



**FORMULACIÓN PRELIMINAR DE RIZOBACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS
DE *Tecia solanivora* INSECTO PLAGA DE LOS TUBÉRCULOS DE PAPA
(*Solanum tuberosum*)**

ESTUDIANTE:

EMMANUEL JOSE GUERRA LURAN

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C, 2019**

**FORMULACIÓN PRELIMINAR DE RIZOBACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS
DE *Tecia solanivora* INSECTO PLAGA DE LOS TUBÉRCULOS DE PAPA
(*Solanum tuberosum*)**

**ESTUDIANTE:
EMMANUEL JOSE GUERRA LURÁN**

**ASESOR EXTERNO:
DR. JAVIER VANEGAS GUERRERO - UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO**

**ASESOR INTERNO:
JOVANNA ACERO GODOY M.Sc.**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C, 2019**

DEDICATORIA

*La presente investigación,
Es el resultado de arduo trabajo
Si tienes un sueño pelea por él,
Siempre trata de hacer que lo peor, se vea mejor
No mires cuantas veces surgen problemas
Solo cuenta cada que te pones de pie
Si eres valiente puedes seguir adelante.*

Emmanuel José

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco primero a Dios, por ayudarme a culminar este gran logro en mi vida; y darme en varios momentos, la fuerza para seguir aun así se presentarán dificultades.

Al Dr. Javier Vanegas, la oportunidad de pertenecer a este gran proyecto, proporcionarme las asesorías, enseñarme nuevos conocimientos; así mismo a los integrantes del laboratorio de microbiología ambiental de la Universidad Antonio Nariño.

A la profesora Jovanna Acero Godoy MSc. mi asesora interna por la ayuda con paciencia y disposición a lo largo de este proyecto.

A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por la formación académica integral.

A mis padres y a mi tía Albenia por estar siempre presente, dispuestos ayudarme y apoyarme en cada paso al transcurrir de la carrera.

A mis profesoras Martha Gómez e Ingrid Pinillos, por creer en mí, ser modelos y ejemplos a seguir.

A Paola (Kosme Azarova), Tefa y Verito por ser las mejores amigas, compañeras y colegas.

Las actividades de esta investigación están enmarcadas dentro del proyecto “Interacciones entre *Tecia solanivora*, rizobacterias con actividad entomopatógena y plantas de papa para aumentar la competitividad de la cadena papera en el Departamento de Boyacá” Financiado por la UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO, COLCIENCIAS y La Gobernación de Boyacá con contrato 298-2018 (FP44842-290-2018).

**FORMULACIÓN PRELIMINAR DE RIZOBACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS
DE *Tecia solanivora* INSECTO PLAGA DE TUBÉRCULOS DE PAPA
(*Solanum tuberosum*)**

RESUMEN EJECUTIVO

Tecia solanivora es uno de los principales insectos plaga del cultivo de papa en Suramérica y Centroamérica. Una opción de control de este insecto es el uso de bioformulados que constan de un material transportador y un agente biológico como rizobacterias entomopatógenas. En este estudio, se realizó una bioformulación preliminar con tres transportadores (turba, roca fosfórica y ceniza volante). La metodología incluyó: verificación de la viabilidad bacteriana de tres rizobacterias, con los transportadores roca fosfórica, ceniza volante y turba, por 90 días además de la evaluación del crecimiento bacteriano en un medio mínimo evaluando diferentes concentraciones de glucosa y tres fuentes de carbono y la medición del potencial de las rizobacterias para la protección y disminución del daño ocasionado por *T. solanivora* y promoción del crecimiento al tubérculo. Se encontró que en los tres transportadores las rizobacterias preservaron la biomasa a los treinta días, siendo la turba, el transportador con los mayores recuentos y mejor conservación de la viabilidad de las rizobacterias. Después de este tiempo, se observó un descenso de la biomasa hasta los noventa días. La dextrosa al 5% fue el mejor tratamiento para el crecimiento bacteriano. De las rizobacterias estudiadas, TN110 fue la que mejor protegió al tubérculo del ataque de *T. solanivora*, seguido de C47 y TN106, en sí, ninguna de las rizobacterias promovió el crecimiento. Se concluye que, una bioformulación que contenga turba y TN110 puede ser una buena alternativa para el control de larvas de *T. solanivora*.

Palabras clave: *Tecia solanivora*, Formulaciones, Rizobacterias entomopatógenas, *Solanum tuberosum*

Estudiante: Emmanuel José Guerra Lurán

Docentes: Jovanna Acero Godoy, Javier Guerrero Vanegas

Fecha: octubre de 2019

Institución: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Tabla de contenido

INDICE DE FIGURAS.....	11
INDICE DE TABLAS.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos específicos	17
<u>1.</u> ANTECEDENTES	18
1.1 Control biológico de <i>T. solanivora</i>	18
1.2 Producción de bioformulaciones.....	20
2. MARCO REFERENCIAL	22
2.1 Cultivo de papa	22
2.2 Insectos plaga que afectan a la papa.	23
2.2.1 <i>Tecia solanivora</i>	24
2.2.2 Manejo integral contra <i>T. solanivora</i>	27
2.3 Rizobacterias entomopatógenas	28
2.4 Rizobacterias promotoras de crecimiento.....	31
2.5 Bioformulación.	31
2.5.1 Características de una bioformulación.	31
2.5.2 Pruebas en campo de una bioformulación.	32
2.5.3 Normatividad vigente sobre bioproductos	33
2.6 Plaguicidas de síntesis química.....	34
2.6.1 Insecticidas utilizados para tratar a <i>T. solanivora</i>	35
3. DISEÑO METODOLÓGICO.....	36
3.1 Tipo de estudio.....	36
3.2 Universo	36
3.3 Población.....	36
3.4 Muestra	36
3.5 Hipótesis.....	36
3.6 Variables	37

4. METODOLOGIA.....	39
4.1 Capacidad de retención de agua de cada transportador	39
4.2 Preparación de la Bioformulación.....	40
En la preparación de la Bioformulación se siguió los siguientes pasos:	40
4.2.1 Preparación del inóculo bacteriano.	40
4.2.2 Preparación de bioformulación.....	40
En la inoculación del transportador se realizó de la siguiente manera:	40
4.3 Evaluación de la bioformulación.....	41
4.3.1Conteo de colonias utilizando el método de la microgota.....	41
4.4 Optimización de medio mínimo M9 para el crecimiento de las rizobacterias.	41
4.5 Bioensayos de protección del tubérculo <i>in vitro</i>	42
4.5.1 Preparación del inóculo bacteriano para los bioensayos.....	42
Para preparación del inóculo bacteriano en los bioensayos, s.....	42
4.5.2 Montaje del bioensayo.	43
4.5.3 Lectura de la prueba.	43
4.5.4 Evaluación de diferentes tratamientos.	43
4.6 Evaluación Promoción de crecimiento en suelo	44
4.6.1 Siembra de papas.....	45
4.7 Análisis estadístico.....	45
5.1 Evaluación de los transportadores	46
5.2 Comportamiento de las rizobacterias en medio mínimo M9.	49
5.3 Bioensayos de protección al tubérculo.	52
5.4 Promoción del crecimiento en suelo.....	54
6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS.....	56
CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	62
8. ANEXOS.....	70

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1: Departamentos que presentan la mayor producción de papa en Colombia.....	23
Figura No. 2 Ciclo de vida de <i>Tecia solanivora</i>	26
Figura No. 3: Daño típico a los tubérculos causados por <i>T. solanivora</i>	26
Figura No. 4 Representación del manejo integral de <i>Tecia solanivora</i>	28
Figura No. 5: Mecanismos de patogenicidad de rizobacterias entomopatógenas.....	30
Figura No 6. Requerimientos del registro de bioplaguicidas establecido por AGROSAVIA.....	34
Figura No. 7: Comportamiento de las rizobacterias en turba, en un periodo de 90 días.....	44
Figura No. 8: Comportamiento de las rizobacterias en roca fosfórica, en un periodo de 90 días.....	45
Figura No. 9: Comportamiento de las rizobacterias en ceniza volante, en un periodo de 90 días.....	46
Figura No. 10: Evaluación del crecimiento de las rizobacterias con diferentes concentraciones de glucosa, en un periodo de 24 hr.....	47

Figura No. 11: Evaluación del crecimiento de las rizobacterias con diferentes concentraciones de glucosa, en un periodo de 48 hr.....	48
Figura No. 12: Evaluación del crecimiento de las rizobacterias con diferentes fuentes de carbohidratos, al 5%, en un periodo de 24 y 48 hr.....	49
Figura No. 13: Disminución del porcentaje de daño respecto al control negativo en <i>S. tuberosum</i> causado por <i>T. solanivora</i> , a una absorbancia de 0,2 y 0,5.....	50
Figura No. 14: Disminución del porcentaje de daño respecto al control negativo, causado por <i>T. solanivora</i>	51
Figura No. 15: Disminución del porcentaje de daño respecto al control negativo, causado por <i>T. solanivora</i> . En dos variedades de papa (<i>Pastusa</i> y <i>criolla</i>) inoculadas a una absorbancia de 0,5.....	52
Figura No. 16: Peso seco promedio de las plantas de papa, al ser inoculadas con las rizobacterias entomopatógenas.....	53

INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1 <i>Insectos plaga que afectan las papas. Recuperado y modificado en línea de: FEDEPAPA y Gobernación de Cundinamarca</i>	23
Tabla No. 2 Diferentes insecticidas para el control de <i>Tecia solanivora</i> en Colombia.....	35
Tabla No. 3. <i>Descripción de variables dependientes e independientes del estudio</i>	34
Tabla No. 4 <i>Tratamientos a evaluados en el presente estudio</i>	40

INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum*) es uno de los cultivos de gran importancia a nivel mundial y nacional, ya que constituye una de las fuentes vegetales más importantes, debido a su alto contenido de carbohidratos y proteínas. El cultivo de papa se ve afectado por una gran variedad de plagas, en donde se destaca *Tecia solanivora* es una plaga de la papa originaria de Centroamérica. Las larvas de *T. solanivora* causan daños directos a los tubérculos de papa tanto en campo como en almacén, lo cual ocasiona pérdidas económicas por el consumo de la cosecha afectada.

El control de *Tecia solanivora*, abarca diferentes formas: químico, etológico, biológico, y cultural siendo el control químico el más utilizado, por su lado el control biológico emplea la ayuda de microorganismos los cuales poseen exoproductos, estos son naturalmente patógenos en contra de este insecto, en la actualidad *Bacillus thuringensis* una de las bacterias más conocidas y utilizadas para tratar a *T. solanivora*. Para lograr suministrar un producto biológico al campo, se hace necesario realizar un método de transporte, una forma de alcanzar esto es mediante las bioformulaciones las cuales logran suministrar un ambiente propicio al crecimiento y ayudan a preservar el microorganismo a pesar de las condiciones adversas. Por lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿ Que tipo de bioformulado es capaz de preservar la viabilidad de las rizobacterias entomopatogenas de *Tecia solanivora*?

Una bioformulación está basada en transportadores y agentes biológicos ⁽¹⁾. Los transportadores pueden ser: suspensiones, materiales sólidos, talcos y medios líquidos.

Las bioformulaciones pueden ser aplicadas sobre semillas, plantas y/o suelo, con el fin de mejorar la fertilidad de los suelos y así ayudar directamente al crecimiento de la planta. También pueden ayudar la defensa de la planta frente a

fitopatógenos ⁽²⁾. De hecho, el uso de bioformulados para el control de plagas en la agricultura, ha sido de gran avance como medida alternativa de productos químicos sintéticos, por ser considerado de seguridad humana y medioambiental.

Entre los diferentes transportadores existentes, los transportadores sólidos se destacan porque facilitan un ambiente propicio para el crecimiento de la planta, ayudando a las bacterias presentes en la bioformulación a colonizar el suelo. Además, los transportadores sólidos brindan una superficie protectora, son ambientalmente sostenibles, no tóxicos y de fácil aplicación ^(4, 5).

Los microorganismos contenidos en una bioformulación pueden ser aislados de la rizósfera. En esta investigación, tres rizobacterias (*Raoultella terrigena* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN110) provenientes de cultivos de papa en Boyacá (Colombia), fueron evaluadas como parte de una bioformulación sólida para ser suministrada en campo. Como transportadores se utilizaron roca fosfórica, ceniza volante y turba. La metodología incluyó la determinación de la viabilidad de las tres rizobacterias, haciendo inoculación en los diferentes transportadores, sobre un medio mínimo de crecimiento. Posteriormente, se optimizó el medio mínimo M9 variando diferentes concentraciones y fuentes de carbono. En los bioensayos de protección se utilizaron dos tipos de papa, la pastusa y criolla. En éstos bioensayos *in vitro* de protección inicialmente se evaluaron dos concentraciones (0,2 y 0,5 de absorbancia), de esa manera se encontró la concentración en que las rizobacterias protegieron mejor al tubérculo. Seguidamente se aplicó en la papa criolla la mejor concentración que protegió a la papa pastusa. Finalmente se ejecutó un bioensayo para evaluar a los dos tipos de papa bajo las mismas condiciones *in vitro* y poder valorar a qué tipo de papa afecta más *Tecia solanivora*.

El aporte de esta investigación, es suministrar una bioformulación sólida que contiene rizobacterias con actividad entomopatógena dirigida al estado larval de este insecto, que sirva de guía para la protección a los cultivos de papa contra el ataque de *T. solanivora*, satisfaciendo la necesidad de implementación de ésta alternativa como tratamiento de este insecto y a la disminución del uso de pesticidas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar una formulación preliminar de rizobacterias entomopatógenas contra el ataque de *Tecia solanivora* en tubérculos de papa.

Objetivos específicos

1. Determinar la viabilidad en turba, ceniza volante y roca fosfórica como transportadores de las rizobacterias entomopatógenas *Raoultella terrigena* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN110.
2. Seleccionar la fuente de carbono óptima para el crecimiento de las rizobacterias a partir de un medio mínimo
3. Establecer el efecto de biocontrol de las rizobacterias entomopatógenas sobre *Tecia solanivora*
4. Comprobar el efecto de rizobacterias entomopatógenas sobre la promoción de crecimiento en plantas de papa bajo condiciones de invernadero

1. ANTECEDENTES

1.1 Control biológico de *T. solanivora*.

En la actualidad, el control de *T. solanivora* principalmente se realiza por insecticidas químicos, los cuales no tienen un control eficiente de esta plaga⁽⁶⁾. En consecuencia, causan una serie de problemas ambientales tales como la contaminación ambiental pues estos insecticidas suelen lixiviarse o filtrarse, llegar a los alimentos y fuentes hídricas y, en consecuencia, el hombre es uno de los seres vivos más susceptibles a esta situación y por lo tanto quien va a presentar efectos adversos en la salud^(7, 8).

Como alternativa al uso de plaguicidas, se ha evidenciado la ayuda de microorganismos en plantas para el control de fitopatógenos⁽³⁾. Algunas logran la colonización de la rizósfera y sobreviven a las condiciones ambientales gracias a la producción de exoproductos biológicamente activos que pueden tener actividades microbianas líticas y tóxicas⁽⁹⁾.

El género bacteriano más utilizado como biocontrolador frente a *Tecia solanivora* es *Bacillus*, el cual se destaca por tener una amplia actividad biocontroladora contra diferentes insectos, hongos y nematodos. Entre el género *Bacillus*, se destaca *Bacillus thuringiensis* como uno de los insecticidas biológico más utilizado en el mundo para controlar organismos plaga¹⁰. Es el caso de Crickmore, quien en 1998 reportó que las diferentes proteínas producidas por esta bacteria, afectan a lepidópteros, dípteros, y coleópteros; las proteínas que se ven implicadas en esta acción, son: *Cry I*, *Cry II*, *Cry III* respectivamente, y como principal característica evidenció actividad parecida a la que presenta un pesticida comercial⁽¹¹⁾.

En 2004 Bosa C. y Cotes A ⁽¹²⁾. evaluaron el efecto de la actividad enzimática de *Serratia marcescens*, previamente sometida en contacto con larvas de *Tecia solanivora* y a crecimientos continuos sobre medios suplementados con sustratos inductores de enzimas y siendo estas actividades ligeramente mayores cuando la bacteria creció en los medios suplementados con el homogeneizado de larvas del insecto.

Otra estrategia exitosa para el control de esta plaga a nivel de post-cosecha es el uso de virus. Espinel-Correal (2010) ⁽¹³⁾ reportan el aislamiento y la patogenicidad de un granulovirus en Colombia con actividad entomopatógena contra *T. solanivora*. En esa investigación, se evaluó como el granulovirus afecta a las larvas de diferentes instares, observándose que su patogenicidad se reflejaba en la capsula cefálica, ocasionándoles un retraso en su desarrollo y a su vez una mayor duración transitoria de dos semanas, en cada fase de su ciclo de vida.

Aislamientos nativos de *Beauveria spp*, fueron evaluados como microorganismos entomopatogenos contra *T. solanivora*. Villamil J y Martinez J. en 2014 ⁽¹⁴⁾ Los aislamientos fueron obtenidos de larvas y adultos de gusano blanco *Premmotrypes vorax*, *Aepytus sp*, *Rinchophorus palmarum*, *Hypothenemus hampei*, Se seleccionaron in vitro, de forma preliminar cinco de los siete aislamientos de hongos obtenidos: Bv01, Bv03, Bv04, Bv05 y Bv07, los cuales ocasionaron mortalidad superior al 10%, se destaca Bv03 y Bv05 en obtener mortalidades acumuladas (7,4 y 8,5%, respectivamente). Siendo caracterizados, y resultando pertenecientes al género *Beauveria spp*. Se confirmó el bajo potencial los hongos entomopatogenos nativos para el control de larvas de *T. solanivora*.

Pantoja L. en 2018 aisló y reportó diez variedades de rizobacterias las cuales son productoras de moléculas de tipo Acil Homoserina Lactonas (AHL). En este estudio se comprobó mortalidad mayor del 70% contra larvas del primer instar de *Tecia solanivora*. Estas rizobacterias presentan diferentes mecanismos de

patogenicidad como: proteasas, lipasas, quitinasas, hemolisinas, sideróforos, ácido cianhídrico (HCN), entre otros ⁽¹⁵⁾.

1.2 Producción de bioformulaciones.

Para evidenciar potencialización del crecimiento en la formulación, en la investigación realizada por Camelo M en el 2010 ⁽¹⁶⁾ evaluó la viabilidad y estabilidad de *Azotobacter chroococcum* en una bioformulación, encontrándose que después de 105 días de evaluación la cepa era capaz de mantener su viabilidad y actividad biológica.

Martínez L en el año 2010 ⁽¹⁷⁾, reporta que la finalidad de una bioformulación es mejorar la fertilidad del suelo, esto se evidencia por el efecto en el crecimiento de plantas porque puede aumentar la actividad biológica en el entorno de la raíz. En ese estudio, se utilizó alginato de calcio, almidón, dextrina, gelatina, con un microorganismo fúngico considerado entomopatógeno del insecto *Demotispa neivai*. El investigador caracterizó los materiales y coadyuvantes y luego realizó la respectiva bioformulación demostrando que el mejor tratamiento fue cuando adicionó un fotoprotector al 1% (25:75) y gelatina al 10%.

Pallo y Velasteguí en el año 2011⁽¹⁸⁾ realizaron variaciones de bioformulados, sólidos y líquidos a base de *Azospirillum* spp, para ser aplicado en cultivos de maíz. En los resultados se encontró que, a los 180 días, el transportador que mejor mantenía la viabilidad era la mezcla de turba con vermiculita. El crecimiento correspondió a concentraciones de 5.52×10^8 UFC/g. El mejor tratamiento líquido fue la solución de melaza al 2% con la cual se obtuvo una concentración de 3.86×10^8 UFC.

Kumar *et, al* en el año ⁽¹⁾ estudiaron dos transportadores (carbón vegetal y ceniza) para la preparación de bioformulaciones con dos rizobacterias *Bacillus* spp. A30 y *Burkholderia* cepa L2. Los investigadores evaluaron su efecto sobre el crecimiento

de *Solanum lycopersicum*. La viabilidad de las cepas se determinó en 4 momentos con un intervalo de 60 días, durante un período de 240 días. Se concluyó que la cepa L2 con el carbón vegetal como transportador, presentó una mayor viabilidad de la cepa. Al realizar el estudio en el suelo, observaron que ésta bioformulación mejora la fertilidad del suelo y promueve crecimiento de la planta de tomate.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1 Cultivo de papa

Solanum tuberosum es una planta dicotiledónea, perteneciente a la familia de las solanáceas ^(19, 20). A partir del crecimiento de sus raíces, se originan nuevos tubérculos, indispensables como sistema de acumulación de nutrientes y sustancias ⁽²¹⁾.

La clasificación taxonómica de esta planta es la siguiente:

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Subfamilia: Solanoideae

Tribu: Solaneae

Género: *Solanum*

Especie: *Solanum tuberosum*

La papa es utilizada aproximadamente por mil millones de consumidores en todo el mundo ⁽²²⁾. Colombia se encuentra entre los primeros 20 países con mayor producción del tubérculo de papa, sobresaliendo la zona andina como la principal productora, consumidora y comercializadora; debido a que se encuentran las condiciones óptimas para su desarrollo como la temperatura (entre 10°C hasta 15°C) y la altitud (entre 2000 y 3000 msnm). Los departamentos que presentan la mayor producción son Cundinamarca (35%), Boyacá (30%), Nariño (15%) y Antioquia (10%) ⁽²³⁾ (Figura No. 1).



Figura No. 1: Departamentos que presentan la mayor producción de papa en Colombia: **A.** Cundinamarca, **B.** Boyacá, **C.** Nariño **D.** Antioquia. Mapa recuperado y modificado en línea ⁽²⁴⁾ por Guerra Lurán Emmanuel José

2.2 Insectos plaga que afectan a la papa.

Los insectos del orden *Lepidóptera*, *Coleóptera* e *Himenóptera* son los principales oportunistas de la papa ⁽²⁵⁾. Estos insectos pueden atacar diferentes partes de la planta. Un grupo se centra en destruir y comer parte del tubérculo, afectando también la etapa de pos-cosecha. Adicionalmente, otros insectos atacan el follaje de la planta y causan daños indirectos al comer las hojas, tallos y flores, disminuyendo la producción y afectando la eficiencia fotosintética ^(23, 26) (Tabla No. 1):

Parte afectada de la planta	Especie
Tubérculo (en campo)	<i>Premnotrypes vorax</i>
	<i>Tecia Solanivora</i>
	<i>Naupactus sp.</i>
	<i>Phthorimaea operculella</i>
	<i>Milax gagates</i>
Follaje	<i>Epitrix cucumeris</i>
	<i>Agrotis ipsilon</i>
	<i>Liriomyza quadrata</i>
	<i>Copitarsia consuenta</i>
	<i>Symmetrischema plaesiosema</i>
	<i>Frankliniella tuberosi</i>
Tubérculo (en almacenamiento)	<i>Phthorimaea operculella</i>
	<i>Tecia Solanivora</i>
	<i>Rhopalosiphoninus latysiphon</i>
	<i>Symmetrischema plaesiosema</i>

Tabla No. 1 Insectos plaga que afectan las papas. Recuperado y modificado en línea de: FEDEPAPA y Gobernación de Cundinamarca⁽²⁷⁾ por Guerra Lurán Emmanuel José.

2.2.1 *Tecia solanivora*

Tecia solanivora, también conocida como polilla guatemalteca, es un insecto que pertenece al orden *Lepidóptera*. Originaria de Guatemala y por falta de control, se ha dispersado entre los países cercanos como Costa Rica, Panamá, Honduras y El Salvador⁽²⁸⁾, el primer país suramericano afectado por esta plaga fue Venezuela, en el año de 1983. En Colombia, Norte de Santander fue el primer departamento donde se detectó la plaga en el año de 1985, por la llegada de semilla infestada desde Costa Rica. Actualmente, *T. solanivora* está distribuida en Centroamérica, Suramérica y las islas Canarias en España⁽²⁹⁾. En Colombia, los departamentos con mayor prevalencia de este insecto son Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Nariño y Norte de Santander⁽³⁰⁾.

Según Povolny (1973), este insecto corresponde a la siguiente clasificación taxonómica:

Orden: Lepidóptera

Sub-Orden: Dytrisia

Superfamilia: Tineoidea

Familia: Gelechiidae

Tribu: Gnorimoschemini

Género: *Tecia*

Especie: *Tecia solanivora* (Povolny)

El ciclo de vida de *T. solanivora* se divide en cuatro estados: huevo, larva (estados larvales L1, L2, L3 y L4), pupa y adulto (Figura No. 3). La forma infectiva es el estado larval L1, estado en el que después de la eclosión, penetra al tubérculo y empieza a consumirlo para alimentarse de él y crecer. Esto ocasiona que la consistencia del tubérculo pase de ser firme a blanda, y se vuelva más susceptible a la entrada de microorganismos que causan enfermedades secundarias, lo que afecta su apariencia y así mismo su comercialización^(29, 31), ya que los tubérculos pueden verse afectados entre 50% y 100% (Figura No. 3), tanto en campo como en almacenamiento^(31, 32, 33). En las figuras 2 y 3 se observa el ciclo de *T. solanivora* y el daño que causa a la papa.

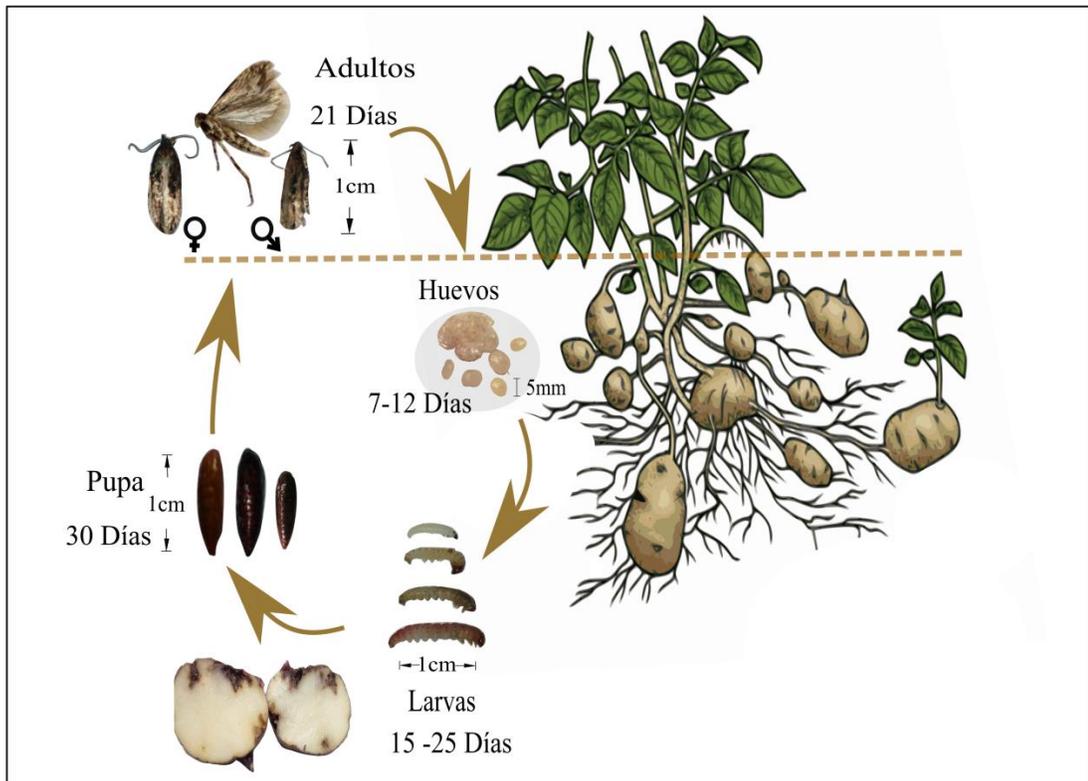


Figura No. 2 Ciclo de vida de *T. solanivora*. Elaborado por Guerra Lurán Emmanuel J.



Figura No. 3: Daño típico a los tubérculos causado por *T. solanivora*.

2.2.2 Manejo integral contra *T. solanivora*.

El programa de manejo integrado de plagas (MIP), constituye como un programa eficiente para contrarrestar las enfermedades y plagas que atacan a los cultivos, con el objetivo de reducir la severidad del ataque, determinar las medidas de control más adecuadas y mantener las poblaciones del insecto a niveles inferiores a los que causan daños económicos ⁽³⁴⁾

El objetivo del control de plagas es mantener las poblaciones a niveles inferiores a los que causan daños económicos ⁽³⁴⁾ (Ver figura 5). Se han establecido algunas metodologías para el control de *T. solanivora* como:

- Control químico, insecticidas comerciales de naturaleza química ⁽²⁷⁾.
- Control etológico, feromonas sexuales ⁽³⁵⁾.
- Control cultural, determinación del nivel de población, cosecha y siembra en tiempos de mayor humedad ⁽²⁷⁾.
- Control biológico, que implica el uso de microorganismos entomopatógenos ⁽³⁶⁾
- Control biotecnológico, que se basa en la producción de plantas genéticamente modificadas ⁽²⁷⁾.

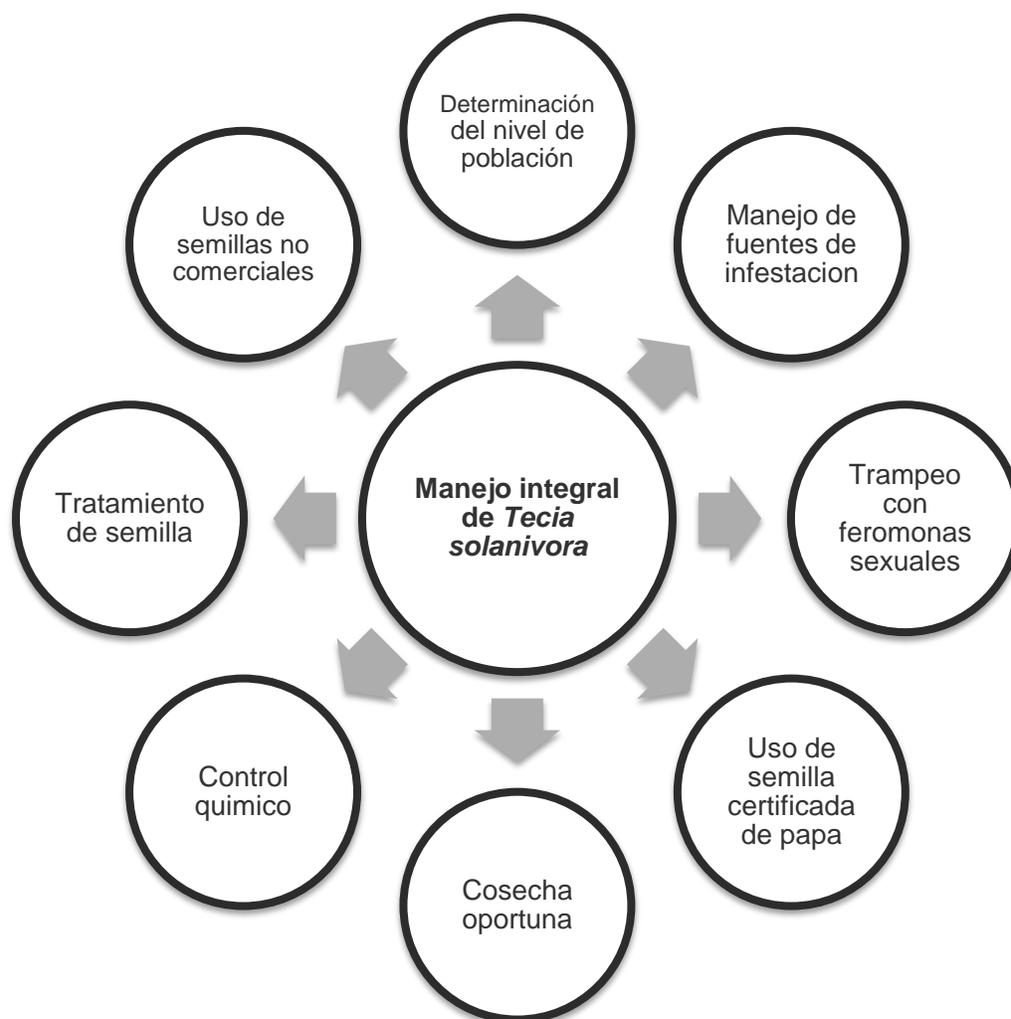


Figura No. 4 Representación del manejo integral de *Tecia solanivora*. Recuperado y modificado de: FEDEPAPA y Gobernación de Cundinamarca. ⁽²⁾

2.3 Rizobacterias entomopatógenas

La actividad entomopatógena en el ámbito de la agricultura, significa la regulación de la población de un organismo que afecta un determinado cultivo, mediante el uso de un microorganismo que pueden ser: hongos, bacterias o virus. Este microorganismo naturalmente tiene actividad para controlar la población o causar la muerte de la plaga ⁽³⁷⁾.

Entre los microorganismos potencialmente entomopatógenos, se encuentran las rizobacterias. Para que las rizobacterias causen infección en el insecto es necesario que sobrevivan a las condiciones adversas del intestino y al sistema inmune. Las estrategias les permiten persistir y superar las defensas inmunológicas de los insectos causando enfermedad o mortalidad del huésped ^(38, 9).

La principal característica de las rizobacterias es la colonización de las raíces, favoreciendo la protección fisicoquímica de la planta al actuar como antagonistas de los patógenos. También, evitan el movimiento de iones tóxicos y ajustan el equilibrio iónico y el transporte de agua en los tejidos vegetales. Las proteasas, lipasas, quitinasas, y el ácido cianhídrico (HCN), entre otros (Figura No. 5), representan los mecanismos de patogenicidad empleados por parte de rizobacterias en controlar fitopatógenos. Además, los microorganismos estimulan la respuesta de defensa de las plantas mediante la absorción de nutrientes o la producción de metabolitos secundarios, enzimas, compuestos orgánicos volátiles y hormonas de crecimiento ^(22, 21), como se observa en la figura 5.

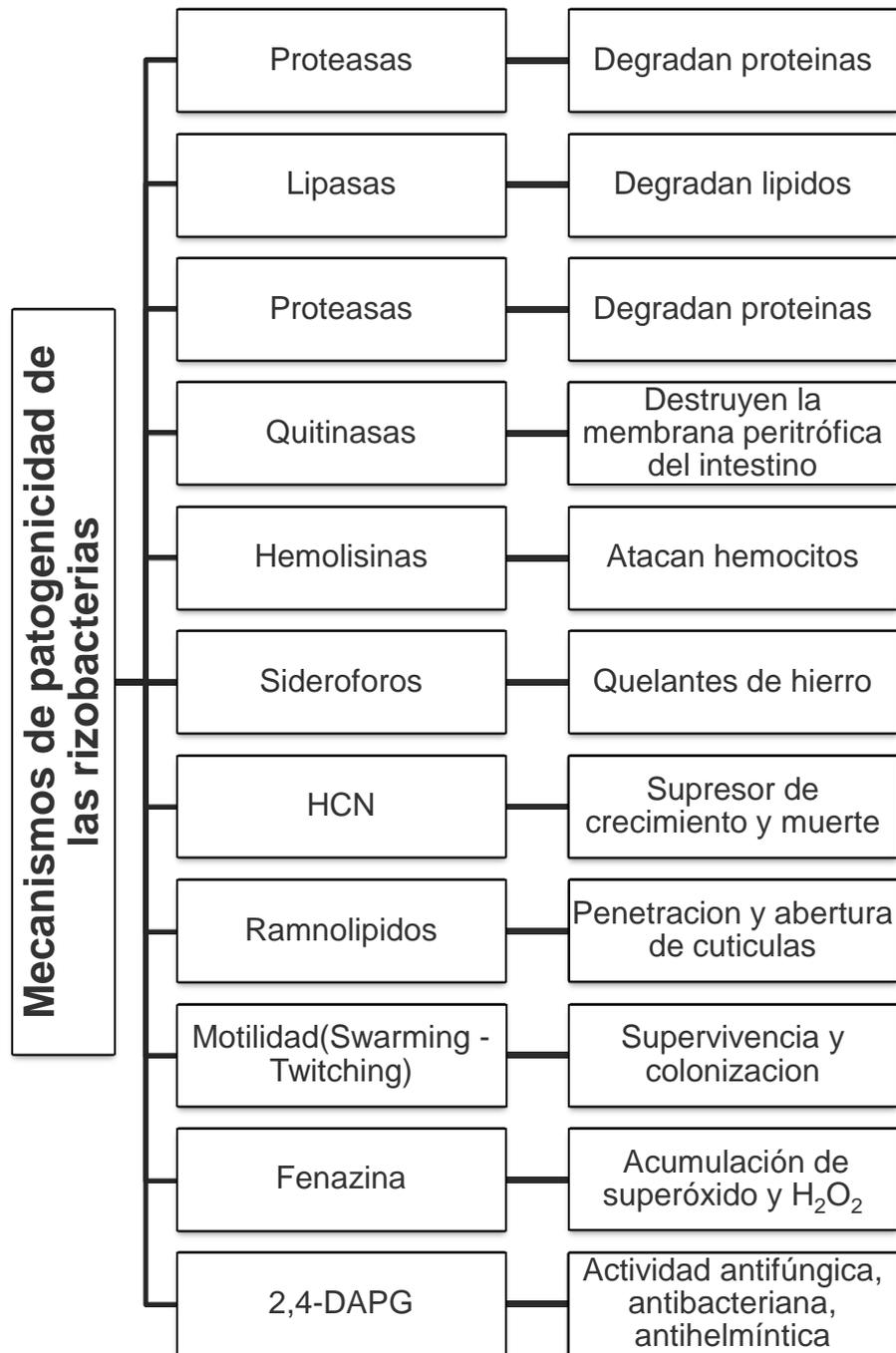


Figura No. 5: Mecanismos de patogenicidad de rizobacterias entomopatógenas. Recuperado y modificado de Pantoja L ⁽¹⁵⁾.

2.4 Rizobacterias promotoras de crecimiento.

La rizósfera vegetal es un entorno altamente competitivo en el que los microorganismos están presentes en abundancia debido a la disponibilidad de nutrientes activamente secretados por la raíz de la planta. Algunas de estas bacterias actúan como simbióticas, las raíces de las plantas apoyan su desarrollo y se denominan rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas realizando procesos bioquímicos como: fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de ácido indol-3-acético, producción de auxinas, giberelinas entre otras fitohormonas para regular el metabolismo vegetal y aumentar la tolerancia al estrés ⁽³⁹⁾. Se ha evidenciado que, en algunos casos, la actividad promotora del crecimiento de las plantas provista por las rizobacterias, es relacionada con su capacidad para suprimir los patógenos vegetales transmitidos por el suelo (bacterias, hongos o insectos), usando mecanismos como la producción de compuestos antimicrobianos o antibióticos ⁽⁴⁾.

2.5 Bioformulación.

La bioformulación son preparaciones las cuales tienen múltiples propósitos, pueden actuar tanto como biofertilizante, como un bioplaguicida y generalmente está basada con portadores sólidos, suspensiones, talcos y líquidos¹, estos puede contener microorganismos beneficiosos en un estado viable destinado a la aplicación de semillas o al suelo, también pueden emplearse para mejorar la fertilidad del suelo y ayudar al crecimiento de la planta al aumentar su número y, por lo tanto, su actividad biológica en el entorno de la raíz, la bioformulación está acompañada de un material conocido como transportador el cual es el que ayuda soportar y preservar los microorganismos en un estado viable².

2.5.1 Características de una bioformulación.

Un bioformulado consta de tres características fundamentales:

1. Apoyar el crecimiento de los microorganismos previstos
2. Soportar el número necesario de células microbianas viables en buenas condiciones fisiológicas durante un período de tiempo aceptable.
3. Aportar suficientes microorganismos en el momento de la inoculación para alcanzar un número umbral de bacterias que generalmente se requiere para obtener una respuesta de la planta, es decir, el inoculante debe contener suficientes bacterias viables después del proceso de formulación ^(16, 40).

Cualquier formulación debe ser estable durante la producción, distribución, almacenamiento y transporte al agricultor, particularmente cuando el ingrediente principal está vivo y es susceptible a cambios, en comparación con los productos químicos agrícolas. Las formulaciones líquidas tienen sus propias ventajas para los sistemas agrícolas de menor escala, como ser uniformes, trabajar más rápido, facilitar el manejo y almacenar; mientras que las formulaciones de base sólida son más baratas y más fáciles de fabricar⁴.

2.5.2 Pruebas en campo de una bioformulación.

Algunos de los requisitos que debe cumplir el inoculante es que debe ser compatible con las prácticas de campo rutinarias, desinfectar solo los tubérculos que serán usados como semillas, facilidad de uso, tener compatibilidad con el equipo de siembra, tolerante al tiempo de almacenamiento, capaz de trabajar en diferentes condiciones y tipos de suelo, capacidad para ayudar a prolongar la supervivencia de las bacterias inoculadas durante el tiempo de cosecha de la planta, es decir, que tenga una vida útil que dura más de una temporada y que el inoculante sea biodegradable, no sea tóxico ni contaminante ^(41. 42).

La producción de un bioformulado requiere mayor producción de biomasa del microorganismo; los coadyuvantes para el producto final se determinarán posteriormente. Uno de los principales objetivos al considerar la inoculación de

plantas es encontrar el mejor aislamiento bacteriano que brinde el efecto deseado en el cultivo objetivo. El siguiente paso es diseñar una formulación de inoculante específica para el cultivo objetivo y un método de aplicación práctica, teniendo en cuenta las limitaciones de los productores, principalmente la temperatura ⁽⁴⁰⁾.

2.5.3 Normatividad vigente sobre bioproductos

El desarrollo y la puesta en el mercado de un nuevo producto, es un proceso complejo que debe ser manejado de forma estructurada; en este proceso, los desarrolladores de bioplaguicidas deben integrar toda la cadena, desde la investigación que incluye una formulación preliminar y el desarrollo del producto hasta su comercialización. Es muy importante que los usuarios finales del futuro producto de biocontrol se encuentren informados de toda la normatividad legal con respecto al bioproducto. Es importante que al ingresar un bioproducto, la entidad encargada de valorar, asegurar, realizar múltiples estudios de calidad es AGROSAVIA y que este cumpla todos los lineamientos tales como (descritos en la resolución 698 del 4 de febrero del 2011⁽⁴³⁾, de igual forma esta normatividad se ve mejor profundizada en el libro reglamentado por agrosavia (Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: agentes de control biológico volumen).⁽⁴⁴⁾

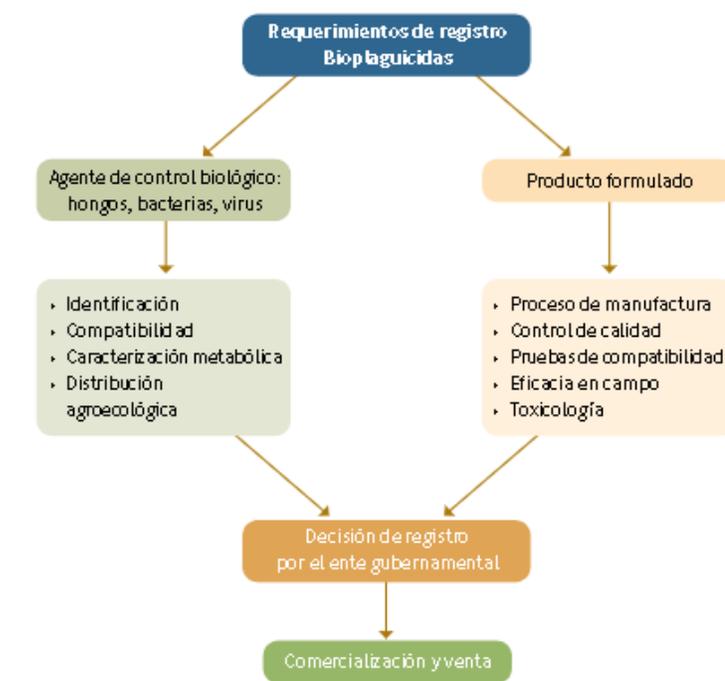


Figura No 6. Requerimientos del registro de bioplaguicidas establecido por AGROSAVIA

2.6 Plaguicidas de síntesis química

Según la FAO, un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. ⁽⁴⁵⁾

2.6.1 Insecticidas utilizados para tratar a *T. solanivora*

De acuerdo a Botina L. ⁽⁴⁶⁾ estos son los insecticidas mayormente comercializados para tratar a *T. solanivora*, estos comprenden diferentes grupos químicos, los departamentos que más utilizan estos son Nariño y Boyacá

Producto comercial	Ingrediente activo	Formulado	ingrediente activo	Desventaja	Dosis comercial
Lorsban 4EC	Clorpirifos (Organofosforado)	Concentrado emulsionable	480 g/L	Puede ser toxico	0,8 – 1,2 lts/h.a
Pirestar 38EC	Permetrina (Piretroide)	Concentrado emulsionable	384 g/L	Altamente toxico	750 cc/ha
Furadan	Carbafuran (Carbamato)	Suspension concentrada	330 g/L	Altamente toxico	3-4 lts/ha

Tabla No. 2 Diferentes insecticidas para el control de *Tecia solanivora* en Colombia ⁽⁴⁶⁾

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de estudio

El trabajo realizado corresponde a un enfoque de una investigación cuantitativa, con un diseño de tipo descriptivo transversal; en donde se evaluó una bioformulación preliminar de rizobacterias entomopatógena en un tiempo de noventa días.

Es cuantitativo sustentado en la elaboración de una formulación preliminar de rizobacterias entomopatógena de *Tecia solanivora*, con evaluación del crecimiento en tres tipos de transportadores.

Es descriptiva, en donde se evaluó la viabilidad de las rizobacterias entomopatógenas en las variedades propuestas de transportadores.

3.2 Universo

Bacterias con actividad entomopatógena frente a *Tecia solanivora*.

3.3 Población

Aislamiento de rizobacterias con potencial entomopatógeno asociada a cultivos de papa.

3.4 Muestra

Aislamiento de rizobacterias con potencial entomopatógeno asociada a cultivos de papa, caracterizadas por Pantoja L. ⁽¹⁵⁾ pertenecientes a la Universidad Antonio Nariño, las cuales están conservadas en glicerol al 20% a -70 °C.

3.5 Hipótesis

Los formulados preparados con tres rizobacterias (*Raoultella terrigena* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN110) utilizando los

transportadores roca fosfórica, ceniza volante y turba, presentan actividad entomopatógena dirigida al estado larval del insecto *Tecia solanivora*.

3.6 Variables

Tabla No. 3. Descripción de variables dependientes e independientes del estudio.

TIPO DE VARIABLE	NOMBRE DE LA VARIABLE	INDICADOR
Dependientes	Crecimiento de las rizobacterias <i>Raoultella terrigena</i> C47, <i>Serratia plymuthica</i> TN106 y <i>Enterobacter asbury</i> TN110	Viabilidad bacteriana
Independiente	Capacidad de retención de los transportadores: turba, roca fosfórica, y ceniza volante	
Dependiente	Crecimiento de las rizobacterias <i>Raoultella terrigena</i> C47, <i>Serratia plymuthica</i> TN106 y <i>Enterobacter asbury</i> TN110	Crecimiento óptimo de las rizobacterias en el medio mínimo
Independiente	Fuentes de carbono y su concentración	
Dependiente	Mortalidad y crecimiento vegetal	Aumento del crecimiento y del peso seco de plantas de papa inoculadas con las rizobacterias

Independiente

Cepas de rizobacterias
Raoultella terrigena C47,
Serratia plymuthica TN106 y
Enterobacter asbury TN110

**Porcentaje de daño
causado por las larvas de
Tecia solanivora frente a
la inoculación de las
rizobacterias.**

4. METODOLOGIA.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo durante el año 2018 e inicios del 2019 en los laboratorios de microbiología ambiental de la Universidad Antonio Nariño, Las actividades de esta investigación están enmarcadas dentro del proyecto “Interacciones entre *Tecia solanivora*, rizobacterias con actividad entomopatógena y plantas de papa para aumentar la competitividad de la cadena papera en el Departamento de Boyacá” Financiado por la UNIVERSIDAD ANTONIO NARIÑO, COLCIENCIAS y La Gobernación de Boyacá con contrato 298-2018 (FP44842-290-2018). Se espera que tenga un buen impacto en los agricultores de dicho departamento al utilizar esta opción biológica y al lograr disminuir el daño ocasionado por *T. solanivora*, indirectamente se esperar disminuir el uso de químicos utilizados para tratar este insecto. Con el fin de lograr producir la bioformulación de rizobacterias entomopatógenas, se realizó la siguiente metodología.

PRIMER OBJETIVO:

Para lograr cumplir las actividades del primer objetivo, se llevaron a cabo las siguientes actividades

4.1 Capacidad de retención de agua de cada transportador

Este procedimiento se realizó a cada transportador (turba, roca fosfórica y ceniza volante), en donde se calculó la capacidad de retención de agua (WHC) mediante la prueba del ‘puño’ ⁽⁴⁷⁾ con algunas modificaciones. De cada transportador se tomó 100 g en un vaso de precipitado de tamaño de 500 ml. Luego se les agregó lentamente agua a los transportadores y se mezcló constantemente para homogeneizar bien la muestra. Cuando el transportador fue lo suficientemente húmedo, al no decantar agua, se detuvo la prueba y se midió cuantos mililitros de agua fueron utilizados. La cantidad total utilizada de agua correspondió al 100%

de retención. Este procedimiento se realizó, para evitar posibles contaminaciones al estar totalmente húmedo el material transportador.

4.2 Preparación de la Bioformulación

En la preparación de la Bioformulación se siguió los siguientes pasos:

4.2.1 Preparación del inóculo bacteriano.

Se realizó una siembra de las tres rizobacterias, *Raoultella terrigena* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN110, en agar LB; se llevaron a incubación por 24 horas a 30°C. Posteriormente, cada una se inoculó en Medio Mínimo de sales M9 y se ajustó la concentración por espectrofotometría a 0,5 de absorbancia, concentración equivalente a 1×10^{11} UFC/mL a una longitud de onda de 600 nm.

4.2.2 Preparación de bioformulación.

En la inoculación del transportador se realizó de la siguiente manera:

De cada transportador se pesaron 100 g, previamente esterilizados dos veces. Posteriormente, se procedió a agregar el inóculo de cada una de las tres bacterias *Raoultella terrigena* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN110, suspendidas en medio mínimo M9, para cada transportador. La cantidad agregada de inóculo a los transportadores fue dependiente de la capacidad de retención de agua de cada transportador. Los tres transportadores se inocularon lentamente la cantidad correspondiente del 80% de la capacidad de retención de agua. El bioformulado fue empacado en bolsas de polietileno a 18°C. Cada tratamiento de las rizobacterias fue realizado por duplicado. Para la evaluación de la viabilidad de cada transportador, se realizó mediante el método de la microgota.

4.3 Evaluación de la bioformulación

Para llevar a cabo la evaluación de cada una de las bioformulaciones en estudio se llevó a cabo la siguiente metodología.

4.3.1 Conteo de colonias utilizando el método de la microgota.

De cada uno de los tratamientos realizados en la bioformulación, se tomó 1,0 g y se suspendió en 9,0 ml de agua destilada estéril. Se realizaron diluciones seriadas en base 10, hasta llegar a una dilución de 10^{-10} . De cada dilución se tomaron 20 μ l, los cuales fueron sembrados en agar LB por duplicado, usando el método de la microgota ⁽⁴⁸⁾. Después de 24 horas de incubación a 30°C, se realizó el conteo de colonias. Este experimento permitió definir cuál transportador mantuvo la mejor viabilidad de las rizobacterias. Se realizaron lecturas de viabilidad cada 15 días, durante 90 días.

SEGUNDO OBJETIVO:

Para lograr cumplir las actividades del segundo objetivo, se realizaron las siguientes actividades

4.4 Optimización de medio mínimo M9 para el crecimiento de las rizobacterias.

Se utilizó un medio mínimo M9, el cual contenía los componentes minerales mínimos para el crecimiento de las bacterias, según el protocolo de ATCC Org ⁽⁴⁹⁾, Chitiva L. ⁽⁵⁰⁾. Los componentes del medio se encuentran descritos en el anexo No. 2.

Se midió la concentración óptima para el crecimiento de las rizobacterias con diferentes concentraciones de glucosa (10,0%, 5,0%, 3,0%, 2,0%, 1,0% y 0,5%) y otras fuentes de carbono (sacarosa, dextrosa y maltosa), con el fin de evaluar la

concentración óptima del crecimiento ⁽⁵¹⁾. Para cada concentración se realizaron de a tres replicas para cada rizobacterias.

TERCER OBJETIVO:

Para el cumplimiento de las actividades del tercer objetivo, se realizaron las siguientes actividades

4.5 Bioensayos de protección del tubérculo *in vitro*.

Los bioensayos para evaluar el potencial de protección de las rizobacterias sobre el tubérculo frente al ataque de *Tecia solanivora*, se realizaron en condiciones *in vitro*, siguiendo los protocolos descritos por Bravo A. y Cerón J. ⁽⁵²⁾, mediante la técnica de la dieta natural contaminada, que consistió en proveer al insecto en estudio, su alimento natural con una suspensión del inoculo bacteriano.

4.5.1 Preparación del inóculo bacteriano para los bioensayos.

Para preparación del inoculo bacteriano en los bioensayos, se realizó una siembra de las tres rizobacterias en agar LB, las cuales fueron incubadas a 30°C por 24 horas; de las cajas que presentaron crecimiento, se tomaron tres colonias y se inocularon en caldo nutritivo (15 mL), suplementado con glicerol al 50% (5.0 mL) y una solución de triptófano al 0,3 mM (0,018 g), que fue puesto en agitación a 150 rpm a 30°C por 24 horas; una vez finalizado el tiempo de incubación las muestras se sometieron a centrifugación y el pellet resultante se utilizó para re-inocular el sobrenadante ajustando la concentración en dos absorbancias (0,2 absorbancia equivalente a 1×10^5 y 0,5 absorbancia equivalente a 1×10^{11}) UFC/mL, leídas a una longitud de onda de 600 nm, con un volumen final de 15 mL. Posteriormente se agregó goma de xantana (0,5% w/v), para mejorar la adherencia de las rizobacterias al tubérculo.

4.5.2 Montaje del bioensayo.

Para el montaje de los bioensayos, se tomaron frascos plásticos de 30 cm de largo x 10 cm de ancho, se colocó una capa de arena de aproximadamente 2 cm, esta estaba bi-estéril, esto con el fin reducir lo mayor posible la contaminación proveniente de la arena. Sobre la capa de arena se colocaron 30 huevos de *T. solanivora* y estos fueron recubiertos con una capa aproximadamente de 3cm de arena. Posteriormente, se colocó la papa previamente inoculada con cada una de las rizobacterias suplementadas con goma de xantana al 0,5% w/v y se cubrieron totalmente de arena hasta llenar el frasco. El frasco se cerró y se dejó a 18°C. Este ensayo se realizó con cinco replicas. Como control positivo se utilizó CHA0 (*Pseudomonas fluorescens*) en cada tratamiento; y en el control negativo se utilizó una papa sin inóculo.

4.5.3 Lectura de la prueba.

La lectura de la prueba, se llevó a cabo a los 30 días de haber realizado el ensayo. Los pasos para las lecturas incluyeron: descartar y separar la arena de la papa, dividir la papa en cuatro secciones, para evidenciar si hubo cambio físico interno causado por *T. solanivora*.

La escala del daño de la papa está contemplada en el Anexo 3, ésta se ejecutó visualmente. La escala fue basada en el protocolo de Carpio C. et al ⁽⁵³⁾, el cual analizó y cuantificó el daño tomando fotos, descifrando el daño con la ayuda de las herramientas tecnológicas Gimp 2.6.4 y Scion Image.

4.5.4 Evaluación de diferentes tratamientos.

Se utilizaron distintos tratamientos para evidenciar el potencial de las rizobacterias bajo algunas variaciones. En todos los tratamientos el montaje del inóculo de las tres rizobacterias fue igual.

Tabla No. 4 Tratamientos evaluados en el presente estudio.

Tipos de tratamientos	Descripción	Tipo de papa
Tratamiento 1	Se realizó una inoculación a dos concentraciones diferentes (0,2 abs; 0,5 abs), para evaluar la concentración óptima de rizobacterias, que protegen del daño de <i>T. solanivora</i> .	Papa pastusa
Tratamiento 2	En la evaluación de otra variedad de papa se realizó una inoculación de las rizobacterias a una absorbancia de 0,5; para evidenciar si las rizobacterias obtenían el mismo potencial de protección y disminución del daño en otras papas.	Papa criolla
Tratamiento 3	Con los dos tipos de papas (una de cada una) anteriormente utilizadas, se realizó una inoculación de las rizobacterias, para descartar que variedad de papa fue mayormente afectada que la otra variedad.	En un mismo frasco dos papas (papa criolla y papa pastusa)

CUARTO OBJETIVO:

Para lograr cumplir las actividades del cuarto objetivo, se llevaron a cabo las siguientes actividades

4.6 Evaluación Promoción de crecimiento en suelo

Para evaluar la promoción de crecimiento de las rizobacterias en suelo, se realizó una siembra de las diferentes rizobacterias en agar LB y se incubaron por 24 horas a 30°C. Posteriormente, se realizó una siembra a caldo nutritivo suplementado con 5 mL de glicerol al 50% y triptófano al 0,3 mM; se incubó en agitación a 150 rpm por 24 horas a 30°C. Luego se centrifugaron las muestras, se

separó el sobrenadante y el pellet y se ajustó a una absorbancia 0,3 equivalente a 1×10^7 UFC/mL, en 15 ml a 600 nm. Posteriormente, se agregó goma de xantana (0,1% w/v). Finalmente se tomó la papa y se sumergió en la mezcla goma xantana-inóculo durante 1 minuto. Este ensayo se montó por quintuplicado. Se utilizaron dos controles negativos: papas mezcladas con agua destilada y caldo nutritivo mezclado con goma de xantana 0,1% w/v.

4.6.1 Siembra de papas.

En este bioensayo, se llevaron a cabo en condiciones de invernadero, inicialmente colocó la papa inoculada con cada una de las rizobacterias en vasos de siembra a una profundidad de 5 a 7 cm y se cubrieron totalmente con el suelo estéril. Para evitar la inundación o encharcamiento de los ensayos, se abrieron agujeros en los vasos de siembra y se dejó en un lugar con abundante luz. El riego se realizó cada tercer día. Este ensayo se hizo por quintuplicado. La lectura del ensayo se hizo a los 27 días. Al cumplirse este tiempo se limpiaron las raíces y se llevaron a secar las raíces y el tallo por tres días a 60°C por separado en bolsas de papel.

4.7 Análisis estadístico.

Se analizaron los resultados obtenidos utilizando la prueba *t* student, este análisis se basa en un tipo de estadística deductiva, determinando si existen diferencias significativas entre las medias de dos muestras (dos colas) de igual varianza. El valor obtenido de esto fue un indicador entre los pares evaluados para determinar la diferencia. A partir de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Cuanto más grande fue diferencia entre las dos muestras, mayor fue la probabilidad de hallar la diferencia.

5. RESULTADOS

Los resultados de este estudio se presentan en el siguiente orden: primero la evaluación de la turba, ceniza volante y roca fosfórica como transportadores de las rizobacterias entomopatógenas. En segundo lugar, se estableció la mejor fuente de carbono para el crecimiento de las rizobacterias a partir de un medio mínimo; en tercer lugar, se determinó del potencial biocontrolador y finalmente la actividad promotora del crecimiento de las rizobacterias.

5.1 Evaluación de los transportadores

En relación a la evaluación de la turba, ceniza volante y roca fosfórica como transportadores de las rizobacterias entomopatógenas *Raoultella terrigena* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN110, se evidenció que todos lograron conservar durante los 90 días a las rizobacterias. (Figuras No. 7,8,9).

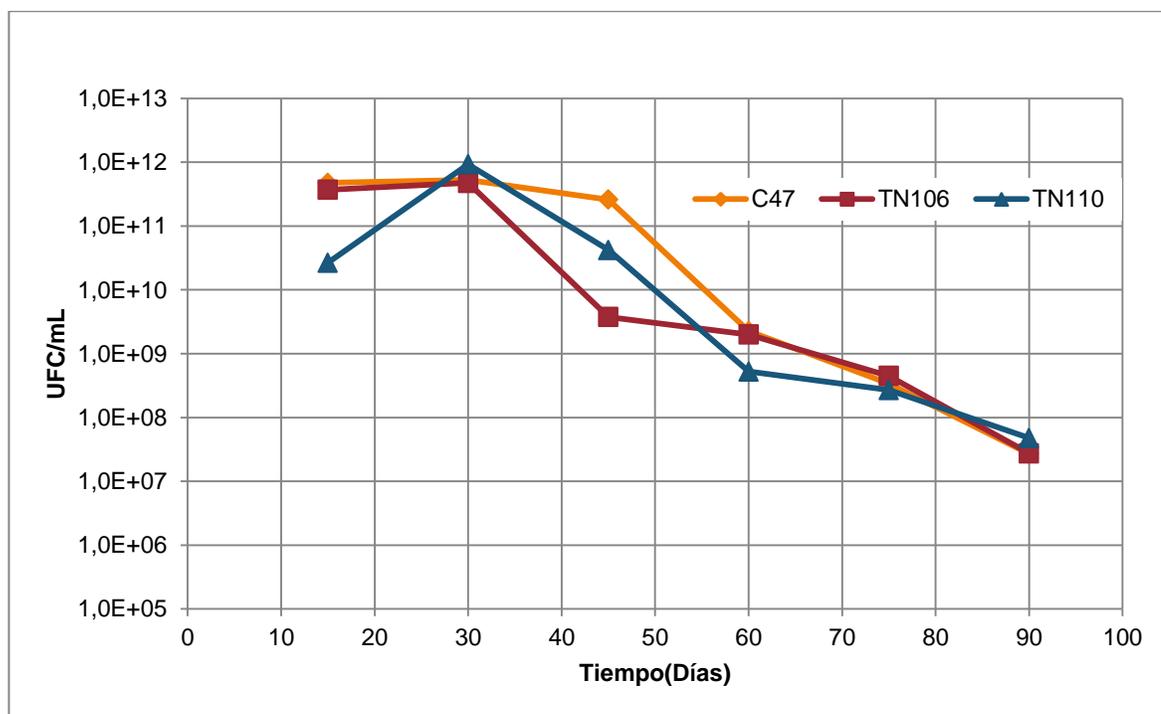


Figura No. 7: Viabilidad de las rizobacterias en turba, en un periodo de 90 días.

En cuanto a su viabilidad, en la bioformulación de turba, las rizobacterias conservaron una concentración cercana a la concentración inoculada (equivalente a 1×10^{11} UFC/mL); en lo referente al comportamiento de cada una: C47 y TN106

durante el tiempo del estudio tienden al descenso (figura 6), en donde inicialmente fue más estable hasta los 30 días; pero la viabilidad en TN110 inicialmente a los 15 días fue menor en comparación a las dos rizobacterias anteriores. Sin embargo, alcanzó ligeramente un ascenso mayor a los 30 días, observándose que, a partir de los cuales hubo descenso de la viabilidad con respecto a las dos rizobacterias. Posteriormente, desde los 75 días hasta los 90 las tres rizobacterias llegan a la mayor reducción de la viabilidad. Revisando los recuentos de las rizobacterias alcanzados en los transportadores, éstas van de $9,25 \times 10^{11}$ la máxima y la mínima obtenida $2,75 \times 10^7$, en donde la turba como transportador ayuda a preservar la viabilidad.

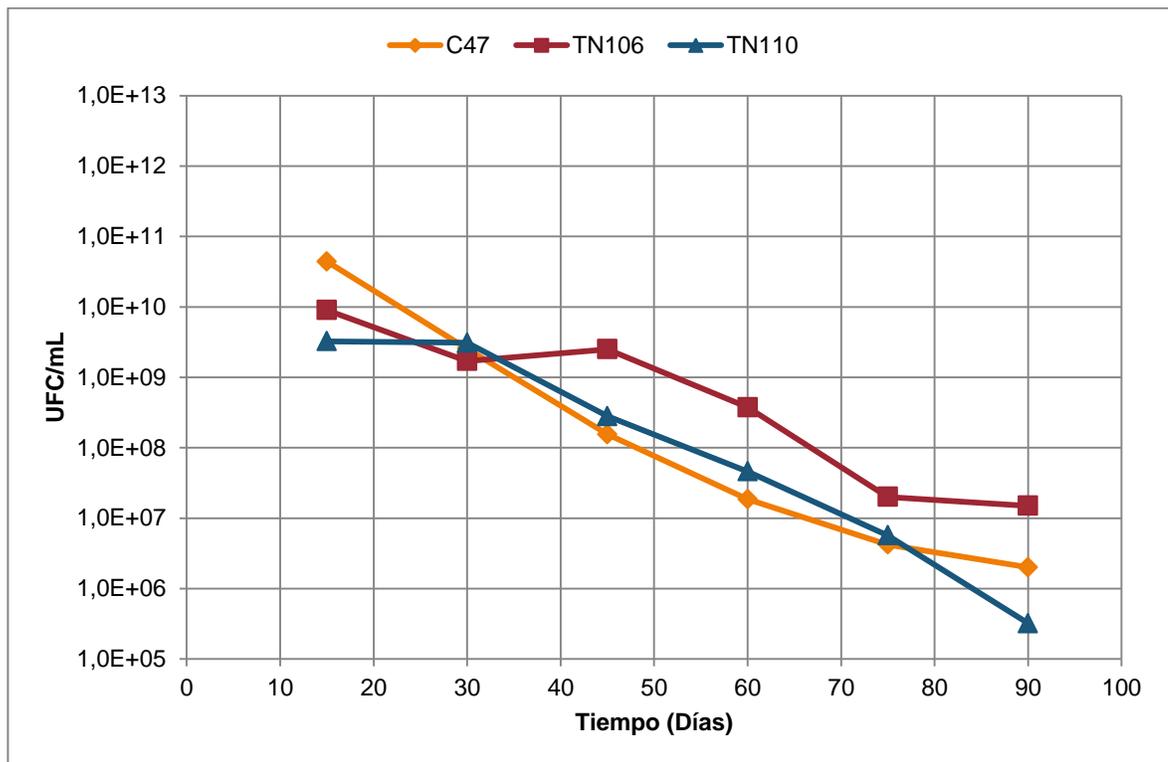


Figura No. 8: Viabilidad de las rizobacterias en roca fosfórica, en un periodo de 90 días.

Las rizobacterias en la roca fosfórica, (Figura No. 7) presentan una viabilidad descendente, en la medición a los 15 días, las rizobacterias presentaron diferentes resultados en cuanto a su viabilidad, siendo C47 la mayor entre las tres en esta medición, a medida avanzó el estudio hasta completarse todas las mediciones:

C47 y TN110 tienen una viabilidad cercanamente similar, mientras que TN06 demostró una mayor concentración entre las tres rizobacterias en todo el estudio; TN110 alcanzó $3,2 \times 10^5$ el menor recuento a los 90 días. Se puede decir que, la roca fosfórica es el transportador que menos mantiene la viabilidad de las rizobacterias, pues existen muchas variaciones en la viabilidad de las rizobacterias en todo el estudio. Observando los recuentos de las rizobacterias alcanzados en los transportadores, éstas van de $4,4 \times 10^{10}$ la máxima y la mínima obtenida $3,20 \times 10^5$

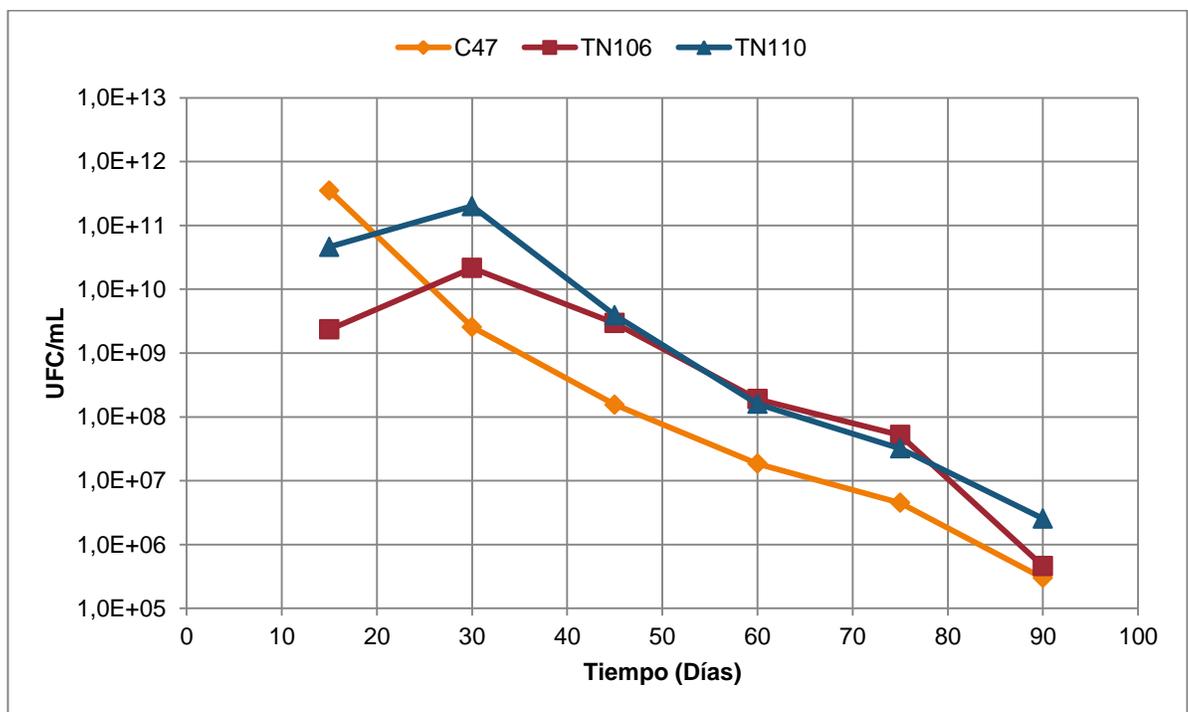


Figura No. 9: Viabilidad de las rizobacterias en ceniza volante, en un periodo de 90 días.

En ceniza volante, la viabilidad de las rizobacterias tiene un comportamiento descendente; en los primeros 15 días el mayor aumento fue con C47 seguido por TN110 y en último lugar TN106. Posteriormente, a los 30 días la viabilidad de C47 empieza a descender, pero en TN106 y TN110 se observó que aumentaron. Para el día 45, las dos rizobacterias (TN106, TN110) alcanzan una viabilidad similar hasta completar los 75 días, la rizobacteria C47 se caracterizó por tener un

descenso rápido y lineal durante todo el periodo, situación similar que se observó en roca fosfórica (Figura No 8).

El comportamiento de la ceniza volante como transportador en relación a roca fosfórica, mantiene en cierta medida, la viabilidad de las rizobacterias desde los 15 hasta los 30 días; luego empieza a descender. Sin embargo, es donde se observan menores concentraciones de viabilidad de las rizobacterias. La ceniza volante como transportador, revisando los recuentos alcanzados van desde $3,5 \times 10^{11}$ la máxima y la mínima obtenida fue 3×10^5 .

5.2 Comportamiento de las rizobacterias en medio mínimo M9.

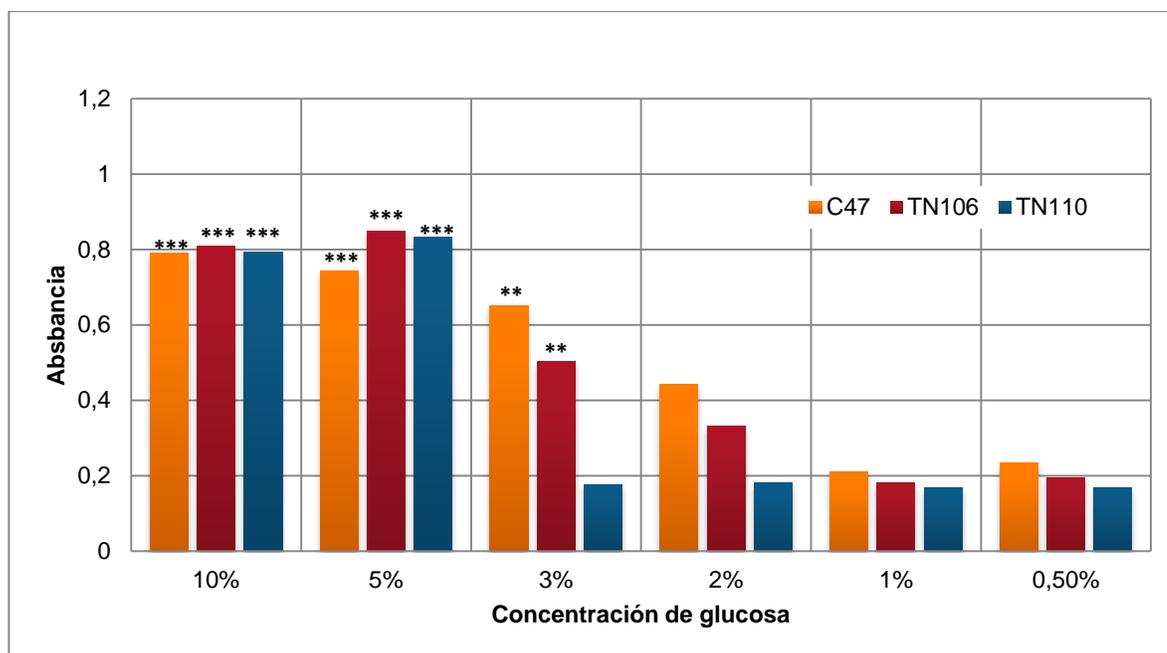


Figura No. 10: Evaluación del crecimiento de las rizobacterias con diferentes concentraciones de glucosa, en un periodo de 24 hr. Cada uno de los tratamientos fue comparado con las diferentes concentraciones de glucosa. (***: $P < 0,001$, **: $0,01-0,001$).

El comportamiento de las rizobacterias en medio mínimo M9 se realizó con concentraciones de glucosa en 24 horas y 48 horas. Los resultados a las 24 y 48 horas se presentan en la Figura (9 y 10) respectivamente. El comportamiento del

crecimiento de las rizobacterias durante el periodo del estudio, evidenció que las bacterias crecen a medida que la concentración de glucosa es agregada, siendo su mayor crecimiento al 5,0%, por consiguiente, ésta es la concentración optima de glucosa; el crecimiento al 10,0% de glucosa es muy similar al crecimiento al 5,0%. Se observa que el crecimiento del 3,0% al 2,0% de glucosa es muy similar entre estos dos porcentajes. De igual forma, estos resultados suceden al 1,0% y 0,50% de glucosa. Al comparar la concentración de glucosa al 5% y 10% (Figura No. 9), no se encontraron diferencias significativas, pero al comparar 5,0% y 10,0% hubo diferencias significativas con 0,50%.

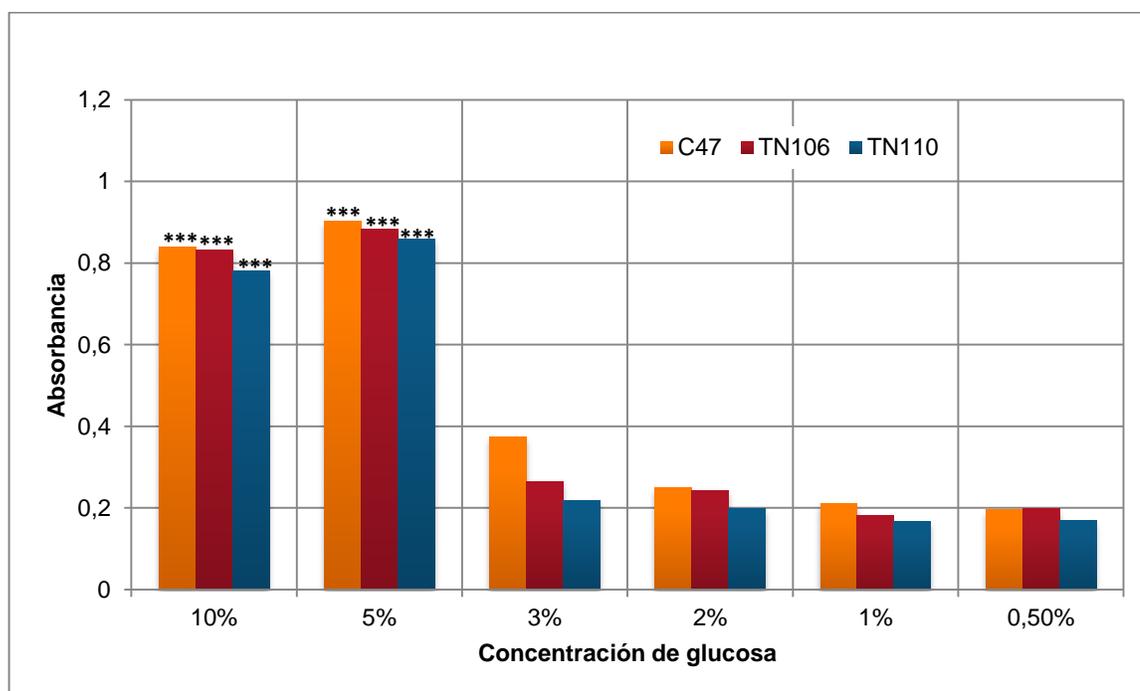


Figura No. 11: Evaluación del crecimiento de las rizobacterias con diferentes concentraciones de glucosa, en un periodo de 48 hr. Cada uno de los tratamientos fue comparado con las diferentes concentraciones de glucosa. (***) : $P < 0,001$, *: 0,05 - 0,01).

De manera similar, a las 48 horas, las rizobacterias presentaron un mejor crecimiento en las concentraciones de glucosa al 5% y 10% (Figura No. 10), encontrándose que no hubo diferencias significativas al comparar las dos concentraciones en ninguna de las rizobacterias, se evidencio que hubo diferencias significativas al comparar 5,0% y 10,0% con 0,5%. En contraste, con

concentraciones inferiores de glucosa, se presentó una disminución del crecimiento y una ligera uniformidad.

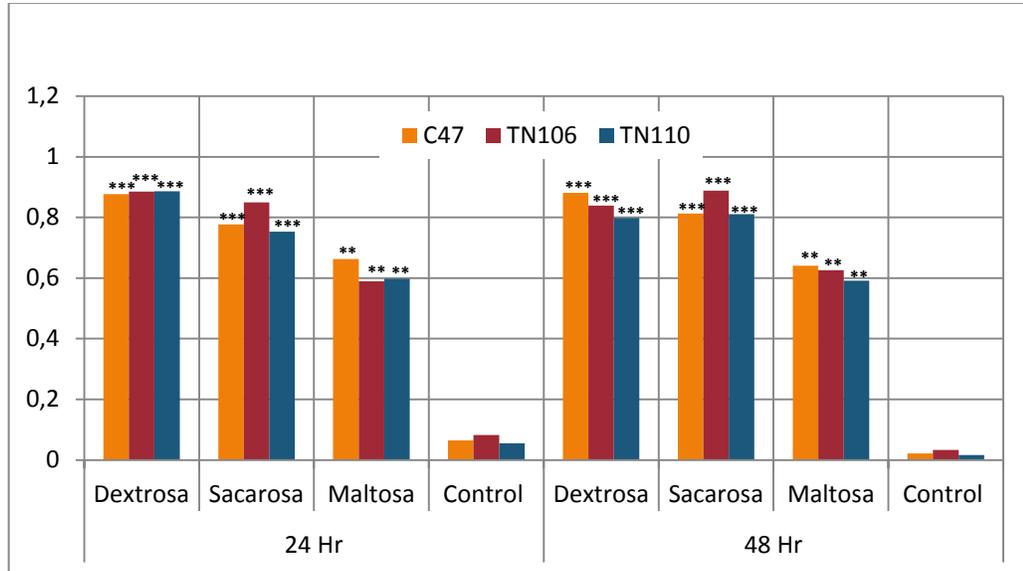


Figura No. 12: Evaluación del crecimiento de las rizobacterias con diferentes fuentes de carbohidratos, al 5%, en un periodo de 24 y 48 hr. Cada uno de los tratamientos fue comparado con el control (medio mínimo sin glucosa). (***: $P < 0,001$, **: $0,01-0,001$).

En la evaluación de las distintas fuentes de carbono (dextrosa, sacarosa y maltosa al 5%) tanto a las 24 y 48 horas (Figura No. 11), se observa un crecimiento similar entre dextrosa y sacarosa; mientras que el crecimiento en maltosa fue menor en comparación a los dos anteriores, tanto a las 24 y a las 48 horas. La maltosa fue la fuente que menos ayudó a las rizobacterias en su crecimiento, condición que puede esperarse por ser otro tipo de carbohidrato. En cuanto a la muestra del control sin glucosa, se observa que el crecimiento fue mínimo especialmente a las 48 horas, se puede confirmar que la glucosa si facilita el crecimiento de las rizobacterias en el medio mínimo.

5.3 Bioensayos de protección al tubérculo.

En la presentación de la disminución del daño, en los diferentes tipos de papa, se logró demostrar el efecto de biocontrol de las rizobacterias entomopatógenas sobre *Tecia solanivora* (Figura No. 12 y Figura No. 13), se observa que:

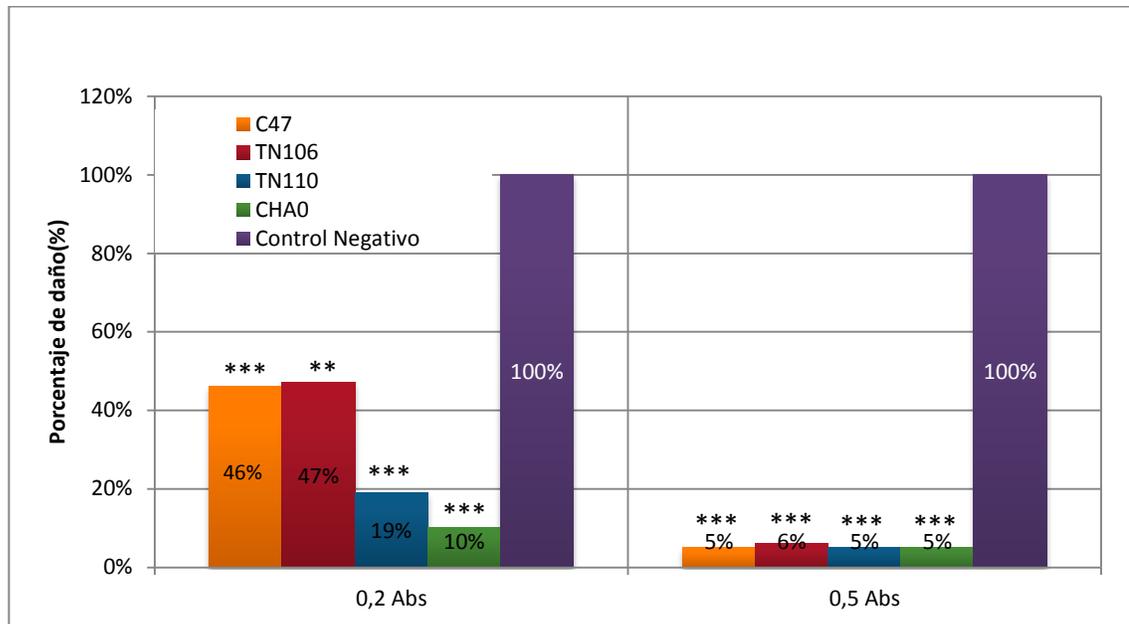


Figura No. 13: Disminución del porcentaje de daño respecto al control negativo en *S. tuberosum* causado por *T. solanivora*, a una absorbancia de 0,2 y 0,5. Cada uno de los tratamientos fue comparado con el control negativo (***: $P < 0,001$ **: 0,01-0,001).

En las tres rizobacterias se logró una protección al daño de *Tecia solanivora* al ser inoculados en las dos concentraciones en comparación al control negativo. Adicionalmente se observa una mejor protección de TN110 a una menor concentración de 0,2 absorbancia (equivalente a 1×10^5 UFC/mL) con respecto a las otras dos rizobacterias.

En la concentración de 0,5 de absorbancia (equivalente a 1×10^{11} UFC/mL) hay una mejor respuesta de las rizobacterias; y por consiguiente un menor porcentaje del daño, al compararse con la anterior absorbancia.

Se puede estimar que las rizobacterias pueden reducir el daño causado por *Tecia solanivora* a las papas desde un 19% hasta un 47% con una absorbancia de 0,2%(equivalente a 1×10^5 UFC/mL), mientras que con una absorbancia de 0,5(equivalente a 1×10^{11} UFC/mL) disminuyen el daño entre un 5% y 6%.

Cuando se usó otra variedad de papa (criolla), se observó Figura No. 13, que esta se ve más sensible; y por lo tanto el daño de *Tecia solanivora* es mayor que con la papa pastusa. Es de resaltar que TN110 en este ensayo esta rizobacteria sigue siendo la que mejor protege a esta variedad de papa, seguido de C47 y por ultimo TN106. Las papas criollas presentan diferentes características intrínsecas, puede ser que esta sea una de las causas de que sea mayormente dañada por *Tecia solanivora*.

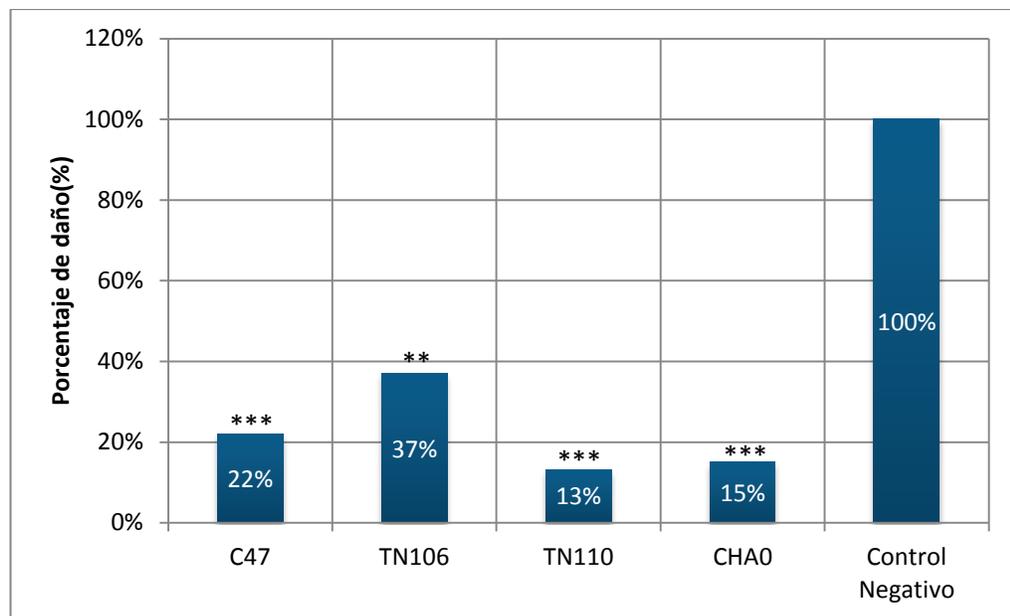


Figura No. 14: Disminución del porcentaje de daño respecto al control negativo, causado por *T. solanivora*. En papa criolla a una absorbancia de 0,5. Cada uno de los tratamientos fue comparado con el control negativo (***: $P < 0,001$; **: 0,01-0,001 comparado con control negativo)

En la inoculación con las mismas rizobacterias se obtuvo Figura No. 14, que el daño es siempre mayor al utilizar la papa criolla. Además, la rizobacteria que menos protegió fue TN106. Al realizar el ensayo con la papa pastusa, varió un poco el porcentaje del daño; sin embargo, fue nuevamente TN110 la mejor

rizobacteria que protegió del daño a los dos tipos de papas. Así mismo la rizobacteria que menos protegió a la papa pastusa en este ensayo fue C47.

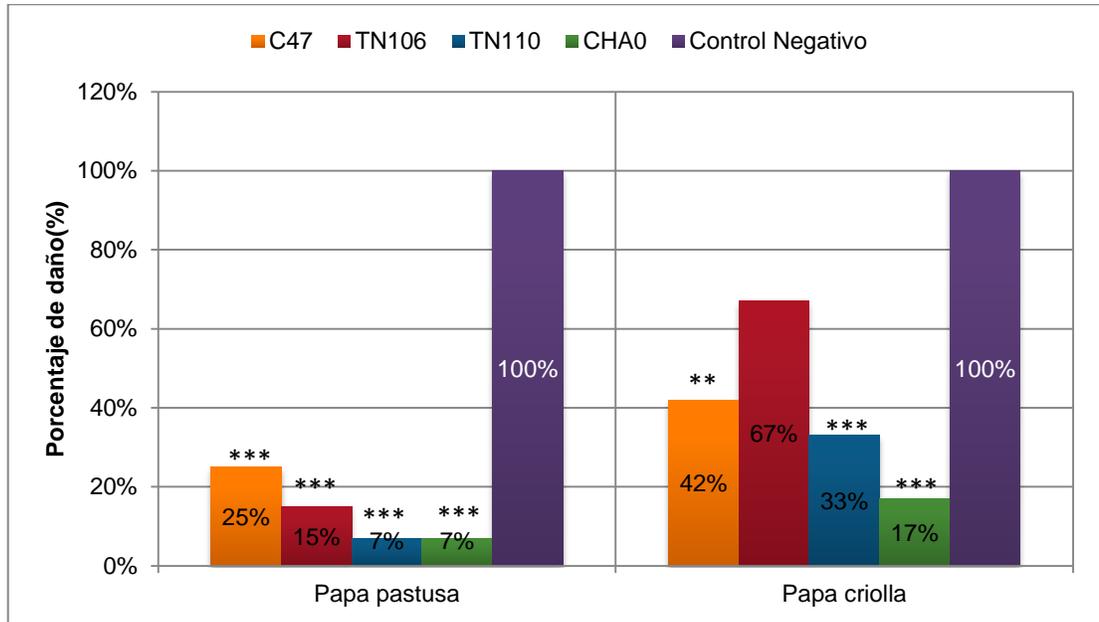


Figura No. 15: Disminución del porcentaje de daño respecto al control negativo, causado por *T. solanivora*. En dos variedades de papa (Pastusa y criolla) inoculadas a una absorbancia de 0,5. Cada uno de los tratamientos fue comparado con su respectivo control negativo (***: $P < 0,001$ **: 0,01-0,001)

5.4 Promoción del crecimiento en suelo.

Al comprobar el efecto de rizobacterias entomopatógenas sobre la promoción de crecimiento en plantas de papa bajo condiciones de invernadero, se encontró que: las tres rizobacterias evaluadas no presentaron promoción de crecimiento en las plantas de papa cuando se evaluó el peso seco de raíz y tallo, fueron similares a las del control (Figura No. 15).

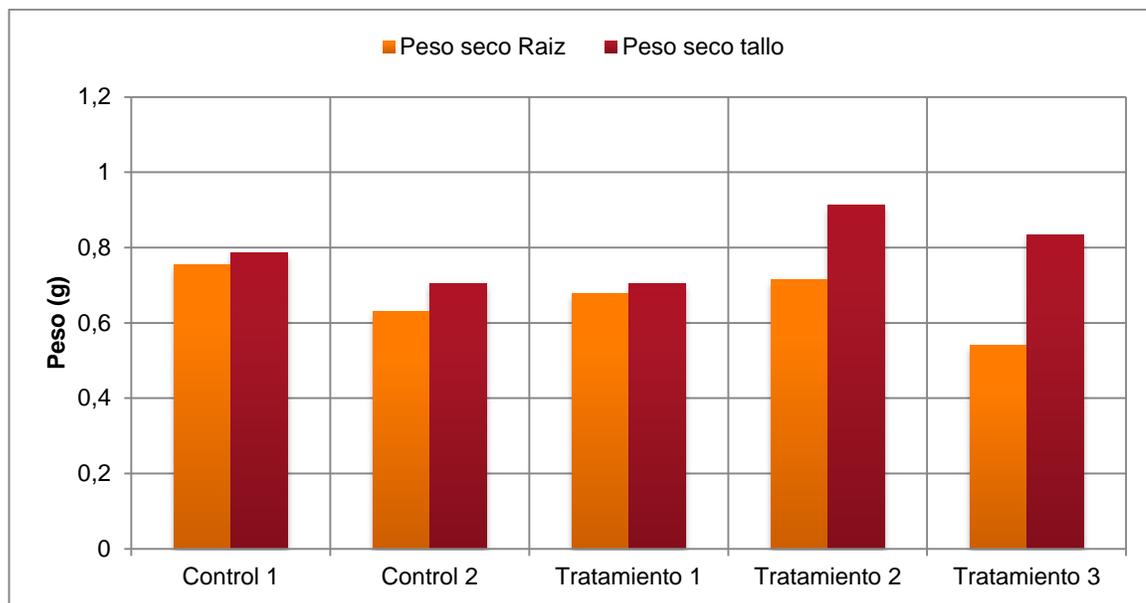


Figura No. 16: *Peso seco promedio de las plantas de papa, al ser inoculadas con las rizobacterias entomopatógenas. Cada uno de los tratamientos fue comparado con ambos controles, y no se obtuvieron diferencias significativas entre estos.*

***Control 1:** Agua + Goma de xantana; **control 2:** Caldo sin inóculo + goma de xantana;

Tratamiento 1: C47 + goma de xantana; **Tratamiento 2:** TN106 + goma de xantana; **Tratamiento 3:** TN110 + goma de xantana

6. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En esta investigación los resultados en relación a la evaluación de la turba, ceniza volante y roca fosfórica como transportadores de las rizobacterias entomopatógenas *Raoultella terrigena* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN110, se evidenció que la viabilidad de las rizobacterias en los tres transportadores fue distinta (Figura No. 8, 9, 10), uno de los factores que pudo haber influido en la viabilidad de las rizobacterias entomopatógenas, fue la temperatura a 18°C. También se observó que la turba mantiene la viabilidad de las rizobacterias durante el periodo de los 90 días hasta $2,7 \times 10^7$ UFC/mL para C47; $2,75 \times 10^7$ UFC/mL para TN106; y para TN110 hasta $4,75 \times 10^7$ UFC/mL; la ceniza volante se mantuvo para C47, TN106 y TN110 respectivamente hasta: $3,0 \times 10^5$ UFC/mL; $4,6 \times 10^5$ UFC/mL; $2,55 \times 10^6$ UFC/mL; y en roca fosfórica la variabilidad estuvo alrededor de: C47 $2,0 \times 10^6$; para TN106: $1,50 \times 10^7$ UFC/mL y para TN110: $3,20 \times 10^5$ UFC/mL. Por lo anterior el transportador que mejor conserva la viabilidad de las rizobacterias es la turba, ésto puede deberse a su composición química y capacidad de retención de agua ⁽⁵⁴⁾.

En un estudio similar realizado por Moreno y Obando en 2018 ⁽⁵⁵⁾, donde evaluaron la viabilidad de *Raoultella* spp a 18°C en tres diferentes transportadores (turba, aserrín y medio líquido) sus resultados reportan que la mejor conservación de microorganismos en bioformulados es a partir de turba, a pesar de haber analizado tres transportadores, de los cuales dos son diferentes; la turba como transportador también es el mejor.

En 2009, Chingal ⁽⁵⁶⁾ evaluó una propuesta para el control biológico de *T. solanivora*, mediante la formulación a base del virus de la granulosis (PhopGV) y el virus anchilibí. Ellos determinaron la viabilidad en: turba, talco mineral, maicena y carbonato de calcio. A pesar que el estudio se realizó con virus, concluyeron que turba precedido por el carbonato de calcio mantuvieron la viabilidad por

periodo de 2 hasta 4 meses, siendo una buena elección para preservar la viabilidad.

En los resultados de esta investigación sobre el crecimiento de las rizobacterias entomopatógenas en medio mínimo M9, se encontró que crecieron mejor al 5% de glucosa en comparación a las concentraciones menores (3,0%, 2,0%, 1,0% y 0,50%); al agregar al medio mínimo dextrosa y sacarosa no mostraron ninguna diferencia entre ellas, y se evidenció un menor crecimiento con maltosa. En una bioformulación realizada por Rojas J, y Moreno N. ⁽⁵¹⁾ para bacterias nativas de cultivos de arroz, igualmente evaluaron dextrosa y sacarosa, estableciendo diferentes concentraciones bajas, media (estándar), y alta. Por otra parte, probaron distintas fuentes de nitrógeno tales como: extracto de levadura, nitrato de amonio, y urea, concluyeron que al mezclar sacarosa junto con nitrato de amonio es un medio óptimo para el crecimiento de estas bacterias; de igual forma estos resultados son similarmente a la presente investigación.

Al mirar los resultados de esta investigación en cuanto a las rizobacterias con actividad entomopatógena no influyeron significativamente en el crecimiento de plantas de papas; pero éstos géneros de rizobacterias son promotoras del crecimiento en otras plantas. En el estudio de Almaghrabi O et al ⁽⁵⁷⁾, observaron el efecto de *Serratia marcescens*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *B. amyloliquefaciens* para promover el crecimiento, a plantas de tomate viéndose reflejado en su peso seco y en la producción de frutos. En los dos resultados se evidenció, que *S. marcescens* es la mejor bacteria que ayudó a promover el crecimiento alcanzando 43 gramos de peso seco y mayor producción de frutos a los 45 días. Igualmente, en el estudio de la promoción del crecimiento realizado por Álvarez y Vaquero ⁽⁵⁸⁾, en donde evaluaron esta misma bacteria en plantas de tomate, del mismo modo resultó promotora del crecimiento.

Por otro lado, en otros estudios que indican evaluaciones de Enterobacterias para promover el crecimiento vegetal; una de estas investigaciones es la realizada por Usha Rani M ⁽⁵⁹⁾.en 2011, en donde Aisló múltiples rizobacterias de distintas praderas de Samalkot, Pithapuram, Peddapuram y Kakinada, pueblos provenientes de India, en esta realizaron 65 aislamientos de distintas bacterias, las cuales fueron caracterizadas por ácido indolacético, movilización de fosfatos y pruebas de antagonismo con *Fusarium* spp. comprobando que dos rizobacterias de resultados promisorios: *Bacillus cereus*, *Enterobacter*. En cuanto *Raoultella* spp, fué la bacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR) en plantas de trigo ⁽⁵⁶⁾; de igual manera las rizobacterias son promotoras de crecimientos en otras plantas.

Dentro de los fundamentos teóricos, P. Kupferschmied ⁽⁶⁰⁾, plantea que las rizobacterias del género *Pseudomonas* son las que se han reportado con actividad promotora de crecimiento vegetal, presentando de igual forma biocontrol contra algunos fitopatógenos. Estos aspectos teóricos van en correspondencia con los hallazgos de la promoción.

Al ser limitado los estudios actuales que evidencian reportes del uso de rizobacterias aisladas de cultivos de papa, contra el ataque de *Tecia solanivora*, se espera contribuir al control biológico de este insecto, Esto permitirá el desarrollo comercial de un biopesticida que ataque a la con apoyo de asociaciones de productores y entidades relacionadas con cultivos de papa se pueda facilitar a las comunidades productoras de papa del país.

A pesar de la evidencia del control biológico de *T. solanivora*, los estudios actuales se evidencian limitados reportes del uso de rizobacterias aisladas de papa. La mayoría de trabajos para el control de *T. solanivora* se basan en el uso de *B. thuringiensis*, granulovirus y nematodos mutualistas (*Xenorhabdus* y

Photorhabdus). Actualmente algunos estudios demuestran que estas formas de biocontrol presentan limitaciones ⁽⁶¹⁾.

Por ejemplo, en el caso de granulovirus, se ve afectado por factores ambientales, el mayor efecto lo producen la radiación solar especialmente la luz ultravioleta ⁽⁶²⁾, cuando el virus logra producir la infección, la muerte del insecto ocurre hasta los 12 y 21 días, tiempo suficiente que el tubérculo ya ha sido afectado y ha perdido características ⁽⁶³⁾. Por otra parte, *B. thuringiensis* se ve afectado por la luz ultravioleta, haciendo que persista por poco tiempo después de la aplicación, en el caso de *Xenorhabdus* y *Photorhabdus*, es indispensable la existencia de los nematodos que los transporte hasta el insecto, ocasionando que las aplicaciones de estos microorganismos en los cultivos sean más complejas de lo que sería con una rizobacteria proveniente de cultivos de papa ⁽⁵⁷⁾. Según López ⁽⁶⁴⁾, los aislamientos nativos son promisorios como agentes de biocontrol en el cultivo de papa, ya que podrían permitir el equilibrio entre las plagas y sus enemigos naturales en los ecosistemas.

CONCLUSIONES

En la evaluación de una formulación preliminar de rizobacterias entomopatógenas contra el ataque de *Tecia solanivora* en tubérculos de papa, se puede concluir que:

1. En la determinación de la viabilidad de los transportadores utilizados, los mejores recuentos de viabilidad se obtuvieron con la turba, en comparación a los otros dos transportadores.
2. En la evaluación del crecimiento en el medio mínimo M9, se observó que las rizobacterias crecen mejor a una concentración de 5,0% de glucosa; de igual manera a ésta concentración con sacarosa crecen similarmente las rizobacterias.
3. Las rizobacterias lograron el efecto de biocontrol, disminuyendo el daño en ambos tipos de papas, siendo mejor en TN110 a una concentración de 1×10^{11} UFC/mL (0,5 Absorbancia).
4. Las rizobacterias no promovieron el crecimiento en las plantas de papas evaluadas.

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados de este trabajo se recomienda:

- Evaluar la aplicación de este bioformulado en campo, para evidenciar la persistencia de las rizobacterias.
- Evidenciar el potencial entomopatógeno de las rizobacterias en otros tipos de fitopatógenos de papa

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Kumar A, Usmani Z., Kumar V., Anshumali, Tripti. 2017 Biochar and flyash inoculated with plant growth promoting rhizobacteria act as potential biofertilizer for luxuriant growth and yield of tomato plant. Journal of environmental management. 190, 20-27.
2. Saharan, K. Sarmaa K . Srivastava S. Sharmab B.N. Prakashc J. Sahaia V.S. (2010). Development of non-sterile inorganic carrier-based formulations of fluorescent pseudomonad R62 and R81 and evaluation of their efficacy on agricultural crops. Applied soil ecology, 46(2), 251-258
3. Torriente D. 2010. Aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo de la caña de azúcar. Perspectivas de su uso en Cuba. Vol. 31, no. 1, p. 19-26
4. Berninger T. Mitter B. Preininger C. 2016. Zeolite-based, dry formulations for conservation and practical application of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN Volume122, Issue4. P. 974-986
5. Benjumea D. 2017. Bacterias Promotoras Del Crecimiento Vegetal: Mecanismos y Aplicaciones. (Revisión Bibliográfica). [Tesis de pregrado]. Sevilla: Universidad de Sevilla.
6. Rodríguez, A. 1996. Consideraciones al manejo de plagas y enfermedades de la papa en Colombia. En: Papas colombianas con el mejor entorno ambiental. Bogotá D.C.: Fedepapa. pp. 122-126
7. Pitre L., Hernández J., Bernal J.2008 Toxicidad de δ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidóptera: Gelechiidae) Rev. Colomb. Biotecnol vol.10 no.2
8. Puerto A. Suarez S. Palacio D. 2014 Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Rev. Cubana Hig Epidemiol vol.52 no.3.; 52 (3):372-387

9. Moreno L. Galvis F. 2013. Potencial biofertilizante de bacterias diazótroficas aisladas de muestras de suelo rizosférico. Pastos y Forrajes, Vol. 36, No. 1. P 33-37.
10. Carreras S. Aplicaciones de la bacteria entomopatógena 2011 *Bacillus thuringiensis* en el control de fitopatógenos. Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria;12(2)
11. Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., et al. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. 1998. Rev. 62, 807–813
12. Bosa C. Cotes A. 2004. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la actividad enzimática de *Serratia marcescens* contra *Tecia solanivora* (*Lepidoptera: Gelechiidae*) Rev. Colomb. Entomol. vol.30 no.1 Bogotá
13. Espinel Correal C. Cotes Prado A. Villamizar Rivero L. 2009. Efecto de la infección con granulovirus en el desarrollo de *tecia solanivora* (*lepidoptera: gelechiidae*) Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín vol.62 no.1 Medellín.
14. Villamil J. Martínez J. 2014. Evaluación de aislamientos nativos de *Beauveria* Spp. sobre *Tecia solanivora* (*lepidoptera: gelechiidae*) in vitro Volumen 31 (1): 92 - 105
15. Pantoja L. 2018. Efecto de moléculas señal tipo N-acil homoserina lactonas (AHLs) de aislamientos provenientes de cultivos de papa en el control de *Tecia solanivora* (*Lepidoptera: Gelechiidae*). [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia
16. Camelo M. 2010. Desarrollo tecnológico de un biofertilizante con base en la bacteria diazotrófica *Azotobacter chroococcum*. [Tesis de maestría]. Bogotá: Universidad Militar Nueva Granada
17. Martínez L, 2010 L. C. Desarrollo de un prototipo de formulación con hongos entomopatógenos para el manejo de *Demotispa neivai* Bondar (*Coleoptera: Chrysomelidae*). [Tesis de Maestría para optar al título de Magíster en Ciencias

Agrarias con énfasis en Entomología]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.

18. Evaluación de soportes sólidos y líquidos, para la producción de un biofertilizante a base de azospirillum spp. aplicable. Alimentos, ciencia e ingeniería [Internet]. 2019 [citado agosto 2019] ;(22):34-39. Available from: http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/24547/2/Alimentos_22_1_2014.pdf#page=34
19. FEDEPAPA 2018” Rev. “Revista Colombiana de Productores de Papa., Edición 43,
20. D. Ugent, 1970 “The potato,” Science (80-). V. 170, N. 3963, p. 1161–1166,
21. M. Toledo, 2013. “Secretaría de Agricultura y Ganadería Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuaria El cultivo de la papa en Honduras,” p. 1–82,
22. E. Torres et al., 2012. “Development of transgenic lines from a male-sterile potato variety, with potential resistance to *Tecia solanivora* Povolny,” Rev. Agron. Colomb. V. 30, N. 2, p. 163–171,
23. DANE, “El cultivo de la papa, *Solanum tuberosum*. Alimento de gran valor nutritivo, clave en la seguridad alimentaria mundial,” Min Agricultura, V. 15, 2013.
24. Mapa político de Colombia, extraído en línea [Internet]. Bogotá. 2016 [Consultado 2018 Agosto. 2] extraído en línea de: <https://www.mundonets.com/mapa-politico-de-colombia/>
25. M. F. Karlsson, 2010 “Odours, potato and insects,” Swedish Univ. Agric. Sci.,
26. N. Lutaladio 2016., “El campo no puede parar, su maquinaria tampoco.” Rev. Papa - FEDEPAPA, V. 39, 2016
27. Colombia. FEDEPAPA y Gobernación de Cundinamarca. 2010. PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LA PAPA

28. Villanueva., D. F. 2013. "Tecia solanivora, Povolny (Lepidóptera: Gelechiidae): una revisión sobre su origen, dispersión y estrategias de control biológico," Ing. y Cienc. - ing. cienc., V. 9, N. 18, p. 197–214,
29. Villanueva D. 2009 Caracterización molecular de una cepa colombiana de *Bacillus thuringiensis* con actividad contra *Tecia solanivora* (Lepidóptera: Gelechiidae). Rev. Colomb. Entomol. 2009, vol.35, n.2, pp.130-137
30. Colombia. ICA. Informe especial: Polilla Guatemalteca o Polilla de la Papa [Internet]. Bogotá. 2016 [Consultado 2018 Nov. 2] Disponible en: <https://www.ica.gov.co/movil/Noticias/4862.aspx>
31. Colombia. ICA. Manual fitosanitario del cultivo de la papa, Medidas para la temporada invernal 2011 [Internet]. Bogotá. [Consultado 2018 nov. 2]
32. Arias G. 1996l., "Evaluación de la incidencia y severidad del daño de Tecia solanivora. Boletín técnico,"
33. López A. "Estudios de hábitos y comportamiento de la polilla guatemalteca *Tecia solanivora* (Lepidóptera: Gelechiidae) en papa almacenada," Rev. Colomb. Entomol., V. 30, N. 2, p. 211–217, 2004.
34. Baquero L., "Programa Nacional de Biotecnología Programa Nacional de Ciencia y Tecnologías Agropecuarias," Inf. Vigil. Tecnológica. Colcienc., 2007
35. Fan XueJuan S. Maggiorani, A. ; Gudiño, S. "Use of entomopathogenic nematodes as an alternative for controlling polilla (*Tecia solanivora*), an important pest of the potato (*Solanum tuberosum*) in Mérida-Venezuela." p. 115–118, 2000.
36. D. Fischbein, "Introducción a la teoría del control biológico de plagas," Manejo Integr. Plagas For., V. 15, p. 277–284, 2012.
37. Rodríguez A, Guillén C, Uva V, Segura R, Laprade S, Sandoval J. Aspectos a considerar sobre el control biológico. Proyecto demostrativo con implementación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en el cultivo de banano.

Recuperado de: [http://cep.unep.org/repcar/proyectosdemostrativos/costa-rica-1/publicacionescorbana/HOJA% 20DIVULGATIVA% 20Nb02-2010](http://cep.unep.org/repcar/proyectosdemostrativos/costa-rica-1/publicacionescorbana/HOJA%20DIVULGATIVA%20Nb02-2010) 2010

38. Valderrama, A.; Velásquez, N.; Rodríguez, E.; Zapata, A.; Zaidi, M.; Altosaar, I.; Arango, R. 2007. Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) in three transgenic Andean varieties of potato expressing *Bacillus thuringiensis* *Cry1Ac* protein. *Journal of Economic Entomology* 100 (1): 172-179
39. Vega P. Canchignia H. Gonzalez M. Seeger M. 2016. Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. vol. 37, no. especial, pp. 33-39
40. Bashan Y. Bashan L. Prabhu S. Hernandez J. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). (2014). *Plant and Soil*, 1-33
41. Acuña I. 2011 DESINFECCIÓN DE TUBÉRCULO SEMILLA DE PAPA Y SUS CONSIDERACIONES. Informativo Número: 84
42. Feris, M., Gutiérrez, C., Varela, A. Y Espitia, E. 2002. Evaluación de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 28(2):179-182.
43. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros: aplicaciones y perspectivas. (2018). AGROSAVIA. Bogotá, pp.634 - 665.
44. Resolución 698 Lineamientos para producción de bioproductos agrícolas [Internet]. 2011 [cited 17 November 2019]. Available from: <https://www.ica.gov.co/getattachment/225bd110-d1c4-47d7-9cf3-43745201e39a/2011R698.aspx>
45. FAO.org. [internet]. Colombia: FAO ;2008. Gestión de las plagas y enfermedades. Available from: <http://www.fao.org/potato2008/es/lapapa/plagas.html>

46. Botina L. 2015. Resistencia de la polilla de la papa *Tecia solanivora* polovny (Lepidóptera): gelechiidae a la aplicación de insecticidas en poblaciones provenientes de municipios de Nariño y Boyacá . [Tesis de pregrado].Nariño: Universidad de Nariño
47. Mendez M. Viteri S. 2007 Alternativas de biofertilización para la producción sostenible de cebolla de bulbo (*Allium cepa*) en Cucaita, Boyacá. Agronomía Colombiana, vol. 25, núm. pp. 168-175
48. Strahsburger E. 2016 Microdot method: used with chromogenic agar is a useful procedure for sanitary monitoring in aquaculture. vol.44 no.4 Valparaíso
49. ATCC Org. 2012 Medium: 2511 M9 Minimal Agar/Broth for Solid Media M9 salts [Consultado 2018 Nov. 2] Disponible en:
<https://www.atcc.org/~-/media/B3590BBD1DF74203B0E8F0890ECF974F.ashx>
50. Chitiva L. Dussan J. 2003. Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas spp.* En bioremediación de fenol. Rev. Colomb. Biotecnol., Volumen 5, Número 2, p. 5-10
51. Rojas J. Moreno N. 2008. Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*) Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. X No. 2 diciembre 2008 50-62
52. Bravo A. y Cerón J. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. Volumen 1, Número 1, p. 214.
53. Carpio C, Zeddám J, Barragán A, Nuñez G. Patiño M Un método cuantitativo para medir el área de tubérculo dañado por larvas de *Tecia solanivora* (Lep.; Gelechiidae) a través de análisis de imágenes digitales.
54. Nuñez, A. 2009 Turba y zeolita como soportes de inoculantes microbianos con acción fertilizante ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. XLIII, núm. 3

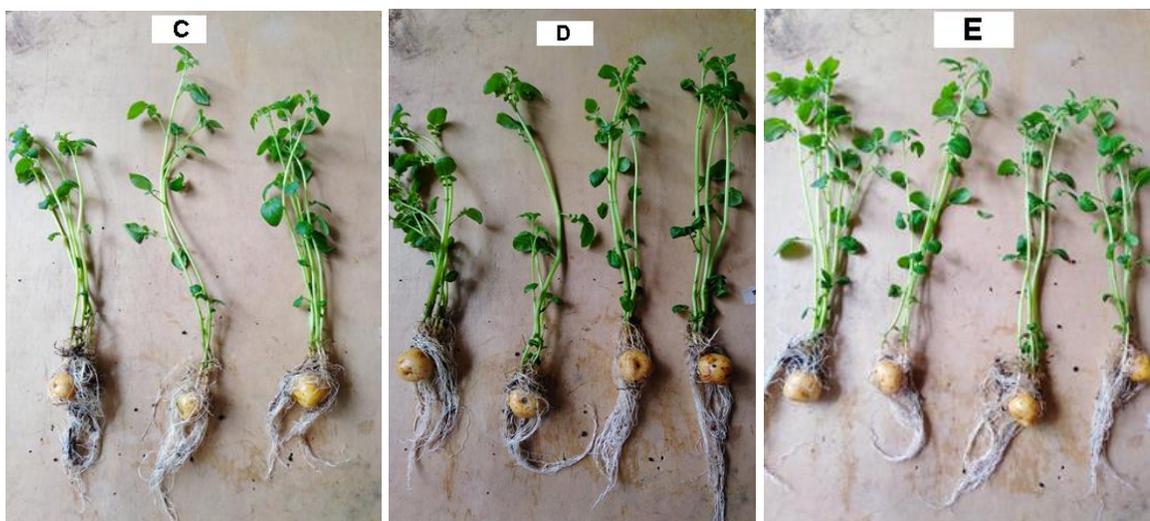
55. Moreno D. Obando M. 2018. Actividad de *Raoultella* sp. como entomopatógena de *T. solanivora* frente a: AHLs (N-acil homoserina lactonas), co-inoculaciones, una formulación preliminar y compatibilidad con insumos agrícolas. (Tesis de pregrado) Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
56. Chingal A. Evaluación de portadores sólidos para la formulación de bioinsecticidas a base del virus de la granulosis y anchilibí para el control de polilla de la papa, *Tecia solanivora* (povolny), en san gabriel, provincia del Carchi (Tesis de pregrado) Universidad Tecnica del Norte.
57. Almaghrabia O. Massoud S. Abdelmoneim S. 2013 Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Volume 20, Issue 1, Pages 57-61
58. Alvarez J. Baquero A. 2018. Efecto de la inoculación de rizobacterias sobre plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum*) crecidas bajo estrés salino. (Tesis de pregrado) Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
59. M. Usha Rani. 2011. *Bacillus cereus* and *Enterobacter* spp screened for their efficient plant growth promoting traits rhizobacteria (PGPR) and antagonistic traits among sixteen bacterial isolates from rhizospheric soil of Pigeon Pea. African Journal of Microbiology Research Vol. 5(15), pp. 2090-2094
60. Metin T., Fikretin S. The effect of PGPR strain on wheat yield and quality parameters. Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science: Soil solutions for a changing world, Brisbane, Australia, 1-6 August 2010. Symposium 2.3. 1 The soil-root interface: International Union of Soil Sciences (IUSS), c/o Institut für Bodenforschung, Universität für Bodenkultur; 2010
61. P. Kupferschmied et al., "Promise for plant pest control: root-associated pseudomonads with insecticidal activities, *Front. Plant Sci.*, V. 4., July, p. 1–18, 2013.
62. M. Chaparro., "Photostability and insecticidal activity of two formulations of granulovirus against *Tecia solanivora* larvae," *Fotoestabilidad y Act. insecticidas dos formulaciones granulovirus sobre larvas Tecia solanivora*, V. 36, N. 1, p. 25–30, 2010.

- 63.L. Villamizar., “Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella* PhopGV,” Revista Colombiana de Entomología, V. 31, N. 2. p. 127–132,
- 64.López Avila A. 2002. Control biológico componente fundamental del MIP: origen, definiciones y conceptos básicos.

8. ANEXOS

Anexo 1: Resultados de las plantas de papa





Tratamientos	Peso seco Raíz (g)	Peso seco tallo (g)
(A) Control Agua + Goma de xantana	0,754	0,786
(B) Control Caldo + Goma de xantana	0,631	0,703
(C) C47 + Goma de xantana	0,678	0,704
(D) TN106 + Goma de xantana	0,714	0,913
(E) TN110 + Goma de xantana	0,539	0,833

Analisis del peso seco de cada una de las rizobacterias a través de la prueba *t* student

Resultados de la prueba <i>t</i> Student (Peso Raíz)	Valor <i>P</i>
C47 vs Control Agua + Goma de Xantana	0,740856285
C47 vs Control Caldo + Goma de Xantana	0,802053618
TN106 vs Control Agua + Goma de Xantana	0,842299362
TN106 vs Control Caldo + Goma de Xantana	0,632967666
TN152 vs Control Agua + Goma de Xantana	0,225407365
TN152 vs Control Caldo + Goma de Xantana	0,455995709

Resultados de la prueba <i>t</i> Student (Peso tallo)	Valor <i>P</i>
C47 vs Control Agua + Goma de Xantana	0,765211016
C47 vs Control Caldo + Goma de Xantana	0,986852333

TN106 vs Control Agua + Goma de Xantana	0,650615698
TN106 vs Control Caldo + Goma de Xantana	0,285830491
TN152 vs Control Agua + Goma de Xantana	0,839135581
TN152 vs Control Caldo + Goma de Xantana	0,259355227

Anexo No. 2 Componentes del Medio de cultivo mínimo en un litro. Tomado en línea de ATCC Org²¹

Componente	Cantidad
Glucosa	20,0%
Na ₂ HPO ₄	6,0 g.
K ₂ HPO ₄	3,0 g.
NaCl	0,5 g.
NH ₄ Cl	4,0 g.

Una vez estéril se agrega 1 ml de MgSO₄ y 1 ml de CaCl₂ 200 mM previamente auto clavados

Anexo no. 3: Valor del porcentaje del daño interno a causado por *Tecia solanivora*, al ser inoculado con las distintas rizobacterias.

Porcentaje de daño	Características	Imagen
0%	Tubérculo firme, no se evidencia ningún cambio interno o externo	

10%	Tubérculo firme, daño interno ligero, este se observa cercano a la periferia	
25%	El tubérculo puede cambiar de consistencia. El daño interno es moderado, este se observa cercano a la periferia, se pueden encontrar larvas	
50%	El tubérculo empieza a cambiar de consistencia y firmeza. El daño interno es avanzado, se pueden encontrar larvas.	
100%	El tubérculo se transforma totalmente blando, totalmente consumido, se evidencian larvas	

Anexo 4. Tablas de valores *P*

4.1 Comparacion de la absorbancia del crecimiento del medio mínimo entre las rizobacterias entomopatas a diferentes concentraciones Versus 0,5% de glucosa mediante la prueba *t*-student. Valores *P* <0,05 se consideran significativo

	0,5% Vs 1% - 24 Horas	0,5% Vs 1% - 48 Horas
C47	0,13963152	0,34516538
TN106	0,14806183	0,09711811
TN110	0,07772353	0,91189318

	0,5% Vs 2% - 24 Horas	0,5% Vs 2% - 48 Horas
C47	0,64379772	0,16015958
TN106	0,33892948	0,16160799
TN110	0,11939232	0,07113054

	0,5% Vs 3% - 24 Horas	0,5% Vs 3% - 48 Horas
C47	0,011305351	0,06321971
TN106	0,010609397	0,35760602
TN110	0,202136788	0,10977034

	0,5% Vs 5% - 24 Horas	0,5% Vs 5% - 48 Horas
C47	3,23897E-05	0,000504076
TN106	4,39245E-05	4,03333E-08
TN110	2,19104E-07	6,23227E-05

	0,5% Vs 10% - 24 Horas	0,5% Vs 10% - 48 Horas
C47	7,66027E-06	4,01243E-05
TN106	0,000423389	1,74651E-05
TN110	9,86733E-08	6,75676E-07

4.2 Comparacion de la proteccion al daño obtenido con las rizobacterias entomopatogenas Versus el daño obtenido del control negativo, mediante la prueba *t*-student. Valores $P < 0,05$ se consideran significativo.

	Dextrosa vs Control Negativo	Sacarosa vs Control Negativo	Maltosa vs Control Negativo
C47	0,0000447291	4,65834E-05	3,83327E-05
TN106	5,947E-05	3,44511E-06	4,20935E-05
TN110	3,12607E-07	1,06719E-06	2,5658E-06

4.2.1 Valores *P* comparando diferentes concentraciones

	0,2 Absorbancia	0,5 Absorbancia
C47 vs Control Negativo.	8,9985E-05	0,00073487
TN106 vs Control Negativo.	0,003620027	1,7231E-05
TN110 vs Control Negativo.	1,89297E-08	1,03847E-10

4.2.2 Valores *P* en papa criolla

	Valor <i>P</i>
C47 En Papa criolla	7,21932E-05
TN106 En Papa criolla	0,000173283
TN110 En Papa criolla	3,28594E-06

4.2.3 Valores *P* en el tratamiento tres

	Valor <i>P</i>
C47 en Papa pastusa Vs Ctrl Papa pastusa	1,59532E-06
TN106 en Papa pastusa Vs Ctrl Papa pastusa	9,34927E-05
TN152 en Papa pastusa Vs Ctrl Papa pastusa	1,62132E-05
C47 en Papa criolla Vs Ctrl Papa criolla	0,00219213
TN106 en Papa criolla Vs Ctrl Papa criolla	0,116116524
TN152 en Papa criolla Vs Ctrl Papa criolla	1,62132E-05

Anexo 5. Participaciones en congresos

FORMULACIÓN PRELIMINAR DE RIZOBACTERIAS ENTOMOPATÓGENAS DE *Tecia solanivora* INSECTO PLAGA DE TUBÉRCULOS DE PAPA (*Solanum tuberosum*)



ejguerra@unicolmayor.edu.co; jacerog@unicolmayor.edu.co; javanegas100@uan.edu.co

Palabras clave: Formulaciones, Rizobacterias Entomopatógenas, Papa, *Tecia solanivora*



Guerra E¹, Acero J¹, Vanegas J²,
Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca¹
Universidad Antonio Nariño²

INTRODUCCIÓN

Tecia solanivora es uno de los mayores insectos plaga de la papa en Suramérica. [1] Esta es controlada con la aplicación de pesticidas tóxicos para humanos y el ambiente. Una opción de control son las rizobacterias entomopatógenas en bioformulados con transportadores económicos y de fácil adquisición. Estos conservan e inmovilizan los microorganismos por un periodo de tiempo determinado sin requerir complejo almacenamiento. [2]



FIGURA 1: Daño típico a los tubérculos causados por *T. solanivora*

OBJETIVO

Realizar una formulación a base de rizobacterias entomopatógenas de *T. solanivora* en tres transportadores

DISEÑO METODOLÓGICO

Se seleccionaron con tres variedades de rizobacterias (*Raoultella ornithinolytica* C47, *Serratia plymuthica* TN106 y *Enterobacter asbury* TN152). Aisladas y caracterizadas por su actividad entomopatógena. [3] Para el diseño de la formulación se evaluaron tres transportadores: turba, roca fosfórica y ceniza volante evaluando su viabilidad hasta 90 días a temperatura ambiente. Para el crecimiento de las rizobacterias, su inoculación se realizó a través de un medio mínimo. Finalmente se determinó el potencial entomopatógeno a dos diferentes concentraciones y la actividad promotora del crecimiento de las rizobacterias

RESULTADOS

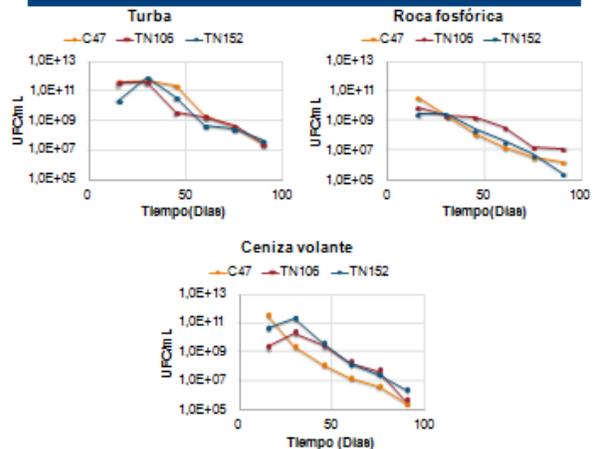


FIGURA 2: Viabilidad de las rizobacterias, en los diferentes transportadores

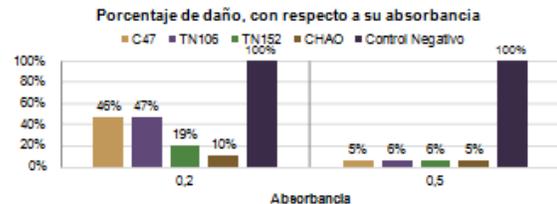


FIGURA 3: Potencial entomopatógeno de las rizobacterias

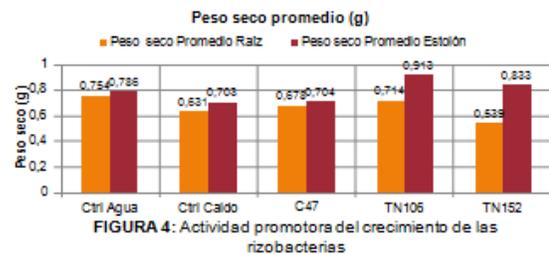


FIGURA 4: Actividad promotora del crecimiento de las rizobacterias

CONCLUSIONES

- El transportador más efectivo para mantener la viabilidad, de las rizobacterias es turba
- La rizobacteria que mejor protege al tubérculo, es TN152 a una abs de 0,5

AGRADECIMIENTOS

A COLCIENCIAS y la gobernación de Boyacá por financiar el proyecto "Interacciones entre *Tecia solanivora*, rizobacterias con actividad entomopatógena y plantas de papa para aumentar la competitividad de la cadena papera en el Departamento de Boyacá". Las actividades están enmarcadas en este proyecto con código 61936.

REFERENCIAS

- Colombia - FEDERPA y Gobernación de Cundinamarca. (2010). PLAGAS Y ENFERMEDADES DE LA PAPA
- T. Berringer, B. Mitter and C. Preininger(2016). Zeolite-based, dry formulations for conservation and practical application of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN
- Pantoja L. (2018) Efecto de moléculas señal tipo N-acil homoserina lactonas (AHLs) de aislamientos provenientes de cultivos de papa en el control de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)