison at 95% confidence with IBM SPSS Statistics 25.00 software. **Results:** Bacillus morphology was observed, Gram+, white colony, amorphous edge, with presence of spore-crystal with malachite green staining and 130KDa crystal was evidenced by SDS-PAGE characteristic of *B. thuringiensis*, the statistical analysis gives a p-value of 0.000, therefore it would lead to accept the hypothesis of the researcher that would indicate that, if there is significant difference between the treatments analyzed, it also indicates that the highest mortality in larvae of *D. juno* were shown the concentration of 2 ng/cm², with the strain Bt-23 and with the formulation of spore and crystal. **Conclusions:** It is concluded that native strains of *Bacillus thuringiensis* significantly influence the control of *Dione juno* (defoliating worm) at laboratory level, considering biological control as an alternative for agricultural pest control.

Key words: bioassays, toxicity, pest control.

INTRODUCCIÓN

El estudio denominado “Toxicidad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio”. Se realizó con el objeto de brindar el potencial de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas agrícolas. En tal sentido el estudio tuvo objetivo determinar si las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influyen en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

El capítulo I está referido al planteamiento del problema, aquí se expone la realidad problemática, la formulación del problema, objetivos, justificación, delimitación y viabilidad del estudio, acá se plantearon las siguientes preguntas ¿De qué manera influye las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio? ¿De qué manera influye la concentración de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio? ¿De qué manera influye el tipo de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio? ¿De qué manera influye la formulación de cepa de Bt para el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio?

En el capítulo II se refiere al marco teórico, aquí se muestran los antecedentes nacionales e internacionales, bases teóricas, definiciones conceptuales y formulación de hipótesis, se presentan las dos variables de estudio variable independiente: cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* y variable dependiente: control de *Dione Juno*.

En el capítulo III de metodología, se presenta una investigación del tipo aplicativo de nivel explicativo, experimental; se evidencian las técnicas para la recolección de datos y el análisis estadístico por medio del Análisis de Varianza y comparación múltiples de Tukey al 95% de confianza con el Software IBM SPSS Statistics 25, adicionales las técnicas de observación y documentación.

En el capítulo IV se dan los resultados sobre la caracterización y bioensayos con cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*, así como presencia de figuras y las tablas estadísticas obtenidas después del procesamiento de los datos.

En el capítulo V se dan la discusión y en el capítulo VI conclusiones y recomendaciones del estudio, en base a determinar la concentración, tipo de cepa y formulación óptima para la utilización de la bacteria *Bacillus thuringiensis* para el control de larvas de tercer estadio de *Dione juno*, en el capítulo VII las Referencias y en Anexos se visualizan la guía de observaciones y figuras complementarias.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

En la historia de la agricultura, el ser humano siempre ha dado importancia a otras especies de la naturaleza que ayudan o dificultan la producción agrícola. Entre estas especies se encuentran los insectos ya que son los primeros en colonizar los campos de cultivo recién sembrados y en muchas de las ocasiones, sobrepasan el umbral tolerado por los agricultores convirtiéndose en una plaga (Alomar, 2005). Las pérdidas de cosechas generadas por plagas y enfermedades, han sido aproximadas en un 37% de la producción agrícola en todo el mundo y con un 13% causada por insectos (Gatehouse, Hilder y Boulter, 1992).

Una de estas plagas es la especie *Dione juno* conocida como “gusano defoliador” o “mariposa negra del maracuyá” que afecta al cultivo de maracuyá (García, 2006), tiene una amplia flexibilidad adaptativa de crecimiento y reproducción en lugares con vegetación secundaria (Montero, 2007), en estadio larvario la mayoría se alimenta de las hojas causando defoliación, pudiendo llegar a afectar los botones florales, además presenta tener un hábito gregario, lo que puede ser crítico para el cultivo (Calle, Cobos y Romero 2005).

Frente a esto, desde su invención, los agroquímicos han representado la principal opción para el control de numerosas plagas (Rosas-García, 2008). Su uso se ha propagado sin tomar en cuenta los efectos adversos de estos, como el surgimiento de plagas resistentes y secundarias, daños al medio ambiente y otros organismos (Rosas-García y De Luna-Santillana, 2006). Existe evidencia que provocan la contaminación de acuíferos superficiales, alimentos, suelo. Además, afectan a la diversidad de las especies, la cadena alimenticia, el flujo de energía, los ciclos de nutrientes, la genética de los organismos, y en general, en el equilibrio del ecosistema y la situación actual de las abejas es preocupante, debido a que el censo poblacional ha disminuido drásticamente por el uso extensivo de pesticidas y agroquímicos (Kovács-Hostyánszki *et al.*, 2017).

El daño a la salud que origina en los agricultores se debe principalmente al inadecuado manejo de los agroquímicos y a la toxicidad de estos productos durante y después de su uso, ello genera efectos de manera inmediata por intoxicaciones agudas (Rozas, 1999), y a largo plazo provoca intoxicaciones crónicas que puede ocasionar cáncer testicular, riesgos elevados de leucemia, mieloma múltiple, cáncer de próstata, cáncer de estómago, cáncer a la piel y cáncer cerebral, numerosos estudios sugieren que los agricultores expuestos a los fenoxiácidos y otros herbicidas tienen un elevado riesgo de sarcoma de tejidos blandos y linfoma no-Hodgking (Zahm y Blair, 1993).

Es por eso que desde hace algunos años se ha hecho énfasis en el uso de bioinsecticidas, ya que son productos biodegradables y específicos. Existen organismos entomopatógenos, y entre ellos figuran los hongos, protozoarios, algunos grupos de nemátodos y bacterias. Dentro de este último grupo podemos señalar a *Bacillus thuringiensis* (Bt) como la más importante, debido a que es la bacteria más utilizada para la producción de bioinsecticidas, presenta la particular habilidad de producir inclusiones de tipo cristalinas en simultaneidad en su fase de esporulación. Se han descubierto δ -endotoxinas activas contra lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), ácaros y contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Carreras, 2003). Las ventajas de Bt es que presenta inocuidad al hombre, animales domésticos, flora y fauna silvestre. La vida en almacén es duradera en forma de producto seco, además cada vez se mejora los precios de producción, debido a los avances tecnológicos, microbiológicos y genéticos, lo que lo hace competitivo frente a los agroquímicos (Razo, 1991).

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

- ¿De qué manera influye las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿De qué manera influye la concentración de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio?
- ¿De qué manera influye el tipo de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio?
- ¿De qué manera influye la formulación de cepa de Bt para el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Determinar si las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influyen en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar si la concentración de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influyen en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.
- Determinar el tipo de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* influyen en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.
- Determinar si la formulación de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* influyen en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

1.4 Justificación de la investigación

1.4.1 Justificación científica

A nivel nacional y mundial se buscan bacterias que tengan aplicaciones biotecnológicas y que puedan ser una mejor tecnología que los métodos convencionales, con

esta finalidad, se justifica desarrollar una colección de cepas bacterianas capaces de controlar diversos insectos plaga de manera eco amigable, dentro de un plan de manejo integrado.

1.4.2 Justificación Técnico-Económica

En este siglo la humanidad afronta una grave problemática debido al aumento de la demanda de alimentos, agotamiento de los recursos, incremento del precio de productos agrícolas y las dificultades ambientales causadas por los insecticidas químicos. Esta situación demanda urgentemente el uso de insecticidas biológicos que genera procesos sustentables y amigables con el ambiente, que además posibiliten una solución para el control de plagas. El presente estudio de investigación, ayudará a tomar en cuenta a las bacterias y su uso como controladores biológicos, evitando el daño al medio ambiente. Se podrá interesar a los organismos del estado e industria privada en un futuro no muy lejano, en la implementación de industrias biotecnológicas, mejorando así la economía del país.

1.4.3 Justificación Social

El presente trabajo de investigación, oriento sus esfuerzos en planificar, evaluar y educar a la población en la prevención de la contaminación del medio ambiente. Se podrá implementar programas de concientización enseñando los daños que genera el uso indiscriminado de insecticidas químicos, promoviendo además el control ecológico de plagas.

1.5 Delimitación del estudio

1.5.1 Delimitación espacial

La investigación se desarrolló en el Departamento de Lima, Provincia de Huaura, ciudad de Huacho dentro de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión en la Facultad de Ingeniería Agrarias, Alimentaria e Ambiental en la Escuela de Agronomía, Laboratorio de Biotecnología de la Producción (N°309).

1.5.2 Delimitación temporal

Se realizó desde Noviembre del 2020 a Julio del 2021.

1.5.3 Delimitación teórica

El reemplazo de tecnologías convencionales por tecnologías amigables al medio ambiente, como sería el uso de insecticidas biológicos.

1.6 Viabilidad del estudio

1.6.1 Viabilidad técnica

La investigación es viable porque cuenta con la información bibliográfica y experiencia profesional en investigación, además se tiene un contacto fluido con la Doctora Alejandra Bravo de la Parra del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México que tiene más de 30 años en esta línea de investigación.

1.6.2 Viabilidad ambiental

Debido a la naturaleza de la investigación se generó impacto ambiental positivo, con aportes de beneficio directo a los agricultores de la Región, del Perú y a nivel Mundial, debido a que permitiría un uso de tecnologías eco amigables, en comparación a los insecticidas químicos.

1.6.3 Viabilidad financiera

El recurso económico necesario para el estudio estará garantizado en su totalidad por fondos propios del Laboratorio de Biotecnología de la Producción a cargo del Doctor Sergio Liza Contreras de la Facultad de Agrarias, Industrias Alimentarias e Ingeniería Ambiental ubicada dentro de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión-Huacho. La viabilidad de la disponibilidad de recursos humanos, infraestructura, materiales, insumos y otros estará garantizada por el investigador.

1.6.4 Viabilidad social

La tecnología será puesta a disposición de los agricultores para que posean una alternativa para el control de plagas.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

2.1.1 Investigaciones internacionales

Loor y Salvatierra (2018), Universidad Laica Eloy Alfaro De Manabí, en su Tesis de Pregrado Uso de *Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis*, para el control del defoliador *Dione juno* en el cultivo de Maracuyá, cantón Sucre - 2018; tuvo como objetivo evaluar el uso de *B. bassiana* y *B. thuringiensis* para el control de *D. juno*, en el cultivo de maracuyá. Se utilizó un diseño experimental DBCA con tres repeticiones, en una plantación de un año. Se realizó una sola aplicación de los productos, fueron evaluadas las larvas antes del tratamiento y cada tres días luego de la aplicación y evaluándose cuatro veces cada tres días. El análisis de varianza para la variable efectividad de los tratamientos (fórmula de ABBOT), estableció diferencias significativas para los tratamientos presentando dos rangos de significación según la prueba de Tukey al 5% siendo el coeficiente de variación de 3,75%. El mayor promedio lo presentaron los tratamientos T1 (5ml de Bb), T3 (15ml de Bb), T5 (10ml de Bt) y T6 (15ml de Bt), con un valor de 100%; mostrando los tratamientos T4 (5ml de Bt) y T2 (10ml de Bb) los menores promedios, con valores de 81,67 y 79% respectivamente. Por lo cual se concluye que *B. bassiana* y *B. thuringiensis* son efectivos para el control de *D. juno*.

Dutra, Tutida, Pissinati y Ventura (2017), publicó en la Revista Científica de Ciencias de la Agronomía y Biotecnología el artículo científico Mortalidad y deformación adulta causada por aceites vegetales rociados sobre larvas de *Dione juno juno* (Cramer, 1779); tuvo como objetivo evaluar la mortalidad de larvas y deformidades en insectos adultos *D. juno juno* aplicando aceite vegetal de semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), aceite de ricino (*Ricinus communis* L.) y neem (*Azadirachta indica* A. Juss). Los tratamientos incluyeron soluciones en spray con 2% de aceites (emulsionadas con detergente). Se utilizaron como controles detergentes (1%) y agua destilada. Se realizaron

experimentos para larvas de segundo, tercer y quinto estadio, las evaluaciones se realizaron 1 y 5 días después del tratamiento. En los tres estadios probados, el aceite de neem mostró un mayor porcentaje de mortalidad (83, 73 y 64% respectivamente) que otros tratamientos. Los aceites de ricino y algodón son más eficientes en el segundo y tercer estadio larvario. La pulverización de cualquiera de los dos aceites determinó la deformación en adultos, estas deformaciones fueron más drásticas en los insectos cuyas larvas fueron tratadas con aceite de semilla de algodón que con neem y aceite de ricino.

Moura, Picanço, Rocha y Horst (2000), publicó en la Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira publica el artículo científico Selectividad de insecticidas a tres avispas predadoras de *Dione juno* (Lepidoptera: Heliconidae); tuvo como objetivo evaluar la selectividad de los insecticidas Fentiom, Cartape, Malatión y Deltametrina a *Dione juno juno* en relación con las avispas predadoras *Polybia fastidiosuscula*, *Polybia scutellaris* y *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera: Vespidae), para ello se estimaron las curvas de concentración-mortalidad y utilizando la concentración letal del insecticida en el 90% de los individuos (CL₉₀) y se calcularon índices de selectividad diferencial e índices de tolerancia, obteniendo los resultados para Deltametrina, Cartape, Fentiom y Malation contra larvas de *D. juno juno* obteniendo valores de CL₉₀ (mg/mL) de 0.0016, 0.1563, 0.4418 y 0.3994 respectivamente, concluyendo que existe un efecto toxico en las especies de avispas.

Figueiro (1995). Universidad Federal de Pará, en su Tesis de Maestría en Biología ambiental que lleva el título de Aspectos biológicos y control de la larva *Dione juno* (Lepidoptera, Heliconidae) en maracuyá (*Passiflora edulis*) por Baculovirus dione; tuvo como objetivo determinar la eficacia de Baculovirus dione en el control biológico de larvas de *D. juno juno*. En este estudio se llevaron a cabo dos series de experimentos, realizándolas en laboratorio, para evaluar la susceptibilidad de las larvas al virus. Otra serie de experimentos fueron aplicadas en condiciones de campo para probar las dosis del virus. Los

principales resultados de este estudio se dividen de la siguiente manera: mortalidad larvaria de 20 a 40% para larvas agrupadas y 90 a 95% para larvas aisladas; control biológico: B. dione es un virus de poliedrosis múltiple nuclear (MNPV) que ha demostrado ser altamente patógeno y eficaz para controlar *D. juno juno* empalme a concentraciones de 10, 20, 40 y 80 gramos de larvas con 500 litros de agua, con un porcentaje de eficiencia que oscila entre el 56 y el 100% al séptimo día después de la aplicación del virus.

Villani, Campos, y Gravena (1980), publicó en la Revista científica Anais da Sociedade Entomologica do Brasil el artículo científico Eficacia de *Bacillus thuringiensis* Berliner y fenitrotión + fenvalerato para el control de la larva del maracuyá *Dione juno juno* (Cramer, 1779) (Lepidóptera, Heliconidae); tuvo como objetivo evaluar en Brasil la eficacia de 3 formulaciones de *B. thuringiensis* (Dipel PM, Dipel Flowable y Thuricide PM) para el control de larvas de *D. juno juno* (Cram.) y se realizó un bioensayo para determinar la DL₅₀ de Dipel Flowable, que contiene un 10% de Dipel PM en aceite mineral. En las pruebas de campo, se aplicaron las 3 formulaciones de *B. thuringiensis* a 3,2 g a.i./100 litros, paratión a 24 g/100 litros y una mezcla de fenitrotión y fenvalerato a 5 y 25 g, respectivamente/100 litros. Entre tres y seis días después del tratamiento, todos los tratamientos permitieron reducir en más de un 60% el número de larvas vivas. En el bioensayo de laboratorio, se calculó que la DL₅₀ era de 380 ppm. para Dipel Flowable, aproximadamente 3 veces menor que la DL₅₀ en condiciones de campo, por lo cual, se concluye que las formulaciones de Bt son eficientes para el control de *D. juno*.

2.1.2 Investigaciones nacionales

Rafael-Rutte, Aguilar, Maldonado y Ruiz (2020), publicó en la Revista científica Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences el artículo científico Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* y *Alabama argillacea* en el cultivo de algodón (*Gossypium barbadens*) en Piura, Perú; tuvo como objetivo aislar cepas nativas

de *B. thuringiensis* (Bt) y evaluar su toxicidad contra *S. frugiperda* y *A. argillacea*, insectos plaga del cultivo de algodón. Las cepas nativas de Bt fueron aisladas de muestras de suelo de diferentes zonas aldoneras de Piura, Perú. Se obtuvieron 600 colonias del género *Bacillus*, de los cuales 37 cepas nativas presentaron características morfológicas similares a las cepas estándares de Bt (HD1 y NA118). La caracterización morfológica y bioquímica de las 37 cepas nativas mostró que 15 cepas presentaron cristal paraesporal de forma bipiramidal de acción tóxica contra lepidópteros, y características bioquímicas similares a las cepas estándares de Bt. El efecto tóxico de las 15 cepas nativas se evaluó con la prueba del alimento contaminado con discos de hojas de lechuga y algodón. Los resultados mostraron que las cepas IN-24, IN-30 e IN-34 ocasionaron 100% de mortalidad en *S. frugiperda* y las cepas IN-19, IN-24 e IN-25 ocasionaron 100% de mortalidad en *A. argillacea*, mientras que la cepa IN-24 ocasionó 100% de mortalidad en ambas especies. Por otra parte, la prueba de la dieta artificial reveló que las cepas IN-34, IN-01 e IN-31 ocasionaron los mayores porcentajes de mortalidad en *S. frugiperda* y *A. argillacea*, respectivamente. Se concluyó que existe varias cepas nativas de *B. thuringiensis* que pueden controlar *S. frugiperda* y *A. argillacea*.

Gutiérrez (2016), Universidad Nacional Hermilio Valdizán, en su Tesis de Maestría Efecto de insecticidas biológicos para el control de mosca blanca (*Bemisa tabaci*) y rendimiento del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en condiciones climáticas del valle de Huánuco – 2016; tuvo como objetivo fue evaluar el efecto de los insecticidas biológicos en el control de mosca blanca (*B. tabaci*), el diseño que se empleó fue de Bloques Completamente al Azar (DBCA) con 5 tratamientos y 4 repeticiones haciendo un total de 20 unidades experimentales. La variable independiente (Insecticidas biológicos *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, *Bacillus thuringiensis* y Buprofecin) se midió con la variable dependiente (control de mosca blanca y rendimiento) se comparó con el testigo (sin

aplicación). Las variables evaluadas fueron número de ninfas y adultos por cada tratamiento y rendimiento del cultivo. Los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento *V. lecanii* con (80,53 - 90,83 %) y Buprofezin con (91,29 % - 96,98 %) muestra la mayor efectividad en el control de ninfas y adultos de la mosca blanca, así como el incremento en el rendimiento en el cultivo de frijol.

Girano (2004), Universidad Nacional de San Martín, en su Tesis de Pregrado Eficiencia de *Bacillus thuringiensis* en el control de *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz (*Zea mays*) en el bajo Mayo; tuvo como objetivo determinar la eficiencia de *Bacillus thuringiensis* en el control biológico en el cultivo de maíz. Se desarrolló en los campos del Proyecto Maíz de la E.E. "El Porvenir"; se utilizó el Diseño de Bloques Completamente al Azar, con arreglo factorial de 3 x 4 por 4 repeticiones. Los factores A1=Tiempo de aplicación de *B. thuringiensis* (1; 5 y 10 días después de la infestación con *S. frugiperda*) y A2=Dosis de *Bacillus thuringiensis* (0,0; 0,6; 0,8 y 1,0 Kg/Ha). Los resultados demostraron que a mayor dosis de *B. thuringiensis* y a 72 horas después de la aplicación se tiene un mejor control de *S. frugiperda* en campo con promedios de 100; 100 y 92,04 % de larvas muertas para 1, 5 y 10 días después de la infestación.

Malpartida-Zevallos, Narrea-Cango y Dale-Larraburre (2013), publicó en la Revista de Ecología Aplicada el artículo científico Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador de maracuyá *Dione juno* (Cramer) (Lepidóptera: Nymphalidae) en laboratorio; tuvo como objetivo evaluar la patogenicidad de *B. bassiana*, sobre el gusano defoliador del maracuyá *D. juno* en laboratorio. La aplicación se realizó directamente mediante suspensiones de 10^6 , 10^7 y 10^8 conidias/mL⁻¹ de *B. bassiana* perteneciente a la colección comercial del Servicio Nacional de Sanidad Agraria SENASA y registró una mortalidad en las larvas de *D. juno*, entre 20% y 84% al cuarto día. La CL₅₀ y la CL₉₅ fueron de 9.39×10^6 conidias mL⁻¹, y 1.42×10^8 conidias mL⁻¹ respectivamente, por

lo que se concluye que la cepa CCB-LE 262 de *Beauveria bassiana* (Bb SENASA) tiene un gran potencial como controlador biológico de *D. junco*.

Abad *et al.* (2011), publicó en la Revista Ciencia e Investigación el artículo científico Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida; tuvo como objetivo aislar y caracterizar cepas de *Bacillus thuringiensis* de interés biotecnológico de suelos agrícolas peruanos, y evaluar su potencial entomotóxico frente a *Spodoptera frugiperda*. Como resultado se aislaron 54 cepas de *B. thuringiensis* de 385 muestras de suelo agrícola de diferentes partes del país. Las observaciones microscópicas mostraron la presencia de cristales parasporales característicos. Las cepas aisladas fueron evaluadas y confirmadas en sus características culturales y bioquímicas. Los bioensayos realizados sobre *S. frugiperda*, mostraron que la cepa Bt-UNMSM-42 posee una toxicidad superior al resto de las cepas con una media de mortalidad de 39,73% con 50 µg/mL y de 71,93% para 250 µg/mL, con una desviación estándar de 11,30 y 9,98; respectivamente.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Bacillus thuringiensis*

2.2.1.1 Historia

El biólogo Berliner en 1911, fue el primero en descubrir la bacteria *B. thuringiensis* cuando la encontró en la pupa de la mariposa del mediterráneo (*Ephestia kuefmiella*) y en otras larvas de insectos provenientes de la ciudad Thuringen, la descripción realizada fue ser un bacilo Gram +, con flagelos peritricos, crecimiento vegetativo y con presencia de espora (Berliner, 1915). Este microorganismo ya había sido identificado (Ishiwata, 1901) como un patógeno que generaría la enfermedad de sotto en la mariposa de seda (*Bombyx mori*), el cual llamó *B. sotto* (Lambert y Peferoen, 1992). En el año de 1915, Aoki y Chigasaki observaron en cultivo viejos de *B. sotto* la presencia de una toxina que era la causante de la muerte de los insectos y en 1927, Mattes verificó la observación realizada por Berliner,

añadiendo que el crecimiento del cuerpo de desecho de la bacteria cambiaba también la localización de la espora (Aizawai, 1971; Dulmage y Aizawai, 1982).

Bacillus thuringiensis es una bacteria que se encuentra en todas partes y existe en diversos hábitats como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, etc. Se tiene registro de más de 350 secuencias diferentes de los genes Cry, esto impacta directamente en el control de insectos que afectan a la agricultura y vectores de enfermedades (Crickmore *et al.*, 1998).

2.2.1.2 Ciclo de vida

Consta de 2 fases, que incluye la división de la célula vegetativa y el desarrollo de la espora. La célula vegetativa tiene forma de bastón se fragmenta en 2 células hijas que forman un tabique de división iniciado a la mitad de la membrana plasmática. La esporulación (Figura 1), incluye la división celular e involucra a 7 etapas que incluye la formación del filamento axial (etapa I), preespora y aparición del tabique (etapa II), aparición de cristales parasporales y formación de la preespora (etapa III), formación de exosporium, pared celular primordial, corteza y abrigos de esporas acompañado de transformación del nucleóide y esporas (etapas IV a VI), y la maduración de las esporas y lisis del esporangio (etapa VII) (Bulla *et al.*, 1980).

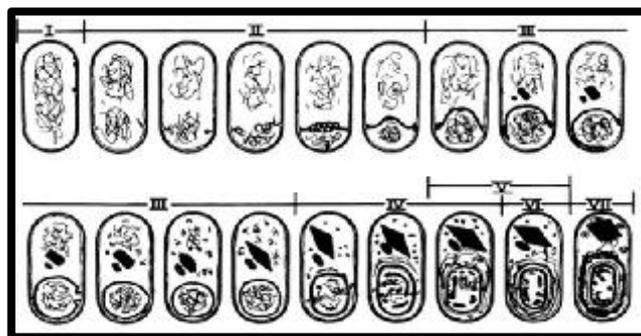


Figura 1. Etapas del proceso de esporulación de *B. thuringiensis* (Bulla et al., 1980).

La esporulación es inducida por una disminución de los recursos nutritivos presentes en el medio, el proceso dura entre 6 a 8 horas y originan una serie de cambios morfológicos y fisiológicos remarcables. Las observaciones efectuadas en otros trabajos sobre el crecimiento y la naturaleza del cristal paraesporal, mostraron que existe una relación entre

la esporulación y la aparición de este cuerpo cristalino (Figura 2), el cual se compone principalmente de una o varias toxinas de naturaleza proteica llamadas comúnmente δ -endotoxinas (Porcar y Juárez-Pérez 2004).

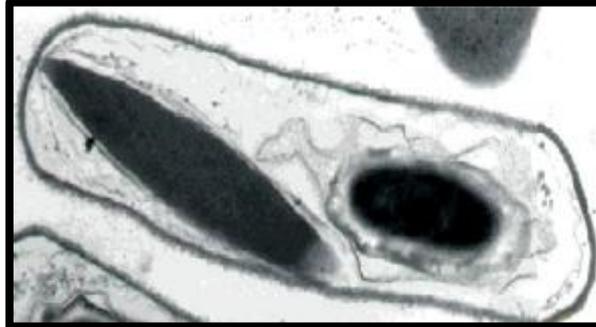


Figura 2. Micrografía electrónica de transmisión de *B. thuringiensis* (Soberón y Bravo 2003).

2.2.1.3 Características de las δ -endotoxinas

Las δ -endotoxinas son el componente paraesporal predominante en la mayoría de subespecies de Bt (Bulla *et al.*, 1980), donde existen variaciones en el número, la forma y la composición de estas inclusiones (Aronson, Beckman, y Dunn 1986)(Aronson *et al.*, 1986). Estas inclusiones cristalinas contienen las proteínas Cry (crystal) y Cyt (cytolytic) de una o varias clases, las cuales les confieren un amplio y diverso espectro de acción insecticida (Porcar y Juárez-Pérez, 2004). La actividad biocida afecta a especies de insectos del orden de Lepidóptera, durante el estadio larvario. Las proteínas Cry son estructuras paraesporal de 130 a 140 KDa, que muestra un efecto tóxico hacia algún organismo, esto se verifica por ensayos de toxicidad o cualquier proteína que muestre similitud con las actuales proteínas Cry (Barloy *et al.*, 1996).

La familia de genes que codifican para estas toxinas es la familia del gen cry (Crickmore *et al.*, 1998; Schnepf *et al.*, 1998), una característica común de los genes cry es su expresión durante la fase estacionaria de crecimiento. La gran mayoría de los genes cry pertenecen al grupo cry1 (Figura 3) y estos son los más estudiados (Crickmore *et al.*, 1998).

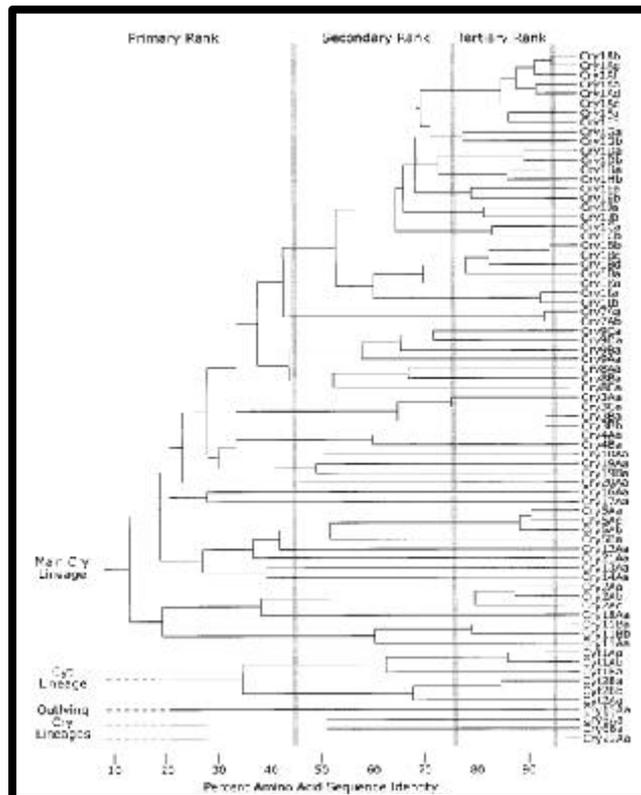


Figura 3. Filograma de identidad de las proteínas Cry y Cyt (Crickmore *et.al.*, 1998).

2.2.2.4 Modo de acción de las toxinas

El modelo del mecanismo de acción que es más aceptado y tiene mejor soporte experimental, propone que son proteínas que ejercen su efecto tóxico formando poros en las células intestinales de los insectos, los cuales provocan un choque osmótico que conducen a la lisis celular y finalmente la muerte de las larvas.

Esto inicia cuando un insecto ingiere los cristales de Bt, al llegar a intestino son solubilizados y liberan las protoxinas. Las toxinas Cry1A se producen como protoxinas de 130 kDa y se activan por acción de las proteasas, lo que da como resultado un núcleo resistente a proteólisis de 60 kDa compuesto por los tres dominios (Pardo-López, Soberón y Bravo, 2013). Posteriormente, las proteínas Cry1A experimentan interacciones secuenciales con diferentes proteínas del intestino medio del insecto, incluidas una proteína transmembrana caderina (CAD) de 210 kDa y dos proteínas ancladas con glicosil-fosfatidilinositol (GPI), la fosfatasa alcalina (ALP) de 65 kDa y la aminopeptidasa-N (APN) de 120

kDa (Gómez *et al.*, 2014). La interacción con CAD es una interacción compleja que implica tres epítomos localizados en las regiones extracelulares denominadas CR7, CR11 y CR12, donde CR12 es el dominio proximal a la membrana. Estos epítomos de CAD interactúan con los bucles 2, 3 y -8 del dominio II de la toxina Cry1A (Atsumi *et al.*, 2008; Gómez *et al.*, 2002). La interacción con CAD promueve la formación de una estructura oligomérica de la toxina Cry1A, la cual se inserta en la membrana para formar el poro (Pacheco *et al.*, 2009). Durante la oligomerización, la toxina Cry1Ab experimenta un cambio conformacional que conduce a la reorganización de las cadenas laterales de triptófano, localizadas principalmente en el dominio I de la toxina, reduciendo su accesibilidad al solvente. Tras la penetración de la membrana, se produce un segundo cambio en la conformación favoreciendo que los residuos de triptófano entren en estrecho contacto con la membrana y posiblemente anclan al oligómero a la bicapa lipídica. Estos datos muestran que el dominio I se inserta en la membrana. La oligomerización de las toxinas 3d-Cry se ha estudiado solo en un número limitado de toxinas (Cry1A, Cry3Aa, Cry4Ba y Cry11Aa). Se demostró que, al igual que las toxinas Cry1A, las toxinas Cry11Aa y Cry3Aa también requieren la unión a CAD para oligomerizar (Fabrick *et al.*, 2009). En contraste, la toxina Cry4Ba es una excepción porque es capaz de oligomerizar in-vitro en ausencia de unión al receptor CAD (Rodríguez-Almazán *et al.*, 2012). Posterior a este importante evento de formación de oligómeros, se propone que los monómeros insertan a la membrana una horquilla hidrofóbica formada por las hélices -4 y -5, mientras que el resto de las hélices del dominio I se extienden sobre la superficie de la membrana en forma de “paraguas” (Girard *et al.*, 2009). Así el oligómero insertado en la membrana forma poros iónicos que llevan eventualmente a la lisis celular (Knowles y Ellar, 1987). Los primeros síntomas de la intoxicación son la casi inmediata parálisis de la motilidad intestinal y la detención de ingesta; después de uno o dos días, una vez que la barrera impuesta por el intestino ha sido

superada, las esporas germinan en el ambiente nutritivo de la hemolinfa y el insecto muere por la inanición y septicemia. En relación al modo de acción de la toxina Cry1A, el Dr. Sabino Pacheco Guillén, propone una versión inédita (Figura 4).

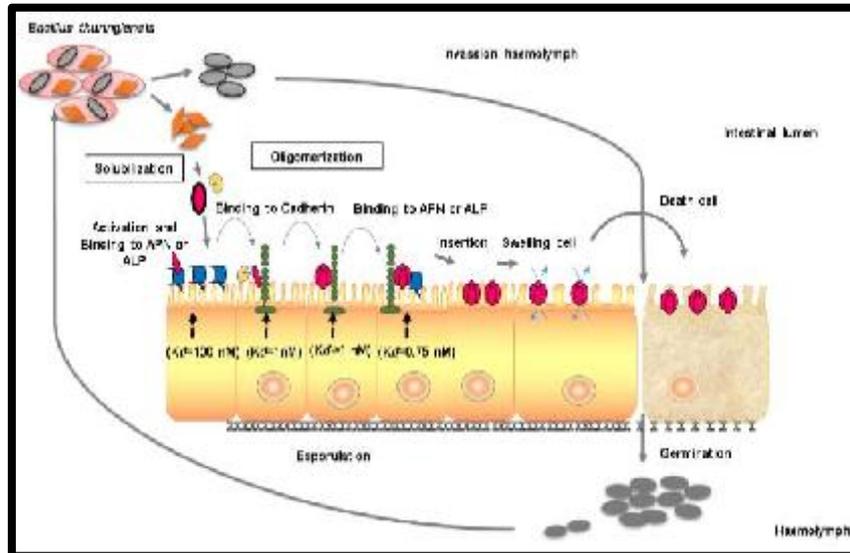


Figura 4. Modo de acción de la toxina Cry1A (Fuente inédita del Dr. Sabino, 2018).

2.2.2 *Dione juno*

2.2.2.1 Daño

Las larvas de *Dione juno* es conocido como “gusano defoliador”, representa una de las principales plagas de especies cultivadas del género *Passiflora* (García, 2006). Siendo el cultivo de Maracuyá desarrollado en principalmente Brasil, Colombia, Ecuador y, más recientemente en Perú, Venezuela y Costa Rica (Schweintesiuss y Gómez, 1995). Se considera una plaga de importancia, las larvas de esta especie son gregarias frecuentemente viven en las hojas alimentándose de ellas y causando una fuerte defoliación, reduciendo el crecimiento y la producción de maracuyá, y los ataques sucesivos de esta plaga pueden causar la muerte de las plantas.

2.2.2.2 Ciclo biológico

El gusano defoliador del maracuyá (*Dione juno*) presenta una metamorfosis completa o también denominada holometábola. Su ciclo de vida comprende cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto (Alvites 2012).

Huevo: son de color amarillo, y poco antes de eclosionar se tornan negros, su forma es cónica, la superficie exterior es rugosa con crestas y micrópilo verticales. Son colocados en grupos alineados en fila en el haz o en el envés de las hojas. *Dione juno* tiene una estrategia singular para invadir las plantas de *P. edulis*, inicialmente 2 o 3 hembras inspeccionan la planta durante 30 minutos, en dos días depositan un promedio de 170 huevos cada una, la postura de cada huevo dura 14 segundos en promedio, son colocados en hileras, de preferencia en el envés de las hojas intermedias (Molina-Moreira y Arias De Lopez 2006).



Figura 5. Huevos de *Dione juno* (Elaboración propia).

Larva: La etapa larvaria, está dividida en 5 estadios, las larvas del primero y segundo estadio presentan una tonalidad amarillo claro con manchas naranjas, del tercero al quinto instar el cuerpo es de color negro y a lo largo del cuerpo tiene espinas urticantes. Para todos los estadios la cápsula cefálica está compuesta por dos lóbulos frontales lisos de color negro con ornamentaciones a manera de cuernos, un par de antenas cortas, seis estematas, un labro, un clípeo y un aparato bucal masticador. El tórax está conformado por tres segmentos, cada uno tiene un par de patas torácicas; en el protórax se encuentra el casco protorácico color negro con pequeñas cerdas ramificadas y un espiráculo a cada lado. El abdomen está constituido por 10 segmentos. Del segmento 1 al segmento 8 se puede observar un espiráculo a cada lado del cuerpo; del 3 al 6 se encuentran los propodios ventrales. Los segmentos 9 y 10 están fusionados, y entre ellos se ubica la lámina anal. En el segmento 10 se encuentra el propodio anal más reducido que los propodios ventrales (Sánchez & Rivas, 2008). En general cada

estadio dura en promedio 4 días, por lo que completa su desarrollo larval entre 19 a 27 días, a una temperatura promedio de 25°C (Malpartida-Zevallos *et al.*, 2013).



Figura 6. Larvas de *Dione juno* (Alomía, 2013).

Pupa: presenta proyecciones en forma de “espinas” a lo largo del cuerpo en la región anterior y dorsal del abdomen, su coloración es café claro (Sánchez y Rivas 2008). Toledo (2011), indica que la etapa de crisálida o pupa de *Dione juno* tiene una duración de 12 días, a lo que Molina-Moreira y Arias De Lopez (2006) acotan que en su ensayo registraron una media longitudinal promedio de 2.5 cm. Al final del quinto estadio larval, deja de alimentarse, con todas las reservas adquiridas empieza a hilar con sus mandíbulas un tejido seguro que la sostenga, se cuelga cabeza hacia abajo, se recoge ventralmente tomando la forma de un bastón, se queda quieta y empieza a realizar movimientos oscilatorios, para desprenderse de la piel de oruga. La crisálida realiza esporádicamente ligeros movimientos laterales, cuando caen durante este proceso, son pocas las posibilidades de alcanzar el estado adulto. La configuración de la pupa es del tipo obtecta o momificada, pero apartándose de la configuración general, ya que es algo irregular su color es marrón a marrón claro con manchas ligeras algo blanquecinas, conforme avanza su desarrollo se va tornando en un color un poco más oscuro hasta que se produzca la muda imaginal (Alvites, 2012).



Figura 7. Pupa de *Dione juno* (Elaboración propia).

Adulto: Cuando llega el momento de la emergencia la crisálida se oscurece y se rompe, lo primero en salir es la cabeza, inmediatamente se sostiene de la crisálida con las patas y sale toda, el abdomen muy abultado, las alas replegadas y muy frágiles, se mueve suavemente para desplegar las alas, tardan un promedio de 5 horas en secarse, abre y cierra las alas lentamente, hasta lograr el vuelo. Se alimentan de preferencia del néctar de las flores de Lantana cámara (Molina-Moreira y Arias De Lopez, 2006). Los adultos son mariposas de alas anaranjadas con márgenes oscuros que ovipositan en promedio unos 70-150 huevos por postura, completándose su ciclo biológico en aproximadamente 38 a 42 días (Gallo *et al.*, 2002). A los tres días de nacidos los adultos alcanzan la madurez sexual, de 4 a 8 machos cortejan una hembra, vuelan persiguiéndola durante 20 a 30 minutos; el vuelo es ondulado, muy dinámico, finalmente la hembra se posa en cualquier superficie, el macho perseverante se aproxima y con la cabeza toca la cabeza de la hembra varias veces, luego camina lentamente alrededor de ella hasta lograr la cópula, que dura una hora, la cual se realiza con la unión de los últimos segmentos del abdomen, donde se localizan los órganos reproductores tanto en el macho como en la hembra, las alas de ambos se mueven muy despacio, hasta quedarse totalmente quietos, 24 horas después la hembra busca un lugar seguro para poner los huevos, en estado adulto las hembras y los machos tienen una duración

de 8 y 12 días en promedio y miden 82.5 y 75 mm, respectivamente. Ambos presentan una coloración naranja con bordes negros en la región dorsal y manchas plateadas en la región ventral, la hembra se diferencia del macho por el abdomen abultado (Molina-Moreira y Arias De Lopez, 2006).



Figura 8. Adulto de *Dione juno* (Elaboración propia).

2.3 Bases filosóficas

La filosofía se única en el momento que el ser humano comienza a dudar, reflexionar, cuestionar el mundo, cuestionar la vida y cuestionar el pensamiento. La filosofía es la ciencia de las leyes universales a las que se subordina el ser (naturaleza y sociedad) y el pensamiento del hombre. El trabajo se enmarca a la filosofía positivista, que es teoría y metodología de la ciencia, siendo las ideas filosóficas de la lógica (pensamiento concreto) y de problema filosófico al epistemológico, el cual estudia la producción de conocimiento desde sus aspectos metodológicos hasta sus aspectos teóricos esenciales. Siendo por tanto la epistemología parte de la filosofía que estudia los principios, fundamentos, extensión y metidos de conocimiento humano.

2.4 Definición de términos básicos

- **Toxicidad:** Es la capacidad de alguna sustancia que puede producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.

- **Mutación:** Es cualquier alteración de la secuencia de bases de un segmento de ADN correspondiente a un gen o a un locus, aun cuando esta alteración no se refleje en forma de cambio fenotípico observable o detectable.
- **Transformación bacteriana:** Captación y asimilación de ADN libre (desnudo), a partir del medio, por parte de una célula receptora.
- **Plásmido:** Son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico.
- **Oligonucleótido:** Secuencia lineal de nucleótidos, unidos por enlaces fosfodiéster, habitualmente no mayor de 50 nucleótidos.
- **Concentración letal media (CL₅₀):** Es la concentración, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte, durante la exposición o en un plazo definido después de ésta, del 50% de los animales expuestos a dicha sustancia durante un periodo determinado.
- **Secuenciamiento de ADN:** es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos en un oligonucleótido de ADN.
- **Protoxina:** Constituyente de una toxina que tiene mayor afinidad por la antitoxina correspondiente.
- **Toxina:** Sustancia tóxica producida en el cuerpo de los seres vivos por la acción de los microorganismos.
- **Control biológico:** Es un tipo de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

2.5 Hipótesis de investigación

2.5.1 Hipótesis general

- Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel de laboratorio.

2.5.2 Hipótesis específicas

- La concentración de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.
- La variedad de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.
- La formulación de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio

2.6 Operacionalización de las variables

Tabla 1.

Operacionalización de las variables

Variable	Concepto	Operacionalización de variables	
		Dimensión	Indicadores
Cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (V.I)	Es una bacteria entomopatógena nativo del suelo y catalogado como cosmopolita	Concentración	Bacteria y cristal-espóra
		Tipo de cepa	Caracterización bioquímica, macro y microscópicas
		Formulación	Cristal o espóra
Control de <i>Dione juno</i> (V.D)	Es la utilización de métodos y tecnologías adecuadas para mantener la densidad poblacional de plaga a niveles subeconómicos conservando a la vez la calidad ambiental	Ensayos de toxicidad	Mortalidad y viabilidad

Elaboración propia

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de investigación

Dependiendo del objetivo de la investigación que se va a realizar, podemos determinar el tipo de investigación al que corresponde. Esta labor debe realizarse antes de formular el plan de investigación, con el fin de tener bien definido lo que se piensa hacer y qué tipo de información se debe obtener, ya que este documento constituye una secuencia estructurada de fases y operaciones que se articulan en cadena (Carrasco, 2017).

- Según la intervención del investigador: observacional.
- Según la planificación de las mediciones: prospectivo.
- Según el número de mediciones de la variable de estudio: longitudinal.
- Según el número de variables analíticas: analítico.
- Tipo de investigación: investigación aplicada.

3.1.2 Nivel de investigación

Siendo la producción de los nuevos conocimientos y la resolución de problemas críticos, acciones estratégicas, que en esencia representan el propósito fundamental de la investigación científica, deben realizarse guardando un cierto orden progresivo y escalonado (Carrasco, 2017).

Nivel de investigación: explicativo.

3.1.3 Diseño

La diversidad y complejidad de los hechos y fenómenos de la realidad (social y natural) han conducido a diseñar y elaborar numerosas y variadas estrategias, para analizar y responder a los problemas de investigación según su propia naturaleza y características. Así, por ejemplo, tenemos: los diseños experimentales y los diseños no experimentales, ambos con igual importancia y trascendencia en el plano científico (Carrasco, 2017).

- Diseño: Experimental longitudinal explicativo.

Es explicativo porque el propósito del estudio fue ver el efecto o la influencia de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en el control de *Dione juno*.

3.1.4 Enfoque

Dado el nivel de investigación presenta un enfoque cuantitativo, dado que se utilizarán las herramientas estadísticas en el procesamiento de la información (Carrasco, 2017).

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

La población de referencia son larvas de *Dione juno* (gusano defoliador), colectadas en cultivos de maracuyá.

3.2.2 Muestra

Las muestras son del tipo no probabilístico y extraídas por conveniencia; estarán constituidas por n individuos de *Dione juno*, según el procedimiento indicado en la parte metodológica.

3.3 Técnicas de recolección de datos

3.3.1 Técnicas a emplear

Obtención de cepas de Bt

Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Biotecnología de la Producción (N°309) perteneciente a la Facultad de Ingeniería Agrarias, Alimentaria e Ambiental en la Escuela de Agronomía de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, a cargo del Dr. Sergio Contreras Liza, las cepas se encontraron crioconservadas en viales de 5 ml a -20 °C.

Activación de las cepas nativas

Las cepas nativas se activaron con 10 ml de caldo nutritivo incubando a 35 °C por 48 horas, se realizó este procedimiento por 2 veces donde se generó cepas viables, se observó en el microscopio óptico a 100X y se sembró en Agar nutritivo para verificar pureza.

Caracterización macroscópica y microscópica

Se caracterizó considerando la verificación de la pureza bacteriana de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para ello se observó las características morfológicas (colonia blanca, opaca, límites amorfos tipo estrella, sin olor) y se realizó 2 tinciones (GRAM y verde malaquita), el primero para comprobar que son Gram positiva y el segundo para visualizar presencia de espora, características de Bt.

Identificación, producción y cuantificación de esporas-prototoxina de Bt

Se realizó un pre-inóculo de las cepas de Bt en agar Luria Bertani por 12 horas. A partir de este pre-inóculo se produjo las endoesporas y cristales para esporales formados de protoxinas Cry de Bt en un medio de esporulación HCT y se incubó a 30°C por 48 a 72 horas para que las bacterias se diferencien a esporas. Transcurrido este tiempo se observaron los cultivos por microscopia para ver presencia de los cristales de la toxina o se teñirá con azul de Coomassie. Las cepas que presentaron ser positivas para cristales de toxina, se sembró en medio HCT por triplicado para recuperar la biomasa. Se realizó 3 lavados con 25 ml de buffer de lavado (NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) y 3 lavados con 30 ml de H₂O/PMSF 1 mM. Finalmente, se resuspendió la biomasa en 5 ml de H₂O. Se realizó un SDS-PAGE al 10% a fin de identificar cepas idénticas y quedarnos con una colección de cepas únicas, que presenten diferente patrón de proteínas. Se cuantificará la concentración de proteína total por espectrofotometría con la técnica Bradford utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA).

Colección, condicionamiento y mantenimiento de larvas de *Dione juno*

Se colectaron larvas de primer a quinto estadio en los cultivos de *Passiflora edulis* (maracuyá) del Valle Huaura, para ello se usaron frascos de vidrio colectando larvas y hojas, luego se llevaron al Laboratorio de Biotecnología de la Producción (N° 309) al área de Crianza de Lepidópteros donde se condicionó en jaulas con brotes de maracuyá en forma de florero, para

mantener la humedad se empapara algodón con agua destilada, midiendo diariamente temperatura ambiental (T°), humedad relativa (%) y se regulara el fotoperiodo de 16:8 h.

Bioensayos con larvas de *Dione juno*

Se evaluó la toxicidad de las diferentes concentraciones de espora-cristal (ng/cm^2), formulaciones (espora o cristal) y tipos de cepas frente a larvas de tercer estadio *Dione juno*. Para el ensayo se utilizarán 20 larvas por tratamiento, un control negativo (sin toxina) y tratamientos (cepas de Bt). Las placas se incubarán a 28°C con un $65\% \pm 5\%$ de humedad relativa y un fotoperiodo de claro a oscuro de 16:8 h. La mortalidad se registrará después de 7 días, realizando por triplicado cada bioensayo.

3.4 Técnicas para el procedimiento de la información

Se realizó la prueba estadística del Análisis de Varianza (ANVA), la prueba de comparación múltiples de Tukey con un nivel de significación del 5%. El análisis de los datos de los bioensayos, se llevó a cabo con el Software IBM SPSS Statistics 25.00 con un nivel de confianza del 95%, calculando el porcentaje de mortalidad para cada ensayo.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Análisis de resultados

La bacteria *Bacillus thuringiensis* se utiliza en diferentes cultivos de importancia económica para el control de insectos plagas que ejercen un efecto dañino en la planta generando una disminución de la producción agrícola.

Obtención y activación de cepas de Bt

Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) se obtuvieron del cepario del Laboratorio de Biotecnología de la Producción (N° 309) perteneciente a la Facultad de Ingeniería Agrarias, Alimentaria e Ambiental en la Escuela de Agronomía de la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión, a cargo del Dr. Sergio Contreras Liza, las cepas que se utilizaron fue Bt-10, Bt-15, Bt-21, Bt-23 y Bt-32 se encontraron crioconservadas en viales de 5ml a -20 °C, por lo cual se procedió a dejar por 20 minutos a temperatura ambiente, posterior a ello se colocó un inóculo de 2ml de Bt a 8ml de caldo nutritivo incubando a 35°C por 48 horas, posterior a este proceso se resembro en Agar nutritivo por 3 veces incubando a 37°C, observando colonias blanquecinas (Figura 9).



Figura 9. Colonias aisladas de *Bacillus thuringiensis*.

Caracterización macroscópica y microscópica

Las cepas de Bt presentaron características macroscópicas de ser colonias blancas, opacas y con bordes amorfos y en las características microscópicas se observó la presencia de bacterias GRAM+ y con la tinción de verde malaquita se evidencio esporas y cristales (Figura 10).

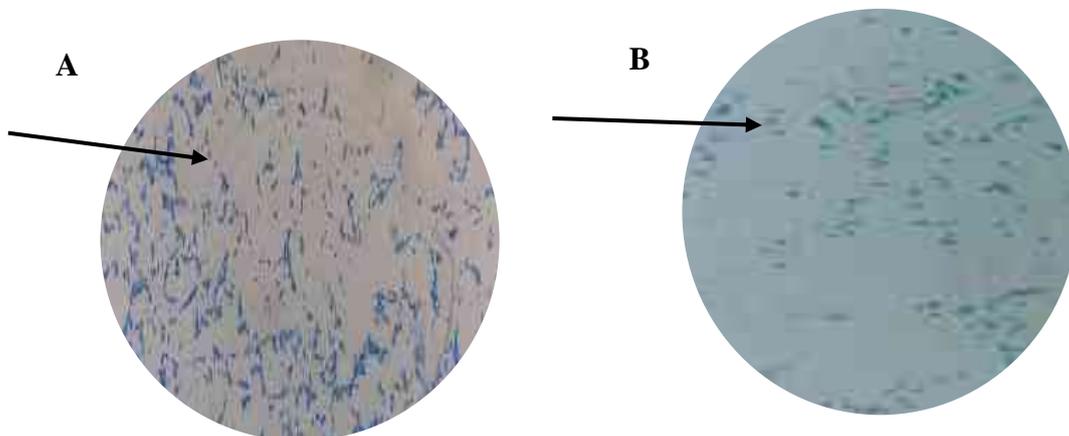


Figura 10. Caracterización microscópica de Bt. **A.** Se observa bacterias Gram positivas y en forma de bacilo. **B.** Presencia de esporas de color verde (Elaboración propia).

Las cepas de Bt produjeron protoxina Cry en medio HCT, se lavaron con 25 ml de buffer de lavado (NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) y 30 ml de H₂O/PMSF 1 mM. Finalmente, se resuspende en 5ml de H₂O la biomasa, utilizando 100 µl para la prueba de SDS-PAGE al 10% donde se evidencio presencia de protoxina de 130 kDa (Figura 11). La cuantificación se realizó por espectrofotometría con la técnica Bradford obteniendo valores de 2 a 5 (µg/µl) de cristales.

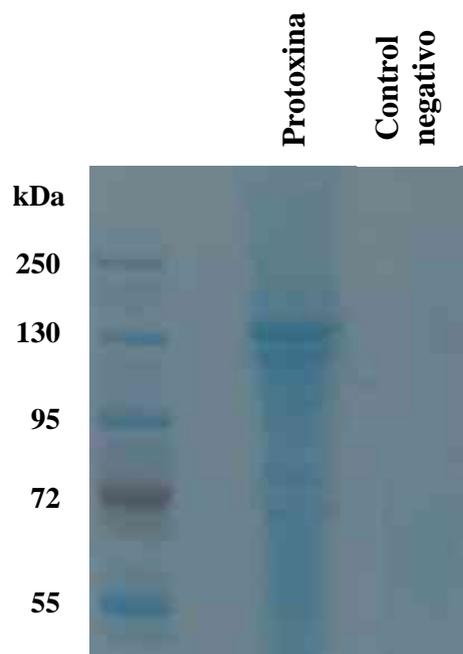


Figura 11. Análisis de la expresión en SDS-PAGE de la cepa *Bacillus thuringiensis*.

Colección, condicionamiento y mantenimiento de larvas de *Dione juno*

Se identifico larvas de primer a tercer estadio en los cultivos de *Passiflora edulis* (maracuyá) del Valle Huaura, se estableció en el Laboratorio de Biotecnología de la Producción (N° 309)

al área de Crianza de Lepidópteros donde se condicionaron en jaulas con brotes de maracuyá en forma de florero, para mantener la humedad se empapará algodón con agua destilada, se obtuvo valores de 30 °C con un 65% ± 5% de humedad relativa y el de 16:8 h (Figura 12).



Figura 12. Acondicionamiento y mantenimiento de larvas de *Dione juno*.

Bioensayos con larvas de *Dione juno*

Se evaluó la toxicidad de las diferentes cepas de Bt, concentraciones de espora-cristal ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y formulaciones de aplicación (Tabla 2) frente a larvas *Dione juno*. Para el ensayo se utilizó 12 larvas por tratamiento considerando control negativo en cada una de ellas. Las placas se incubo a 28°C con un 65 ± 5% de humedad relativa y un fotoperiodo de claro a oscuro de 16:8 h. La mortalidad se registró después de 7 días, realizando por triplicado cada bioensayo.

Tabla 2.

Bioensayos con larvas de tercer estadio de *Dione juno*

Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
T1: 0ng toxina /cm ²	T1: Sin Bt	T1: Sin espora-cristal
T2: 0.5ng toxina /cm ²	T2: Bt-10	T2: Con cristal
T3: 1ng toxina /cm ²	T3: Bt-15	T3: Espora-cristal
T4: 2ng toxina /cm ²	T4: Bt-21	
ng: nanogramos	T5: Bt-23	
cm: centímetro	T6: Bt-32	
	Bt: <i>Bacillus thuringiensis</i>	

Análisis estadísticos

Se realizó la prueba de Normalidad, el análisis de varianza y la comparación múltiple de Tukey en el software IBM SPSS Statistics 25.00, obteniendo valores de P-Valor menores del nivel de significación del 5% aplicado para cada experimento, considerando la presencia de diferencia significativa entre los tratamientos.

4.2 Contratación de hipótesis

El contraste de hipótesis es un proceso estadístico prioritario para los resultados de esta investigación.

La cual tiene como hipótesis general: Las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel de laboratorio.

4.2.1 Contraste de la hipótesis específica 1

a. Hipótesis del investigador:

La concentración de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

b. Redacción de la hipótesis:

H₀: La concentración de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* no influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

H₁: La concentración de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

c. Nivel de significancia

Definimos el porcentaje de error: $\alpha = 0,05 = 5\%$

d. Elección de la prueba estadística

Análisis de varianza (ANVA) y prueba de Tukey

e. Lectura de P-valor

Prueba de Normalidad

Se realiza la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para muestras pequeñas menores de 30.

Tomándose los siguientes criterios para su determinación:

P-valor $\geq 0,05$ aceptamos H_0 = Los datos provienen de una distribución normal

P-valor $< 0,05$ Aceptamos H_1 = los datos no provienen de una distribución normal

Tabla 3.

Prueba de normalidad de diferentes concentraciones de toxinas

Concentración de toxina	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	,170	16	,200*	,904	16	,093

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Como p- valor 0,093 $>$, donde $\alpha = 0,05$. Se acepta la hipótesis nula donde los datos provenientes de la concentración de toxina presentan distribución normal.

f. Decisión estadística

Tabla 4.

Resumen de la ANVA de diferentes concentraciones de toxinas (tratamientos)

ANVA					
Mortalidad por las diferentes concentraciones de toxinas de Bt					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	678,250	3	226,083	285,579	,000
Dentro de grupos	9,500	12	,792		
Total	687,750	15			

Tabla 5.

Comparaciones múltiples de Tukey de las diferentes concentraciones de toxina (tratamientos)

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Mortalidad de larvas de *Dione juno*

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
T1 (0ng/cm ²)	T2	-9,250*	,629	,000	-11,12
	T3	-12,250*	,629	,000	-14,12
	T4	-18,000*	,629	,000	-19,87

T2 (0.5ng/cm ²)	T1	9,250*	,629	,000	7,38
	T3	-3,000*	,629	,002	-4,87
	T4	-8,750*	,629	,000	-10,62
T3 (1ng/cm ²)	T1	12,250*	,629	,000	10,38
	T2	3,000*	,629	,002	1,13
	T4	-5,750*	,629	,000	-7,62
T4 (2ng/cm ²)	T1	18,000*	,629	,000	16,13
	T2	8,750*	,629	,000	6,88
	T3	5,750*	,629	,000	3,88

h. Conclusiones.

En el Análisis de Varianza se observa que nivel de significancia 0,000 calculado es menor al de 0,05 por lo cual los datos observados son estadísticamente significativos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula Ho. Se tiene evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis de que las diferentes concentraciones de toxinas de Bt influyen efectivamente el control de *Dione juno*, a un nivel de significación del 5 %.

En la prueba de comparación múltiples de Tukey se observa que el nivel de significancia es 0,000 y 0,002 calculado es menor al de 0,05 por lo cual los datos observados son estadísticamente significativos, por lo tanto, la mortalidad de larvas de *Dione juno* con el T4 (2ng/cm²), es más eficiente que la de los T1 (0ng/cm²), T2 (0.5ng/cm²) y T3 (1ng/cm²), a un nivel de significación del 5%.

4.2.2 Contraste de la hipótesis específica 2

a. Hipótesis del investigador:

La variedad de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

b. Redacción de la hipótesis:

H₀: La variedad de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* no influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

H₁: La variedad de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio.

c. Nivel de significancia

Definimos el porcentaje de error: $\alpha = 0,05 = 5\%$

d. Elección de la prueba estadística

Análisis de varianza (ANVA) y prueba de Tukey.

e. Lectura de P-valor

Normalidad

Se realiza la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para muestras pequeñas menores de 30.

Tomándose los siguientes criterios para su determinación:

P-valor $\geq 0,05$ aceptamos H_0 = Los datos provienen de una distribución normal

P-valor $< 0,05$ Aceptamos H_1 = los datos no provienen de una distribución normal

Tabla 6.

Prueba de normalidad de los diferentes tipos de cepas de Bt

	Pruebas de normalidad			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Tipo de cepa (Bt)	,119	24	,200*	,915	24	,066

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors.

Como p- valor 0,066 $>$, donde $\alpha = 0,05$. Se acepta la hipótesis nula donde los datos provenientes del tipo de cepa presentan distribución normal.

f. Decisión estadística

Tabla 7.

Resumen de la ANVA de las diferentes variedades de cepas nativas de Bt (tratamientos).

ANVA

Mortalidad por el tipo de cepa nativa de Bt

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	875,708	5	175,142	130,002	,000
Dentro de grupos	24,250	18	1,347		
Total	899,958	23			

Tabla 8.

Comparaciones múltiples de Tukey de diferentes variedades de cepas de Bt (tratamientos).

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Mortalidad de larvas de *Dione juno*

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
T1 (sin Bt)	T2	-10,750*	,821	,000	-13,36	-8,14
	T3	-14,250*	,821	,000	-16,86	-11,64
	T4	-8,250*	,821	,000	-10,86	-5,64
	T5	-19,000*	,821	,000	-21,61	-16,39
	T6	-15,000*	,821	,000	-17,61	-12,39
T2 (Bt-10)	T1	10,750*	,821	,000	8,14	13,36
	T3	-3,500*	,821	,005	-6,11	-,89
	T4	2,500	,821	,065	-,11	5,11
	T5	-8,250*	,821	,000	-10,86	-5,64
	T6	-4,250*	,821	,001	-6,86	-1,64
T3 (Bt-15)	T1	14,250*	,821	,000	11,64	16,86
	T2	3,500*	,821	,005	,89	6,11
	T4	6,000*	,821	,000	3,39	8,61
	T5	-4,750*	,821	,000	-7,36	-2,14
	T6	-,750	,821	,938	-3,36	1,86
T4 (Bt-21)	T1	8,250*	,821	,000	5,64	10,86
	T2	-2,500	,821	,065	-5,11	,11
	T3	-6,000*	,821	,000	-8,61	-3,39
	T5	-10,750*	,821	,000	-13,36	-8,14
	T6	-6,750*	,821	,000	-9,36	-4,14
T5 (Bt-23)	T1	19,000*	,821	,000	16,39	21,61
	T2	8,250*	,821	,000	5,64	10,86
	T3	4,750*	,821	,000	2,14	7,36
	T4	10,750*	,821	,000	8,14	13,36
	T6	4,000*	,821	,001	1,39	6,61
T6 (Bt-32)	T1	15,000*	,821	,000	12,39	17,61
	T2	4,250*	,821	,001	1,64	6,86
	T3	,750	,821	,938	-1,86	3,36
	T4	6,750*	,821	,000	4,14	9,36
	T5	-4,000*	,821	,001	-6,61	-1,39

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

h. Conclusiones.

En el Análisis de Varianza se observa que nivel de significancia 0,000 calculado es menor al de 0,05 por lo cual los datos observados son estadísticamente significativos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula H_0 . Se tiene evidencia estadística suficiente para aceptar la

hipótesis de que las diferentes variedades de cepas de *Bacillus thuringiensis* influyen efectivamente en el control de *Dione juno*, a un nivel de significación del 5 %.

En la prueba de comparación múltiples de Tukey se observa que el nivel de significancia menores al de 0,05 indican que los datos observados son estadísticamente significativos, por lo tanto, la mortalidad de larvas de *Dione juno* con el T₅ (Bt-23) es más eficiente que la de los T₁ (sin Bt), T₂ (Bt-10) y T₃ (Bt-15), T₄ (Bt-21) y T₆ (Bt-32), además el T₃ con el T₆ y el T₂ con el T₄ muestran no tener diferencia significativa por lo tanto tiene un mismo efecto en la mortalidad de larvas de *Dione juno*, a un nivel de significación del 5%.

4.2.3 Contraste de la hipótesis específica 3

a. Hipótesis del investigador:

La formulación de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio

b. Redacción de la hipótesis:

H₀: La formulación de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* no influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio

H₁: La formulación de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio

c. Nivel de significancia

Definimos el porcentaje de error: $\alpha = 0,05 = 5\%$

d. Elección de la prueba estadística

Análisis de varianza (ANVA) y prueba de Tukey.

e. Lectura de p-valor

Normalidad

Se realiza la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para muestras pequeñas menores de 30.

Tomándose los siguientes criterios para su determinación:

P-valor = 0,05 aceptamos H_0 = Los datos provienen de una distribución normal

P-valor < 0,05 Aceptamos H_1 = los datos no provienen de una distribución normal

Tabla 9.

Prueba de normalidad de las diferentes formulaciones

Formulaciones	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
	,207	12	,166	,887	12	,106

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Como p- valor 0,106 , donde = 0,05. Se acepta la hipótesis nula donde los datos provenientes del tipo de formulación presentan distribución normal.

f. Decisión estadística

Tabla 10.

Resumen de la ANVA de la mortalidad con diferentes formulaciones

Mortalidad	ANVA				
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	548,667	2	274,333	189,923	,000
Dentro de grupos	13,000	9	1,444		
Total	561,667	11			

Tabla 11.

Comparaciones múltiples de Tukey con diferentes formulaciones

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Mortalidad de larvas de *Dione juno*

HSD Tukey

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior
T1 (sin espora-cristal)	T2	-9,500*	,850	,000	-11,87
	T3	-16,500*	,850	,000	-18,87
T2 (con cristal)	T1	9,500*	,850	,000	7,13
	T3	-7,000*	,850	,000	-9,37
T3 (con espora-cristal)	T1	16,500*	,850	,000	14,13
	T2	7,000*	,850	,000	4,63

h. Conclusiones.

En el Análisis de Varianza se observa que nivel de significancia 0,000 calculado es menor al de 0,05 por lo cual los datos observados son estadísticamente significativos, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula H_0 . Se tiene evidencia estadística suficiente para aceptar la hipótesis de que las diferentes formulaciones de toxinas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influyen efectivamente en el control de *Dione juno*, a un nivel de significación del 5 %.

En la prueba de comparación múltiples de Tukey se observa que el nivel de significancia es 0,000 calculado es menor al de 0,05 por lo cual los datos observados son estadísticamente significativos, por lo tanto, la mortalidad de larvas de *Dione juno* con el T₃ (con espora-cristal) es más eficiente que la de los T₁ (sin espora-cristal) y T₂ (con cristal), a un nivel de significación del 5%.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

5.1 Discusión de resultados

En los resultados de investigación se llegó a determinar si las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influyen en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel laboratorio. Así mismo se comprobó la hipótesis general de investigación que las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* influye efectivamente en el control de *Dione juno* (gusano defoliador) a nivel de laboratorio.

Respecto Moura, Picanço, Rocha y Horst (2000), publicó en la Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira publica el artículo científico Selectividad de insecticidas a tres avispa predadoras de *Dione juno* (Lepidóptera: Heliconidae); obtuvo que la Deltametrina, Cartape, Fentiom y Malation contra larvas de *D. juno juno* matan al 90% en las concentraciones (mg/mL) de 0.0016, 0.1563, 0.4418 y 0.3994 respectivamente, estos insecticidas tienden a generar el surgimiento de plagas resistentes y secundarias, daños al medio ambiente, daños a la salud de los agricultores y consumidores (Rosas-García y De Luna-Santillana, 2006; Zahm y Blair, 1993; Rozas, 1999) y daños a la salud. Por lo tanto, es uso de *Bacillus thuringiensis* como las cepas nativas Bt-23 y Bt-32 son alternativas para el control selectivo de larvas de tercer estadio de *Dione juno* en concentraciones de 0.5-2 ng/cm² controlando de 50 a 100% obteniendo p-valor 0,000 a un 95% de confianza.

Respecto Loor y Salvatierra (2018), Universidad Laica Eloy Alfaro De Manabí, en su Tesis de Pregrado Uso de *Beauveria bassiana* y *Bacillus thuringiensis*, para el control del defoliador *Dione juno* en el cultivo de Maracuyá, cantón Sucre - 2018; obtuvo un control de larvas de *Dione juno* con los tratamientos, T5 (10 ml de Bt) y T6 (15 ml de Bt), con un valor de 100% y T4 (5 ml de Bt) con valor de 81,67% hasta el día 6. Además Villani, Campos, y Gravena (1980), publicó en la Revista científica Anais da Sociedade Entomológica do Brasil el artículo científico Eficacia de *Bacillus thuringiensis* para el

control de la larva del maracuyá *Dione juno juno* (Cramer, 1779) (Lepidóptera, Heliconidae); obtuvieron que la aplicación de Bt comercial (3,2 g/L) se presentaba valores de mortalidad más de un 60% a nivel de campo. Se debe considerar que varios de los productos comerciales a base de Bt contienen bacterias, esporas, cristal y excipientes, estando inactivos y en muchos casos ya desintegradas, adicionalmente se debe considerar las condiciones ambientales hacen que disminuya la mortalidad (Buitrago, 2004), en el presente trabajo se utilizaron 2,5 g/L bacterias con metabolismo activado, siendo formulada mediante espora o cristales que son cruciales para el proceso de intoxicación, donde se obtuvo valores de mortalidad mayores a 65% en larvas de *Dione june* de la cepa Bt-23 a esta concentración en comparación a las cepas Bt-10, Bt-15, Bt-21y Bt-32 avalando ello con el ANVA y la comparación múltiple por Tukey mostrando diferencias significativas en las cepas mencionadas y su formulación.

El uso de bacterias Bt sigue siendo una alternativa rentable y eficiente para el control de diversas plagas agrícolas, sin embargo, se pueden complementar con otros bioinsecticidas para el control de larvas de *Dione juno* como son los mencionados por Malpartida-Zevallos, Narrea-Cango y Dale-Larraburre (2013) donde presento hasta una mortalidad del 50% con *Beauveria bassiana* cepa CCB-LE 262 con 9.39×10^6 conidias mL^{-1} , Dutra, Tutida, Pissinati y Ventura (2017), presento que el aceite de neem (*Azaditachta indica* A. Juss) presenta porcentajes de mortalidad de 64% para larvas de 3° estadio. Figueiro (1995), obtuvo valores de mortalidad del 5 al 100% con Baculovirus dione, así mismo obtiene porcentajes de mortalidad cerca al 100% con la plaga del maíz *Spodoptera frugiperda* (Rafael-Rutte, Aguilar, Maldonado y Ruiz, 2020; Girano, 2004; Abad *et al.*, 2011), esto con llevaría plantearnos futuras investigaciones con las cepas nativas estudiadas y su efecto a otras plagas agrícolas así como su uso paralelo con otros bioinsecticidas.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

Después de aplicar los instrumentos de recolección de datos y realizar el procesamiento debido, se llegó a la siguiente conclusión:

- Se determinó estadísticamente mediante el ANVA y comparaciones múltiples a un nivel de confianza del 95% que la concentración de toxina de *Bacillus thuringiensis* influye significativamente en la eficiencia del control de larvas de *Dione juno*, siendo de 5µg/µl aquel que obtuvo hasta 100 % de mortalidad en larvas del tercer estadio a nivel laboratorio.
- Se determinó estadísticamente mediante el ANVA y comparaciones múltiples a un nivel de confianza del 95% que el tipo de cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* influye significativamente en el control de larvas de *Dione juno*, siendo la cepa Bt-23 la que obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad frente a larvas del tercer estadio a nivel laboratorio.
- Se determinó estadísticamente mediante el ANVA y comparaciones múltiples a un nivel de confianza del 95% que la formulación de la cepa nativa de *Bacillus thuringiensis* influye significativamente en el control de larvas de *Dione juno*, siendo la espora con cristal en solución la que obtuvo un mayor porcentaje de mortalidad frente a larvas del tercer estadio a nivel laboratorio.

6.2 Recomendaciones

- Se debe complementar el estudio con pruebas de bioensayos a nivel de campo para ajustar los parámetros de aplicación en *Bacillus thuringiensis* para el control de *Dione juno*.
- Debe priorizarse la investigación científica que busque nuevas cepas candidatas de *Bacillus thuringiensis* para el control de *Dione juno* y otras plagas importantes para

nuestro país, así mismo generar propuestas de investigación relacionadas al mejoramiento genético de cepas nativas para potenciar su acción insecticida.

- Se debe apostar por la implementación de tecnologías que estén a favor del medio ambiente y al cuidado de la biodiversidad.

CAPÍTULO VII: REFERENCIAS

7.1 Fuentes documentales

- Calle, A., Cobos, L. y Romero, M. (2005). *Producción y comercialización de aceite de maracuyá en Ecuador* (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/3864/1/6391.pdf>
- Carreras, B. (2003). *Caracterización de cepas de Bacillus thuringiensis para el control fitosanitario* (Tesis de maestría). Universidad de La Habana, La Habana, CuGarcía, A. (2006). *Plan de negocios para la producción y exportación de concentrado de maracuyá a la comunidad europea (Holanda)* (Tesis de maestría). Universidad Técnica Equinoccial, Quito, Ecuador.
- Girano, R. (2004). *Eficiencia de Bacillus thuringiensis en el control de Spodoptera frugiperda en el cultivo de maíz (Zea mays) en el bajo Mayo* (Tesis de pregrado). Recuperado de http://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/773/TP-H10_G53.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Gutiérrez, M. (2016). *Efecto de insecticidas biológicos para el control de mosca blanca (Bemisa tabaci) y rendimiento del cultivo de frijol (Phaseolus vulgaris) en condiciones climáticas del valle de Huánuco-2016* (Tesis doctoral). Recuperado de http://repositorio.unheval.edu.pe/bitstream/handle/UNHEVAL/1917/TD_Gutierrez_Solorzano_Maria.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Loor, J. y Salvatierra, A. (2018). *Uso de Beauveria bassiana y Bacillus thuringiensis, para el control del defoliador Dione juno en el cultivo de Maracuyá, cantón Sucre-2018* (Tesis de pregrado). Recuperado de <https://repositorio.uleam.edu.ec/bitstream/123456789/1965/1/ULEAM-AGRO-0049.pdf>
- Razo, F. (1991). *Escalamiento de un proceso por lote de nivel de laboratorio la planta piloto*

para la producción de *Bacillus thuringiensis* (Tesis de maestría). Recuperado de http://132.248.9.41:8880/jspui/handle/DGB_UNAM/TES01000158393

7.2 Fuentes bibliográficas

Aizawai, K. (1971). *Strain improvement and preservation of virulence of pathogens*. En: *Microbial control of insects and mites*. Londres, Reino Unido: Editorial Academic Press.

Buitrago, G (2004). La producción de ingredientes activos con *Bacillus thuringiensis*. En *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Bravo, A. y Cerón, J. eds. Editorial Buena Semilla. Bogotá, Colombia. pp. 233-273.

Carrasco, S. (2017). *Metodología de la Investigación Científica*. Lima, Perú: Editorial San Marcos E.I.R.L.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira, N., Carvalho, R., Batista, G. Berti, E.,... Omoto, C. (2002). *Entomología agrícola*. Piracicaba. Brasil: Editora Agronomica CERES Ltda.

Montero, J. (2007). *Manual para el manejo de mariposarios*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Editorial INBio.

Porcar, M. y Juárez-Pérez, V. (2004). Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. En A. Bravo y J. Cerón (Eds.), *Bacillus thuringiensis en el control biológico*. Bogotá, Colombia. pp. 69-100.

Rozas, M. E. (1999). *Catastro de conflictos ambientales por plaguicidas Bolivia – Perú– Chile*. Santiago de Chile, Chile: Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales.

Toledo, Y. (2011). *Metamorfosis artificial*. En A. Ayala (Presidencia). XXII Congreso de Investigación CUAM-ACMor. Estado de Morelos, Mexico.

7.3 Fuentes hemerográficas

Abad, F., Egusquiza, M., Alcarraz, J., Woolcott, E., Benavides, J., Godoy, D., Huerta, Y.,

- Jesús, M. y Patiño, G. (2011). Biodiversidad de *Bacillus thuringiensis* aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida. *Rev. Ciencia e Investigación* 12 (1), 29-43. Recuperado de <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/3235/2702>
- Alomar, O. (2005). Control Biológico de plagas: biodiversidad funcional y gestión de agrosistema. *Biojournal* 1(1), 1-9. Recuperado de http://www.cropprotection.es/documentos/Control_Biologico/ALOMAR%20Y%20ALBAJES%202005.pdf
- Alomía, J. (2013). Sistema de policultivo de plantas hospederas de lepidópteros comerciales en condiciones de campo abierto en la Zona de Satipo. *Rev. Prospectiva Universitaria*. 10(1), 106-111. Recuperado de <http://revistas.uncp.edu.pe/index.php/prospectiva/article/view/33/31>
- Aronson, A., Beckman, W. y Dunn, P. (1986). *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Rev. Microbiol.*, 50 (1), 1-24. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373051/pdf/microrev00052-0009.pdf>
- Atsumi, S., Inoue, Y., Ishizaka, T., Mizuno, E., Yoshizawa, Y., Kitami, M., y Sato, R. (2008). Location of the *Bombyx mori* 175 kDa cadherin-like protein-binding site on *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin. *Journal of FEBS*, 275(19), 4913-4926. Recuperado de <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1742-4658.2008.06634.x>
- Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L. y Lecadet, M. (1996). Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subs. malasya, encoding a new mosquitocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxinas. *Journal of Bacteriology*, 178(11), 3099-3105. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC178058/pdf/1783099.pdf>

- Berliner, E. (1915). Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kühniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* sp. Zeitschrift für angewandtes. *Journal of Applied Entomology*, 2(1), 29-56. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1439-0418.1915.tb00334.x>
- Bulla, L., Bechtel, D., Kramer, K., Shethna, Y., Aronson, A. y Fitz-James, P. (1980). Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *Critical Reviews in Microbiology*, 8(2), 147-204. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408418009081124>
- Crickmore, N., Zeigler, D., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. y Dean, D. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 807–813. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98935/pdf/mr000807.pdf>
- Dulmage, H. y Aizawai, K. (1982). Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. *Microbial and viral pesticides*, 209-237. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8251006>
- Dutra, V., Tutida, M., Pissinati, A. y Ventura, M. (2017). Mortalidad y deformación de adultos causadas por aceites vegetales pulverizados sobre larvas de *Dione juno juno* (Cramer, 1779). *Ciencias de la Agronomía y Biotecnología*, 1(2), 68. doi: 10.33158 / ASB.2015v1i2p68.
- Fabrick, J., Oppert, C., Lorenzen, M., Morris, K., Oppert, B. y Jurat-Fuentes, J. (2009). A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 284(27), 18401–18410. doi: 10.1074 / jbc.M109.001651
- Gatehouse, A., Hilder, V. y Boulter, D. (1992). Potential of plant derived genes in the genetic

- manipulation of crops for insect resistance. *Biotechnology in Agriculture*, 7, 155-181.
doi: https://doi.org/10.1007/978-94-011-1654-1_73
- Girard, F., Vachon, V., Lebel, G., Préfontaine, G., Schwartz, J., Masson, L. y Laprade, R. (2009). La modificación química de mutantes de cisteína individuales de toxina Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis* revela la importancia de los elementos estructurales del dominio I en el mecanismo de formación de poros. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1788(2), 575-580. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.11.001>
- Gómez, I., Sánchez, J., Miranda, R., Bravo, A. y Soberón, M. (2002). Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix -1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *FEBS Letters*, 513(2), 242–246. doi: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02321-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02321-9)
- Gómez, I., Sánchez, J., Muñoz-Garay, C., Matus, V., Gill, S.S., Soberón, M. y Bravo, A. (2014). Las toxinas Cry1A de *Bacillus thuringiensis* son proteínas versátiles con múltiples modos de acción: dos pre-poros distintos están implicados en la toxicidad. *Biochemical Journal*, 459(2), 383 – 396. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20131408>
- Ishiwata, S. (1901). On a kind of severe flasherie (sotto disease). *Dainhan Sanbshi Kaiho*, 9, 1-5. Recuperado de [https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Danihan+Sanbshi+Kaiho&title=On+a+kind+of+severe+flasherie+\(sotto+disease\)&author=S+Ishiwata&volume=9&publication_year=1901&pages=1-5&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Danihan+Sanbshi+Kaiho&title=On+a+kind+of+severe+flasherie+(sotto+disease)&author=S+Ishiwata&volume=9&publication_year=1901&pages=1-5&)
- Knowles, B. y Ellar, D. (1987). Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* -endotoxins with different specificity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 924(3), 509–518. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/030441658790167X>
- Kovács-Hostyánszki, A., Espíndola, A., Vanbergen, A., Settele, J., Kremen, C. y Dicks, L.

- (2017). Ecological intensification to mitigate impacts of conventional intensive land use on pollinators and pollination. *Ecology Letters*, 20(5), 673-689. doi: <https://doi.org/10.1111/ele.12762>
- Lambert, B. y Peferoen, M. (1992). Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience*, 42(2), 112-122. doi: <https://doi.org/10.2307/1311652>
- Malpartida-Zevallos, J., Narrea-Cango, M. y Dale-Larraburre, W. (2013). Patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., sobre el gusano defoliador de maracuya *Dione juno* (Cramer) (Lepidoptera: Nymphalidae) en laboratorio. *Ecología Aplicada*, 12(2), 75-81. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/ecol/v12n2/a02v12n2.pdf>
- Pacheco, S., Gómez, I., Gill, SS., Bravo, A. y Soberón, M. (2009). Mejora de la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxinas por fragmentos de una toxina vinculante caderina se correlaciona con la formación de oligómeros. *Péptidos*, 30(2), 583-88. doi: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2008.08.006>
- Molina-Moreira, N. y Arias De Lopez, M. (2006). Bioetología de *Dione juno* andicola (Bates, 1864) (Lep.: Nymphalidae: Heliconiinae). *Revista Nicaragüense de Entomología*, 66(2), 9-18. Recuperado de <https://docplayer.es/37570758-Bioetologia-de-dione-juno-andicola-bates-1864-lepidoptera-nymphalidae-heliconiinae.html>
- Rodríguez-Almazán, C., Reyes, E. Zúñiga-Navarrete, F., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Evans, A., Likitvivatanavong, S., Bravo, A., Gill, SS. y Soberón, M. (2012). Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subs. israelensis Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal*, 443(3), 711–717. doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20111579>
- Rosas-García, N. (2008). Avances en el desarrollo de bioinsecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 39-63. Recuperado de

[https://www.researchgate.net/publication/26850657_Avances_en_el_desarrollo_de_fo
mulaciones_insecticidas_a_base_de_Bacillus_thuringiensis](https://www.researchgate.net/publication/26850657_Avances_en_el_desarrollo_de_fo
mulaciones_insecticidas_a_base_de_Bacillus_thuringiensis)

Rosas-García, N. y De Luna-Santillana, E. (2006). Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 22(3), 135-142. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/26475623_Disenio_de_una_matriz_microen
capsulante_a_partir_de_compuestos_biodegradables_para_la_elaboracion_de_un_bio
insecticida](https://www.researchgate.net/publication/26475623_Disenio_de_una_matriz_microen
capsulante_a_partir_de_compuestos_biodegradables_para_la_elaboracion_de_un_bio
insecticida)

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. y Dean, D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 775-806. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98934/pdf/mr000775.pdf>

Villani, H., Campos, A. y Gravena, S. (1980). Eficacia de *Bacillus thuringiensis* Berliner y fenitrotión + fenvalerato para el control de la larva del maracuyá *Dione juno juno* (Cramer, 1779) (Lepidoptera, Heliconidae). *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil*, 9(2), 255-260. Recuperado de <https://www.cabdirect.org/?target=%2fcabdirect%2fabstract%2f19820589889>

Zahm, S. y Blair, A. (1993). Cancer among migrant and seasonal farmworkers: an epidemiologic review and research agenda. *American Journal of Industrial Medicine*, 24(6), 753-66. doi: <https://doi.org/10.1002/ajim.4700240612>

7.4 Fuentes electrónicas

Alvites, S. (2012). *Determinación del ciclo biológico del gusano negro del maracuyá Dione juno juno bajo condiciones no controladas*. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/163246658/Determinacion-del-ciclo-biologico-del-gusano-negro-del-maracuya-dione-juno-juno-cramer-bajo-condiciones-no-controladas>.

- Sánchez, J. y Rivas, I. (2008). *Ciclo biológico y hábitos alimentarios de Dione juno juno huascuma (Lepidoptera: Nymphalidae) del platanar, Malinalco, estado de México*. Recuperado de <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2008/BHN/99-104.pdf>
- Schweintesiús, R. y Gómez, M. (1995). *El Maracuyá-Fruta de la pasión: Situación y tendencias de la producción y el comercio en México y en el Mundo*. Recuperado de <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300097638>
- Soberón, M. y Bravo, A. (2003). *Bacillus thuringiensis y sus toxinas insecticidas*. Recuperado de <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap12/>

ANEXOS

ANEXO 01. FORMATO PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD

La técnica para la toma de datos es la observación ya que requiere que el investigador tenga acceso directo al evento de estudio y sea contemporáneo con éste, es decir, que sea testigo de las manifestaciones del evento y el instrumento es la guía de observación.

- Formato de guía de observación 1:
 1. Laboratorio: Biotecnología de la Producción
 2. Localización: Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión
 3. Observador: Jean Piere Jesús Quiliche Duran

Tabla 12.

Guía de observación de Bioensayos con *Dione juno*

Protoxina	Concentración	Observación después de 7 días	
		Vivos	Muertos
Concentración (ng/cm ²)	0	19	1
	0.5	10	10
	1	6	14
	2	1	19
Tipo de cepa	Sin Bt	19	1
	Bt-10	9	11
	Bt-15	6	14
	Bt-21	11	9
	Bt-23	1	19
	Bt-32	5	15
Formulación C: Cristal E: Espora	Sin E-C	19	1
	C	10	10
	E-C	3	17

ANEXO 02. FIGURAS COMPLEMENTARIAS

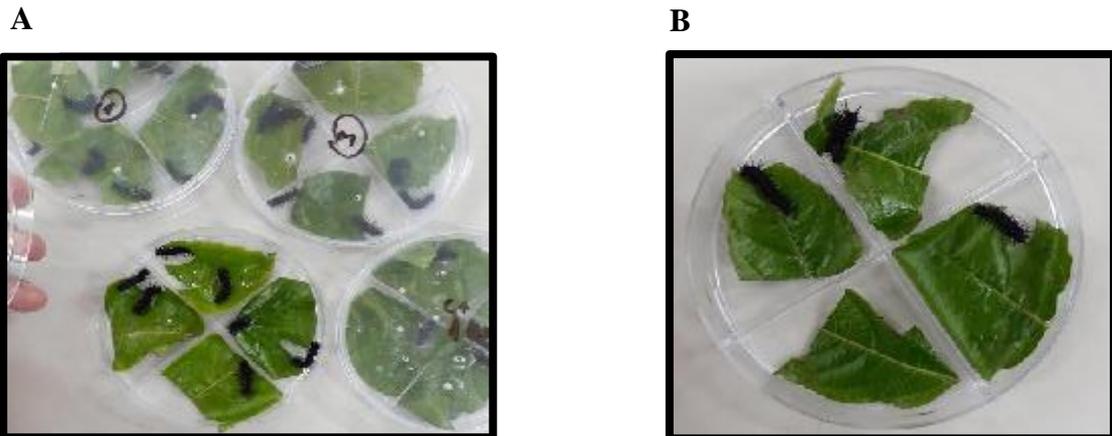


Figura 13. Bioensayos con larvas de tercer estadio de *Dione juno*. **A.** Tratamientos a diferentes concentraciones de toxina. **B.** Tratamiento con distintas cepas de Bt.

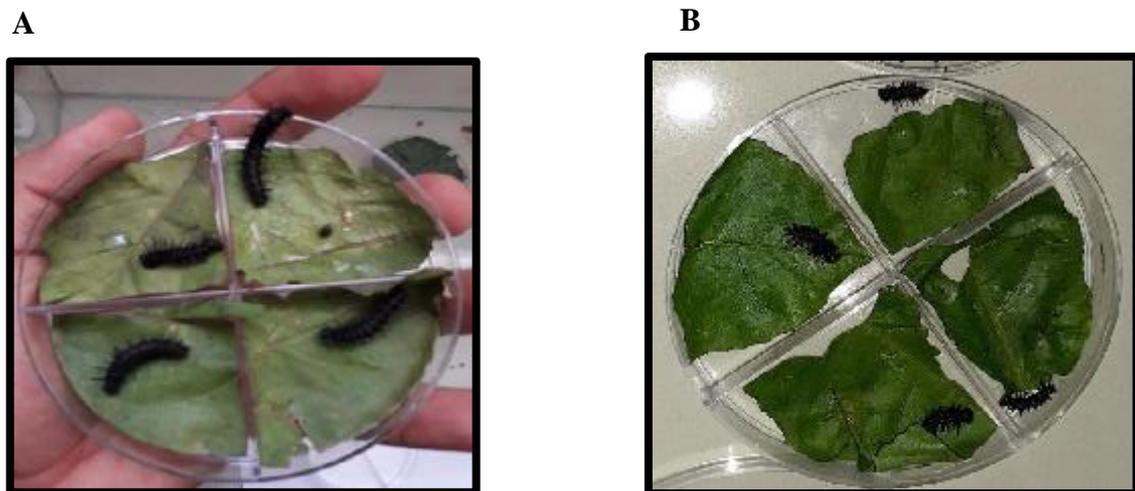


Figura 14. Bioensayos con larvas de tercer estadio de *Dione juno*. **A.** Control negativo. **B.** Tratamiento con diferentes formulaciones de Bt.

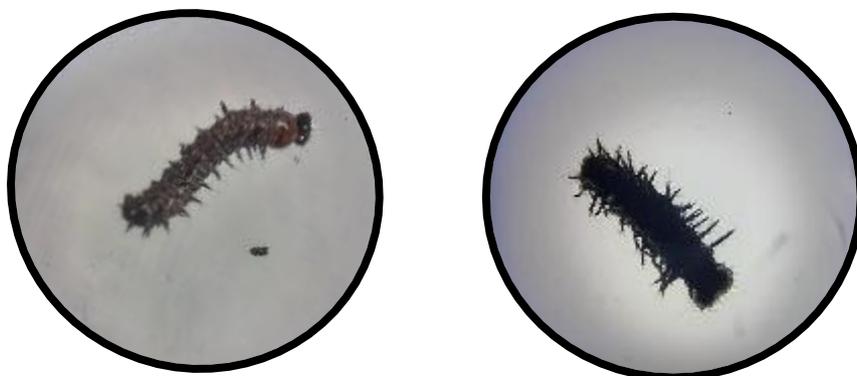


Figura 15. Observación en el estereoscopio (20X) de larvas de tercer estadio de *Dione juno*. **A.** Larva viva. **B.** Larva muerta.

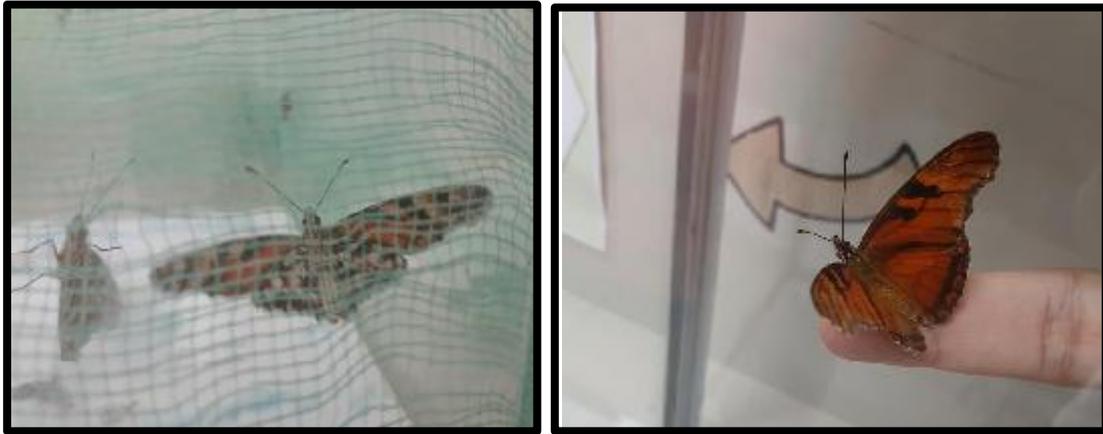


Figura 16. Acondicionamiento de adultos de *Dione juno* en condiciones de laboratorio.

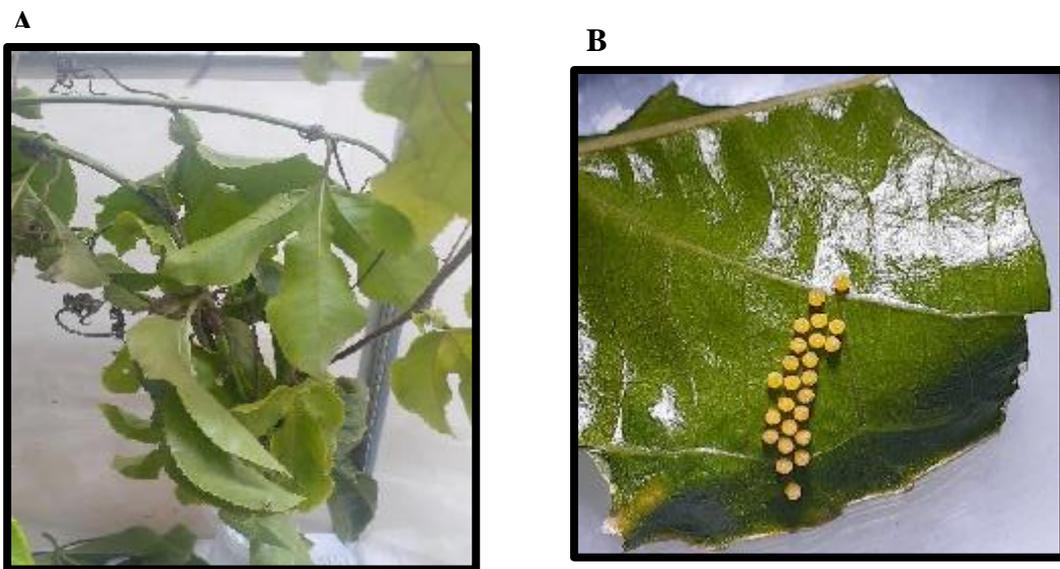


Figura 17. Estadio de insecto plaga *Dione juno*. **A.** Larvas. **B.** Huevos.

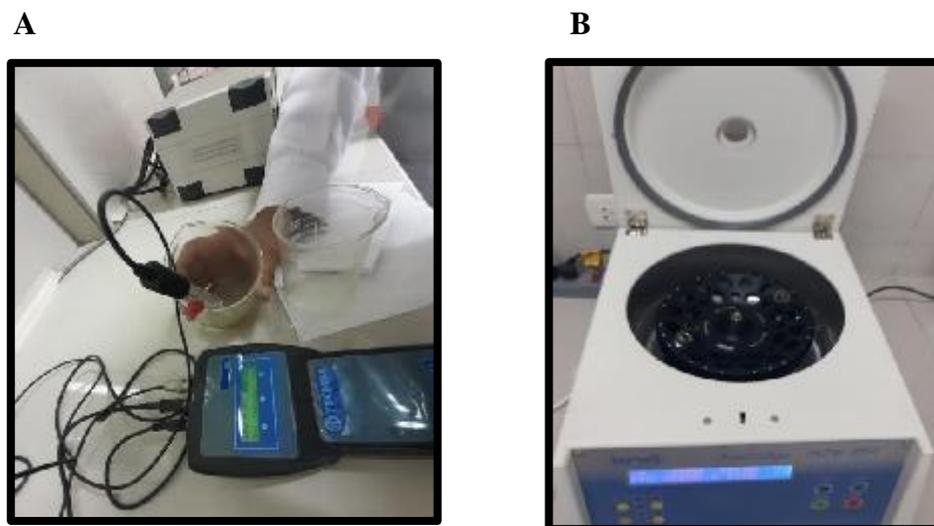


Figura 18. Trabajo en laboratorio **A.** Regulacion del Medio HCT. **B.** Centrifugación de toxinas de Bt.