



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Potenciación ecofisiológica de conidios de *Nomuraea rileyi* mediante el uso de factores abióticos de estrés

Adriana Marcela Santos Díaz

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2014

Potenciación ecofisiológica de conidios de *Nomuraea rileyi* mediante factores abióticos de estrés

Adriana Marcela Santos Díaz

Tesis o trabajo de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias – Bioquímica

Director (a):

D.Sc. Laura Fernanda Villamizar Rivero

Codirector (a):

Ph.D. Pedro Filipe de Brito Brandão

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2014

*Al creador de todo lo que existe,
A mis padres, a mi hermano y a Maru
Por enseñarme a ser quien soy*

Agradecimientos

A Laura Fernanda Villamizar, D.Sc., directora de este trabajo, por guiarme, por sus invaluable enseñanzas y sobre todo por su aporte en mi formación personal.

A Pedro F.B Brandão, Ph. D., codirector de este trabajo, por su inmensa colaboración y apoyo incondicional en todo momento.

A Liz Alejandra Uribe por su colaboración, entusiasmo, apoyo incondicional y por su gran amistad.

A Mauricio Cruz por su colaboración en el análisis de datos y por su amistad.

A Claudia Mesa por su ayuda desinteresada y porque nunca existe un no.

A todos las personas que de alguna manera me colaboraron a terminar con éxito este trabajo.

Resumen

El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (cepa Nm006) ha demostrado un alto potencial para ser utilizado en el control biológico del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Sin embargo, este microorganismo es altamente susceptible a condiciones abióticas de estrés, lo que dificulta su producción masiva, formulación y eficacia en campo. Una estrategia para incrementar la tolerancia del microorganismo a dichas condiciones es a través de la manipulación fisiológica, por lo que el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una estrategia mediante el uso de factores abióticos de estrés (temperatura y luz UVB) durante la fermentación de *N. rileyi*. Los conidios obtenidos de los diferentes choques de estrés y los no expuestos (tratamiento control) fueron caracterizados microbiológicamente (rendimiento y germinación), enzimáticamente (β -esterasa, *N*-acetilglucosaminidasa y quimoelastasa proteasa Pr1) y biológicamente (actividad biológica). Los choques de temperatura no afectaron el rendimiento y la actividad *N*-acetilglucosaminidasa. Sin embargo, germinación, eficacia y la actividad β -esterasa fueron significativamente superiores en los conidios expuestos a los choques térmicos en comparación con los conidios no expuestos. Con respecto a los choques de luz UVB, se evidenció que a medida que aumentó el tiempo de exposición disminuyeron las respuestas. Sin embargo, el choque UVB de 5 minutos potenció la germinación y las actividades enzimáticas. La implementación combinada de un choque térmico a 5°C durante 3,45 horas y un choque con luz UVB durante 5 minutos potenció el rendimiento, la germinación y la eficacia de los conidios de Nm006. El bioplaguicida a base de los conidios provenientes de las fermentaciones en donde se implementó la combinación de choques de estrés fue estable durante tres meses a las temperaturas de almacenamiento de 8°C y 18°C, mientras que el bioplaguicida a base de conidios provenientes de fermentaciones sin choques de estrés solamente fue estable a la temperatura de 8°C. Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, la implementación de choques de estrés (térmico y de luz UVB) durante el proceso de fermentación potenció ecofisiológicamente los conidios de Nm006 ya que permitió obtener un microorganismo más estable y virulento, el cual puede ser utilizado como principio activo del bioplaguicida.

Palabras clave: Entomopatógeno, producción masiva, estrés, bioplaguicida

Abstract

The entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Nm006) has shown a high potential for use in biological control of *Spodoptera frugiperda* “corn fall army worm”. However, this microorganism is highly susceptible to abiotic stress conditions, which makes difficult mass production, formulation and field efficacy. A strategy to increase the tolerance to these conditions is the physiological manipulation. The aim of this work was to develop a strategy during fermentation of *N. rileyi* (Nm006) using abiotic stress factors (temperature and UVB light). Conidia obtained from the different shock stress and unexposed (control treatment) were microbiological (yield and germination), enzymatical (β -esterase, *N*-acetylglucosaminidase and subtilin-like protease Pr1) and biological (biological activity) characterized. Temperature shocks did not affect the yield and *N*-acetylglucosaminidase activity. However, germination, efficacy and β -esterase activity were significantly higher in the conidia exposed to thermal shock than unexposed conidia. In relation with the UVB light shock, when the exposure time increased, the variables response decreased. However, 5 minutes UVB light shock enhanced germination and enzyme activities. The combined implementation of a thermal shock at 5°C for 3.45 hours and 5 minutes with UVB light, enhanced conidia (Nm006) germination and efficacy. The biopesticide based on conidia from fermentations where the combination of shock stress was implemented was stable for three months at 8°C and 18°C, while the biopesticide based on conidia from conventional fermentation was only stable at 8°C. The implementation of shock stress (temperature and light UVB) during *N. rileyi* fermentation increased the ecophysiological fitness of conidia. Because of that, *N. rileyi* was more stable and virulent and it can be used as active ingredient in a biopesticide.

Keywords: Entomopathogen, mass production, stress, biopesticide

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIV
Lista de tablas	XV
Consideraciones éticas	XVII
Introducción	1
1. Marco Teórico	5
1.1. El gusano cogollero del maíz <i>Spodoptera frugiperda</i>	5
1.1.1 Ciclo de vida de <i>Spodoptera frugiperda</i>	5
1.1.2 Métodos de control de <i>Spodoptera frugiperda</i>	7
1.2 Los hongos entomopatógenos.....	8
1.3 El hongo entomopatógeno <i>Nomuraea rileyi</i>	9
1.3.1 Características morfológicas y fisiológicas	10
1.3.2 Mecanismo de infección.....	11
1.4 Aspectos bioquímicos del desarrollo de la infección	13
1.4.1 Lipasas	13
1.4.2 Proteasas y peptidasas	14
1.4.3 Quitinasas	15
1.4.4 Otras enzimas	16
1.5 Factores abióticos de estrés	17
1.5.1 Temperatura	17
1.5.2 Radiación Ultravioleta	18
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo general.....	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Materiales y métodos	22

3.1	Microorganismo.....	22
3.2	Selección de condiciones abióticas de estrés que mejoren la esporulación, la viabilidad, la actividad enzimática y la actividad insecticida de los conidios de <i>N. rileyi</i> Nm006.....	22
3.2.1	Efecto de la temperatura (choque térmico)	23
3.2.2	Efecto de la luz ultravioleta Tipo B (choque de irradiación UVB).....	24
3.3	Caracterización microbiológica de los conidios de <i>N. rileyi</i> Nm006.....	24
3.3.1	Germinación	25
3.4	Caracterización enzimática de los conidios de <i>N. rileyi</i> Nm006	25
3.4.1	Actividad N-acetilglucosaminidasa.....	25
3.4.2	Actividad quimoelastasa proteasa (Pr1).....	26
3.4.3	Actividad β -esterasa	27
3.5	Caracterización biológica de los conidios de <i>N. rileyi</i> Nm006	27
3.5.1	Actividad biológica	28
3.6	Efecto de la interacción de las condiciones abióticas de estrés sobre el desempeño ecofisiológico de <i>N. rileyi</i> Nm006.....	29
3.6.1	Elaboración del bioplaguicida a base de <i>N. rileyi</i> Nm006.....	30
3.6.2	Estudio de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento.....	30
4.	Resultados y discusión	33
4.1	Efecto de choques térmicos sobre el rendimiento, la germinación, la actividad enzimática y biológica de <i>Nomuraea rileyi</i> Nm006.....	33
4.1.1	Rendimiento	33
4.1.2	Germinación	35
4.1.3	Actividad enzimática	38
4.1.4	Actividad biológica	43
4.2	Efecto de choques de irradiación con luz UV sobre el rendimiento, la germinación, la actividad enzimática y biológica de <i>Nomuraea rileyi</i> Nm006.	47
4.2.1	Rendimiento	47
4.2.2	Germinación	50
4.2.3	Actividad enzimática	53
4.2.4	Actividad biológica	57
4.3	Efecto de la interacción de las condiciones abióticas de estrés sobre el desempeño ecofisiológico de <i>N. rileyi</i> Nm006.....	60

4.4	Estabilidad en condiciones de almacenamiento del bioplaguicida a base de conidios de <i>N. rileyi</i> (Nm006) provenientes de fermentaciones con implementación de choques de estrés.	72
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	85
5.1	Conclusiones	85
5.2	Recomendaciones	86
A.	Anexo: Medios de cultivo	87
B.	Anexo: Curvas de calibración enzimática	89
C.	Anexo. Análisis estadísticos	91
	Bibliografía	120

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos (Modificado de Villamizar 1998).	12
Figura 4-1. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a luz UVB sobre la variable respuesta rendimiento (conidios/g de sustrato húmedo).	64
Figura 4-2. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta germinación (%).	65
Figura 4-3. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta actividad <i>N</i> -acetilglucosaminidasa (UE).	66
Figura 4-4. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta actividad β-esterasa (UE).	67
Figura 4-5. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta Eficacia (%).	68
Figura 4-6. Superficie de respuesta para la deseabilidad de la respuesta al implementar choques de estrés térmico a 5°C y choques de irradiación UVB durante la fermentación de <i>N. rileyi</i> Nm006.	69
Figura 4-7. Estabilidad en almacenamiento a 8°C de los bioplaguicidas y conidios sin formular a base de <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentaciones con y sin choques de estrés.	74
Figura 4-8. Estabilidad en almacenamiento a 18°C de los bioplaguicidas y conidios sin formular a base de <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentaciones con y sin choques de estrés.	75
Figura 4-9. Estabilidad en almacenamiento a 28°C de los bioplaguicidas y conidios sin formular a base de <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentaciones con y sin choques de estrés.	77

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 4-1. Producción de conidios del hongo <i>N. rileyi</i> (Nm006) crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques de temperatura.	34
Tabla 4-2. Germinación de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques térmicos.....	36
Tabla 4-3. Actividad <i>N</i> -acetilglucosaminidasa y β - esterasa de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentaciones sólidas y expuestos a choques de temperatura. Unidad Enzimática UE (mmoles de <i>p</i> -nitrofenol liberados por minuto por mililitro a 35°C).....	40
Tabla 4-4. Concentraciones letales de la cepa <i>N. rileyi</i> Nm006 sobre larvas de segundo ínstar de <i>S. frugiperda</i>	44
Tabla 4-5. Actividad insecticida de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentación sólida y expuestos a choques de temperatura. La dosis utilizada corresponde a la concentración letal 90 (1 x 10 ⁶ conidios/mL).....	45
Tabla 4-6. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuestas germinación, eficacia y actividad β -esterasa de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentación sólida expuesta a choques térmicos.	46
Tabla 4-7. Producción de conidios del hongo <i>N. rileyi</i> (Nm006) crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques de irradiación con luz UV.....	48
Tabla 4-8. Germinación de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques de irradiación con luz UV.....	50
Tabla 4-9. Actividad <i>N</i> -acetilglucosaminidasa y β - esterasa de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentaciones sólidas y expuestos a choques de irradiación. Unidad Enzimática UE (mmoles de <i>p</i> -nitrofenol liberados por minuto por mililitro a 35°C).	54

Tabla 4-10. Actividad insecticida de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentación sólida y expuestos a choques de irradiación. La dosis utilizada corresponde a la concentración letal 90 (1×10^6 conidios/mL).....	58
Tabla 4-11. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuestas germinación, eficacia y actividades β -esterasa y <i>N</i> -acetilglucosaminidasa de los conidios del hongo <i>N. rileyi</i> Nm006 producidos en fermentación sólida expuesta a choques de irradiación con luz UVB.....	59
Tabla 4-12. Codificación de los tratamientos del diseño factorial multinivel para determinar el efecto de la interacción entre los choques de temperatura y los choques de irradiación UVB implementados durante la fermentación de <i>N. rileyi</i> Nm006. Para cada temperatura (5°C y 45°C) se realizó el mismo diseño factorial.....	61
Tabla 4-13. Rendimiento, germinación, actividad <i>N</i> -acetilglucosaminidasa y β -esterasa y eficacia de los conidios de <i>N. rileyi</i> Nm006 provenientes de las fermentaciones expuestas a 45°.....	62
Tabla 4-14. Rendimiento, germinación, actividad <i>N</i> -acetilglucosaminidasa y β -esterasa y eficacia de los conidios de <i>N. rileyi</i> Nm006 provenientes de las fermentaciones expuestas a 5°C.....	63
Tabla 4-15. Validación del punto óptimo establecido por el modelo de predicción para la implementación de los factores de estrés durante la producción masiva de <i>N. rileyi</i> Nm006.....	71
Tabla 4-16. Comparación entre las características de los conidios provenientes de la fermentación con implementación de choques de estrés y sin choques de estrés (tratamiento control).....	71
Tabla 4-17. Tratamientos evaluados en el estudio de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento.....	73
Tabla 4-18. Estabilidad de la eficacia (%) de los bioplaguicidas y los conidios sin formular de <i>N. rileyi</i> almacenados durante 3 meses a 8°C, 18°C y 28°C.	80

Consideraciones éticas

En este proyecto se consideraron los aspectos éticos relacionados en las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en cuestiones ambientales. En este trabajo se incluyó el uso del hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (cepa Nm006), el cual fue aislado a partir de larvas de *S. frugiperda* infectadas naturalmente en un cultivo de maíz en Puerto López Gaitán, Meta, Colombia. Este microorganismo fue suministrado por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés Biológico de CORPOICA y por esta razón se cumplieron los requerimientos del Decreto 309 de 2000, expedido por el Ministerio del Medio Ambiente, por el cual se reglamenta la investigación científica sobre diversidad biológica. Este proyecto no generó impacto negativo apreciable en el ambiente, ya que fue realizado en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA, y por esta razón se cumplieron las normas emitidas para el trabajo en este lugar y para la disposición de residuos que se generaron en el proyecto. Además, los reactivos tóxicos conocidos o material biológico contaminante fueron desechados ajustándonos a las normas nacionales y a estándares internacionales (ATCC). Los investigadores que participaron en este proyecto no tienen conflictos de interés derivados de la investigación realizada.

Introducción

El gusano cogollero, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), es una plaga agrícola presente en la mayor parte del hemisferio occidental (García et al. 2002). En Colombia, esta especie es una plaga primaria en el cultivo de maíz (*Zea mays*) debido a que puede generar pérdidas económicas hasta en un 35% y es una plaga secundaria en cultivos como el sorgo (*Sorghum* spp.), el algodón (*Gossypium hirsutum*) y los pastos (García et al. 2002).

Este insecto plaga es de importancia económica debido a su amplia distribución geográfica y a la gran cantidad de hospederos alternos que tiene, ya que es un insecto polífago. Para su control químico, a nivel mundial se gastan aproximadamente 4,2 millones de dólares en plaguicidas por año, lo que incide negativamente en los costos de producción de los cultivos (Fernández 2003). Dentro de los plaguicidas químicos que se han utilizado para el control de *S. frugiperda* se encuentran los fosforados, los piretroides y los carbamatos, los cuales presentan categorías toxicológicas I y II y son tóxicos para el ambiente y la salud animal y humana (García & Del Pozo 1999).

Debido a lo anterior, es necesario reducir el uso y la dependencia de agroquímicos para el control de este insecto y desarrollar alternativas que sean amigables con el medio ambiente. Dentro de estas alternativas se encuentra el control biológico mediante el uso de bacterias, virus, hongos y protozoarios entomopatógenos (Charnley & Collins 2007). Estos microorganismos han demostrado un potencial interesante para ser incluidos en propuestas de manejo integrado de plagas, debido a que aparecen en condiciones naturales y no presentan riesgos para la salud animal y humana (Srivastava *et al.* 2009).

Dentro de los hongos entomopatógenos que afectan a *S. frugiperda* se destacan los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Nomuraea* e *Isaria* (anteriormente clasificado como

Paecilomyces), los cuales se caracterizan por presentar una amplia distribución geográfica, un amplio rango de hospederos, alta virulencia y la posibilidad de ser transmitidos de forma horizontal (Khachatourians & Qazi 2008).

Una de las especies promisorias para integrar en el control biológico de *S. frugiperda* es el hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson. Este microorganismo está distribuido en amplios agroecosistemas y frecuentemente se encuentra causando epizootias naturales sobre este insecto y otros lepidópteros de importancia económica como *Anticarsia gemmatalis* (Hubner) (Lepidoptera : Noctuidae), *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera : Noctuidae), *Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera : Noctuidae) y *Helicoverpa virescens* (F.) (Lepidoptera : Noctuidae) (León & Pulido 1991; Ríos-Velasco *et al.* 2010).

Sin embargo, es escasa la literatura con respecto al efecto biocontrolador de *N. rileyi* sobre *S. frugiperda*. Uno de los estudios que se destaca es el de García y Del Pozo (1999), quienes evidenciaron que la aplicación de este hongo en combinación con la bacteria *Bacillus thuringiensis* en forma de cebo, produjo mortalidades superiores al 90% en larvas de *S. frugiperda* y además presentó una alta selectividad y persistencia. En otro trabajo en Cuba, al realizar tres aplicaciones de *N. rileyi* a una concentración de 5×10^7 conidios/mL sobre larvas, se obtuvieron mortalidades superiores al 90% (Pérez 2003). Pavone *et al.* (2009) también evaluaron una formulación granulada a base de *N. rileyi* contra *S. frugiperda*, la cual consistía en partículas de germen de maíz inoculadas con 10^7 conidios/g. Esta preparación protegió a los conidios de la radiación ultravioleta y eliminó el 80% de la población de larvas en bioensayos en condiciones de laboratorio. De igual manera, Vega-Aquino *et al.* (2010) evaluaron la actividad biocontroladora de conidios de *N. rileyi* formulados en varios aceites vegetales y los autores encontraron que las diferentes formulaciones causaron una mortalidad del 100% con un tiempo de mortalidad promedio de 4,7 días.

A pesar del potencial que ha demostrado *N. rileyi* para el control de esta plaga, la información que existe es escasa, posiblemente a las dificultades que presenta este microorganismo para su producción masiva y a la baja estabilidad del mismo en condiciones de almacenamiento. Por esta razón, a la fecha no se encuentra registrado

ningún bioinsumo a base de este hongo en los Estados Unidos (EPA 2012) ni en Colombia (ICA 2013) para el control del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*.

Teniendo en cuenta lo anterior, el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA, realizó investigaciones encaminadas hacia la búsqueda y selección de microorganismos entomopatógenos para el control de *S. frugiperda*. Es así como se seleccionó el aislamiento de *N. rileyi* codificado como Nm006, el cual ocasionó una mortalidad en condiciones de laboratorio del 95% sobre larvas de tercer ínstar de *S. frugiperda* (Bosa et al. 2004).

Con dicho aislamiento se estandarizó un sistema de producción masiva de conidios, para lo cual se evaluaron matrices sólidas a base de cereales y suplementadas con fuentes de nitrógeno orgánico (Villamizar et al. 2004). Una vez seleccionado el medio de cultivo adecuado, se elaboraron dos prototipos de bioplaguicidas formulados como un concentrado emulsionable y un granulado dispersable. Sin embargo, estas formulaciones afectaron negativamente la actividad biocontroladora del microorganismo posiblemente debido al proceso o a los excipientes utilizados, ya que los conidios sin formular causaron una mortalidad del 95% (Villamizar et al. 2004). Entre los dos prototipos, se seleccionó el concentrado emulsionable para continuar con los estudios de optimización del producto ajustando la composición del bioplaguicida y las operaciones unitarias del proceso con miras a incorporar coadyuvantes en la formulación que estabilicen los conidios de *N. rileyi* (Aguirre et al. 2009).

En otro trabajo posterior, Zarate y colaboradores (2010) evaluaron la estabilidad bajo condiciones de almacenamiento de dicha formulación (antiguo prototipo) y una modificación de la misma (nuevo prototipo). Los autores encontraron que el prototipo antiguo presentó una vida útil inferior a tres meses cuando fue almacenado a 10°C, mientras que el nuevo prototipo fue estable durante tres meses a 10°C y 20°C (Zarate et al. 2010). Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionó el nuevo prototipo para continuar con el desarrollo, el cual presentó una eficacia del 70% en condiciones de casa de malla. Sin embargo, una vida útil de 3 meses es muy corta teniendo en cuenta que una vez el producto es manufacturado se requiere un tiempo para cumplir con la cadena de distribución comercial, la cual puede tomar varios meses. Además, en el mercado

existen productos a base de hongos entomopatógenos como *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp. e *Isaria* sp. que son estables durante seis o más meses cuando son almacenados a 20°C (Copping 2009). También es importante resaltar que la eficacia obtenida en casa de malla con este prototipo fue del 70%, la cual puede disminuir cuando el producto sea aplicado en condiciones de campo (Srivastava et al. 2009), por lo que para que el producto se considere adecuado desde el punto de vista de su actividad, se espera que en condiciones controladas la eficacia sea superior al 80% (Jenkins & Grzywacz 2000).

Para que este producto sea competitivo en el mercado es necesario contar con un aislamiento muy virulento, que presente una alta eficacia y que sea tolerante a condiciones abióticas como la luz ultravioleta, la actividad de agua y la temperatura, factores que disminuyen la vida en anaquel del bioplaguicida y el establecimiento del hongo en el ambiente y por lo tanto la eficacia del mismo en campo (Magan 2001). La tolerancia a estas fluctuaciones abióticas es un prerrequisito para el éxito de los bioproductos y una estrategia para incrementar dicha tolerancia es a través de la manipulación fisiológica de los conidios (Andersen et al. 2006).

Por medio de la manipulación fisiológica de los conidios, éstos pueden acumular solutos compatibles, compuestos de bajo peso molecular como alcoholes polihídricos (polioles) y azúcares como la trehalosa o el glicerol, que permiten a la célula continuar con su metabolismo y procesos enzimáticos en condiciones de estrés (Andersen et al. 2006).

Por estas razones, el presente trabajo pretendió desarrollar una estrategia para potenciar ecofisiológicamente los conidios de *N. rileyi* mediante el uso de factores abióticos de estrés durante el proceso de fermentación y de esta manera obtener un microorganismo que sea más estable y virulento, el cual pueda ser utilizado en la formulación del bioplaguicida y garantice el éxito del mismo.

1. Marco Teórico

1.1. El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*

Spodoptera frugiperda (J.E Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) es considerada la plaga más importante del maíz en muchas regiones de América (Andrews, 1989; García, 1993; León, 1987; citado por García, 2000). En Colombia, es conocido con el nombre común de “gusano cogollero del maíz”, el cual ataca otros cultivos como arroz, pastos, sorgo, caña de azúcar y algodonero, haciendo que su dispersión sea amplia y la supervivencia y abundancia de sus poblaciones sea mayor (García 2000).

De acuerdo con Borrór y Delong, citados por Jiménez (1980), la clasificación taxonómica del insecto es la siguiente:

Orden: Lepidoptera

Familia: Noctuidae

Género: *Spodoptera*

Especie: *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith).

1.1.1 Ciclo de vida de *Spodoptera frugiperda*

El ciclo de vida de *S. frugiperda* desde la oviposición hasta la emergencia del adulto es aproximadamente de 23 a 25 días, con una duración promedio de los adultos de 14 a 15 días. Los huevos tienen una duración de 3 a 5 días y son puestos en grupos de hasta 300 en cualquier cara de la hoja, los cuales son cubiertos por escamas grisáceas que la hembra se arranca del abdomen al momento de poner los huevos. Éstos son redondos, con dimensiones entre 0,45 mm y 0,5 mm de diámetro de color rosado pálido que se

torna a gris a medida que se acerca la eclosión (Carbonell *et al.* 2001; Negrete & Morales 2000).

Las larvas al nacer se alimentan del coreon y más tarde se trasladan a diferentes partes de las plantas o a las vecinas, evitando así la competencia por el alimento y el canibalismo. Su color varía según el alimento pero en general son oscuras con tres rayas pálidas estrechas y longitudinales; en la región frontal se distingue una “Y” blanca invertida (Montesbravo 2005; Negrete & Morales 2000).

Las larvas pasan por 6 o 7 estadios o mudas, siendo los dos primeros de mayor importancia para tomar las medidas de control. En el primero éstas miden entre 2 y 3 mm y la cabeza es completamente negra, el segundo mide entre 4 y 10 mm y la cabeza es café claro. En las dos primeras etapas, las larvas se alimentan de la superficie inferior de las hojas tiernas, causando un manchado característico, en forma de ventanas. A partir del tercer estadio se introducen en el cogollo, haciendo perforaciones que son apreciadas cuando la hoja se desvaina. En gran densidad pueden matar las plantas jóvenes por defoliación o destruir los puntos de crecimiento (Montesbravo 2005; Negrete & Morales 2000). Las larvas grandes pueden actuar como gusanos cortadores, escondiéndose en el suelo durante el día y cortando plantas durante la noche, mediante túneles que perforan en la base del tallo (Montesbravo 2005).

Cuando la larva está próxima a pasar al estado de pupa, ésta busca el suelo para preparar la cámara pupal, deja de moverse, sufre una muda y se transforma en pupa, la cual tiene de 14 a 17 mm de longitud, con su extremo abdominal (cremaster) terminando en dos espinas o ganchos en forma de “U” invertida. Esta fase se desarrolla en el suelo y el insecto permanece en reposo entre 8 a 10 días, momento en que emerge el adulto o mariposa (Negrete & Morales 2000).

Los adultos son polillas de un color pardo con una envergadura alar entre 30 y 35 mm. Las hembras tienen alas de colores oscuros y uniformes, mientras que los machos tienen arabescos o figuras irregulares llamativas en las alas. En reposo doblan sus alas sobre el

cuerpo formando un ángulo agudo que permite la observación de una prominencia ubicada en el tórax. Los adultos son inactivos en el día y permanecen en hojarascas o en sitios sombreados, durante la noche se vuelven activos al realizar las actividades de cópula y postura (Negrete & Morales 2000).

1.1.2 Métodos de control de *Spodoptera frugiperda*

Control cultural: Las medidas que ayudan a reducir el daño incluyen una buena fertilidad del suelo para asegurar un desarrollo rápido de la planta, minimizar la exposición de las plantas jóvenes al ataque y permitir una recuperación del daño. También la siembra en densidades mayores permite compensar las pérdidas, así como la rotación con una leguminosa para reducir la reinfestación y el control de malezas gramíneas (García *et al.* 2002).

Control químico: El gusano cogollero del maíz es una plaga comúnmente controlada con plaguicidas químicos, presentándose una alta dependencia de los agricultores a este medio de control. Si la aplicación se realiza en forma oportuna y bien dirigida al sitio donde está la plaga, el control puede ser satisfactorio pero no deja de ser un control temporal, siendo necesario repetir la aplicación cuando se presente otra generación del insecto (García & Pulido, 1984). Existe una gran variedad de insecticidas tales como metomil, clorpirifos y cipermetrina, plaguicidas de categorías toxicológicas I, II y III respectivamente (I = extremadamente tóxico, II = altamente tóxico, III = moderadamente tóxico). Sin embargo, su uso continuo provoca disturbios en la dinámica de la plaga al destruir sus enemigos naturales, además de problemas de resistencia a estos compuestos, intoxicación en operarios que aplican los productos en campo, contaminación del ambiente y un incremento notable en los costos de producción (García & Pulido 1984).

Control físico: Las lluvias continuas, especialmente en las primeras tres semanas de sembrado el maíz, época en la cual ocurre la mayor oviposición y el nacimiento de las larvas; contribuyen a la reducción del daño fresco por la alta mortalidad de larvas pequeñas, muchas de las cuales mueren por ahogamiento en el cogollo. Actividades

como el riego, interfiere con la oviposición de las hembras y contribuye con la mortalidad de las larvas pequeñas (García, 2000).

Control biológico: El gusano cogollero del maíz *S. frugiperda* es un insecto que posee una amplia gama de enemigos naturales, como especies de parasitoides y organismos entomopatógenos como hongos, virus y bacterias (Rodríguez 1984). Entre las especies de parasitoides se encuentran *Cotesia marginiventris* (Cresson) y *Chelonus texanus* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae), especies que también están asociados con otras especies de noctuidos. Los depredadores del gusano cogollero son los mismos que atacan generalmente a otras plagas como *Labidura riparia* (Pallas) (Dermaptera: Labiduridae), *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae), y *Orius insidiosus* (Say) (Hemiptera: Anthocoridae) (Hoballah et al. 2004).

Se conocen numerosos agentes patógenos, incluyendo virus, hongos, protozoos, nematodos, y bacterias que afectan al gusano cogollero del maíz (Gardner & Fuxa 1980), pero sólo unos pocos causan epizootias. Entre los microorganismos más importantes se encuentra el virus de la poliedrosis nuclear (NPV), los hongos entomopatógenos *Entomophaga aulicae*, *Nomuraea rileyi* e *Isaria* spp y la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Hoballah et al. 2004).

1.2 Los hongos entomopatógenos

Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos (Feng et al. 1994; Hajek & St Leger 1994; Shah & Pell 2003), entre las que se destacan los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoopthora*., *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Isaria*, *Nomuraea* y *Lecanillium*, pertenecientes a la clase Zygomycota e Hyphomycota (Srivastava et al. 2009). Muchas de estas especies tienen un amplio rango de hospederos y son patógenos de diferentes órdenes de insectos como Lepidópteros, Coleópteros y Hemípteros (Faria & Wraight, 2007).

Los hongos entomopatógenos con potencial biocontrolador deben tener como características básicas una alta virulencia contra el insecto plaga, facilidad de producción masiva y la resistencia a condiciones ambientales extremas (Ali *et al.* 2009a). Además, los aislamientos que presentan altas tasas de germinación y variabilidad enzimática, tienen la ventaja de infectar rápidamente al hospedero (Hajek & St Leger, 1994; Varela & Morales, 1996).

Teniendo en cuenta este potencial, durante las últimas décadas varios bioinsecticidas a base de hongos entomopatógenos han sido comercializados. Sin embargo, de las 700 especies de hongos entomopatógenos actualmente conocidas, sólo 12 especies son utilizadas como principio activo de formulaciones, quedando un número importante con potencial para su aplicación (Srivastava *et al.* 2009).

1.3 El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi*

Este hongo entomopatógeno tiene como hospederos primarios insectos del orden de los lepidópteros (Lepidoptera: Noctuidae), dentro de los que se encuentran plagas de importancia económica como *Anticarsia gemmatalis* (Hubner), *Pseudoplusia includens* (Walker), *Trichoplusia ni* (Hubner), *Heliothis virescens* (F.) y *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (J.E. Smith) (Boucias *et al.* 2000).

Clasificación taxonómica según Devi *et al.* (2007):

Subdivisión: Deuteromicotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliacea

Género: *Nomuraea*

Especie: *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson

El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* fue originalmente descrito como *Botrytis rileyi* (Farlow) en 1883, luego como *Spicaria rileyi* (Farlow) Charles en 1936, posteriormente como *Nomuraea maublanc* por Kish y colaboradores en 1974 y finalmente como *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson en 1974 (Boucias et al. 2000).

1.3.1 Características morfológicas y fisiológicas

Nomuraea rileyi es un hongo imperfecto y dimórfico en su desarrollo. El crecimiento inicial de este hongo es levaduriforme, por gemación del tubo germinal de un conidio. Al cabo de unos días los cuerpos hifales en forma de levadura producen un crecimiento de color crema (Ignoffo 1981; Pendland & Boucias, 1997). Posteriormente el color de la colonia progresa de blanco a verde pálido hasta un verde intenso a medida que se produce la esporulación (Boucias et al. 2000).

Las hifas miden entre 2 y 3 μm de diámetro, son septadas, hialinas a ligeramente pigmentadas (Kish & Samson, 1974; Ignoffo 1981). Los conidioforos son erectos y septados. Las ramas se forman cerca de cada septo, se desarrollan en ramilletes, cada uno dando origen entre 2 y 4 fiálides. Los conidios forman cadenas divergentes, son lisos, elipsoidales, algunas veces cilíndricos, verdes pálidos y con dimensiones de 3,5 a 4,5 μm por 2 a 3,1 μm (Kish & Samson, 1974; Ignoffo 1981).

Este microorganismo tiene un crecimiento exigente ya que requiere de fuentes de nitrógeno especiales (Boucias et al. 2000) siendo la forma orgánica del nitrógeno la más utilizada (Riba & Glandard, 1980). El hidrolizado de levadura enzimático, la levadura cervecera, la leche descremada en polvo y la leche entera en polvo son buenas fuentes de nitrógeno para el desarrollo de *N. rileyi*. El extracto de levadura (como fuente de nitrógeno y vitaminas) es necesario para promover el crecimiento micelial de *N. rileyi* (Vimala, 1994). Estas características hacen que la producción masiva sea difícil y costosa de realizar.

Generalmente su producción se realiza en medio Sabouraud maltosa agar fortificado con 1% de extracto de malta (SMAE), lo que la hace muy costosa. Varios trabajos han tratado de disminuir los costos de producción utilizando sustratos económicos como arroz, soya, sorgo, trigo y cebada (Sahayaraj *et al.* 2008; Rajan & Muthukrishnan, 2010), pero por los estrictos requerimientos nutricionales de este hongo, ha sido difícil el desarrollo de medios de cultivo económicos que permitan un alto rendimiento en la producción de conidios (Vimala, 1994; Sahayaraj *et al.* 2008; Rajan & Muthukrishnan, 2010).

1.3.2 Mecanismo de infección

La principal barrera para la infección para *N. rileyi* es la cutícula de los insectos, la cual está compuesta por tres capas: la epicutícula, la procutícula y la epidermis. La epicutícula es una capa muy delgada (0,1-3,0 μ m) compuesta en su mayoría por quitina, proteínas y lípidos no polares como ácidos grasos de 20 a 40 carbonos y ésteres (Pedrini *et al.* 2007). La procutícula forma la mayor parte de la cutícula y contiene fibras de quitina incrustadas en una matriz de proteínas, la cual puede ser de hasta un 75% en su totalidad (Pedrini *et al.* 2007).

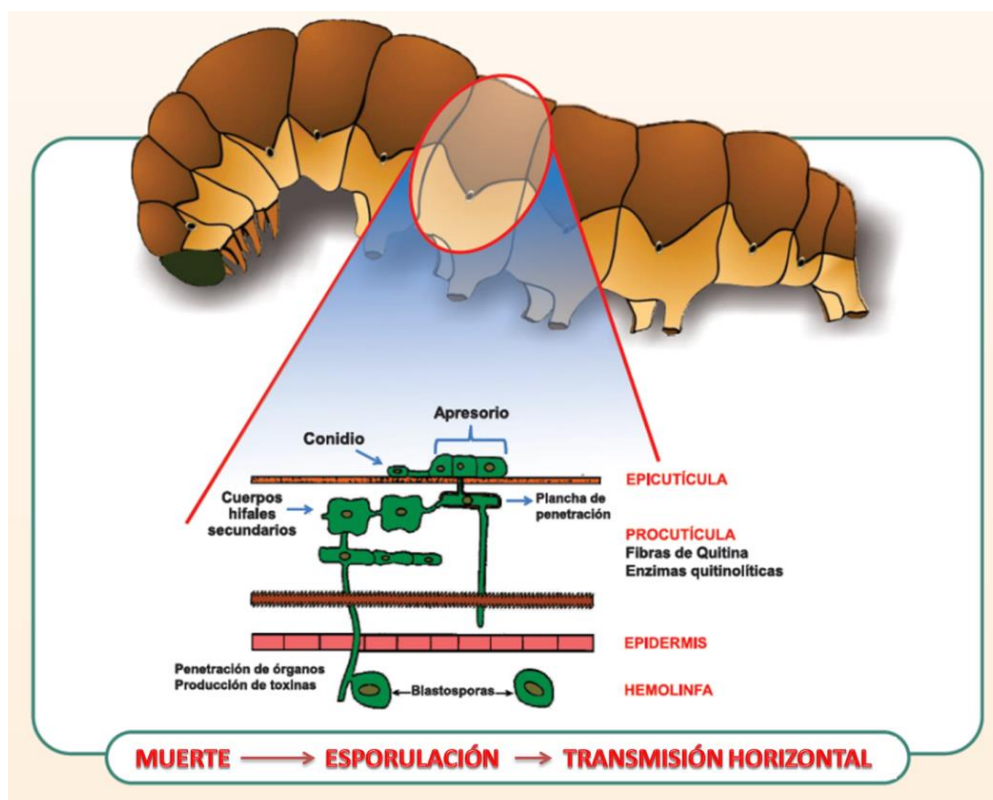
Para que el hongo entomopatógeno pueda desarrollarse y causar la infección sobre el insecto plaga, éste debe interactuar físico-químicamente con su hospedero. El desarrollo de la infección implica el crecimiento del tubo germinal del conidio sobre la cutícula del insecto, la producción de enzimas hidrolíticas, la producción de sustancias adhesivas, formación del apresorio, la penetración de las hifas hasta la hemolinfa, el crecimiento y reproducción del hongo y la producción de metabolitos tóxicos; mecanismos que en conjunto causan la muerte del insecto (Figura 1) (Khachatourians & Qazi, 2008).

El proceso inicia cuando los conidios se adhieren a la cutícula debido a la alta hidrofobicidad que tienen, lo que también los protegen de condiciones ambientales extremas (Tucker & Talbot 2001). El proceso de adhesión del conidio a la cutícula del insecto, está mediado por la presencia de moléculas sintetizadas por el hongo denominadas adhesinas, como la descrita para *Metarhizium anisopliae* denominada MAP1, que se localiza en la superficie de los conidios (Wang & St Leger 2007). Además,

se ha demostrado que iones divalentes como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} reducen las fuerzas de repulsión electrostáticas promoviendo también la adhesión de los conidios (Pucheta et al. 2006).

Una vez adheridos, los conidios germinan produciendo un tubo de germinación, que en su extremo terminal forma un abultamiento conocido como apresorio (Charnley & Collins 2007). La formación de esta estructura se ve influenciada por la topografía del hospedero, en superficies lisas el tubo germinal es corto y el apresorio se forma muy cerca del conidio, y en las superficies rugosas se produce primero un crecimiento extensivo sobre los micropliegues del insecto y posteriormente se forma el apresorio (Charnley & Collins 2007).

Figura 1-1 Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos (Modificado de Villamizar 1998).



La penetración de las hifas en la cutícula es una combinación de mecanismos físicos y enzimáticos. Entre las principales enzimas que actúan en el proceso de infección se encuentran las proteasas, las quitinasas y las lipasas que degradan químicamente la cutícula, permitiendo que la hifa de penetración llegue a la hemolinfa (Shah & Pell, 2003). Una vez el hongo alcanza el hemocele del insecto, comienza a crecer de forma micelial invasiva o en forma de blastosporas que garantizan la adquisición de nutrientes, la producción de metabolitos tóxicos y la evasión de la respuesta inmune del insecto (Qazi & Khachatourians, 2007). Esta evasión puede darse por el cambio conformacional en la superficie de las blastosporas, por la producción de sustancias inmunomodulantes y por la alta tolerancia a enzimas y péptidos de defensa (Qazi & Khachatourians, 2007). Por lo tanto, la muerte del insecto puede ser el resultado de una combinación de mecanismos como la obstrucción física, la invasión de órganos y la toxicosis (Charnley & Collins 2007).

El ciclo de infección se completa cuando el hongo esporula sobre el cadáver del insecto en condiciones adecuadas de humedad y temperatura. Este nuevo inoculo de infección puede ser dispersado a través del viento, la lluvia o de otros insectos, comenzando nuevamente un ciclo de infección (Shah & Pell, 2003).

1.4 Aspectos bioquímicos del desarrollo de la infección

Los hongos entomopatógenos invaden sus hospederos por medio de la acción combinada de enzimas hidrolíticas como proteasas, quitinasas y lipasas, que van degradando los componentes cuticulares y proporcionan nutrientes para una mayor proliferación del hongo. La importancia de cada una de estas enzimas depende de las características de la cutícula del insecto y también del mecanismo de invasión del hongo (Shah & Pell, 2003).

1.4.1 Lipasas

La cutícula de los insectos además de estar compuesta por quitina y proteínas, contiene capas de lipoproteínas, ácidos grasos y esteroides, los cuales son importantes para la

viabilidad del insecto, ya que previenen la desecación en condiciones extremas e impiden la penetración de insecticidas químicos (Pedrini et al. 2007). Por lo tanto, la acción de las lipasas y lipoxigenasas del hongo entomopatógeno contribuyen significativamente en la penetración e infección del mismo sobre el insecto plaga.

Se ha establecido que el crecimiento de algunos hongos entomopatógenos puede ser inhibido por ácidos grasos de cadena corta presentes en la cutícula del insecto, como lo reportó James *et al.* (2003) quienes demostraron que los lípidos cuticulares de *Bemisia argentifoli* afectaron la germinación de *B. bassiana* e *I. fumosorosea*, sugiriendo que dichos componentes pueden contribuir en la defensa del insecto ante la infección de un hongo entomopatógeno. Lord & Howard, (2004), evidenciaron un comportamiento similar al evaluar los ácidos grasos cuticulares de *Liposcelis bostrychophila* sobre el crecimiento de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, encontrando una disminución del 18% en la germinación de los conidios, resultado atribuido a que los ácidos grasos disminuyen la hidrofobicidad y la carga eléctrica de los conidios y por lo tanto su adhesión a la superficie del insecto (Khachatourians & Qazi 2008).

Sin embargo, las lipasas al intervenir en el proceso de hidrólisis de la cutícula también pueden aumentar la velocidad de germinación de los conidios (Supakdamrongkul et al. 2010a) y por lo tanto incrementar la virulencia del hongo. En condiciones *in vivo*, la acción de las lipasas es el primer paso enzimático en la degradación de la cutícula, después actúan las proteasas y las quitinasas, pero sólo a través de la acción combinada de estas enzimas principales se lleva a cabo la desintegración de la cutícula (Ali *et al.* 2009a)

1.4.2 Proteasas y peptidasas

Las enzimas proteolíticas tienen dos roles en la patogénesis sobre el insecto: la degradación de la cutícula y como factores de virulencia. Estas enzimas han sido identificadas y caracterizadas en la mayoría de los hongos entomopatógenos como *M. anisopliae*, *L. lecanii*, *I. fumosorosea*, *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *Erynia* spp. y *N. rileyi*

(Charnley & St Leger 1991; Khachatourians 1991; López-Llorca & Olivares 2002; Sheng et al. 2006; Ali, Z Huang, et al. 2009).

Dentro de las enzimas producidas por los hongos entomopatógenos existe un complejo de proteasas compuestas principalmente por proteasas tipo serin, tipo tripsinas, metaloproteasa y diversas exopeptidasas que son importantes en la degradación de la cutícula (St Leger 1995). Además, las enzimas tipo serin de diferentes hongos han demostrado un alto grado de similitud entre sí, sugiriendo su posible procedencia de un ancestro común (Yang et al. 2007). La enzima clave en el proceso de infección pertenece a la familia de las subtilisinas proteasas K y es conocida como quimoelastasa proteasa (Pr1), cuya expresión está directamente relacionada con los componentes cuticulares de los insectos (Ali et al. 2009b). Otra enzima importante en el proceso de infección es la enzima tipo tripsina (Pr2), la cual también se produce en las primeras etapas de infección, sugiriendo que tiene un rol complementario con la enzima Pr1 en la degradación de las proteínas cuticulares (Fonseca et al. 2010).

Smith y colaboradores (1981) determinaron que la cutícula de los insectos está compuesta por un complejo de quitina-proteína, en donde no existen los espacios suficientes para el paso de las estructuras hifales de los hongos entomopatógenos, siendo necesario la producción de enzimas proteolíticas y posteriormente de quitinasas para la degradación de ésta (Smith et al. 1981). Debido a lo anterior, la regulación de la producción de proteasas es compleja, siendo principalmente de tipo catabólico (St Leger *et al.* 1991). Esta regulación se ha evidenciado con sustratos complejos como la cutícula y algunas proteínas de alto peso molecular que estimulan la producción de dichas proteasas, mientras que fuentes de nitrógeno como aminoácidos y sales de amonio actúan como inhibidores (Villamizar & Cotes 2003).

1.4.3 Quitinasas

Los hongos entomopatógenos producen varias quitinasas con una gran variedad de funciones (St Leger *et al.* 1998). Algunas de éstas participan de forma coordinada con las proteasas en la degradación de la cutícula, la cual está compuesta entre un 20% a un

40% de quitina. La hidrólisis de dicha quitina está mediada por diferentes enzimas como las exo-(*N*-acetilglucosamidasa y quitobiasa) y las endo-quitinasas, las cuales son inducidas por monómeros solubles de quitina, glucosamina, *N*-acetilglucoamina y quitobiosa, que están presentes en pequeñas cantidades en la cutícula del insecto (Hegedus & Khachatourians 1995). Además de contribuir en el proceso de infección inicial, las quitinasas participan en las últimas etapas del ciclo de infección cuando el hongo esporula sobre el cadáver del insecto y son utilizadas como un mecanismo de defensa por parte del hongo entomopatógeno para inhibir el desarrollo de microorganismos competidores (Wattanalai et al. 2004).

St Leger *et al.* (1986) determinaron por primera vez la presencia de *N*-acetil- β -D-glucosaminodasas y endoquitinasas en aislamientos de *M. anisopliae*, *M. flavoride* y *B. bassiana* en medio de cultivo suplementado con cutícula de insecto (St Leger *et al.* 1986). Sin embargo, *M. flavoride* también produce 1,4- β -quitobiasas y las secuencias de dichas enzimas presentan una alta homología con quitinasas de *Trichoderma harzianum* (Khachatourians & Qazi 2008). Asimismo, se han identificado y caracterizado quitinasas de los hongos *L. lecanii* (Lu et al. 2005), *I. fumosorosea* (Ali *et al.* 2010) y *N.rileyi* (Wattanalai et al. 2004), las cuales tienen potencial de ser utilizadas para mejorar de la virulencia de los hongos.

1.4.4 Otras enzimas

Una amplia variedad de enzimas diferentes a las descritas anteriormente han sido identificadas en los hongos entomopatógenos, dentro de éstas se encuentran la fosfatasa alcalina, la C4-esterasa, la leucina aminopeptidasa, la β -galactosidasa, la α -glucosidasa, las amilasas, la β -glucosamidasa, la α -fucosidasa, entre otras. Sin embargo, la contribución de estas enzimas en el proceso de infección no se ha establecido claramente (Khachatourians & Qazi 2008).

1.5 Factores abióticos de estrés

Los conidios expuestos a factores de estrés desarrollan tolerancia, no solo al factor evaluado sino a otras condiciones diferentes de estrés. Este fenómeno conocido como “protección cruzada”, sugiere la existencia de un mecanismo integrado de respuesta como el evidenciado en los microorganismos expuestos a estrés por temperatura y actividad de agua, que han demostrado ser más resistentes a la luz ultravioleta tipo UV-B y más virulentos (Rangel *et al.* 2008).

Teniendo en cuenta el potencial de la manipulación fisiológica en el control biológico, a continuación se describen los principales factores abióticos que son utilizados para realizar dicha manipulación.

1.5.1 Temperatura

Una de las principales limitantes para el éxito de los hongos entomopatógenos en condiciones de campo es la fluctuación de la temperatura ambiental, ya que ésta puede afectar negativamente la viabilidad del microorganismo y por lo tanto su eficacia (de Crecy *et al.* 2009).

La exposición a temperaturas superiores o inferiores a las establecidas como óptimas para el crecimiento del microorganismo, induce varios mecanismos de termotolerancia, los cuales pueden ser físicos o bioquímicos (Magan 2007). En primer lugar se sintetizan las proteínas de estrés térmico conocidas por su siglas en inglés como HSPs (heat shock proteins), seguido de la producción de trehalosa, mantenimiento del pH intracelular por medio de las ATPasas membranales, disminución de la actividad de agua y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Tereshina 2005).

En el caso de los hongos entomopatógenos, el mecanismo más utilizado en condiciones de estrés de temperatura es la producción de proteínas de estrés térmico HSPs (Ying & Feng 2004), las cuales han sido ampliamente estudiadas en *Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulas*, *Achlya ambisexualis* y *Schizophillum commune*

(Morozova et al. 2001). La mayoría de estas proteínas de estrés son proteínas esenciales que se sintetizan en condiciones óptimas de crecimiento y son de carácter hidrofóbico (Ying & Feng 2004). La función principal de estas proteínas es de chaperonas en los procesos de replicación del ADN y entre las HSPs más importantes se encuentran la ubiquitina, la tirosina y algunos glicoproteínas (Tereshina 2005).

Además, Rangel *et al.* (2008) evaluaron la termotolerancia de cepas de *M. anisopliae* evidenciaron que el nivel de trehalosa aumentó cuando los conidios fueron expuestos a 45°C durante 3 horas, y disminuyó rápidamente cuando los conidios volvieron a la temperatura óptima de crecimiento. Resultado similar obtuvieron (Neves et al. 1991) al exponer conidios de *N. crassa* a las mismas condiciones. Lo anterior posiblemente se debe a que la trehalosa es utilizada como fuente de carbono durante el crecimiento micelial y la rápida degradación después del choque térmico se relaciona con su interferencia en los procesos de desnaturalización de proteínas. Sin embargo, la cantidad de trehalosa presente cuando los conidios son expuestos a altas temperaturas no es significativa, por lo que en la mayoría de los casos el mecanismo involucrado es de las proteínas de estrés térmico (Rangel *et al.* 2005).

1.5.2 Radiación Ultravioleta

La persistencia de los conidios de los hongos entomopatógenos en campo, es afectada principalmente por la radiación ultravioleta proveniente del sol (Smits & Sinoquet 2004). La radiación solar de acuerdo con su longitud de onda, se ha clasificado en tres tipos, de 100 a 280 nm se denomina UVC, de 280 a 320 nm correspondiente a UVB y UVA desde 320 a 400 nm, siendo estas dos últimas capaces de atravesar la atmósfera terrestre y de ocasionar efectos negativos sobre los microorganismos. La radiación UVC es absorbida por parte de las moléculas de ozono y oxígeno molecular presentes en la estratosfera (Ribera & Paradelo 1997).

Los daños que produce la radiación ultravioleta se centran en la formación de fotoproductos generalmente a nivel del ADN, donde se forman dímeros de bases

pirimidínicas adyacentes sobre la misma cadena de ADN (Nicholson et al. 2005). También pueden producir peroxidaciones lipídicas al reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos, lo cual afecta la fluidez de la membrana celular (Grijalba & Villamizar 2009). Además de los daños a nivel del ADN, la radiación UV puede causar estrés oxidativo generando retraso en el crecimiento, mutaciones o muerte celular de los hongos (Braga et al. 2001, 2002; Rangel et al. 2011) .

La influencia e interacción de la radiación ultravioleta y los hongos entomopatógenos ha sido ampliamente descrita. Por ejemplo, Tobar et al. (1996) al evaluar la tolerancia de varias cepas de *B. bassiana* a la luz UV, seleccionaron el aislamiento Bb9218 que fue tolerante durante 10, 30 y 60 minutos y presentó una alta virulencia contra *Hypothenemus hampei*. En el caso de *M. anisoplie*, Moore et al. (1996) establecieron que los conidios expuestos a la radiación solar disminuyeron su viabilidad a la mitad después de dos horas de exposición. En general, la exposición a la luz ultravioleta por cerca de dos horas disminuye la germinación y la viabilidad y por lo tanto la eficacia en condiciones de campo de los hongos entomopatógenos. Sin embargo, Cagan & Svercel, (2001) argumentan que la tolerancia de los hongos a la luz ultravioleta se relaciona con los diferentes lugares de aislamiento de las cepas y está asociado también a las características morfológicas de las colonias, ya que algunas secretan pigmentos de absorción (Saxene et al. 2002) o tienen mecanismos enzimáticos de reparación de los daños en el ADN (Rangel et al. 2005).

Sin embargo, la implementación de protectores solares en la formulación de microorganismos es una alternativa para proteger al microorganismo de las condiciones adversas del medio ambiente y de asegurar su viabilidad en condiciones de campo. Por ejemplo, Grijalba et al. (2009) evaluaron la estabilidad de conidios formulados y sin formular de *Isaria* sp. y de *Beauveria bassiana* expuestos a la luz solar durante seis horas. En este trabajo se evidenció una mayor pérdida en la capacidad de germinación de los conidios sin formular en comparación con los formulados, confirmando la importancia del desarrollo de formulaciones que incluyan antioxidantes, filtros y pantallas solares. Pero la posibilidad de aumentar la tolerancia de los hongos entomopatógenos a la luz UV por medio de condiciones de estrés o acumulación de polioles, aunque es una herramienta viable y económica, es un tema muy poco estudiado (Magan 2007).

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Potenciar ecofisiológicamente los conidios de *Nomuraea rileyi* Nm006 mediante el uso de factores abióticos de estrés.

2.2 Objetivos específicos

Seleccionar condiciones abióticas de estrés que mejoren la esporulación, la viabilidad, la actividad enzimática y la actividad insecticida de los conidios de *N. rileyi* Nm006.

Determinar el efecto de la interacción entre las condiciones abióticas de estrés seleccionadas sobre el desempeño ecofisiológico de los conidios de *N. rileyi* Nm006.

3. Materiales y métodos

3.1 Microorganismo

El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* cepa Nm006 (previamente aislado a partir de larvas de *Spodoptera frugiperda* infectadas naturalmente en un cultivo de maíz en Puerto Gaitán, Meta, Colombia) fue suministrado por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico de CORPOICA. Esta cepa fue seleccionada en trabajos previos por causar en condiciones de laboratorio, una mortalidad del 95% sobre larvas de *S. frugiperda* (Bosa et al. 2004).

La cepa de *N. rileyi* se reactivó en medio Agar Extracto de Malta más Extracto de Levadura (Agar YM) y se incubó a 25°C durante 8 días; posteriormente se crioconservó en viales con glicerol al 10% y peptona al 0,1% y se almacenó a -70 °C conformando de esta manera la colección de trabajo.

3.2 Selección de condiciones abióticas de estrés que mejoren la esporulación, la viabilidad, la actividad enzimática y la actividad insecticida de los conidios de *N. rileyi* Nm006

La selección de condiciones abióticas de estrés se realizó mediante la evaluación individual de cada factor de estrés (temperatura y Luz UVB) durante el proceso de producción masiva del hongo *N. rileyi* Nm006 (Daniel 1994).

3.2.1 Efecto de la temperatura (choque térmico)

La producción masiva de *N. rileyi* Nm006 se realizó en bolsas de polietileno de alta densidad, a las cuales se les agregó el sustrato de producción masiva a base de granos de una leguminosa y agua, utilizando las proporciones estandarizadas por Arriero (2001) con algunas modificaciones. Posteriormente, las bolsas con el sustrato se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 15 libras de presión y 120°C.

Cada bolsa con el medio de producción esterilizado se inoculó con 60 mL de una suspensión de conidios de *N. rileyi* Nm006 ajustada a una concentración de $1,0 \times 10^6$ conidios/mL y posteriormente se dispensó en bandejas de aluminio (21 cm x 4 cm x 5,5 cm). Las bandejas con el sustrato inoculado se incubaron a 25°C durante siete días. Transcurrido dicho tiempo, éstas se sometieron a choques térmicos cortos evaluando las siguientes temperaturas 5 ± 2 °C, 15 ± 2 °C, 30 ± 2 °C, y 45 ± 2 °C durante 1 hora, para un total de 4 tratamientos. La incubación siempre se realizó en condiciones de luz constante.

Una vez realizado el choque térmico, las bandejas con el medio de producción masiva inoculado se incubaron nuevamente otros 7 días a 25 °C. Pasado este tiempo, se determinó el rendimiento mediante recuento en cámara de Neubauer. Para lo anterior, se pesó 1 gramo del sustrato esporulado, el cual se adicionó a 9 mL de una solución de Tween[®] 80 al 0,1% (v/v) y a partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} . A partir de la última dilución se realizó el recuento de conidios en microscopio empleando una cámara de Neubauer. Con el recuento obtenido y la dilución empleada se calculó la concentración expresando el resultado como conidios por gramo de sustrato (conidios/g de sustrato) (Santos et al. 2012). Posteriormente, los conidios de cada tratamiento se separaron por medio de tamización utilizando un tambor de tamices (Marca Tyler[®]) y fueron caracterizados microbiológica (numeral 3.3), enzimática (numeral 3.4) y biológicamente (numeral 3.5).

El tratamiento control consistió en bandejas con el medio de producción inoculado, incubadas durante 14 días a 25 ± 2 °C en condiciones de luz constante, las cuales no se

sometieron a ningún choque térmico. La unidad experimental correspondió a una bandeja de aluminio y el diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

3.2.2 Efecto de la luz ultravioleta Tipo B (choque de irradiación UVB)

Para este experimento se siguió la metodología descrita en el numeral 4.2.1. y las bandejas con el sustrato esterilizado fueron inoculadas e incubadas durante siete días a 25 °C y luz constante. En el séptimo día de incubación éstas se irradiaron con una lámpara ultravioleta monocromática con una longitud de onda de 302 nm (tipo UVB) ubicada a 20 cm de altura (4920 mw/cm²) durante 5, 10, 15, 30, 60 y 90 minutos. Realizado lo anterior, las bandejas fueron nuevamente incubadas durante 7 días a 25 °C con luz constante. Pasado este tiempo se determinó el rendimiento mediante recuento en cámara de Neubauer (numeral 3.2.1) y posteriormente los conidios fueron separados mediante tamización y caracterizados microbiológica (numeral 3.3), enzimática (numeral 3.4) y biológicamente (numeral 3.5).

Como tratamiento control se utilizaron bandejas no irradiadas con luz UV, incubadas durante 14 días a 25 ± 2 °C en condiciones de luz fluorescente constante (39 watts). La unidad experimental correspondió a una bandeja de aluminio y el diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

3.3 Caracterización microbiológica de los conidios de *N. rileyi* Nm006

Los conidios de *N. rileyi* Nm006 obtenidos a partir de la producción masiva realizada en diferentes condiciones de estrés (temperatura y luz UVB) se caracterizaron microbiológicamente mediante la determinación de la viabilidad por medio de la técnica de germinación (%).

3.3.1 Germinación

Una muestra de 100 mg de conidios Nm006 se adicionó a 9,9 mL de una solución de Tween[®] 80 al 0,1% (v/v) y a partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-4} . A partir de la última dilución se sembraron 100 μ L en tres cajas de Petri con Agar Extracto de Malta más Extracto de Levadura (Agar YM) suplementado con benomil al 0,00015%. Estas cajas se incubaron a 25 ± 2 °C durante 48 horas, tiempo después del cual se cuantificó el número de conidios germinados y no germinados mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos, por unidad experimental (Santos et al. 2012).

3.4 Caracterización enzimática de los conidios de *N. rileyi* Nm006

Los conidios de *N. rileyi* Nm006 obtenidos de la producción masiva realizada en diferentes condiciones de estrés (temperatura, luz UVB) fueron caracterizados enzimáticamente mediante la determinación de la actividad *N*-acetilglucosaminidasa, quimoelastasa proteasa (Pr1) y β -esterasa.

Para el extracto enzimático se siguió la metodología descrita por St Leger *et al.* (1986) y modificada por Villamizar *et al.* (2001). Después de separar los conidios mediante la tamización del sustrato esporulado, se pesaron 50 mg de éstos y se adicionaron a 1 mL de una solución de Tween[®] 80 al 1%. Esta mezcla se agitó fuertemente durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, esta mezcla fue centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido fue utilizado para la cuantificación enzimática.

3.4.1 Actividad *N*-acetilglucosaminidasa

Para la determinación de *N*-acetilglucosaminidasa se utilizó la metodología descrita por Villamizar *et al.* (2001) con algunas modificaciones. La curva patrón de *p*-nitrofenol se realizó utilizando concentraciones desde 0,1998 hasta 1,9984 mmol/mL de *p*-nitrofenol

disuelto en buffer citrato pH 5. Ésta se realizó con 10 replicas por concentración y los datos se sometieron a un análisis de regresión lineal utilizando el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, USA).

Para la reacción enzimática, a 20 μ L del extracto enzimático se le adicionaron 100 μ L de *p*-nitrofenil-*N*-acetilglusaminidasa (Sigma[®]) (1 mg/mL en buffer citrato 0,1M pH 5), esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 35 ± 2 °C. Finalizado este tiempo, se adicionó 150 μ L de NaOH-glicina a pH 10,4 y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Nanodrop[®] 1000) a 400 nm.

Una unidad de actividad *N*-acetilglucosaminidasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 mmol de *p*-nitrofenol bajo las condiciones de la prueba (Villamizar et al. 2001). Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado.

3.4.2 Actividad quimoelastasa proteasa (Pr1)

Para la determinación de la enzima quimoelastasa proteasa se utilizó la metodología descrita por Villamizar *et al.* (2001) con modificaciones. La curva patrón de *p*-nitroanilina se elaboró usando concentraciones desde 0,362 hasta 3,258 mmol/mL de *p*-nitroanilina disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando 10 réplicas por concentración y los datos se procesaron mediante un análisis de regresión lineal con el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, USA).

Para la reacción enzimática, a 20 μ L del extracto enzimático se le adicionaron 20 μ L de succinil-ala-ala-propil-fenilalanina-*p*-nitroanilida (Sigma[®]) disuelto en DMSO y 250 μ L de buffer Tris-HCl (2 mM, pH 8). Esta mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y finalizado este tiempo se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Nanodrop[®] 1000) a 410 nm.

Una unidad de actividad quimoelastasa proteasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μ mol de *p*-nitroanilida bajo las condiciones de la prueba (Villamizar et

al. 2001). Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado y los datos se procesaron mediante un análisis de regresión lineal utilizando el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, USA).

3.4.3 Actividad β -esterasa

Para la determinación de la enzima β -esterasa se utilizó la metodología descrita por Villamizar *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Esta técnica se basa en la determinación de *p*-nitrofenol como producto de la reacción, por lo que se empleó se utilizó la curva patrón de dicho compuesto descrita en el numeral 3.4.1.

Para la reacción enzimática, a 20 μ L del extracto enzimático se le adicionaron 100 μ L de *p*-nitrofenil-palmitato (Sigma[®]) (1 mg/mL en DMSO), esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 35 ± 2 °C. Finalizado este tiempo, se adicionaron 150 μ L de NaOH-glicina a pH 10,4 y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Nanodrop[®] 1000) a 400 nm.

Una unidad de actividad β -esterasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 mmol de *p*-nitrofenol bajo las condiciones de la prueba (Villamizar *et al.* 2001). Todas las cuantificaciones se realizaron por triplicado para cada muestra.

3.5 Caracterización biológica de los conidios de *N. rileyi* Nm006

Antes de evaluar la actividad biológica de los conidios de *N. rileyi* obtenidos a partir de la producción masiva realizada bajo las diferentes condiciones de estrés, fue necesario establecer las concentraciones letales de dicho aislamiento. Para lo anterior, se realizó un bioensayo siguiendo la metodología descrita por Espinel & Cotes (2008).

A partir de una caja de Petri esporulada de *N. rileyi* Nm006 se preparó una suspensión madre en Tween 80[®] al 0,1% y se determinó la concentración mediante recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente, se prepararon los tratamientos correspondientes a las siguientes concentraciones: 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 conidios/mL.

Para el montaje del bioensayo se utilizaron fragmentos de hojas de higuera (*Ricinus communis*) de 5 cm x 5 cm, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,5% durante cinco minutos y posteriormente se lavaron con agua estéril tres veces por el mismo periodo de tiempo. Las hojas de higuera se colocaron en recipientes plásticos de 16 onzas, los cuales tenían en su interior un fragmento (5 cm x 5 cm) de papel absorbente.

De cada tratamiento se asperjaron 500 μ L por el haz y por el envés de la hoja, una vez inoculada, se ubicó en un recipiente plástico y se colocó una larva de segundo ínstar (L2) de *S. frugiperda* proveniente de la Unidad de Cría del Laboratorio de Control Biológico de Corpoica. Los recipientes se incubaron a 24 ± 2 °C y 50% de humedad relativa. Cada tratamiento contó con tres repeticiones, cada una compuesta por 10 unidades experimentales y la unidad experimental correspondió a un recipiente plástico con una hoja de higuera y una larva neonata de *S. frugiperda*. Se contó con un testigo absoluto, para el cual, las hojas no recibieron ningún tratamiento. Transcurrido 14 días se determinó la mortalidad. El diseño experimental fue completamente al azar y los resultados de mortalidad fueron analizados mediante un análisis Probit utilizando el programa Biostat® 2007. Una vez determinada la CL_{90} (concentración letal 90), ésta fue utilizada para evaluar la actividad biológica de los conidios de *N. rileyi* obtenidos a partir de la producción masiva realizada bajo las diferentes condiciones de estrés.

3.5.1 Actividad biológica

El montaje del bioensayo se realizó de la manera anteriormente descrita (numeral 3.5.). Para la evaluación biológica de cada tratamiento, se preparó una suspensión de conidios ajustada a una concentración de 1×10^6 conidios/mL con la cual se inocularon los fragmentos de la hoja.

Cada tratamiento contó con tres repeticiones, cada una compuesta por 10 unidades experimentales y la unidad experimental correspondió a un recipiente plástico con una hoja de higuera y una larva neonata de *S. frugiperda*. Se contó con un testigo absoluto,

para el cual, las hojas no recibieron ningún tratamiento. La mortalidad fue determinada pasados 14 días y el resultado se corrigió con respecto al testigo utilizando la fórmula de Schneider - Orelli para estimar el porcentaje de eficacia (Zar 1999):

$$Eficacia (\%) = \left[\frac{(A - B)}{(100 - B)} \right] \times 100$$

donde, A corresponde a la mortalidad en el tratamiento y B corresponde a la mortalidad en el testigo.

La normalidad y la homocedasticidad de los resultados fueron determinadas mediante las pruebas de Shapiro Wilks (95%) y Bartlett (95%), respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se procedió a realizar un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) utilizando el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, USA).

3.6 Efecto de la interacción de las condiciones abióticas de estrés sobre el desempeño ecofisiológico de *N. rileyi* Nm006

A partir de la evaluación individual de los factores abióticos de estrés se seleccionaron aquellos que tuvieron un efecto positivo sobre las características ecofisiológicas del microorganismo y se procedió a estudiar la interacción entre los mismos utilizando un diseño tipo factorial multinivel (Kuehl 2001), con tres niveles por factor.

Los tratamientos se definieron a partir de un punto central o punto cero, que correspondió al tratamiento que produjo la mejor respuesta en los ensayos previos (numeral 3.2.). Las variables respuesta fueron la viabilidad expresada como germinación (%) (numeral 3.3.1.), el rendimiento (numeral 3.2.1.), la actividad enzimática (numeral 3.4.) y la actividad biocontroladora (numeral 3.5.). Cada tratamiento se evaluó por triplicado y para determinar las relaciones entre los factores y las variables evaluadas se realizó un

análisis de superficies de respuesta y se generó un modelo de predicción con el programa Statgraphics® versión Centurion XVI (StatPoint Technologies, Virginia, USA)

Posteriormente se validaron los valores óptimos del modelo realizando la producción masiva de *N. rileyi* Nm006 (numeral 3.2) aplicando las condiciones de estrés seleccionadas y los conidios obtenidos fueron caracterizados siguiendo las metodologías anteriormente descritas.

3.6.1 Elaboración del bioplaguicida a base de *N. rileyi* Nm006

La biomasa producida utilizando las condiciones óptimas del modelo fue utilizada para la elaboración del bioplaguicida formulado como concentrado emulsionable (EC). Los conidios se mezclaron con los excipientes de formulación que incluyeron un protector de luz UV y un vehículo oleoso en proporciones previamente establecidas. El bioplaguicida fue caracterizado microbiológica (numeral 3.3) y biológicamente (numeral 3.5) y se realizó un estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento. Como tratamientos control se utilizó conidios sin formular y el bioplaguicida a base de conidios de *N. rileyi* Nm006 producidos utilizando las condiciones estandarizadas previamente al desarrollo del presente trabajo.

3.6.2 Estudio de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento

Muestras de los conidios sin formular y del bioplaguicida a base de *N. rileyi* Nm006 fueron dispensadas en viales plásticos estériles de 2,5 mL de capacidad, los cuales se sellaron con una película de Parafilm®. Los viales se almacenaron a $8 \pm 2^\circ\text{C}$, $18 \pm 2^\circ\text{C}$ y $28 \pm 2^\circ$ durante tres meses y las evaluaciones se realizaron cada mes, determinando el porcentaje de germinación de los conidios, siguiendo la metodología previamente descrita (numeral 3.3.1). La actividad insecticida se determinó antes y después de los tres meses de almacenamiento, utilizando la metodología del bioensayo previamente descrita en el numeral 3.5.1. El diseño del estudio fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo y un arreglo factorial. Para cada análisis se emplearon 3 unidades experimentales por tratamiento.

La normalidad y la homocedasticidad de los resultados se determinaron mediante las pruebas de Shapiro Wilks (95%) y Bartlett (95%), respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se procedió a realizar un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación de medias de Tukey (95%) utilizando el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, USA).

4. Resultados y discusión

4.1 Efecto de choques térmicos sobre el rendimiento, la germinación, la actividad enzimática y biológica de *Nomuraea rileyi* Nm006

4.1.1 Rendimiento

La implementación de choques térmicos durante la fermentación de *N. rileyi* (Nm006) no inhibió el crecimiento del microorganismo, el cual presentó una esporulación homogénea y un crecimiento masivo sobre el sustrato. El efecto de los diferentes choques térmicos sobre la esporulación de *N. rileyi* (Nm006) se evaluó mediante el recuento de conidios/g de sustrato húmedo resultados que se presentan en la Tabla 1. El tratamiento control (sin choque térmico) presentó un rendimiento de $1,48 \times 10^9$ conidios/g de sustrato húmedo, valor que no fue significativamente diferente ($F= 0,08$, $gl=4$, $p=0,9861$) de los obtenidos con las bandejas expuestas a los diferentes choques térmicos (Tabla 4-1). Este resultado indica que la exposición de los sustratos colonizados por el hongo, a choques de temperaturas entre 5°C y 45°C durante una hora al inicio de la esporulación (7 días de incubación) no tuvo un efecto en la conidiación de *N. rileyi*.

Cabe destacar que la producción de conidios obtenida con todos los tratamientos fue superior a la reportada en otros trabajos como el de Thakre *et al.* (2011) con rendimientos de $5,53 \times 10^7$ y de $4,20 \times 10^7$ conidios/g utilizando como sustrato cereales como el arroz y el sorgo respectivamente y Caro y colaboradores (2005) quienes en sustratos como millo, soya y arroz obtuvieron rendimientos de $2,30 \times 10^8$, $4,50 \times 10^8$ y de $2,00 \times 10^8$ conidios/g respectivamente.

Este alto rendimiento puede deberse a la leguminosa utilizada como sustrato en el presente trabajo, la cual contiene una alta cantidad de nitrógeno de tipo orgánico (25,5 %) (USDA 2012), que posiblemente favoreció el proceso de esporulación ya que se ha demostrado que *N. rileyi* requiere una fuente de nitrógeno orgánico para iniciar la conidiación (Osherov & May 2001; El-Sayed et al. 1992). Por ejemplo, Vimala-Devi y colaboradores (2001) al evaluar diferentes medios de producción masiva para un aislamiento nativo de *N. rileyi* demostraron que el proceso de esporulación es óptimo, solamente cuando en el medio de cultivo existe una fuente de nitrógeno de tipo orgánico como el extracto de levadura o la peptona, alcanzando rendimientos superiores a $2,80 \times 10^9$ conidios/g. De igual manera, Rajan et al. (2009) al evaluar el efecto de fuentes de nitrógeno de tipo orgánico e inorgánico en el crecimiento de *N. rileyi*, evidenciaron un efecto significativo cuando el medio de cultivo contenía una fuente de nitrógeno de tipo orgánico como peptona, extracto de carne o levadura, en comparación con los medios de cultivo con nitrógeno inorgánico.

Tabla 4-1. Producción de conidios del hongo *N. rileyi* (Nm006) crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques de temperatura.

Tratamientos	Rendimientos (conidios/g de sustrato)	Desviación estándar
Control sin choque de temperatura	$1,48 \times 10^9$	0,14
Choque a 5°C	$1,64 \times 10^9$	0,08
Choque a 15°C	$1,73 \times 10^9$	0,01
Choque a 35°C	$1,70 \times 10^9$	0,11
Choque a 45°C	$1,65 \times 10^9$	0,09

En la actualidad, dentro de las estrategias más utilizadas para aumentar la eficiencia de los sistemas de fermentación, se encuentra el uso de sustratos como residuos agroindustriales y la manipulación de las condiciones ambientales (Eibes et al. 2009). Dentro de la manipulación de las condiciones ambientales, un método que se puede utilizar para mejorar la productividad y rendimiento de algunos bioprocesos es la

modificación de la temperatura durante un corto tiempo “choque térmico” o “shift strategy” (Zheng et al. 2001). Sin embargo, este método de optimización en la producción masiva de hongos entomopatógenos ha sido poco estudiado e implementado (Magan 2007). En el caso de otros hongos con interés biotecnológico, esta estrategia ha sido ampliamente descrita, por ejemplo Al-Naama y colaboradores (2009) evidenciaron que la exposición del hongo *Baudoinia compniacensis* a 45°C durante 90 minutos indujo el crecimiento micelial y la producción de trehalosa, compuesto que estabiliza las membranas celulares y protege la integridad enzimática del microorganismo (Tereshina 2005). De igual manera, Peng *et al.* (2010) desarrollaron una estrategia durante la fermentación de *Mortierella alpina* que incluye el estrés térmico para la producción de ácido araquidónico (ARA). Los autores controlaron la temperatura a 25°C durante 108 horas, transcurrido este tiempo disminuyeron la temperatura a 20°C durante otras 108 horas, cambio que ocasionó un aumento en la concentración de ARA en un 26,1%.

Teniendo en cuenta los resultados descritos en la tabla 1, la estrategia de choque térmico implementada en el presente trabajo no tuvo ningún efecto sobre el rendimiento de la fermentación de *N. rileyi*. Sin embargo, es posible que al modificar el tiempo de exposición se logre evidenciar una respuesta positiva por lo que se sugiere para futuros trabajos aumentar el tiempo de los choques de temperatura.

4.1.2 Germinación

La viabilidad expresada como porcentaje de germinación de los conidios obtenidos de los diferentes choques térmicos se describe en la tabla 4-2. Los conidios de la fermentación realizada sin la implementación de choques térmicos (tratamiento control) presentaron una germinación del 90,41% a las 48 horas de incubación. Cuando se realizaron los choques térmicos a 5°C y 45°C, los conidios presentaron germinaciones del 83,07% y 86,59% respectivamente, valores que no fueron significativamente diferentes del obtenido con el control (Tabla 4-2). En contraste con estos resultados, los conidios obtenidos después de los choques térmicos a 15°C y 35°C presentaron germinaciones significativamente inferiores ($F=12$, $gl=4$, $p=0,0008$) a la del tratamiento control (sin choque térmico). Este resultado sugiere que los choques de temperaturas superiores en un rango de 20°C por encima o por debajo de la temperatura óptima ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) no

tuvieron ningún un efecto sobre la capacidad de germinar de los conidios de *N. rileyi*, mientras que la exposición a temperaturas cercanas a la óptima disminuyeron la viabilidad del microorganismo.

Tabla 4-2. Germinación de los conidios del hongo *N. rileyi* crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques térmicos.

Tratamientos	Germinación (%)	Desviación estándar
Control sin choque de temperatura	90,41*a	0,80
Choque a 5°C	83,07 ab	4,82
Choque a 15°C	75,40 bc	3,02
Choque a 35°C	72,80 c	2,67
Choque a 45°C	86,59 a	3,06

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Este comportamiento indica que la exposición a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento (25°C) durante un corto tiempo (1 hora) no indujeron los sistemas de adaptación térmica en *N. rileyi* y por el contrario retardaron el proceso de germinación. Comportamientos similares se han evidenciado para diferentes microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Amillastre et al. 2012), *B. bassiana* (Liu et al. 2009), *Candida utilis* (Wei et al. 2003) y *P. farinosus* (Hallsworth & Magan 1996), en donde la exposición a temperaturas cercanas a la óptima durante un corto tiempo generaron una disminución en la viabilidad. Por ejemplo, para la levadura *C. utilis* a la temperatura óptima de desarrollo (24°C) la velocidad máxima de crecimiento (μ) fue de 1,7 mg/g.h, mientras que al realizar un aumento en dos grados (26°C) durante 8 horas, esta velocidad de crecimiento disminuyó a 1,5 mg/g.h. Por el contrario, cuando se realizó un aumento a 30°C durante el mismo tiempo de exposición (8 horas), la velocidad máxima de crecimiento (μ) fue de 1,9 mg/g.h. Los autores concluyeron que la exposición a temperaturas 5°C por encima de la óptima de crecimiento, indujo sistemas de protección

térmica, mientras que la temperatura cercana a la óptima retardo el desarrollo del microorganismo en la fase de crecimiento exponencial (Wei et al. 2003).

La reducción en la germinación de los conidios obtenidos después de los choques a 15°C y 35°C también podría estar relacionada con un efecto deletéreo del cambio de temperatura sobre alguno de los procesos vitales de la célula. Por ejemplo, Gocheva y colaboradores (2009) evidenciaron una reducción significativa en el crecimiento micelial de *Penicillium* sp. debido a un choque térmico a 6°C durante 40 minutos en el proceso de fermentación a 15°C. Los autores sugirieron que el cambio de temperatura causó un efecto oxidativo en las proteínas de la membrana, lo que disminuyó significativamente la viabilidad de los conidios, además se evidenció que el tiempo de exposición no fue suficiente para activar los sistemas de adaptación térmica.

Rangel et al. (2005) sugiere que la inducción de los sistemas de protección térmica en las células fúngicas depende de la termotolerancia de cada microorganismo, pero en general estos se expresan cuando existen cambios en la temperatura superiores a 15°C en comparación con la temperatura óptima de crecimiento (Tereshina 2005).

Dentro de los principales sistemas de adaptación térmica que ocurren en una célula expuesta a un choque térmico se encuentran: la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) Heat Shock Protein por sus siglas en inglés, la síntesis de trehalosa, el mantenimiento del pH intracelular por medio de la actividad ATPasa de la membrana celular, la disminución del a_w , la redistribución de los compartimentos en el citosol y la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (Rangel 2011; Tereshina 2005; Feofilova et al. 2000). Sin embargo, el principal mecanismo de protección térmica son las proteínas de estrés térmico (HSP), cuya expresión se da por el aumento en rangos superiores a 15°C a la temperatura óptima de crecimiento (Tereshina 2005). En el caso específico de *N. rileyi*, Qin y colaboradores (2009) identificaron la proteína de estrés térmico 70 (Hsp70) en una cepa aislada en un cadáver del gusano de seda (*Bombyx mori*). En este sentido, es posible que la alta viabilidad que presentaron en este trabajo los conidios de *N. rileyi* Nm006, (germinación del 86,65%) cuando se expuso el hongo a un choque térmico de 45°C se deba a la rápida inducción de HSP, activadas por el cambio drástico

en la temperatura, considerando que los genes que codifican estas proteínas se encuentran dentro de los más conservados (Rangel 2011).

Otro mecanismo de protección térmica que posiblemente tiene *N. rileyi* (Nm006) es la producción de solutos compatibles como el glicerol, la trehalosa y el manitol. La función de estos solutos es la estabilización de la membrana celular evitando la desnaturalización de proteínas y también como una fuente de carbono de tipo endógeno (Petzold et al. 2006). Por ejemplo, para los hongos entomopatógenos *B. bassiana* y *P. farinosus*, Hallsworth y Magan (1996) evidenciaron que la exposición de los conidios a una temperatura de 5°C aumentó el contenido de polioles en comparación con los conidios no expuestos. De igual forma, Liu et al. (2009) evaluaron el contenido de trehalosa y manitol en los conidios de *B. bassiana* expuestos entre una y seis horas a las temperaturas de 35, 37 y 40°C, encontrando un aumento de la trehalosa a medida que aumentó la temperatura y el tiempo de exposición y una disminución a medida que se acercaron a la temperatura óptima de crecimiento (25°C), comportamiento que sugirió un rol importante de este soluto compatible en la termotolerancia del hongo.

Teniendo en cuenta que cuando *N. rileyi* (Nm006) se expuso a los choques de temperaturas más extremas (5°C y 45°C) no se evidenció una disminución significativa en la germinación, es posible sugerir que el aislamiento de Nm006 cuenta con alguno de los mecanismos de estrés térmico descritos anteriormente, lo que evitó el daño en la integridad celular y por lo tanto mantuvo la viabilidad de los conidios.

4.1.3 Actividad enzimática

Los hongos entomopatógenos como *N. rileyi*, durante el proceso de infección producen enzimas como quitinasas, lipasas y proteasas que son claves e indispensables en el proceso de penetración a través de la cutícula del insecto (Pedrini et al. 2007). Con el fin de evaluar el efecto de los choques de estrés sobre la producción de dichas enzimas se determinó la actividad *N*-acetilglucosaminidasa, la actividad β -esterasa y la actividad

quimoelastasa proteasa (Pr1) de los conidios de Nm006 producidos bajo los diferentes choques de estrés térmico.

La actividad quimoelastasa proteasa (Pr1) no se detectó en ningún extracto enzimático de los conidios de *N.rileyi* Nm006 producidos bajo los diferentes choques térmicos ni en el tratamiento control. Lo anterior posiblemente se debe a que la expresión de dicha enzima es inducida por el sustrato, siendo el mejor inductor la cutícula de insectos (Samuels & Paterson 1995; Small & Bidochka 2005). De igual manera, la expresión de los genes involucrados en la síntesis de Pr1 están regulados por la relación de C/N del medio de cultivo, comportamiento descrito ampliamente para *M. anisopliae* y *B. bassiana* (St Leger et al. 1998; de Moraes et al. 2003; Safavi et al. 2007). Por ejemplo, de Moraes y colaboradores (2003) determinaron la producción de proteasas por parte de *M. anisopliae* en medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono, encontrando que la actividad quimoelasta Pr1 y la actividad tripsina (Pr2), fueron mayores cuando el microorganismo se produjo en los medios que tenían como fuente de carbono solamente quitina o cutícula de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que el medio de cultivo utilizado en el presente estudio no favorezca la expresión de esta enzima durante el proceso de fermentación.

Un resultado similar fue evidenciado por Fonseca et al. (2010), quienes al evaluar la actividad Pr1 de un extracto enzimático de conidios de *N. rileyi* producidos en un medio basal, no detectaron dicha enzima. Sin embargo, cuando evaluaron el extracto enzimático de conidios producidos en un medio con presencia de la cutícula de *A. gemmatilis*, la actividad enzimática fue de 4,742 UE (μ moles de *p*-nitrofenol.mL/min). En otro estudio, El-Sayed y colaboradores (1993) evidenciaron que *N. rileyi* produce la enzima Pr1 una vez el conidio entra en contacto con la cutícula del insecto, en tiempos inferiores a 10 minutos de contacto. Sin embargo, el nivel de expresión de dicha enzima depende del sustrato cuticular y de los inhibidores enzimáticos como fenoles y melaninas presentes en cada especie.

El efecto de la represión catabólica por la relación carbono-nitrógeno en la producción de la proteasa Pr1 ha sido también ampliamente estudiado. Tal es el caso de Wu et al.

(2010), quienes evaluaron el efecto de la relación C/N sobre la producción de Pr1 en tres aislamientos de *M. anisopliae*, encontrando que la mayor expresión de dicha enzima fue en el medio de cultivo con una baja relación C/N (1% de quitina, 2% de peptona y 0,2% de extracto de levadura). En otro trabajo, Ali y colaboradores (2011) evaluaron la actividad proteolítica de *I. fumosoroseus* en medios de cultivo con fuentes de carbono como glucosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), quitina de tipo sintética y la cutícula de *P. xylostella*. Los autores evidenciaron que la actividad Pr1 fue menor en los conidios que provenían de medios de cultivo con solo fuentes de carbono sencillas como glucosa y GlcNAc, mientras que aquellos producidos en medios que contenían al menos quitina o la cutícula del insecto, presentaron una actividad Pr1 mayor.

Resultados similares a los evidenciado en el presente estudio han sido descritos para otros hongos entomopatógenos como *L. lecanii*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* (Charnley & St Leger 1991; Yang et al. 2005; Samuels & Paterson 1995; Sheng et al. 2006).

Para las otras dos enzimas evaluadas, β -esterasa y N-acetilglucosaminidasa, los resultados se presentan en la tabla 4-3.

Tabla 4-3. Actividad N-acetilglucosaminidasa y β -esterasa de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentaciones sólidas y expuestos a choques de temperatura. Unidad Enzimática UE (mmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto por mililitro a 35°C).

Enzima	Tratamiento Control	Choques térmicos			
		5°C	15°C	35°C	45°C
β-esterasa (UE)	0,26 * c	0,75 a	0,52 b	0,68 ab	0,73 ab
N-acetilglucosaminidasa (UE)	7,58 * ab	8,58 a	5,94 b	7,16 ab	6,91 ab

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%). El análisis se realizó independientemente para cada enzima.

La actividad β -esterasa de los conidios no expuestos (tratamiento control) fue de 0,26 UE, valor significativamente inferior ($F=9,54$, $gl=4$, $p=0,0001$) a la actividad β -esterasa

obtenida con los conidios expuestos a todos los choques térmicos. Este resultado sugiere que todos los choques térmicos evaluados indujeron la producción y acumulación intracelular de dicha enzima.

En general, todos los conidios obtenidos después de someter los sustratos colonizados por el hongo a diferentes choques térmicos presentaron una actividad lipolítica superior a la de los conidios no expuestos a ningún choque, comportamiento que sugiere que el nivel basal de esta enzima aumentó debido a la condición de estrés utilizada durante el proceso de fermentación. Esta alta producción y acumulación de esterasas es importante en el proceso de infección, ya que dicha enzima es la responsable de degradar los ésteres grasos que son constituyentes importantes de la epicutícula, o primera capa de la cutícula del insecto (Pedrini et al. 2007), siendo éste el primer paso enzimático en el proceso de infección y penetración del hongo entomopatógeno sobre el insecto plaga (Villamizar & Cotes 2003; Ali et al. 2009a).

La mayor acumulación o producción de dicha enzima en los conidios obtenidos después de los choques térmicos posiblemente se debe a que la producción de β -esterasa es influenciada por la relación carbono – nitrógeno del medio de cultivo y por condiciones abióticas como el pH, la temperatura de crecimiento y la concentración de oxígeno disuelto (Sharma et al. 2001). Este efecto de la temperatura fue evidenciado para el hongo entomopatógeno *I. fumosorosea*, para el cual se estableció que la temperatura óptima para la producción de lipasas es 32°C (Ali et al. 2009a), resultados similares a los descritos para *M. anisopliae* por Beys Silva et al. (2005). De igual forma, se ha evidenciado que una alta actividad lipolítica está relacionada con la inducción o represión catabólica especialmente de la fuente de carbono y nitrógeno, comportamiento descrito ampliamente para *M. anisopliae* (St Leger et al. 1986; Beys Silva et al. 2010).

El nivel basal de la enzima β -esterasa en los conidios de *N. rileyi* (tratamiento control) fue similar al reportado por Beys Silva y colaboradores (2010) para los conidios de *M. anisopliae* antes de iniciar el proceso de infección en *R. microplus*. Estos autores demostraron que la actividad lipolítica se incrementa a medida que aumenta el tiempo de infección sobre el insecto plaga, siendo indispensable una cantidad basal para el inicio de

dicho proceso. Estas enzimas pueden estar en la superficie y en el interior de los conidios debido a que son utilizadas en los procesos de diferenciación celular, por ejemplo en el ensamble de la membrana celular (Beys Silva et al. 2009).

Las lipasas son enzimas que se encuentran en una concentración basal en los conidios de diferentes hongos entomopatógenos (Hegedus & Khachatourian 1988; Charnley & St Leger 1991; Sharma et al. 2001; Supakdamrongkul et al. 2010b) y su mayor expresión está relacionada con una mayor actividad insecticida (Supakdamrongkul et al. 2010a), por lo que es posible que los conidios sometidos a los choques térmicos presenten mayor patogenicidad o virulencia.

La presencia de lipasas extracelulares en el hongo *N. rileyi* ha sido reportada en algunos trabajos como el de Supakdamrongkul y colaboradores (2010a) quienes además demostraron que la temperatura óptima para la actividad lipolítica es de 35°C y también evidenciaron al inocular los insectos con los conidios, un aumento en la mortalidad de *S. litura* (2,7 veces superior) utilizando los conidios mezclados con la enzima purificada.

Para la actividad *N*-acetilglucosaminidasa (quitinasas), los conidios sin exposición a choques térmicos (tratamiento control) presentaron una actividad enzimática de 7,58 UE, valor que no fue significativamente diferente a las actividades enzimáticas de los conidios obtenidos bajos los diferentes choques térmicos (Tabla 4-3) ($F=2,65$, $gl=4$, $p= 0,0571$). Teniendo en cuenta este resultado se puede concluir que la exposición a los choques térmicos no tuvo ningún efecto sobre la producción de esta enzima.

Las quitinasas son de gran importancia en el proceso de infección ya que degradan la quitina, principal constituyente de la procutícula del insecto (de Moraes et al. 2003; Merzendorfer & Zimoch 2003). Además, la enzima *N*-acetilglucosaminidasa ha sido descrita como uno de los principales factores de virulencia de los hongos entomopatógenos (Khachatourians & Qazi 2008). La producción de quitinasas está regulada por una represión de tipo catabólica, especialmente por la fuente de carbono, por ejemplo para *M. anisopliae* la concentración de esta enzima aumenta en medios de

cultivos suplementados con cutícula de insectos (St Leger et al. 1986; Villamizar et al. 2001; de Moraes et al. 2003), pero disminuye en medios ricos en azúcares reductores (Villamizar et al. 2001). Para *I. fumosorosea* se evidenció el mismo comportamiento, ya que la actividad *N*-acetilglucosaminidasa se redujo al utilizar como única fuente de carbono glucosa, en comparación a la combinación de glucosa con glucosamina (GlcNAc) (Ali et al. 2010).

De acuerdo a St Leger et al. (1986), una alta producción de la enzima *N*-acetilglucosaminidasa en hongos entomopatógenos puede estar relacionada con los requerimientos fisiológicos del microorganismo, ya que éstas participan en procesos como la ramificación micelial y la conidiogénesis, por lo que su nivel basal en las células fúngicas es alto (Seidl 2008; Duo-Chuan 2006). También se ha evidenciado que aislamientos de hongos entomopatógenos que tengan una alta producción de quitinasas pueden presentar una alta actividad biológica, como lo reportó Fang et al. (2005) que al clonar el gen que codifica para estas enzimas, incrementó la virulencia de *B. bassiana*. Sin embargo, la correlación entre un aumento de esta actividad enzimática con la virulencia debe determinarse para cada hongo entomopatógeno (Bertholdo et al. 2003).

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, los choques térmicos implementados durante la fermentación de *N. rileyi* potenciaron la actividad β -esterasa de los conidios, lo que posiblemente beneficie la actividad biocontroladora del microorganismo sobre *S. frugiperda*, resultado que se describe en el numeral 4.1.4.

4.1.4 Actividad biológica

Antes de determinar la actividad biológica de los conidios de *N. rileyi* producidos bajo los diferentes choques térmicos, se determinaron las concentraciones letales de este aislamiento, con el fin de utilizar la concentración (dosis) adecuada del microorganismo que permitiera evidenciar el efecto de la implementación de las condiciones de estrés durante la producción de los conidios.

Se utilizó un modelo Probit para calcular la relación dosis-mortalidad de *N. rileyi* sobre larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda*. El valor de p obtenido fue superior a 0,05 (Tabla 4), lo que permitió aceptar la hipótesis de que existe una correlación lineal entre la dosis y la mortalidad de las larvas. El bajo valor de Chi-Cuadrado (χ^2) sugirió homogeneidad entre los datos, lo que además indicó que la distribución experimental se ajustó a la teórica (Zar 1999). La mortalidad de las larvas fue afectada por la concentración de *N. rileyi* utilizada, la concentración letal media (CL₅₀) estimada fue de $1,9 \times 10^4$ conidios/mL y la concentración letal 90 (CL₉₀) fue de $1,1 \times 10^6$ conidios/mL (Tabla 4-4). Resultados similares a los obtenidos por Bosa y colaboradores (2004) para un aislamiento de *N. rileyi* codificado como Nm007, el cual presentó una concentración letal media igual a $1,2 \times 10^4$ conidios/mL y una concentración letal 90 igual a $9,0 \times 10^5$ conidios/mL. Cabe destacar que el aislamiento Nm006 utilizado en el presente trabajo es altamente virulento en comparación con otros aislamientos de *N. rileyi*, como el utilizado por Vimala Devi (1994) para el cual se obtuvo una CL₅₀ de $9,3 \times 10^6$ conidios/mL sobre larvas de segundo ínstar de *S. litura* y el estudiado por Rajan & Muthukrishnan (2009) codificado como PDCB con una CL₅₀ de $2,87 \times 10^7$ conidios/mL sobre larvas de *Cnaphalocrocis medinalis*.

Tabla 4-4. Concentraciones letales de la cepa *N. rileyi* Nm006 sobre larvas de segundo ínstar de *S. frugiperda*.

CL ₅₀ (CI/mL)	Límites de confianza (CI/mL)		CL ₉₀ (CI/mL)	Límites de confianza (CI/mL)		G.L	χ^2	P	Pendiente
	Inferior	Superior		Inferior	Superior				
$1,9 \times 10^4$	$7,9 \times 10^3$	$4,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$3,3 \times 10^7$	3,0	2,435	0,487	0,728

La concentración letal 90 (CL₉₀) de $1,0 \times 10^6$ conidios/mL fue seleccionada para la evaluación de la actividad biocontroladora de los conidios obtenidos con los diferentes choques de estrés. Esta concentración se seleccionó porque causa el 90% de la mortalidad y permite evidenciar diferencias entre los tratamientos.

En la tabla 4-5 se describen los resultados de la actividad biológica de los conidios obtenidos de las fermentaciones con y sin choques térmicos, donde se puede observar

que la mortalidad y la eficacia de los conidios del tratamiento control fueron del 88,45% y del 86,67% respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con los conidios provenientes de las fermentaciones implementadas con choques térmicos a 5°C y 45°C, mientras que los conidios provenientes de las fermentaciones con choques térmicos a 15°C y 35°C presentaron mortalidades y eficacias significativamente inferiores ($F=14,00$, $gl=4$, $p=0,0004$) en comparación al tratamiento control.

Tabla 4-5. Actividad insecticida de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentación sólida y expuestos a choques de temperatura. La dosis utilizada corresponde a la concentración letal 90 (1×10^6 conidios/mL).

Tratamientos	Mortalidad (%)	Eficacia (%)
Control sin choque de temperatura	88,45*a	86,67 a
Choque a 5°C	83,77 a	81,04 a
Choque a 15°C	62,18 b	56,36 b
Choque a 35°C	57,80 b	51,32 b
Choque a 45°C	84,60 a	82,24 a

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Los resultados de actividad insecticida son coherentes con los descritos para otras variables, ya que los conidios obtenidos cuando se implementaron los choques térmicos a 15°C y 35°C, además de presentar eficacias significativamente inferiores, también presentaron germinaciones y actividades β -esterasa inferiores a las del tratamiento control. Este comportamiento permite sugerir que la virulencia y la eficacia del hongo están directamente relacionadas con la viabilidad y la capacidad de producir las enzimas que participan en el proceso de infección, como lo reportó Safavi y colaboradores (2007).

Con las variables respuestas eficacia, germinación y actividad β -esterasa se realizó un análisis de correlación, siendo estas variables las únicas que presentaron un efecto significativo cuando se implementaron los choques térmicos. En la tabla 4-6 se describen los coeficientes de correlación de Pearson para cada una de las interacciones entre las variables respuestas.

Tabla 4-6. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuestas germinación, eficacia y actividad β -esterasa de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentación sólida expuesta a choques térmicos.

	Germinación	Eficacia	Actividad β-esterasa
Germinación	-----	0,8988 p = 0,0001	-0,1116 p = 0,0253
Eficacia	0,8988 p = 0,0001	-----	-0,1043 p = 0,0114
Actividad β-esterasa	-0,1116 p = 0,0253	-0,1043 p = 0,0114	-----

El análisis de correlación demostró que existe una correlación positiva de 0,8988 ($p=0,0001$) entre las variables respuesta germinación y eficacia, resultado que concuerda con lo descrito por diferentes autores (Petlamul & Prasertsan 2012; Safavi et al. 2007; Talaei-Hassanloui et al. 2007; Tang & Hou 2001; Altre et al. 1999; Alves et al. 1996). En ese sentido, Altre y colaboradores (1999) demostraron que existe una alta correlación entre la germinación y la virulencia de ocho aislamientos de *P. fumosoroseus*. Estos autores sugirieron que la alta germinación beneficia el proceso de infección, ya que con una mayor velocidad de germinación hay una mayor probabilidad de infectar al hospedador. De igual forma, Talaei-Hassanloui et al. (2007) evaluaron la correlación entre el tipo de germinación de *B. bassiana* y su virulencia sobre *P. xylostella*, encontrando que existe una alta correlación ($r = 0,71$ $p < 0,05$) entre la germinación unidireccional y la actividad biológica, posiblemente porque la elongación de un solo tubo germinal, concentra en un solo sitio la fuerza mecánica y las enzimas para la penetración, en comparación con la germinación bidireccional.

En el presente estudio se evidenció una baja correlación lineal ($r = -0,1043$ $p = 0,0114$) entre la eficacia y la actividad β -esterasa, lo que sugiere que la actividad enzimática β -esterasa no tuvo un efecto positivo sobre la variable actividad biológica. Aunque las lipasas son importantes en el proceso de infección (Pedrini et al. 2007), es posible que la alta producción de lipasas no sea un factor de virulencia determinante en *N. rileyi* Nm006. Este resultado es similar al reportado por Bertholdo et al. (2003) para cinco aislamientos

de *N. rileyi*, para los cuales los autores no encontraron una correlación entre la actividad lipolítica y la virulencia, comportamiento que si ha sido evidenciado en otros hongos entomopatógenos como *M. anisopliae* (Villamizar et al. 2001) y *B. bassiana* (Kaur & Padmaja 2009).

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, para continuar con el segundo objetivo planteado, se seleccionaron los choques térmicos a las temperaturas de 5°C y 45°C, debido a que estos tuvieron un efecto positivo sobre las variables respuestas germinación, eficacia y actividad β – esterasa.

4.2 Efecto de choques de irradiación con luz UV sobre el rendimiento, la germinación, la actividad enzimática y biológica de *Nomuraea rileyi* Nm006.

4.2.1 Rendimiento

La implementación de choques de irradiación durante la fermentación de *N. rileyi* (Nm006) disminuyó el crecimiento y la esporulación del hongo. En la tabla 4-7 se muestran los resultados de rendimiento expresado como recuento de conidios/g de sustrato húmedo. El tratamiento control (sin choque de irradiación) presentó un rendimiento de $1,48 \times 10^9$ conidios/g de sustrato húmedo, valor que fue significativamente mayor ($F= 17,5$, $gl=20$, $p=0,0000$) que el obtenido con las bandejas expuestas a los choques de irradiación con tiempos superiores a 30 minutos (Tabla 4-7), lo que sugiere un efecto negativo sobre el desarrollo de *N. rileyi* Nm006. Esto contrasta con los rendimientos de las fermentaciones sometidas a los choques de irradiación entre 5 y 15 minutos, que no fueron significativamente diferentes al tratamiento control.

La luz ultravioleta (UV) ha sido ampliamente estudiada como una tecnología para la inactivación de microorganismos patógenos incluyendo mohos y levaduras (Murdoch et al. 2013). Además, en condiciones de cultivo en caja de Petri se ha evaluado el efecto de choques de luz UV sobre el desarrollo de hongos entomopatógenos (Rangel et al. 2008; Braga et al. 2002; Cagan & Svercel 2001). En general, los choques de irradiación ultravioleta en condiciones de caja de Petri han demostrado un efecto deletéreo sobre la

capacidad de crecimiento del microorganismo, sin embargo este efecto está directamente relacionado con el tiempo de exposición. Por ejemplo, Braga y colaboradores (2001) evidenciaron que a medida que aumentó el tiempo de exposición a la luz ultravioleta disminuyó la esporulación de *M. anisopliae*. Sin embargo, los autores también evidenciaron que un tiempo corto de exposición (inferior a 2 horas) causó un efecto positivo sobre la viabilidad de las esporas de *M. anisopliae*, ya que éstas presentaron una germinación del 95%, valor superior al presentado por los conidios no irradiados (85%).

Tabla 4-7. Producción de conidios del hongo *N. rileyi* (Nm006) crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques de irradiación con luz UV.

Tratamientos	Tiempo de irradiación (min)	Rendimientos (conidios/g de sustrato)	Desviación estándar
Control	0	1,48 x 10 ⁹ * a	0,14
1	5	1,14 x 10 ⁹ a	0,12
2	10	1,00 x 10 ⁹ a	0,24
3	15	9,25 x 10 ⁸ ab	0,06
4	30	4,68 x 10 ⁸ bc	0,07
5	60	2,87 x 10 ⁸ c	0,16
6	90	2,30 x 10 ⁸ c	0,10

* Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

En diferentes hongos se ha evidenciado que la exposición a alguna longitud de onda influye en la fisiología del microorganismo de diferentes formas, como la pigmentación, la conidiación, el metabolismo secundario o en el desarrollo sexual o asexual (Fanelli et al. 2012; Schmoll et al. 2010; Karpenko et al. 2006; Idnurm & Heitman 2005; Logemann et al. 2000; Aus et al. 1987; Leach & Trione 1965). En el caso de *N. rileyi*, se demostró que la esporulación es altamente influenciada por la luz blanca (Ignoffo 1981; Glare 1987), siendo este factor abiótico esencial en el proceso de producción masiva, sin embargo la

implementación de choques de irradiación con luz ultravioleta no se ha evaluado hasta el momento. La dependencia de luz que tiene *N. rileyi* para esporular fue demostrada por Glare (1987), evidenciando en condiciones de caja de Petri que la esporulación del aislamiento F1-63 de *N. rileyi* fue inhibida significativamente por las condiciones de oscuridad, en cambio cuando las cajas de Petri con el microorganismo se expusieron a luz constante se obtuvieron esporulaciones significativamente superiores. Lo anterior se denomina fotoesporulación, en donde la exposición a diferentes longitudes de luz durante un tiempo determinado induce la esporulación del microorganismo. En este tipo de esporulación intervienen los fotorreceptores, los cuales son proteínas que se unen a los cromóforos cuando absorben luz, provocando cambios conformacionales y modulando respuestas al medio ambiente (Olmedo 2013). Estos fotorreceptores forman complejos, denominados WCC (White-Collar Complex), los cuales son altamente conservados por la mayoría de hongos (basidiomicetos, deuteromicetos y zigomicetos), lo que sugiere su presencia en un ancestro común (Chen et al. 2010). Con relación a la luz UV, ésta activa fotorreceptores específicos en diferentes especies de zigomicetos (Avalos & Estrada 2010), los cuales activan respuestas de protección como la enzima fotoliasa o la reparación de nucleótidos defectuosos. Respuestas que están ligadas directamente con el tiempo de exposición.

Teniendo en cuenta lo anterior, el comportamiento de *N. rileyi* frente al choque de irradiación con la luz UV puede estar regulado por estos fotorreceptores, ya que la esporulación en condiciones normales de fermentación se realiza en condiciones constantes de luz blanca y cuando se implementaron los choques de irradiación UV se evidenció un descenso en la esporulación a medida que aumentaba el tiempo de exposición. Es posible que la luz ultravioleta haya inhibido las respuestas de protección de los fotorreceptores, comportamiento observado en otros hongos, como en el trabajo de Corrochano y Garre (2010), en el cual se determinó que tiempos superiores a 4 horas de exposición a la luz UVB, disminuyeron la producción de la enzima fotoliasa en *Phycomices* sp. y por lo tanto la viabilidad y esporulación del hongo.

Con base en los resultados descritos en la tabla 4-7, se puede concluir que los choques de irradiación evaluados afectaron negativamente el rendimiento de la fermentación de *N. rileyi* Nm006.

4.2.2 Germinación

La viabilidad expresada como porcentaje de germinación de los conidios obtenidos de los diferentes choques de irradiación se describe en la tabla 4-8. Los conidios obtenidos de la fermentación realizada sin la implementación de choques de irradiación (tratamiento control) presentaron una germinación del 90,41% a las 48 horas de incubación. Cuando se implementaron los choques con tiempos de irradiación entre 5 y 30 minutos, los conidios presentaron germinaciones que no fueron significativamente diferentes a la obtenida con el tratamiento control, mientras que los conidios provenientes de las fermentaciones expuestas a la luz UV por tiempos superiores a 60 minutos presentaron germinaciones significativamente inferiores ($F=8,17, 6, p=0,0006$) a la del control.

Tabla 4-8. Germinación de los conidios del hongo *N. rileyi* crecido en sustrato sólido y expuesto a diferentes choques de irradiación con luz UV.

Tratamientos	Tiempo de irradiación (min)	Germinación (%)	Desviación estándar
Control	0	90,41 * a	0,80
1	5	89,73 a	1,96
2	10	88,00 a	2,95
3	15	85,63 a	2,74
4	30	86,49 a	3,81
5	60	75,70 b	3,04
6	90	74,86 b	5,27

* Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Los resultados sugieren que la irradiación del hongo crecido sobre el sustrato a base de cereales estandarizado previamente para la producción masiva, tiene un efecto negativo

sobre la capacidad de germinar de los conidios producidos, el cual está directamente relacionado con el tiempo de exposición.

La reducción de la germinación de los conidios causada por tiempos de irradiación superiores a 60 minutos posiblemente se debió a que estas dosis de luz UV pueden causar daños en la maquinaria celular de los hongos entomopatógenos debido a la formación de fotoproductos como los dímeros de ciclobutano-pirimidina que afectan directamente la estructura del ADN y de varias proteínas (Rodríguez et al. 2010; Chelico et al. 2006) . También se ha evidenciado que la irradiación a la luz ultravioleta induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que interrumpen la respiración celular, ya que afectan la estabilidad de la membrana celular y de las mitocondrias (Purschwitz et al. 2006; Rodriguez et al. 2010; Murdoch et al. 2013)

El efecto de la radiación UV ha sido evaluado para diferentes hongos entomopatógenos como en el trabajo de Fernandes y colaboradores (2007) quienes estudiaron el efecto de esta luz sobre 60 aislamientos de *Beauveria* sp. y encontraron para todos los aislamientos una disminución significativa en la germinación después de 2 horas de exposición. Los autores también evidenciaron una disminución en la velocidad de germinación; por ejemplo, el aislamiento Bb19 presentó una germinación del 9,5% a las 24 horas de incubación y del 30% después de 48 horas de incubación. Los autores evidenciaron que los conidios después de irradiados requieren un periodo de recuperación antes de reiniciar el proceso de germinación. En otro estudio, Yao et al. (2010) evaluaron el efecto de la radiación UVB (312 nm) y de la radiación UVA (365 nm) sobre 24 aislamientos de *B. bassiana* y 36 aislamientos *Metarhizium* spp. encontrando para todos los aislamientos una mayor sensibilidad a la radiación UV tipo B que a la radiación tipo A.

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo fueron descritos por Moore et al. (1993) quienes observaron que algunos aislamientos de los géneros de hongos entomopatógenos como *Metarhizium* sp. *Beauveria* sp. y *Nomuraea rileyi* expuestos a la radiación UVB redujeron su germinación a medida que aumentó el tiempo de exposición, con un tiempo letal medio entre una y cuatro horas de exposición.

En algunas ocasiones el daño causado por la luz ultravioleta al material genético y otras estructuras celulares es detectado por el microorganismo, lo que se ve reflejado no en la muerte celular sino en una disminución en la velocidad de germinación (Braga et al. 2001). Este comportamiento se evidenció con los conidios provenientes de las fermentaciones en donde se implementaron los choques de irradiación durante 60 y 90 minutos, ya que éstos se encontraban en estado de latencia después de 48 horas de incubación. En ese sentido, Petrocelli y Slingerland (2000) argumentan que dentro de los sistemas de reparación que se inducen debido a la irradiación, se encuentran la prevención de la duplicación del material genético dañado y la segregación de los cromosomas afectados, mecanismos que aumentan la supervivencia y el mantenimiento del material genético.

Otro mecanismo de reparación del ADN es la escisión de nucleótidos, o la acción de la enzima fotoliasa, que en presencia de la luz visible, rompe los dímeros de pirimidina evitando el daño letal causado por la radiación. Esta enzima ha sido reportada en varios organismos procariotas y eucariotas (Chelico et al. 2006; Veluchamy & Rollins 2008; Chelico & Khachatourians 2008; Friedl et al. 2008; Corrochano 2011). En el caso específico de conidios expuestos a la radiación, la interrupción de ciclo celular ocasiona directamente una interrupción temporal en el proceso de germinación, paso crítico para la sobrevivencia del microorganismo. Sin embargo, Braga y colaboradores (2001) argumentan que este mecanismo no es favorable para hongos entomopatógenos, ya que al existir una menor velocidad de germinación disminuye la actividad biológica, comportamiento evidenciado en el presente trabajo (ver numeral 4.2.4) y en otros hongos como *Metarhizum* y *Beauveria* (Cagan & Svercel 2001; Rangel et al. 2011; Costa et al. 2012)

Teniendo en cuenta que cuando el hongo *N. rileyi* (Nm006) fue expuesto a choques de irradiación por tiempos cortos (< 30 minutos) no se evidenció una disminución significativa en la germinación, es posible sugerir que el aislamiento de Nm006 cuenta con alguno de los mecanismos de reparación descritos anteriormente, lo que evitó daños en la integridad celular y no afectó la viabilidad de los conidios.

4.2.3 Actividad enzimática

Con el fin de evaluar el efecto de los choques de luz UV sobre la producción de las enzimas que intervienen en el proceso de infección se determinaron las actividades *N*-acetilglucosaminidasa, β -esterasa y quimoelastasa proteasa (Pr1) en los conidios de Nm006 provenientes de las fermentaciones irradiadas a diferentes tiempos.

La actividad quimoelastasa proteasa (Pr1) no se detectó en ningún extracto enzimático de los conidios de *N.rileyi* Nm006 producidos cuando se implementaron los choques de luz UV ni en el tratamiento control, comportamiento evidenciado anteriormente cuando se implementaron los choques térmicos (numeral 4.1.3). Este resultado posiblemente se debe a que la expresión de dicha enzima es inducida por la presencia de sustrato y el medio de cultivo utilizado en el presente estudio no es el adecuado para evidenciar la producción de dicha enzima. El mejor sustrato reportado como inductor para la producción de esta enzima es la cutícula de insectos y su efecto ha sido ampliamente descrito en hongos entomopatógenos (St Leger et al. 1998; Small & Bidochka 2005; Shah et al. 2005; Castellanos et al. 2007; Safavi et al. 2007; Fonseca et al. 2010).

St Leger y colaboradores (1998) argumentan que la regulación de los genes que codifican para la proteasa Pr1 involucra una combinación de inducción por sustrato y una represión por carbono y nitrógeno. Por ejemplo, Perinotto y colaboradores (2013) evidenciaron que la actividad proteasa de un aislamiento de *Metarhizium* sp. fue significativamente superior cuando se utilizó un medio de cultivo suplementado con cutícula de garrapata, en comparación con el medio estándar en donde la fuente de carbono era glucosa. De igual forma, Nunes et al. (2010) obtuvieron actividades proteolíticas mayores cuando cultivaron un aislamiento de *N. rileyi* en un medio de cultivo con cutícula de *A. gemmatalis* al 10% que cuando se cultivó en un medio sin este suplemento. Además, estudios de proteómica realizados por Santi y colaboradores (2009) demostraron que *M. anisopliae* produce una alta concentración de proteasas en medios de cultivo que simulan la interacción patógeno-hospedador, en comparación con aquellos en donde la fuente de carbono era solamente glucosa. Lo anterior confirma que esta actividad enzimática es claramente inducida por la cutícula de insectos.

En ese sentido, la inducción y expresión de la enzima Pr1 posiblemente se evidencie en condiciones *in vivo*, cuando *N. rileyi* entre en contacto directo con el insecto plaga *S. frugiperda*. Sin embargo, el medio de producción masiva utilizado en el presente trabajo aunque no induce la producción de proteasas, específicamente la enzima Pr1, es el adecuado para el crecimiento y la esporulación de *N. rileyi* Nm006, ya que proporciona los nutrientes suficientes para el crecimiento y la esporulación. Un comportamiento similar fue reportado por Bye & Charnley (2008), quienes al evaluar la producción masiva de *Lecanicillium* sp. en sustratos a base de celulosa, xilano, urea y gelatina, evidenciaron que el hongo entomopatógeno presenta un crecimiento adecuado, pero no detectaron la presencia de la enzima Pr1 en los conidios provenientes de dichas fermentaciones.

En cuanto a las otras dos enzimas evaluadas en el presente trabajo, los resultados se describen en la tabla 4-9.

Tabla 4-9. Actividad *N*-acetilglucosaminidasa y β -esterasa de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentaciones sólidas y expuestos a choques de irradiación. Unidad Enzimática UE (mmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto por mililitro a 35°C).

Enzima	Tratamiento Control	Tiempos de irradiación (minutos)					
		5	10	15	30	60	90
β -esterasa (UE)	0,26 * bc	0,96 a	0,63 ab	0,49 abc	0,47 abc	0,20 bc	0,11 c
<i>N</i> -acetilglucosaminidasa (UE)	7,58 * a	8,73 a	7,01 ab	5,51 bc	5,01 c	4,34 c	4,13 c

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%). El análisis se realizó independientemente para cada enzima.

La actividad lipolítica (enzima β -esterasa) de los conidios no irradiados (tratamiento control) fue de 0,26 UE, valor significativamente inferior ($F=15,7$, $gl=6$, $p=0,0000$) a la actividad β -esterasa obtenida con los conidios irradiado durante 5 minutos. Lo que sugiere que este choque indujo la expresión y acumulación de esta enzima. Los conidios de las fermentación con choques de irradiación entre 15 y 60 minutos, presentaron una actividad lipolítica con valores que oscilaron entre 0,49 y 0,20 UE, no fueron significativamente diferentes de la obtenida con los conidios no irradiados. El único

choque de irradiación que causó un efecto significativamente deletéreo sobre la actividad β -esterasa fue el tiempo de irradiación de 90 minutos con un valor de 0,11 UE.

La exposición de los conidios crecidos sobre el sustrato de producción masiva durante 5 minutos a la luz UVB causó un aumento en la actividad lipolítica comparándolo con la de los conidios no expuestos a ningún choque, lo que sugiere que el nivel basal de esta enzima aumentó debido a esta condición de estrés. La alta producción de enzimas lipolíticas influye en el proceso de infección sobre el insecto plaga, ya que la enzima β -esterasa actúa como iniciador en el proceso de infección sobre el insecto plaga degradando los ésteres grasos de la epicutícula, (Pedrini et al. 2007). Teniendo en cuenta lo anterior, el choque de irradiación por 5 minutos que aumentó esta actividad, es promisorio para ser implementado en fermentaciones a gran escala.

A medida que aumentó el tiempo del choque de irradiación disminuyó la actividad β -esterasa, lo que posiblemente se debe a que a medida que aumenta la dosis de irradiación puede aumentar el daño celular o enzimático (Sinha & Häder 2002). Por ejemplo, Irfan y colaboradores (2011) observaron que al irradiar entre 5 y 65 minutos un cultivo de *Aspergillus niger* se dió una mayor producción de la enzima α -amilasa en los menores tiempos de exposición (< 15 minutos) mientras que en tiempos de irradiación superiores la actividad amilolítica disminuyó significativamente.

El principal efecto de la luz UVB sobre la célula fúngica es la formación de dímeros de pirimidinas, que afectan directamente el proceso de replicación. En la mayoría de los casos, la radiación UVB es perjudicial, pero los tiempos cortos de irradiación pueden ocasionar una mejor adaptación del organismo a condiciones de estrés o a la producción más eficiente de metabolitos (Fanelli et al. 2012; Irfan et al. 2011). En ese sentido, Prabakaran et al. (2009) sugieren que el aumento en la producción de enzimas debido a la exposición a la luz UVB, puede deberse a cambios en los promotores que codifican para dichas enzimas, por lo que la radiación puede influir en el proceso de traducción del mRNA. Además, como la radiación afecta los enlaces de hidrógeno de las bases pirimidinas (citosina y tiamina), las secuencias más vulnerables son aquellas que contengan un alto contenido de C + T. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que en *N. rileyi* el promotor que regula la producción de la enzima β -esterasa presente las características anteriormente descritas.

Para la actividad *N*-acetilglucosaminidasa (quitinasas), los conidios provenientes de la fermentación no irradiada presentaron una actividad enzimática de 7,58 UE, valor que fue significativamente superior a las actividades enzimáticas de los conidios obtenidos de las fermentaciones con tiempos de irradiación superiores a 15 minutos (Tabla 4-9) ($F=6,28$, $gl=6$, $p= 0,0001$). Los conidios irradiados durante 5 y 10 minutos presentaron una actividad *N*-acetilglucosaminidasa que no fue estadísticamente diferente de la del tratamiento control. Aunque no hay una inducción significativa de la exposición de esta enzima con el choque de 5 minutos, cabe destacar que se observa un aumento numérico de la misma, que podría sugerir un efecto positivo de los choques de irradiación.

Como se describió en el numeral 4.1.3. la producción de las quitinasas es regulada mediante la represión catabólica, pero su nivel basal en la célula fúngica es alto debido a que también participan en procesos fisiológicos como el crecimiento micelial o la conidiogénesis (St Leger et al. 1986). Sin embargo, en el presente trabajo, cuando se implementaron los choques de irradiación con tiempos superiores a 15 minutos se obtuvieron actividades enzimáticas inferiores a las del tratamiento control, lo que sugiere que estos tiempos afectaron directamente la producción de dicha enzima y por lo tanto también pudieron afectar algunos procesos fisiológicos como la esporulación (numeral 4.2.1).

En el proceso de infección sobre el insecto plaga, las quitinasas son de gran importancia ya que degradan la quitina, principal constituyente de la cutícula del insecto (Schrank & Vainstein 2010; Pedrini et al. 2007). Se ha evidenciado que aislamientos con altas producciones de quitinasas pueden presentar una alta actividad biológica, por lo que son consideradas por varios autores como factores de virulencia. Por ejemplo, en *B. bassiana* se ha evidenciado una correlación positiva entre la actividad quitinolítica y la actividad biológica (Kaur & Padmaja 2009). De igual forma, Kim y colaboradores (2010) al evaluar varios aislamientos de *B. bassiana* sobre el áfido *Aphis gossypii* (Glover, 1877) encontraron que cuando determinó la actividad biológica de conidios suplementados con un inhibidor de quitinasas, éstos no fueron eficientes para el control del áfido, mientras que aquellos que no fueron suplementados presentaron eficacias significativamente superiores. Este resultado confirmó el papel crucial de las quitinasas en el proceso de infección.

La síntesis de quitinasas extracelulares en los hongos entomopatógenos es regulada por un mecanismo de inducción y represión principalmente por el sustrato *N*-acetilglucosamina (Matsumoto 2006). En ese sentido, St. Leger et al. (1996) obtuvieron altos niveles de quitinasas usando como fuente de carbono quitina, mientras que con el sustrato alanina la actividad quitinolítica disminuyó en un 86% y con el sustrato celulosa no se detectó la enzima. Resultados que sugieren que la producción de esta enzima es regulada por los productos de la degradación de la quitina.

Con base en lo descrito, es posible que los conidios provenientes de las fermentaciones con choques de irradiación superiores a 15 minutos presenten una reducción de la actividad biológica, sin embargo es necesario determinar la correlación entre estas dos variables (numeral 4.2.4). Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, se puede concluir que la implementación de choques de irradiación de 5 minutos durante la fermentación de *N. rileyi* potenciaron las actividades β -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa de los conidios, lo que posiblemente beneficie la actividad biocontroladora del microorganismo sobre *S. frugiperda*, resultado que se describe en el numeral 4.2.4.

4.2.4 Actividad biológica

Los resultados de la actividad biológica de los conidios obtenidos de las fermentaciones con y sin choques de irradiación se describen en la tabla 4-10. La mortalidad y la eficacia causada por los conidios sin irradiar (tratamiento control) fueron del 88,45% y del 86,67% respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes de los obtenidos con los conidios provenientes de las fermentaciones expuestos a choques de irradiación de 5 a 30 minutos. En cambio, los conidios provenientes de las fermentaciones con choques de irradiación superiores a 30 minutos presentaron mortalidades y eficacias significativamente inferiores ($F=6,28$, $gl=6$, $p=0,00022$) en comparación con el tratamiento control.

Los resultados de actividad insecticida de los conidios expuestos a los choques de irradiación fueron coherentes con los resultados descritos para las variables rendimiento, germinación y para las actividades β -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa, ya que los

conidios obtenidos de las fermentaciones en donde se implementaron los mayores tiempos de irradiación, además de presentar eficacias significativamente inferiores a la del control, también presentaron menores valores en todas las variables evaluadas (numeral 4.2.1; 4.2.2; 4.2.3). Lo anterior confirma que la viabilidad y la eficacia del hongo están directamente relacionadas con la viabilidad y la capacidad de producir las enzimas que participan en el proceso de infección.

Tabla 4-10. Actividad insecticida de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentación sólida y expuestos a choques de irradiación. La dosis utilizada corresponde a la concentración letal 90 (1×10^6 conidios/mL).

Tratamientos	Tiempo de irradiación (min)	Mortalidad (%)	Eficacia (%)
Control	0	88,45*a	86,67 a
1	5	87,86 a	86,06 a
2	10	86,67 a	84,89 a
3	15	81,67 a	79,89 a
4	30	78,15 ab	76,37 ab
5	60	67,86 b	66,08 b
6	90	59,26 b	57,26 b

*Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

El efecto de la irradiación con luz UVB sobre la eficacia de hongos entomopatógenos ha sido descrito por varios autores. Por ejemplo, Cagan y Svercel (2001) al exponer durante 15 a 60 minutos la cepa de *B. bassiana* codificada como SK99, obtuvieron en el menor tiempo una mortalidad del 100% de *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796), mientras que los conidios irradiados durante 60 minutos ocasionaron una menor mortalidad (83,6%).

Al implementar en las fermentaciones de *N. rileyi* Nm006 los choques de irradiación con luz UVB, se evidenció un efecto significativo sobre las variables eficacia, germinación y

actividades β -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa por tal razón se realizó un análisis de correlación de Pearson. En la tabla 4-11 se describen los coeficientes de correlación para cada una de las interacciones entre las variables respuestas.

Tabla 4-11. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuestas germinación, eficacia y actividades β -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentación sólida expuesta a choques de irradiación con luz UVB.

	Germinación	Eficacia	Actividad β -esterasa	Actividad N-acetilglucosaminidasa
Germinación	-----	0,8788 p = 0,0450	0,0519 p = 0,9339	0,3242 p = 0,5946
Eficacia	0,8788 p = 0,0450	-----	0,0284 p = 0,9638	0,0246 p = 0,9687
Actividad β-esterasa	0,0519 p = 0,9339	0,0284 p = 0,9638	-----	0,3900 p = 0,5163
Actividad N-acetilglucosaminidasa	0,3242 p = 0,5946	0,0246 p = 0,9687	0,3900 p = 0,5163	-----

El análisis de correlación demostró que existe una correlación positiva de 0,8788 ($p=0,0450$) entre las variables respuesta germinación y eficacia, resultado que concuerda con lo descrito cuando se implementaron los choques térmicos (numeral 4.1.4). Esta correlación concuerda con lo descrito por otros autores como Petlamul & Prasertsan (2012), Safavi et al. (2007), Talaei-Hassanloui et al. (2007), Tang & Hou (2001) y Altre et al. (1999).

En el presente estudio no se evidenció una correlación lineal entre la eficacia y la actividad β -esterasa ($r=0,0519$ $p=0,9339$) y tampoco con la actividad *N*-acetilglucosaminidasa ($r=0,3242$ $p=0,5946$), lo que sugiere que estas enzimas no tienen un efecto significativo sobre la variable actividad biológica. Aunque las lipasas y las quitinasas son importantes en el proceso de infección (Pedrini et al. 2007), es posible que

estas enzimas en *N.rileyi* no sean factores de virulencia, pero son indispensables para que el microorganismo actúe en el insecto plaga. La no correlación entre las actividades enzimáticas y la actividad biológica también ha sido descrita en *N.rileyi* (Bertholdo et al. 2003) y en otros hongos entomopatógenos como *B. bassiana* (Kaur & Padmaja 2009) y *M. anisopliaea* (Villamizar et al. 2001).

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos, para continuar con el segundo objetivo planteado, se seleccionaron los choques de irradiación con tiempos inferiores a 15 minutos, debido a que estos no afectaron de manera significativa las variables respuestas germinación, eficacia, actividad β -esterasa y actividad *N*-acetilglucosaminidasa.

4.3 Efecto de la interacción de las condiciones abióticas de estrés sobre el desempeño ecofisiológico de *N. rileyi* Nm006

Con base en los resultados obtenidos al implementar los choques térmicos y de irradiación ultravioleta durante la fermentación de *N. rileyi* Nm006 (numeral 4.1; numeral 4.2) se procedió a evaluar la interacción entre las temperaturas y los tiempos de irradiación que ocasionaron un efecto positivo sobre el hongo entomopatógeno.

Teniendo en cuenta lo anterior, las temperaturas seleccionadas fueron 5°C y 45°C con tiempos de exposición de 3, 6 y 9 horas y los tiempos de irradiación con luz UVB seleccionados fueron 5, 10 y 15 minutos. Para poder evaluar la interacción entre las variables temperatura y luz UVB se utilizó un diseño factorial multinivel con dos variables (tiempo de irradiación y duración del choque térmico) y tres niveles por variable (Bhanu Prakash et al. 2008). El diseño factorial multinivel se realizó independiente para cada temperatura. Los factores evaluados correspondieron a los tiempos de exposición a cada temperatura y los tiempos de irradiación con luz UVB. Como variables respuestas se determinó el rendimiento, la germinación, las actividades Pr1, β -esterasa, *N*-acetilglucosaminidasa y la eficacia frente a *S. frugiperda*.

Tabla 4-12. Codificación de los tratamientos del diseño factorial multinivel para determinar el efecto de la interacción entre los choques de temperatura y los choques de irradiación UVB implementados durante la fermentación de *N. rileyi* Nm006. Para cada temperatura (5°C y 45°C) se realizó el mismo diseño factorial.

Tiempo de irradiación con luz UVB (min)	Tiempo de exposición al choque de temperatura (horas)		
	3	6	9
5	A	B	C
10	D	E	F
15	G	H	I

La implementación de choques térmicos a 45°C afectó drásticamente la viabilidad de *N.rileyi* Nm006, ya que en las bandejas inoculadas con el microorganismo y expuestas a más de 6 horas a esta temperatura, no se evidenció crecimiento micelial ni esporulación. Debido a lo anterior, en los tratamientos correspondientes a los choques de estrés a 45°C durante 6 y 9 horas no fue posible recuperar biomasa viva y por lo tanto no se determinaron las variables respuestas (Tabla 4-13). Solamente en los tratamientos correspondientes a 3 horas de exposición a 45°C (tratamiento A, D y G) se realizó la separación de la biomasa mediante tamización y los conidios obtenidos fueron caracterizados microbiológica, enzimática y biológicamente (Tabla 4-13).

Los tratamientos expuestos por 3 horas a 45°C e irradiados con luz UVB mostraron una disminución de las variables respuestas a medida que aumentó el tiempo de irradiación (Tabla 4-13). Por ejemplo, el tratamiento A, que corresponde a 3 horas de exposición a 45°C y 5 minutos de irradiación con luz UVB presentó un rendimiento de $7,94 \times 10^8$ conidios/g húmedo de sustrato, una germinación del 60,42%, una actividad *N*-acetilglucosaminidasa del 6,04 UE y una actividad β -esterasa del 0,11 UE, valores que son inferiores a los obtenidos cuando los factores se evaluaron individualmente (numeral 4.1). Los tratamientos D y G presentaron un comportamiento similar, pero las respuestas disminuyeron a medida que aumentó el tiempo de irradiación con luz UVB, por ejemplo la germinación del tratamiento D (10 minutos de irradiación) fue del 35,98% y la del tratamiento G (15 minutos de irradiación) fue del 12,82%.

Tabla 4-13. Rendimiento, germinación, actividad *N*-acetilglucosaminidasa y β -esterasa y eficacia de los conidios de *N. rileyi* Nm006 provenientes de las fermentaciones expuestas a 45°.

Tratamiento	Rendimiento Conidios/g húmedo de sustrato	Germinación %	Actividad N- acetilglucosaminidasa UE	Actividad β -esterasa UE	Eficacia %
A	7,94 x 10 ⁸	60,42	6,04	0,11	77,04
B	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
C	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
D	1,81 X 10 ⁸	35,98	4,70	0,08	50,26
E	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
F	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
G	7,33 x 10 ⁷	12,82	3,83	0,06	34,96
H	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
I	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D

N.D. No determinado.

Los resultados descritos sugieren que la combinación de los choques térmicos a 45°C con los choques de irradiación con luz UVB tuvieron un efecto deletéreo sobre todas las características de *N. rileyi* Nm006, el cual aumentó a medida que se incrementó el tiempo de exposición a la temperatura y a la radiación UVB. En otros trabajos con hongos entomopatógenos se ha demostrado que el efecto negativo de las altas temperaturas depende del tiempo de exposición. Por ejemplo, Li y Feng (2009) establecieron que la exposición a 45°C durante 30 y 180 minutos ocasionaron la muerte celular de 18 cepas de *M. anisopliae*, efecto que atribuyeron a un proceso de oxidación de las proteínas de la membrana, que afectó directamente la viabilidad de los conidios.

Debido a los resultados descritos, la implementación de choques a 45°C en combinación con choques de irradiación no es viable para la fermentación de *N. rileyi* Nm006, ya que su implementación no potenció ninguna característica, por el contrario, redujo la viabilidad y eficacia del microorganismo. Además, no fue posible realizar el análisis de superficie de respuesta para ninguna de las variables respuesta, debido a que en seis tratamientos no se obtuvo esporulación. Teniendo en cuenta lo anterior, la implementación de choques a 45°C en combinación con choques de luz UVB se descartó

como una estrategia para la potenciación ecofisiológica de los conidios de *N. rileyi* Nm006.

En la tabla 4-14 se describen los resultados correspondientes al diseño factorial multinivel para los choques a la temperatura de 5°C.

Tabla 4-14. Rendimiento, germinación, actividad *N*-acetilglucosaminidasa y β -esterasa y eficacia de los conidios de *N. rileyi* Nm006 provenientes de las fermentaciones expuestas a 5°C.

Tratamiento	Rendimiento Conidios/g húmedo de sustrato	Germinación %	Actividad N- acetilglucosaminidasa UE	Actividad β -esterasa UE	Eficacia %
A	1,04 x 10 ⁹	87,05	10,90	0,73	88,00
B	1,41 x 10 ⁹	83,25	11,09	0,35	84,00
C	9,33 x 10 ⁸	87,96	6,31	0,33	92,86
D	8,48 x 10 ⁸	84,18	10,50	0,30	86,00
E	7,75 x 10 ⁸	84,79	10,84	0,28	84,00
F	5,90 x 10 ⁸	88,90	7,53	0,65	89,29
G	1,24 x 10 ⁹	82,80	10,40	0,34	88,00
H	1,20 x 10 ⁹	80,77	7,79	0,35	80,00
I	8,48 x 10 ⁸	88,77	5,05	0,35	92,86

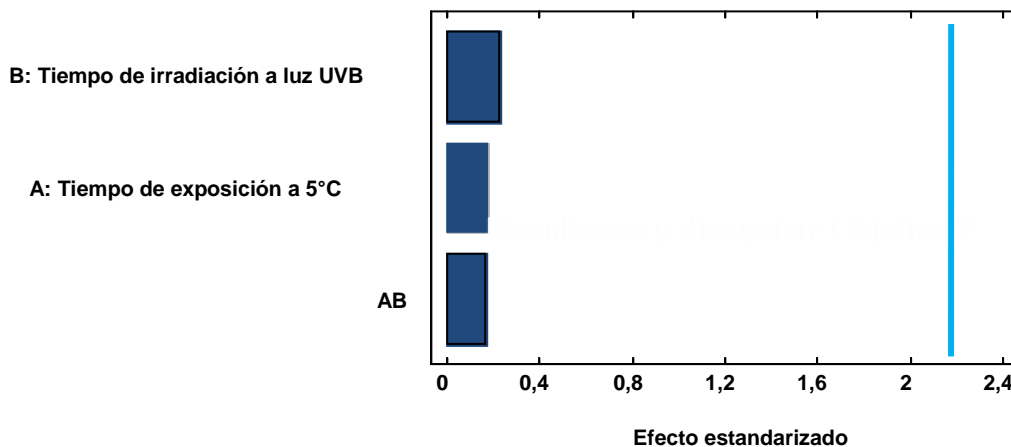
En todos los tratamientos y repeticiones se evidenció un crecimiento masivo de *N. rileyi* Nm006 sobre el sustrato de producción masiva. El rendimiento de los tratamientos osciló entre 1,41 x 10⁹ y 5,90 x 10⁸ conidios/g de sustrato húmedo (Tabla 4-14). Para los tratamientos en donde se implementaron los choques de irradiación con luz UVB durante 5, 10 y 15 minutos, los menores rendimientos se obtuvieron en los tratamientos en donde se combinó con el mayor tiempo de exposición a 5°C correspondiendo a 9 horas, tratamientos C, F e I respectivamente.

El tratamiento B correspondiente a seis horas de choque a 5°C y 5 minutos de irradiación con luz UVB, presentó el mayor rendimiento con 1,41 x 10⁹ conidios/g húmedo, y el

tratamiento F, correspondiente a 9 horas de exposición a 5°C y 10 minutos de irradiación, presentó el menor valor con $5,90 \times 10^8$ conidios/g húmedo de sustrato.

El diagrama de Pareto para esta variable respuesta (Figura 4-1) demostró que ninguno de los factores evaluados tuvo un efecto significativo ($p = 0,4267$) sobre dicha respuesta. Sin embargo, se observó una tendencia a obtener en los menores tiempos de exposición a la temperatura y a luz UVB, los mayores rendimientos. Este resultado concuerda con lo descrito por Peng y colaboradores (2010), quienes al implementar un choque de estrés térmico y oxidativo durante la fermentación de *Mortierella alpina*, evidenciaron los mejores rendimientos cuando utilizaron los menores tiempos de exposición a 5°C.

Figura 4-1. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a luz UVB sobre la variable respuesta rendimiento (conidios/g de sustrato húmedo).

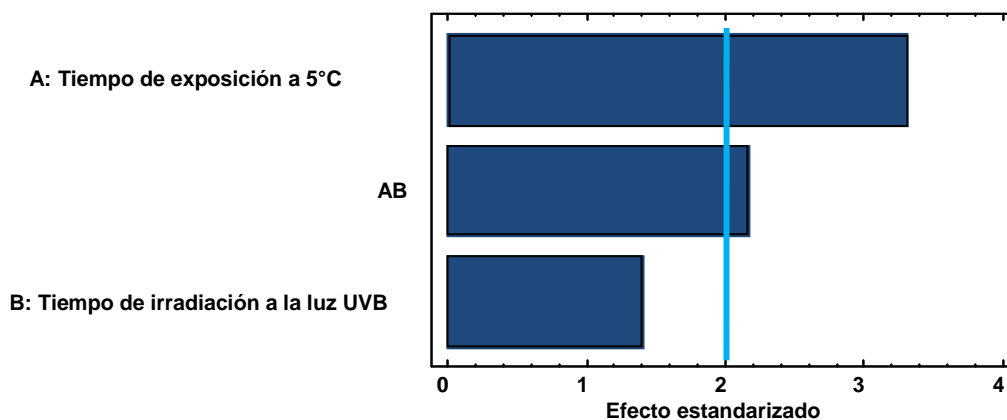


Con respecto a la variable germinación, se obtuvieron valores que oscilaron entre 80,77% y 88,90%. El tratamiento con el cual se obtuvo la mayor germinación fue el F, correspondiente a 12 horas de exposición a 5°C y 10 minutos de irradiación y el tratamiento con la menor germinación fue el H que corresponde a 12 horas de exposición a 5°C y 15 minutos de irradiación. Algo importante a resaltar es que en todos los tratamientos evaluados las germinaciones fueron superiores al límite establecido internacionalmente para esta característica, el cual corresponde al 80% (Jenkins &

Grzywacz 2000). Sin embargo no se observó una tendencia clara en los resultados numéricos, con respecto a esta variable respuesta.

El diagrama de Pareto para la variable germinación mostró que los factores que influyeron significativamente ($p= 0,0213$) sobre la respuesta fueron el tiempo de exposición al choque de 5°C, así como la interacción de los factores (Figura 4-2). El efecto de los choques de temperatura sobre la germinación de hongos entomopatógenos ha sido descrito por varios autores, como por ejemplo Devi et al. (2005), quienes evidenciaron que el cambio durante 3 horas en la temperatura de incubación, aumentó la germinación de *B. bassiana* en un 10%, lo que fue atribuido a sistemas de adaptación como las proteínas de estrés térmico (HSP).

Figura 4-2. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta germinación (%).

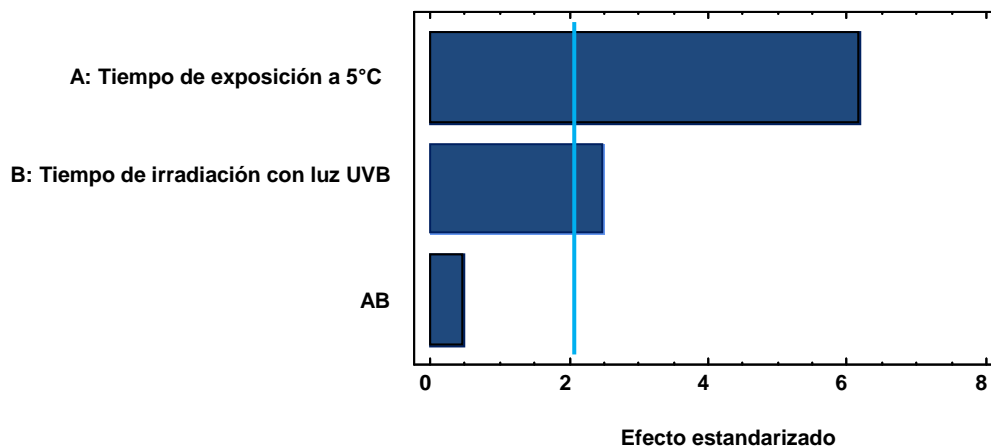


La actividad *N*-acetilglucosaminidasa osciló entre 5,05 UE y 11,09 UE, siendo la mayor actividad para el tratamiento B, que corresponde a 6 horas de exposición a 5°C y 5 minutos de irradiación con luz UVB. El tratamiento codificado como I presentó la menor actividad enzimática con un valor de 5,05 UE, tratamiento que corresponde a los mayores tiempos de exposición tanto a la temperatura como a la luz UVB. Además, se observó una tendencia en los datos, ya que las actividades enzimáticas más altas se presentaron en los tratamientos donde se implementaron los choques de temperatura y de irradiación más cortos, 3 horas y 5 minutos respectivamente, evidenciándose que a

medida que aumentó el tiempo de estrés, disminuyó la producción de la enzima *N*-acetilglucosaminidasa.

En la figura 4-3 se presenta el diagrama de Pareto en donde se muestra claramente la influencia de los factores evaluados sobre la variable respuesta actividad *N*-acetilglucosaminidasa. La mayor influencia la mostró el factor tiempo de exposición a la temperatura de 5°C, seguida del factor tiempo de irradiación con luz UVB (Figura 4-3), teniendo los dos factores un efecto significativo sobre la actividad de dicha enzima ($p = 0,0000$). Según el diagrama, la interacción de los factores no tiene un efecto significativo sobre esta variable respuesta.

Figura 4-3. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta actividad *N*-acetilglucosaminidasa (UE).

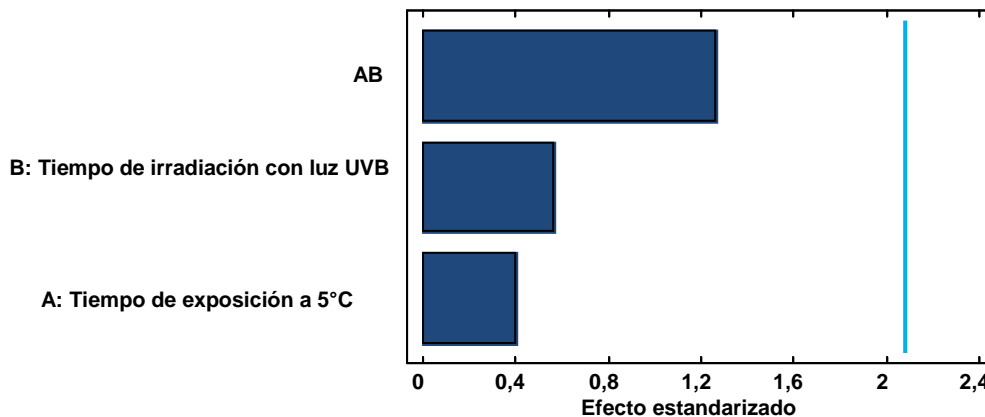


Para la variable respuesta actividad β -esterasa, el tratamiento A que corresponde a los menores tiempos de choques térmicos y de irradiación (3 horas y 5 minutos respectivamente), presentó la mayor actividad con 0,75 UE y el tratamiento E que corresponde a 6 horas de exposición a 5°C y 10 minutos de irradiación a la luz UVB, presentó la menor actividad con 0,28 UE.

El análisis estadístico muestra en el diagrama de Pareto que ninguno de los factores tuvo un efecto significativo ($p = 0,5125$) sobre la actividad β -esterasa (Figura 4-4). No obstante, todos los tratamientos presentaron actividades lipolíticas superiores comparándolas con el tratamiento control (conidios no expuestos), lo que sugiere que la exposición al estrés térmico y a la irradiación UVB indujo la producción de esta enzima.

Una alta producción y acumulación de esterases es importante en el proceso de infección, ya que como se mencionó anteriormente, dicha enzima es la responsable de degradar los ésteres grasos constituyentes importantes de la epicutícula, siendo éste el primer paso enzimático en el proceso de infección y penetración del hongo entomopatógeno sobre el insecto plaga (Villamizar & Cotes 2003; Ali *et al.* 2009a).

Figura 4-4. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta actividad β -esterasa (UE).

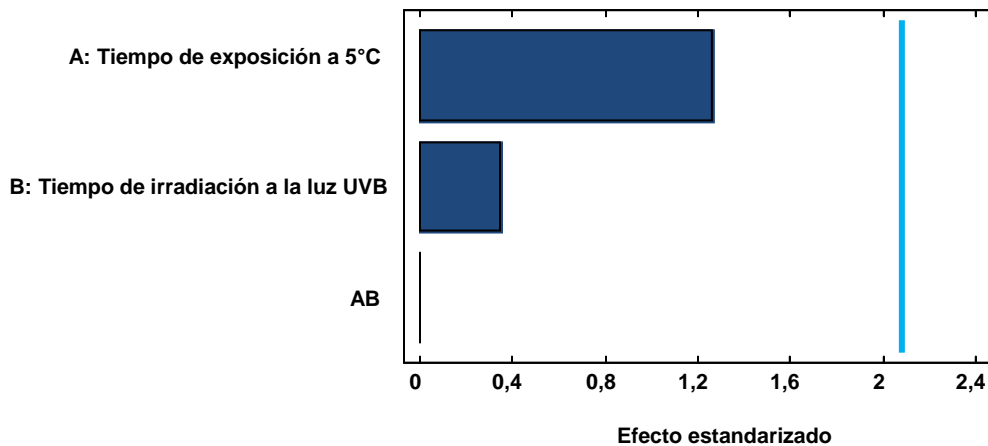


Con respecto a la variable respuesta eficacia, ésta osciló entre 80,00% y 92,86%, valores que superan el límite establecido para esta característica, el cual es del 80% (Jenkins & Grzywacz 2000; Ravensberg 2011), lo que sugiere que los conidios de todos los tratamientos tienen una adecuada actividad insecticida contra el insecto plaga *S. frugiperda*.

Cabe destacar que no se observó una tendencia en el comportamiento de esta variable con respecto a los factores evaluados, comportamiento que corresponde con el obtenido para la variable germinación (Tabla 14).

En la figura 4-5, la cual corresponde al diagrama de Pareto para la variable eficacia, se evidencia que ningún factor tuvo una influencia significativa ($p = 0,6204$) sobre la respuesta, lo que sugiere que la implementación combinada de los choques de estrés térmico y de irradiación con luz UVB no tuvo un efecto sobre la actividad insecticida de los conidios de Nm006.

Figura 4-5. Diagrama de Pareto para la influencia del tiempo de exposición a 5°C y el tiempo de irradiación a la luz UVB sobre la variable respuesta Eficacia (%).

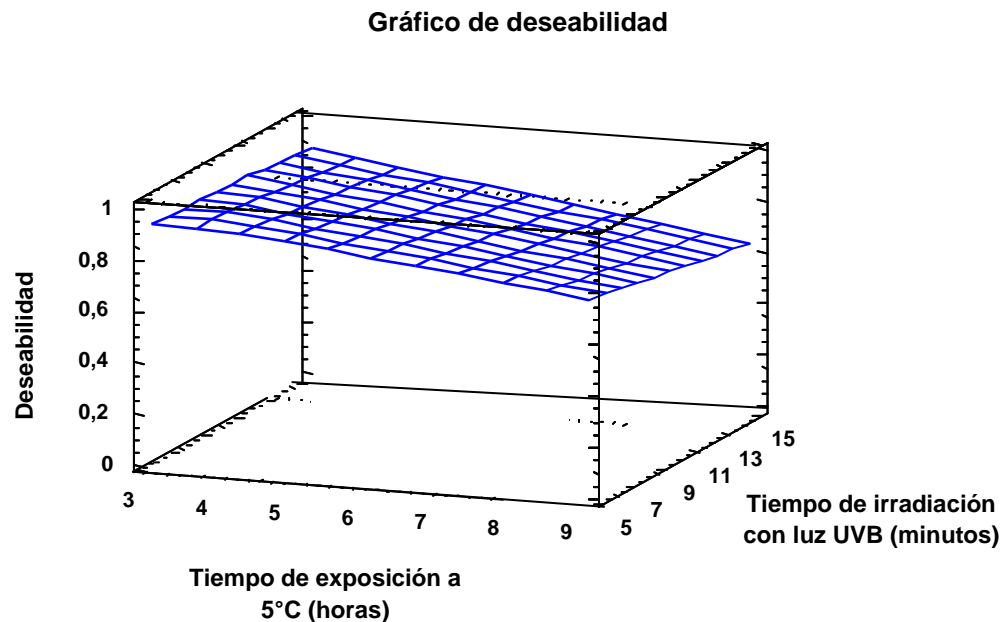


La combinación de choques de estrés térmico y de irradiación con luz UV tipo B para potenciar ecofisiológicamente cepas de hongos entomopatógenos ha sido poco estudiada. Sin embargo, la implementación combinada de otros tipos de estrés como el térmico y el oxidativo ha demostrado que los microorganismos incrementan su viabilidad y su actividad biológica (Devi et al. 2005; Rangel et al. 2008). En el presente trabajo, aunque la combinación de los dos tipos de estrés no potenció la actividad biológica de *N. rileyi* Nm006, si mejoró la viabilidad expresada como germinación, característica considerada crítica en este tipo de bioproducto (Ravensberg 2011) y que en varios

trabajo ha demostrado una correlación directa con la eficacia (Altre et al. 1999; Yeo et al. 2003; Iskandarov et al. 2006; Petlamul & Prasertsan 2012). La alta germinación beneficia el proceso de infección, ya que con una mayor velocidad de germinación hay una mayor probabilidad de infectar al insecto plaga (Altre et al. 1999).

Con el programa Statgraphics® Centurion XVI.II se interpretaron las interacciones y los efectos de los dos factores evaluados, generándose una superficie de respuesta que permite predecir la respuesta deseada expresada como deseabilidad (Figura 4-6). La optimización de la respuesta se realizó con base en las variables germinación y actividad *N*-acetilglucosaminidasa, variables en donde la interacción de factores fue significativa.

Figura 4-6. Superficie de respuesta para la deseabilidad de la respuesta al implementar choques de estrés térmico a 5°C y choques de irradiación UVB durante la fermentación de *N. rileyi* Nm006.



Teniendo en cuenta que la mejor respuesta corresponde a una deseabilidad de uno (1), se podría sugerir que para obtener las mejores características en los conidios de *N. rileyi* Nm006 (rendimiento, germinación, actividad *N*-acetilglucosaminidasa, β -esterasa y eficacia), tanto el choque térmico como el choque de irradiación UVB deben tender hacia

el nivel -1, es decir a los menores tiempos de exposición para cada factor. En ese sentido, el análisis realizado generó un modelo de predicción que estableció los valores óptimos para cada factor, que permitirían maximizar la respuesta en todas las variables. Los niveles óptimos según el modelo correspondieron a 3,45 horas de exposición a 5°C y a 5 minutos de irradiación con luz UVB (Figura 4-6) con un ajuste del 0,9324.

Establecido los niveles óptimos para cada factor de estrés se realizó la validación del punto óptimo. Para esto, se realizaron tres lotes de producción masiva de *N. rileyi* Nm006 implementando el choque térmico a 5°C durante 3,45 horas y el choque de irradiación con luz UVB durante 5 minutos. La comparación entre los valores estimados por el modelo y los valores experimentales se describen en la tabla 4-15, donde se presenta el margen de error entre el valor estimado por el modelo y los valores experimentales, el cual se calculó mediante la ecuación descrita por Sankalia et al. (2004):

$$\text{Margen de error} = \left[\left(\frac{\text{Valor estimado por modelo} - \text{Valor experimental}}{\text{Valor estimado por el modelo}} \right) \right] * 100$$

Según la predicción, la respuesta que se debía obtener al implementar los valores óptimos establecidos para cada factor de estrés, correspondían a un rendimiento de $2,05 \times 10^9$ conidios/g de sustrato húmedo, una germinación del 92,45%, una actividad *N*-acetilglucosaminidasa del 8,90 UE, una actividad β -esterasa del 0,48 y una eficacia del 92,4%. Al realizar la validación con tres lotes de producción se evidenció que los valores obtenidos no fueron significativamente diferentes de los estimados por el modelo de predicción ($p > 0,05$) (Tabla 4-15), encontrándose una alta correlación entre el valor teórico y el experimental, ya que para todas las variables respuestas el margen de error estimado fue inferior al 10% como lo establecieron Sankalia y colaboradores en 2004.

Tabla 4-15. Validación del punto óptimo establecido por el modelo de predicción para la implementación de los factores de estrés durante la producción masiva de *N. rileyi* Nm006.

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Promedio	SD	Valor estimado por el modelo	Margen de error %
Rendimiento (Conidios/g húmedo de sustrato)	1,95 x 10 ⁹	1,85x 10 ⁹	2,10 x 10 ⁹	1,97 x 10 ⁹	0,027	2,05 x 10 ⁹	3,90
Germinación (%)	90,4	93,45	92,34	92,06	1,54	92,45	0,42
Actividad N-acetilglucosaminidasa (UE)	8,92	7,45	8,46	8,27	0,75	8,90	7,07
Actividad β-esterasa (UE)	0,56	0,45	0,40	0,47	0,08	0,48	2,08
Eficacia (%)	94,86	94,86	100	96,57	2,96	92,4	4,51

Los valores experimentales obtenidos con los conidios provenientes de los tres lotes de producción en donde se implementaron los choques de estrés, se compararon con las características de los conidios provenientes de las fermentaciones sin la implementación de choques de estrés (tratamiento control), resultados que se describen en la tabla 4-16.

Tabla 4-16. Comparación entre las características de los conidios provenientes de fermentaciones con y sin implementación de choques de estrés.

Fermentación	Rendimiento (Conidios/g húmedo de sustrato)	Germinación (%)	Actividad N-acetilglucosaminidasa (UE)	Actividad β-esterasa (UE)	Eficacia (%)
Con choques de estrés	1,97 x10 ⁹ *a	92,06 a	8,27 a	0,47 a	96,57 a
Sin choques de estrés (tratamiento control)	1,48 x 10 ⁹ b	90,41 b	7,58 a	0,26 a	86,67 b

*El análisis se realizó independientemente para cada variable respuesta. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de DMS al 95%.

Los conidios provenientes de las fermentaciones en donde se implementaron los choques establecidos como óptimos presentaron valores significativamente superiores para las variables rendimiento ($F=47,4$, $gl=1$, $p=0,0023$), germinación ($F=42,5$, $gl=1$, $p=0,0035$) y eficacia ($F=33,1$, $gl=1$, $p=0,0045$), en comparación con los resultados obtenidos para el tratamiento control. Por el contrario, las actividades enzimáticas (*N*-acetilglucosaminidasa y β -esterasa) no fueron significativamente diferentes entre los dos tratamientos (Tabla 4-16).

Estos resultados confirman que la implementación combinada de los choques de estrés térmico y de luz UVB durante los tiempos estimados por el modelo de predicción, potencializaron las características rendimiento, germinación y actividad biológica de los conidios de *N. rileyi* Nm006. La mejora en estas características favorece el desarrollo tecnológico del bioplaguicida a base de este hongo entomopatógeno. En ese sentido, varios autores argumentan que un aislamiento que sea fácil de cultivar con altos rendimientos y que presente una alta viabilidad y actividad biológica, es un candidato promisorio para ser utilizado como agente de control biológico en condiciones de campo (Evans & Hywel-Jones 1997; Charnley & Collins 2007; Khachatourians & Qazi 2008; St Leger et al. 2011).

Con base en los resultados, se decidió implementar los choques de estrés térmico a 5°C durante 3,45 horas y el choque de irradiación con luz UVB durante 5 minutos en la fermentación de *N. rileyi* Nm006, con miras a la producción del principio activo de un bioplaguicida formulado como un concentrado emulsionable (CE).

4.4 Estabilidad en condiciones de almacenamiento del bioplaguicida a base de conidios de *N. rileyi* (Nm006) provenientes de fermentaciones con implementación de choques de estrés.

La potenciación ecofisiológica de los conidios de *N. rileyi* mediante el uso de factores abióticos de estrés, además de evidenciarse en las características determinadas

anteriormente (numeral 4.3), podría también expresarse en la tolerancia del microorganismo a condiciones de almacenamiento, estabilidad considerada crítica en la comercialización de bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos (Ravensberg 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, se elaboró un bioplaguicida formulado como un concentrado emulsionable (CE), utilizando como principio activo los conidios provenientes de fermentaciones en donde se implementaron los choques de estrés establecidos como óptimos. Dicho producto y el mismo bioplaguicida (CE) utilizando como principio activo los conidios provenientes de una fermentación sin implementación de choques de estrés, además de dos tratamientos controles correspondientes a conidios sin formular provenientes de fermentaciones con y sin choques de estrés, fueron utilizados en un estudio de estabilidad en almacenamiento. En la tabla 4-17 se describen los tratamientos y sus correspondientes codificaciones.

Tabla 4-17. Tratamientos evaluados en el estudio de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento.

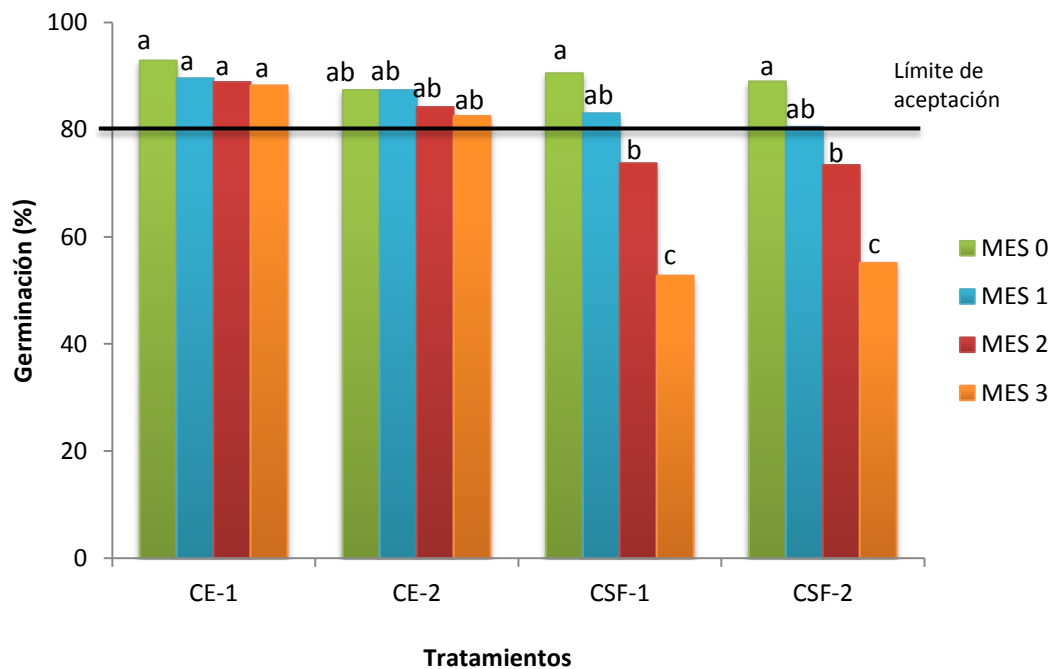
Producto	Tipo de fermentación	Tratamiento
Bioplaguicida formulado como concentrado emulsionable (CE)	Con implementación de choques de estrés	CE-1
	Sin choques de estrés	CE-2
Conidios sin Formular	Con implementación de choques de estrés	CSF-1
	Sin choques de estrés	CSF-2

A la temperatura de almacenamiento de 8°C, el bioplaguicida a base de los conidios producidos bajos choques de estrés (CE-1) presentó una germinación inicial del 92,9%, valor que después de tres meses no disminuyó significativamente. En cuanto al bioplaguicida a base de los conidios producidos sin choques de estrés (CE-2), recién manufacturado presentó una germinación del 87,3% que después de tres meses disminuyó hasta el 82,5% (Figura 4-7). Con respecto a los conidios sin formular, los

producidos bajo choques de estrés (CSF-1) presentaron una germinación inicial del 90,53% y después de tres meses de almacenamiento una germinación del 52,7%, valor significativamente inferior ($F=20,1$, $gl=15$, $p=0,0000$) al presentado inicialmente. Un comportamiento similar al de los conidios sin formular provenientes de las fermentaciones sin choques (CSF-2), ya que antes de ser almacenados presentaron una germinación del 89,0% y después de tres meses de almacenamiento presentaron una germinación significativamente inferior a la inicial (55,1%) ($F=20,1$, $gl=15$, $p=0,0000$) (Figura 4-7).

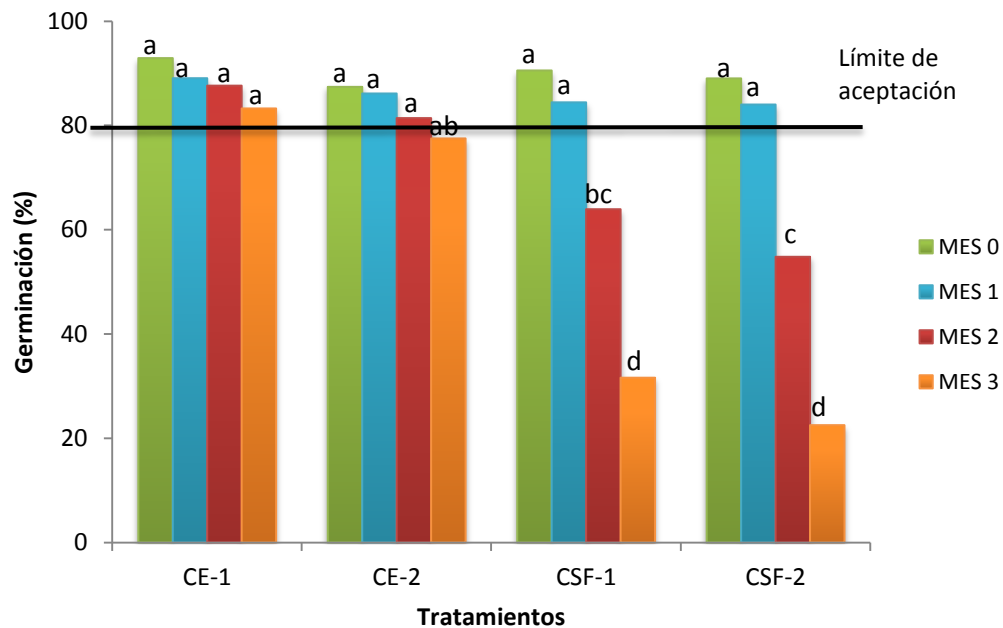
Estos resultados permiten sugerir que el almacenamiento a 8°C, no afectó la estabilidad de los bioplaguicidas a base de *N. rileyi* Nm006, independientemente del tipo de principio activo utilizado, ya que éstos no presentaron una reducción significativa en la germinación durante los tres meses de evaluación. Por el contrario, los conidios sin formular fueron inestables en el tiempo con pérdidas significativas en la viabilidad (Figura 4-7).

Figura 4-7. Estabilidad de los bioplaguicidas y conidios sin formular a base de *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentaciones con y sin choques de estrés almacenado a 8°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey al 95%.



Cuando el almacenamiento se realizó a 18°C, el bioplaguicida a base de los conidios producidos bajo choques de estrés (CE-1) presentó una germinación inicial del 92,9%, valor que no disminuyó significativamente a través del tiempo. Con respecto al bioplaguicida a base de los conidios sin choques de estrés (CE-2), este producto recién manufacturado presentó una germinación del 87,3% y después de uno, dos y tres meses de almacenamiento presentó germinaciones del 86,1%, 81,2 y del 77,5% respectivamente (Figura 4-8). Aunque la germinación obtenida después de tres meses de almacenamiento, no es significativamente inferior a la inicial, ésta sí es inferior al límite de control de calidad establecido para esta característica que es del 80% (Jenkins & Grzywacz 2000; Ravensberg 2011). Este resultado sugiere que este bioplaguicida no fue estable a esta temperatura durante el tiempo del estudio. Una germinación superior al 80%, garantiza que más del 80% de los conidios del hongo son capaces de germinar rápidamente si se encuentran en condiciones de humedad y temperatura adecuadas, lo que asegura que el producto tendrá un rápido efecto sobre la población del insecto blanco en condiciones de campo (Ravensberg 2011).

Figura 4-8. Estabilidad de los bioplaguicidas y conidios sin formular a base de *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentaciones con y sin choques de estrés almacenados a 18°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey al 95%.



A la misma temperatura de almacenamiento (18°C), los tratamientos correspondientes a los conidios sin formular presentaron una pérdida drástica en la viabilidad expresada como germinación (%). Antes del almacenamiento, los conidios sin formular obtenidos de la fermentación con implementación de choques de estrés (CSF-1) presentaron una germinación inicial del 90,5% y después de un mes de almacenamiento del 84,4%. A partir del segundo mes del estudio, se obtuvieron germinaciones significativamente inferiores ($F=20,1$, $gl=15$, $p=0,000$), con valores del 63,9% y del 31,6% en el segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente. Los conidios sin formular obtenidos de las fermentaciones sin choques de estrés (CSF-2) presentaron un comportamiento similar, pero la pérdida de la viabilidad fue más drástica, con una germinación inicial del 89,0% y del 22,5% después de tres meses de almacenamiento (Figura 4-8).

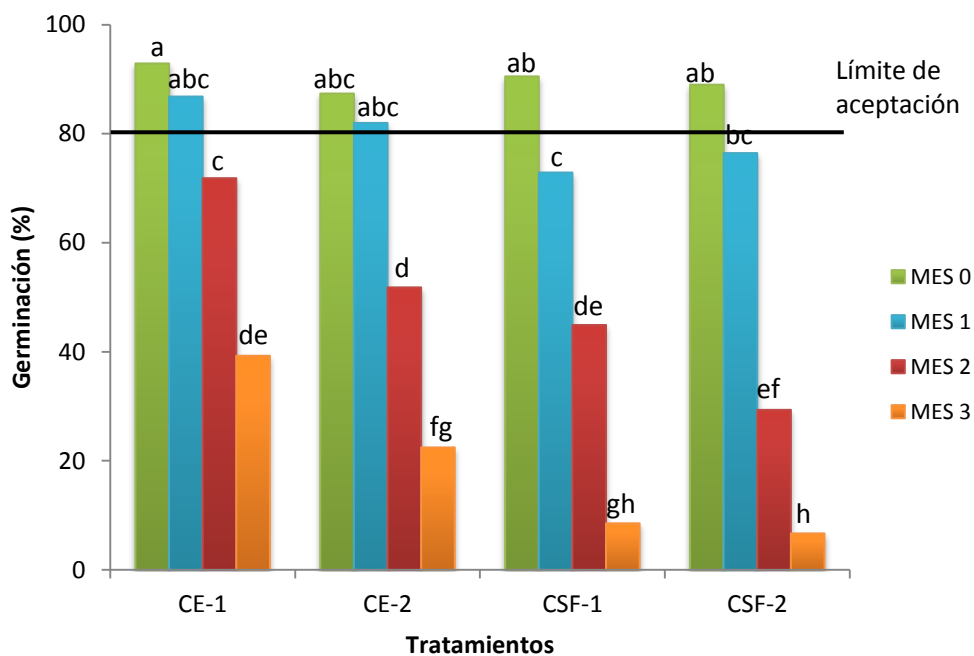
A 28°C se observó para todos los tratamientos un descenso en la capacidad de germinación del principio activo (Figura 4-9). Por ejemplo, el bioplaguicida a base de conidios producidos en la fermentación con choques de estrés (CE-1) presentó una germinación inicial del 92,9%, la cual disminuyó significativamente a partir del segundo mes de almacenamiento ($F=103$, $gl=15$, $p=0,0000$), llegando al 71,8%, y descendiendo después de tres hasta el 39,3%, valor significativamente inferior en comparación con el inicial.

El bioplaguicida a base de los conidios producidos sin choques de estrés (CE-2), recién manufacturado presentó una germinación del 87,3%, característica que también disminuyó significativamente a partir del segundo mes de almacenamiento, presentando al final del estudio una germinación del 22,4%, valor significativamente inferior al inicial. En el caso de los tratamientos controles (conidios sin formular), éstos presentaron pérdidas significativas en la germinación a partir del primer mes de almacenamiento (Figura 4-9), siendo éstas estadísticamente superiores a las presentadas por sus respectivos productos formulados, lo que evidencia un efecto positivo de la formulación.

Los conidios sin formular obtenidos de la fermentación con choques (CSF-1) presentaron una germinación inicial del 90,5% y del 72,9%, 44,9% y del 8,55% durante el primero, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente. Los conidios sin formular

producidos sin choques de estrés (CSF-2) presentaron una germinación del 89,0% antes del almacenamiento, la cual disminuyó progresivamente hasta valores del 76,5%, 29,4% y 6,7% en el primer, segundo y tercer mes de almacenamiento (Figura 4-9).

Figura 4-9. Estabilidad de los bioplaguicidas y conidios sin formular a base de *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentaciones con y sin choques de estrés almacenados a 28°C. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey al 95%.



Para todos los tratamientos se evidenció que a medida que aumentó la temperatura y el tiempo de almacenamiento disminuyó la capacidad de germinación, lo que sugiere que los dos factores son críticos en la estabilidad del microorganismo, comportamiento que ha sido descrito para diferentes agentes de control biológico (Lawrie et al. 2001; Costa et al. 2002; Kinay & Yildiz 2008; Chen et al. 2008; Santos et al. 2012). Este efecto negativo de las altas temperaturas sobre la viabilidad de los microorganismos durante el almacenamiento podría deberse a que a mayor temperatura existe una mayor reactividad de las moléculas, presentándose reacciones o procesos de degradación de los auxiliares de formulación, cuyos productos pueden ser tóxicos para el principio activo (Chen et al. 2008). De igual manera, el metabolismo celular puede permanecer activo a una temperatura alta, lo que causa que los conidios almacenen metabolitos tóxicos que reducen drásticamente la viabilidad (Lawrie et al. 2001).

Por ejemplo en el estudio de Shabana et al. (2003) donde se evaluó la viabilidad de un bioherbicida a base de *Fusarium oxysporum* durante 12 meses de almacenamiento a 3°C y 25°C, se presentó una reducción de la viabilidad del 7% y del 45% para cada temperatura respectivamente. Los autores atribuyeron este resultado a que en la temperatura de 25°C, el metabolismo celular del microorganismo pudo estar activo. De igual manera, Fernández y colaboradores (2012) evidenciaron que los conidios de *Trichoderma harzianum* almacenados a 4°C y 25°C, presentaron una disminución significativa de la viabilidad cuando fueron almacenados a 25°C. Resultados similares obtuvieron Abadias et al. (2003), al evaluar la viabilidad de la levadura *Candida sake* a dos temperaturas (4°C y 25°C) observando que la viabilidad fue más estable cuando el almacenamiento se realizó a la menor temperatura (4°C). De igual manera, los autores observaron que el número de células viables disminuyó rápidamente a partir del décimo día de almacenamiento a la mayor temperatura (25°C).

En el presente trabajo también se evidenció el efecto positivo de la formulación sobre los conidios sin formular, ya que en todas las temperaturas los conidios sin formular presentaron una mayor reducción en la viabilidad en comparación con los conidios formulados, independientemente del tipo de fermentación implementada (con o sin choques). Por ejemplo, los conidios sin formular producidos bajo choques de estrés presentaron después de tres meses, una reducción de la viabilidad del 38,2%, 74,2% y del 92,1% a las temperaturas de 8°C, 18°C y 28°C respectivamente. Mientras que a las mismas temperaturas, el bioplaguicida formulado con los conidios producidos bajo choques de estrés presentó una reducciones del 5,4%, 10,8% y 58,1% después de tres meses a las mismas temperaturas. Estos resultados permiten sugerir que el proceso de manufactura y los excipientes de formulación no afectaron la fisiología del microorganismo y por el contrario le confirieron estabilidad bajo las condiciones de estrés que genera el almacenamiento.

El efecto positivo de la formulación sobre agentes de control biológico ha sido descrito por diferentes autores, como Santos y colaboradores (2012), quienes evaluaron la estabilidad de los conidios sin formular y de dos formulaciones a base de *T. koningiopsis* y *T. asperellum* almacenados a 8°C, 18°C y 28°C durante 18 meses. Los autores

observaron un efecto protector de las formulaciones sobre los conidios, ya que la vida útil de los conidios sin formular fue inferior a la de los conidios formulados en todas las temperaturas evaluadas. Los autores atribuyeron este efecto a la selección adecuada de los excipientes utilizados en las formulaciones. Melin et al. (2006) evaluaron la viabilidad y la concentración de formulados líquidos a base de la levadura *Pichia anomala*, almacenados a diferentes temperaturas y a los cuales se les incorporaron sustancias protectoras de la desecación. En este trabajo la formulación presentó entre un 75% y un 90% de viabilidad después de 4 semanas de almacenamiento a 4°C y 10°C, respectivamente. Sin embargo, la incorporación de lactosa o trehalosa aumentó la viabilidad después de 12 semanas de almacenamiento en todas las temperaturas evaluadas (-20°C a 30°C), efecto que posiblemente se debió a que estas sustancias estabilizaron las proteínas y los lípidos de la membrana celular aumentando la viabilidad del microorganismo.

El efecto de los choques de estrés sobre la estabilidad del bioplaguicida y de los conidios sin formular de *N. rileyi* Nm006 fue positivo, ya que los dos tratamientos presentaron una menor reducción de la viabilidad en todas las temperaturas, en comparación con los tratamientos en donde no se implementaron los choques de estrés. Cabe destacar que el bioplaguicida a base de los conidios producidos bajo condiciones de estrés fue estable durante los tres meses del estudio a las temperaturas de 8°C y 18°C, ya que no presentó una disminución significativa en la viabilidad y los valores de germinación fueron superiores al límite de aceptación establecido en el control de calidad del bioproducto para esta característica. Por el contrario, el bioplaguicida a base de los conidios provenientes de la fermentación convencional sin choques, solamente fue estable por tres meses a 8°C, no presentando una reducción significativa en la germinación y manteniendo esta característica por encima del límite del 80% (Jenkins & Grzywacz 2000). Este resultado sugiere que la implementación de choques de estrés durante el proceso de fermentación de *N. rileyi* mejoró la estabilidad en condiciones de almacenamiento, aumentando la vida útil del bioplaguicida a por lo menos tres meses de almacenamiento a 18°C.

Con respecto a la estabilidad de la variable actividad biológica expresada como eficacia, los resultados se describen en la tabla 4-18.

Tabla 4-18. Estabilidad de la eficacia (%) de los bioplaguicidas y los conidios sin formular de *N. rileyi* almacenados durante 3 meses a 8°C, 18°C y 28°C.

Temperatura de almacenamiento (°C)	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (meses)	
		0	3
8°C	CE-1	100 *a	100 a
	CE-2	94,1 a	100 a
	CSF-1	96,4 a	100 a
	CSF-2	100 a	80,9 b
18°C	CE-1	100* a	100 a
	CE-2	94,1 a	100 a
	CSF-1	96,4 a	82,1 b
	CSF-2	100 a	60,7 c
28°C	CE-1	100 *a	89,9 a
	CE-2	94,1 a	78,6 b
	CSF-1	96,4 a	53,6 c
	CSF-2	100 a	35,7 d

*El análisis estadístico se realizó independientemente para cada temperatura de almacenamiento. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey al 95%.

Los bioplaguicida formulados a base de los conidios con y sin choques de estrés fueron estables después de tres meses de almacenamiento a 8°C, ya que no presentaron una pérdida significativa de la actividad insecticida. En el caso de los conidios sin formular, los provenientes de fermentaciones con implementación de choques de estrés presentaron una eficacia inicial del 96,4% que no disminuyó significativamente a través del tiempo, mientras que los conidios producidos sin choques de estrés mostraron una disminución significativa de la eficacia ($F=2,66$, $gl=7$, $p=0,0490$) después de tres meses de almacenamiento (Tabla 4-18).

Cuando los tratamientos se almacenaron a 18°C, solamente los bioplaguicidas formulados (CE-1 y CE-2) fueron estables en el tiempo, ya que no presentaron una disminución significativa de la eficacia. Los dos tratamientos correspondientes a los conidios sin formular si evidenciaron en efecto negativo del almacenamiento con una reducción significativa en la actividad biológica ($F=40,1$, $gl=7$, $p=0,0000$). En ese sentido,

los conidios producidos con choques térmicos presentaron una reducción de la eficacia del 14,3% y los conidios provenientes de fermentaciones sin choques de estrés presentaron una reducción más drástica correspondiente al 39,3%.

A 28°C, se evidenció para todos los tratamientos una disminución en la actividad biológica, siendo mayor la pérdida en los conidios sin formular al igual que se observó con las demás temperaturas de almacenamiento. El único tratamiento que no presentó una reducción significativa de la eficacia fue el bioplaguicida formulado a base de los conidios provenientes de fermentaciones con choques de estrés (CE-1), con una reducción del 10,1% de la eficacia después de los tres meses de almacenamiento. Por el contrario, el bioplaguicida formulado a base de los conidios sin choques de estrés (CE-2), presentó una disminución significativa en la actividad biológica (15,5%) con una eficacia final del 78,6%, que indica que este producto no fue estable bajo estas condiciones de almacenamiento.

Los dos tratamientos correspondientes a los conidios sin formular (CSF-1 y CSF-2) no fueron estables después de tres meses de almacenamiento a 28°C, ya que presentaron eficacias finales significativamente inferiores a las iniciales ($F=29,1$, $gl=7$, $p=0,000$) (Tabla 4-18).

Los resultados de actividad biológica permitieron evidenciar que a medida que aumentó la temperatura y el tiempo de almacenamiento, disminuyó la eficacia de los conidios de *N. rileyi* Nm006. El efecto que ejerce la temperatura de almacenamiento sobre la actividad biocontroladora, está directamente relacionado con la pérdida de viabilidad del principio activo, ya que a temperaturas altas el metabolismo celular del principio activo se activa, dando como resultado la disminución de la viabilidad, el agotamiento nutrientes y la producción de metabolitos tóxicos para la célula (Sabaratnam & Traquair 2002).

Un ejemplo de lo anterior es el estudio realizado por Chen et al. (2008), quienes evaluaron la estabilidad de un bioinsecticida a base de *Lecanicillium lecanii* bajo condiciones de almacenamiento durante seis meses. Los autores observaron una disminución en la infección sobre *Trialeurodes vaporariorum*, pasando del 86,3% al

55,4% después de seis meses de almacenamiento a 35°C. Estos resultados se atribuyeron a la drástica disminución en la viabilidad de los conidios, evidenciándose a dicha temperatura que la germinación disminuyó drásticamente, a diferencia de los productos almacenados a temperaturas inferiores a 15°C. En otro estudio, Li y Tian (2006), evidenciaron que las células de *Cryptococcus laurentii* almacenadas a 4°C redujeron la incidencia y el diámetro de lesión causadas por *Penicillium expansum* en frutos de manzana infectados, a diferencia de las células de la levadura almacenadas a 25°C con las se obtuvieron valores mayores de incidencia y diámetro de lesión, concluyendo que a mayor temperatura de almacenamiento, menor estabilidad de la actividad antagonista del microorganismo biocontrolador.

En el presente trabajo, el bioplaguicida a base de los conidios provenientes de las fermentaciones con choques de estrés fue estable biológicamente durante los tres meses del estudio a las tres temperaturas evaluadas (8°C, 18°C y 28°C), ya que no presentó una pérdida significativa en la eficacia y ésta se mantuvo en niveles superiores al 80%, considerado como el límite de aceptación para esta característica (Jenkins & Grzywacz 2000). Por el contrario, el bioplaguicida en donde el principio activo fueron los conidios sin choques de estrés, solamente fue estable a las temperaturas de 8°C y 18°C, ya que a 28°C presentó una reducción significativa de la eficacia y ésta se redujo a valores por debajo del 80%. Este resultado permite sugerir que los choques de estrés tuvieron un efecto positivo sobre la estabilidad biológica de los conidios de *N. rileyi* Nm006, resultados que concuerdan con lo descrito en el estudio de estabilidad de la germinación.

El bioplaguicida a base de los conidios provenientes de las fermentaciones con implementación de choques de estrés (CE-1) fue estable durante tres meses de almacenamiento a temperaturas de 8°C y 18°C, mientras que el bioplaguicida convencional a base de los conidios sin choques de estrés (CE-2) solamente cumplió con los estándares de calidad de germinación y de eficacia cuando fue almacenado a 8°C. La implementación de los choques combinados de temperatura y de luz UVB desarrollados en el presente trabajo, permitieron producir conidios más tolerantes a las condiciones de almacenamiento, lo cual es una ventaja tecnológica, ya que el bioplaguicida optimizado podría ser almacenado por lo menos durante tres meses a temperaturas inferiores a

18°C sin utilizar cadena de frío, que aumenta considerablemente los costos durante la comercialización.

A nivel mundial no se encuentra registrados productos a base de *N. rileyi* (Devi & Prasad 2001; Copping 2009; EPA 2012), debido a las dificultades para la producción masiva y a la baja tolerancia de sus conidios a las condiciones drásticas del almacenamiento. Sin embargo, la potenciación ecofisiológica lograda con las condiciones de estrés establecidas en el presente trabajo es una nueva herramienta que puede ser implementada en el proceso de manufactura en planta, con miras a producir un bioplaguicida de mayor calidad y con un alto potencial para ser registrado y comercializado para el control del gusano cogollero del maíz *S. frugiperda*.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La implementación de choques térmicos a 5°C y 45°C durante la fermentación de *N. rileyi* Nm006 influyó positivamente la germinación y la actividad β -esterasa de los conidios de *N. rileyi* Nm006.

Los choques de estrés con luz ultravioleta tipo B, implementados durante un máximo de 5 minutos, mejoraron la germinación, la eficacia, la actividad β -esterasa y la actividad *N*-acetilglucosaminidasa de los conidios de *N. rileyi* Nm006.

Un choque térmico a 5°C durante 3,45 horas y un choque de irradiación con luz UVB durante 5 minutos fueron seleccionados para ser implementados de forma combinada en la fermentación de *N. rileyi* Nm006, por potenciar las variables rendimiento, germinación y eficacia.

La interacción entre los factores de estrés seleccionado (temperatura y luz UVB) mejoró la esporulación (rendimiento) y permitió obtener un principio activo más tolerante a las condiciones de almacenamiento.

El bioplaguicida a base de conidios de *N. rileyi* Nm006 producidos bajo las condiciones de estrés seleccionadas en el presente trabajo puede ser almacenado al menos durante tres meses a 18°C, manteniendo estables sus características microbiológicas y biológicas; siendo más estable en comparación con el bioplaguicida convencional.

5.2 Recomendaciones

Implementar la combinación de choques térmicos y de luz ultravioleta seleccionados en la producción masiva de *N. rileyi* Nm006.

Continuar con el estudio de estabilidad en almacenamiento por lo menos durante 12 meses, para determinar la vida útil real del bioplaguicida a las tres temperaturas evaluadas.

Determinar la eficacia en condiciones de campo del bioplaguicida a base de los conidios de *N. rileyi* Nm006 producidos bajo los choques de estrés.

Realizar estudios de factibilidad económica para la producción del bioplaguicida a base de *N. rileyi* Nm006.

Integrar el uso del bioplaguicida a base de *N. rileyi* en un Programa de Manejo Integrado de *Spodoptera frugiperda*.

A. Anexo: Medios de cultivo

Para preparar Un (1) litro

AGAR YM (Extracto de Malta + Extracto de levadura):

Extracto de Malta: 3 g.

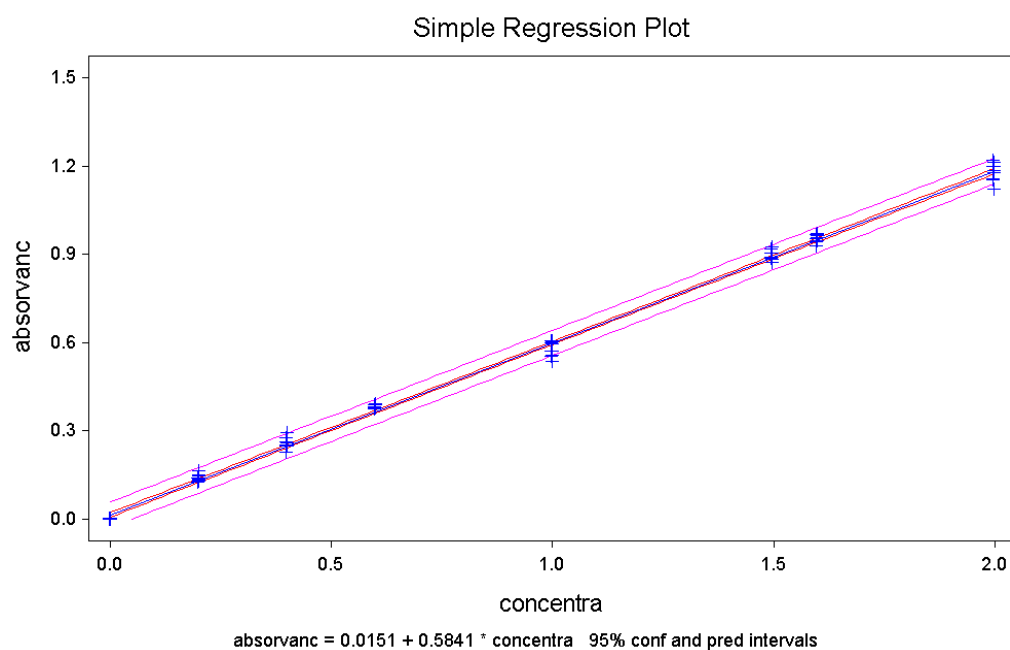
Peptona: 3 g.

Agar: 18 g

B. Anexo: Curvas de calibración enzimática

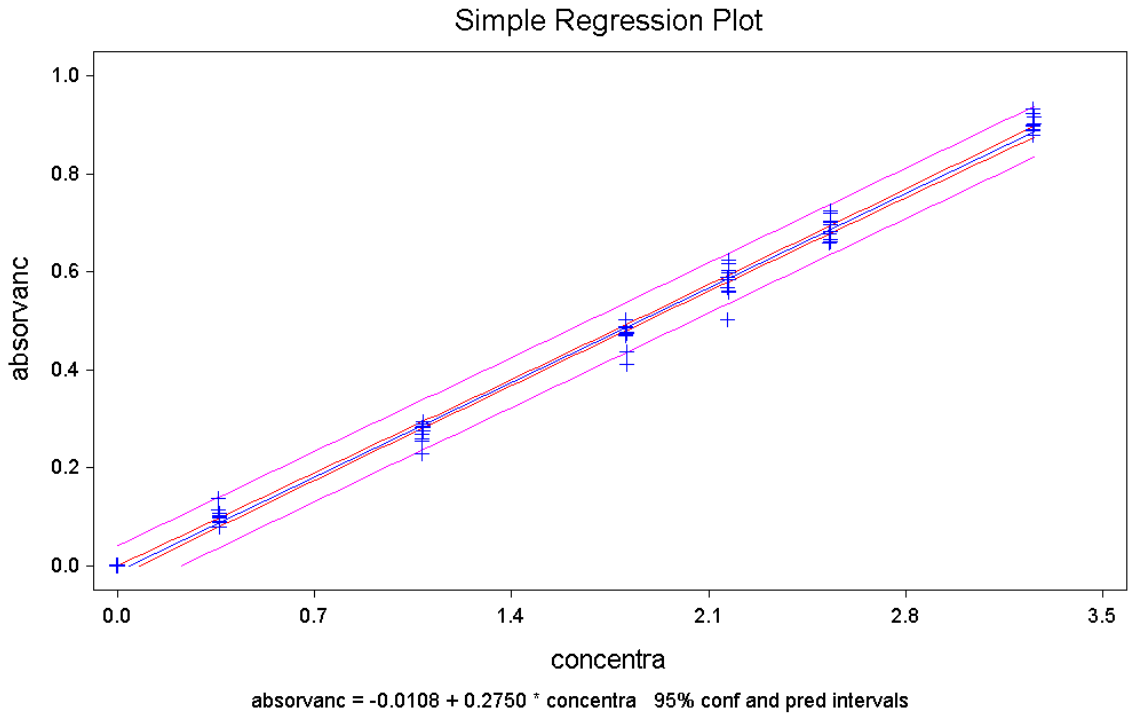
Curva de calibración *p*-nitrofenol.

Concentración (mmoles/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	Curva 8	Curva 9	Curva 10
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1998	0.1305	0.161	0.148	0.1325	0.131	0.1255	0.132	0.1355	0.1485	0.136
0.3996	0.2525	0.2515	0.2775	0.293	0.247	0.248	0.2575	0.2585	0.224	0.2475
0.5995	0.3775	0.3865	0.3855	0.377	0.3795	0.37	0.3755	0.3865	0.394	0.376
0.9999	0.568	0.6045	0.5495	0.5535	0.597	0.572	0.598	0.531	0.603	0.605
1.4952	0.902	0.9	0.902	0.92	0.915	0.882	0.87	0.902	0.8885	0.881
1.5987	0.9525	0.9625	0.959	0.968	0.9715	0.939	0.9415	0.929	0.9695	0.957
1.9984	1.1495	1.196	1.178	1.22	1.1985	1.208	1.181	1.1525	1.1185	1.1515



Curva de calibración *p*-nitroanilida

Concentración (mmoles/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	Curva 7	Curva 8	Curva 9	Curva 10
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.362	0.098	0.0775	0.1355	0.096	0.0995	0.0885	0.112	0.0995	0.0895	0.1085
1.086	0.259	0.28	0.2885	0.2765	0.282	0.2675	0.295	0.227	0.252	0.282
1.810	0.467	0.436	0.411	0.4765	0.473	0.4745	0.4865	0.4875	0.4845	0.5005
2.172	0.586	0.581	0.5015	0.615	0.597	0.561	0.565	0.622	0.5555	0.603
2.534	0.675	0.656	0.659	0.7035	0.666	0.699	0.6805	0.7175	0.695	0.724
3.258	0.8895	0.921	0.895	0.9155	0.885	0.8775	0.9195	0.8995	0.9325	0.8985



C. Anexo. Análisis estadísticos

OBJETIVO 1 – CHOQUES DE TEMPERATURA

Variable rendimiento

Anova

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	0.00323	0.00081	0.08	0.9861
Within	10	0.09853	0.00985		
Total	14	0.10177			

Grand Mean 9.2144 CV 1.08

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	5.73	4	0.2204
Cochran's Q	0.4171		
Largest Var / Smallest Var	108.14		

Component of variance for between groups -0.00302
Effective cell size 3.0

Variable Mean

C15 9.2387

C35 9.2199

C45 9.2100

C5 9.2091

sin 9.1942

Observations per Mean 3

Standard Error of a Mean 0.0573

Std Error (Diff of 2 Means) 0.0810

Variable germinación

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	474.139	118.535	12.0	0.0008
Within	10	99.106	9.911		
Total	14	573.244			

Grand Mean 80.753 CV 3.90
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 3.90 4 0.4200
 Cochran's Q 0.4690
 Largest Var / Smallest Var 35.886

Component of variance for between groups 36.2080
 Effective cell size 3.0

Variable Mean
 C15 75.397
 C35 72.797
 C45 86.590
 C5 83.067
 sin 85.913
 Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 1.8176

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable Mean Homogeneous Groups
 C45 86.590 A
 sin 85.913 A
 C5 83.067 AB
 C15 75.397 BC
 C35 72.797 C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.5704
 Critical Q Value 4.655 Critical Value for Comparison 8.4602
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Variable N-acetilglucosaminidasa

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	8.0313	2.00781	2.65	0.0571
Within	25	18.9561	0.75824		
Total	29	26.9873			

Grand Mean 4.3423 CV 20.05
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 13.2 4 0.0103
 Cochran's Q 0.5794
 Largest Var / Smallest Var 19.786

Component of variance for between groups 0.20826
 Effective cell size 6.0

Variable Mean
 C15 5.1500
 C35 4.2933
 C45 4.1483
 C5 3.5667
 Sin 4.5533
 Observations per Mean 6
 Standard Error of a Mean 0.3555
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.5027

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable Mean Homogeneous Groups
 C15 5.1513 A
 sin 4.5533 AB
 C35 4.2940 AB
 C45 4.1478 AB
 C5 3.5647 B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.5028
 Critical Q Value 4.154 Critical Value for Comparison 1.4768
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Variable β -esterasa

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	0.68430	0.17107	9.54	0.0001
Within	25	0.44832	0.01793		
Total	29	1.13262			

Grand Mean 0.3883 CV 34.48
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 10.1 4 0.0395
 Cochran's Q 0.6045
 Largest Var / Smallest Var 17.062

Component of variance for between groups 0.02552
 Effective cell size 6.0

Variable Mean
 C15 0.4550
 C35 0.6100

C45 0.4083
 C5 0.3133
 Sin 0.1550
 Observations per Mean 6
 Standard Error of a Mean 0.0547
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.0773

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable	Mean	Homogeneous Groups
C35	0.6100	A
C15	0.4550	AB
C45	0.4083	AB
C5	0.3133	BC
Sin	0.1550	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0773
 Critical Q Value 4.154 Critical Value for Comparison 0.2271
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Variable Actividad Biológica

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	4	3217.67	804.419	14.0	0.0004
Within	10	575.76	57.576		
Total	14	3793.44			

Grand Mean 71.526 CV 10.61

At least one group variance is near zero,
 variance-equality tests cannot be computed.

Component of variance for between groups 248.947
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean
T5	81.040
Tcontrol	86.670
t15	56.363
t35	51.323
t45	82.233

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 4.3809
 Std Error (Diff of 2 Means) 6.1955

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable	Mean	Homogeneous Groups
SC	88.453	A
T45	84.603	AB
T5	76.903	AB
T15	62.177	AB
T35	57.810	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 8.5234
 Critical Q Value 4.655 Critical Value for Comparison 28.054
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

OBJETIVO 1 – CHOQUES CON LUZ ULTRAVIOLETA

Variable rendimiento

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	1.78089	0.29681	17.9	0.0000
Within	14	0.23202	0.01657		
Total	20	2.01290			

Grand Mean 8.7988 CV 1.46
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 9.76 6 0.1352
 Cochran's Q 0.4873
 Largest Var / Smallest Var 235.21

Component of variance for between groups 0.09341
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean
CC	9.1671
T10	8.9566
T15	8.9628
T30	8.6665
T5	9.0460
T60	8.4374
T90	8.3551

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 0.0743
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1051

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable Mean Homogeneous Groups

CC	9.1671	A
T5	9.0460	A
T15	8.9628	AB
T10	8.9566	AB
T30	8.6665	BC
T60	8.4374	C
T90	8.3551	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1051
 Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 0.3591
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Variable germinación

ANOVA

Between	3	636.389	212.130	15.7	0.0010
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	526.126	87.6877	8.17	0.0006
Within	14	150.179	10.7270		
Total	20	676.305			

Grand Mean 86.019 CV 3.81
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 2.76 6 0.8380
 Cochran's Q 0.3702
 Largest Var / Smallest Var 8.4252

Component of variance for between groups 25.6536
 Effective cell size 3.0

Variable Mean

C	91.727
T10	88.000
T15	85.627
T30	86.490
T5	89.733
T60	85.697
T90	74.857

Observations per Mean 3
 Standard Error of a Mean 1.8909
 Std Error (Diff of 2 Means) 2.6742

 PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable	Mean	Homogeneous Groups
C	91.727	A
T5	89.733	A
T10	88.000	A
T30	86.490	A
T60	85.697	A
T15	85.627	A
T90	74.857	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.6742
 Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 9.1364
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

Variable N-acetilglucosaminidasa

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	3.02575	0.50429	6.28	0.0001
Within	35	2.80950	0.08027		
Total	41	5.83525			

Grand Mean 0.4448 CV 63.70
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 22.6 6 0.0010
 Cochran's Q 0.3195
 Largest Var / Smallest Var 36.005

Component of variance for between groups 0.07067
 Effective cell size 6.0

Variable	Mean
control	0.2583
t10	0.4950
t15	0.1133
t30	0.6267
t5	0.9567
t60	0.1967
t90	0.4667

Observations per Mean 6
 Standard Error of a Mean 0.1157
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.1636

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable	Mean	Homogeneous Groups
t5	0.9567	A
t30	0.6267	AB
t10	0.4950	ABC
t90	0.4667	ABC
control	0.2583	BC
t60	0.1967	BC
t15	0.1133	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1636
 Critical Q Value 4.421 Critical Value for Comparison 0.5113
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Variable β -esterasa

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	110.659	18.4432	15.7	0.0000
Within	35	41.081	1.1737		
Total	41	151.740			

Grand Mean 6.0455 CV 17.92
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 19.7 6 0.0032
 Cochran's Q 0.3444
 Largest Var / Smallest Var 35.501

Component of variance for between groups 2.87825
 Effective cell size 6.0

Variable	Mean
control	7.5883
t10	7.0083
t15	5.5067
t30	5.0050
t5	8.7317
t60	4.3433
t90	4.1350

Observations per Mean 6
 Standard Error of a Mean 0.4423
 Std Error (Diff of 2 Means) 0.6255

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable Mean Homogeneous Groups

t5	0.9567	A
t30	0.6267	AB
t10	0.4950	ABC
t90	0.4667	ABC
control	0.2583	BC
t60	0.1967	BC
t15	0.1133	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.1636
 Critical Q Value 4.421 Critical Value for Comparison 0.5113
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another

Variable Actividad Biológica

ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	6	2240.66	373.443	6.28	0.0022
Within	14	832.70	59.478		
Total	20	3073.36			

Grand Mean 78.560 CV 9.82
 Chi-Sq DF P
 Bartlett's Test of Equal Variances 45.1 6 0.0000
 Cochran's Q 0.8270
 Largest Var / Smallest Var 2.582E+06

Component of variance for between groups 104.655
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean
control	88.457
t10	86.670
t15	81.667
t30	78.150
t5	87.857
t60	67.857
t90	59.263
Observations per Mean	3
Standard Error of a Mean	4.4527
Std Error (Diff of 2 Means)	6.2970

PRUEBA DE COMPARACIÓN DE TUKEY

Variable Mean Homogeneous Groups

control	88.457	A
t5	87.857	A
t10	86.670	A
t15	81.667	A
t30	78.150	AB
t60	67.857	AB
t90	59.263	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 6.2970
 Critical Q Value 4.832 Critical Value for Comparison 21.514
 There are 2 groups (A and B) in which the means
 are not significantly different from one another.

OBJETIVO 2 – DISEÑO FACTORIAL MULTINIVEL**ANÁLISIS DE SUPERFICIE DE RESPUESTA**

Paso 1: Definir las variables respuesta a ser medidas

Nombre	Unidades	Analizar	Objetivo	Destino	Impacto
Rendimiento	Log Conidios/g húmedo de sustrat	Media	Maximizar		3,0
Germinación	%	Media	Maximizar		3,0
Act acetilglucosaminidasa	n UE	Media	Maximizar		3,0
Act b esterasa	UE	Media	Maximizar		3,0
Mortalidad	%	Media	Maximizar		3,0
Eficacia	%	Media	Maximizar		3,0

Sensibilidad	Bajo	Alto
Medio	0,0	10,0
Medio	0,0	100,0
Medio	0,0	11,0
Medio	0,0	1,0
Medio	0,0	100,0
Medio	0,0	100,0

Paso 2: Definir los factores experimentales que van a variar

Nombre	Unidades	Tipo	Papel	Bajo	Alto	Niveles
A:Tiempo de choque a 5°C	Horas	Continuo	Controlable	3,0	9,0	
B:Tiempo de choque a UVB	Minutos	Continuo	Controlable	5,0	15,0	

Paso 3: Seleccione el diseño experimental

Tipo of	Diseño	Puntos Centrales	Punto Central	Diseño es	Número de
Factores	Tipo	Por Bloque	Colocación	Aleatorizado	Replicaciones
Proceso	Factorial de 3 niveles: 3 ²	0	Espaciado	No	2

Total Ejecuciones	Total Bloques	Error D.F.
27	3	19

Número de muestras por ejecución: 1

Paso 4: Indicar el modelo inicial a ajustar a los resultados del experimento

Factores	Modeo	Coficientes	Efectos excluidos
Proceso	cuadrático	4	AA, BB

Paso 8: Analizar los resultados del experimento

Modelo	Rendimiento	Germinación	Act acetilglucosaminidasa	Act b esterasa	Mortalidad
Transformación	Ninguno	ninguno	ninguno	ninguno	ninguno
Modelo d.f.	3	3	3	3	3
P-valor	0,4267	0,0213	0,0000	0,5125	0,6204
Error d.f.	21	21	21	21	21
Std. error	0,188766	4,67485	1,44501	0,226327	8,48613
R-cuadrado	12,14	36,33	67,98	10,15	7,93
Adj. cuadrado	R- 0,00	21,18	60,35	0,00	0,00

Eficacia
ninguno
3
0,4628
21
9,63156
11,27
0,00

Paso 9: Optimizar las respuestas

Valores de respuesta y Óptimo

Respuesta	Optimizado	Predicción	Inferior Limite 95,0%	Superior Limite 95,0%
Rendimiento	no	8,94722	7,77619	10,1183
Germinación	si	86,9542	-2,55385	176,462
Act acetilglucosaminidasa	n si	11,7236	1,75901	21,6882
Act b esterasa	no	0,487315	0,229198	0,745432
Mortalidad	no	85,7218	-76,9661	248,41
Eficacia	no	82,7928	-99,3794	264,965

Deseabilidad
0,894722
0,869542
1,0
0,487315
0,857218
0,827928

Deseabilidad optimizada = 0,932492

Factores establecidos y Óptimo

Factor	Establecimiento
Tiempo de choque a 5°C	3,45
Tiempo de choque a UVB	5,0

El StatAdvisor

Ha especificado 6 variables respuesta y 2 factores experimentales. El diseño seleccionado tiene 27 ejecuciones, con 1 una muestra para ser tomada en cada ejecución. El modelo por defecto es cuadrático con 4 coeficientes.

Los modelos estadísticos han sido ajustados a las variables de respuesta. Modelos con P-valores por debajo de 0,05, de los cuales hay 2, indican que el modelo ajustado es estadísticamente significativo al 5,0% de nivel de significación. También es interesante el estadístico R-cuadrado, el cual muestra el porcentaje de variación en la respuesta que ha sido explicado por el modelo ajustado. El rango de valores de R-cuadrado varía de 7,93% a 67,98%.

Las características óptimas de los factores experimentales han sido determinadas y mostradas en el resumen. Con estas características, las variables respuesta generan un índice de deseabilidad de 93,25%.

Tabla ANOVA

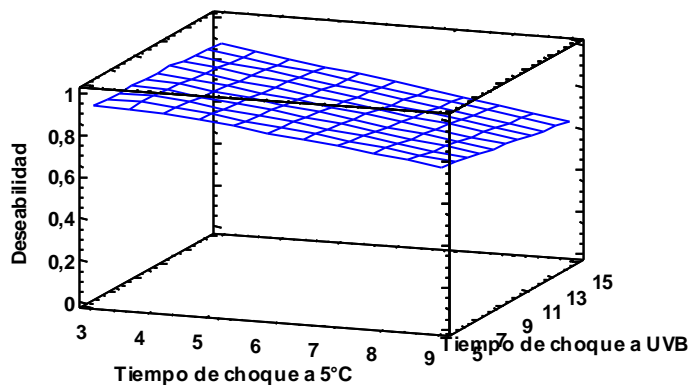
Origen	D.F.
Modelo	3
Error total	23
Falta de ajuste	23
Error puro	0
Total (corr.)	26

Coeficientes del Modelo

				Potencia at	Potencia	Potencia
Coeficiente t	Standard Error	VIF	R- Cuadrado	SN = 0.5	SN = 1.0	SN = 2.0
A	0,235702	1,0	0,0	17,43%	52,89%	98,21%
B	0,235702	1,0	0,0	17,43%	52,89%	98,21%
AB	0,288675	1,0	0,0	13,19%	38,22%	91,25%

alpha = 5,0%, Error total de sigma estimado con 23 d.f.

Grafico de deseabilidad



Conveniencia

	Observado	Observado				Especificado
Respuesta	Mínimo	Máximo	Objetivo	Impacto	Sensibilidad	Bajo
Rendimiento						
Germinación	70,62	90,39	Maximizar	3,0	Medio	0,0
Act n acetilglucosaminidasa	4,21	11,68	Maximizar	3,0	Medio	0,0
Act b esterasa						
Mortalidad						
Eficacia						

Analizar Experimento - Rendimiento

Efectos estimados para Rendimiento (Log Conidios/g húmedo de sustrato)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	8,96556	0,036328	
A:Tiempo de choque a 5°C	-0,0144444	0,0889851	1,0
B:Tiempo de choque a UVB	-0,00888889	0,0889851	1,0
AB	-0,06	0,108984	1,0
bloque	-0,146667	0,102751	1,33333
bloque	0,137778	0,102751	1,33333

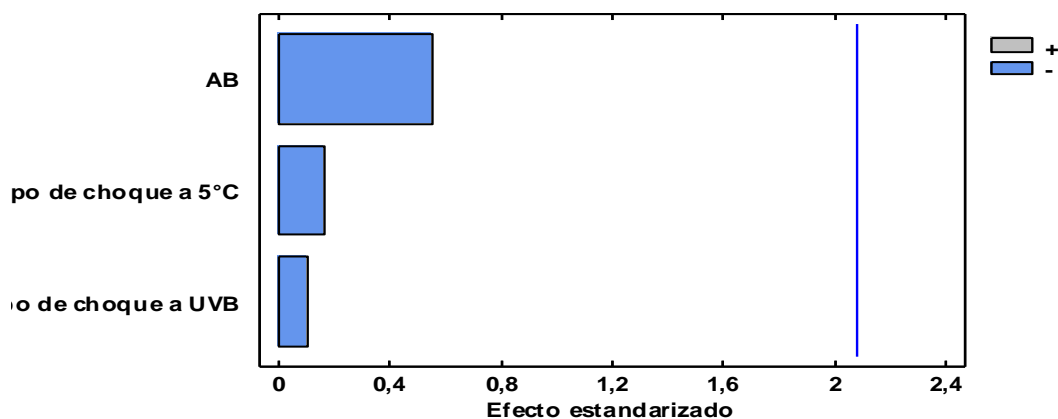
Errores estándar basados en el error total con 21 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,33333. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Rendimiento



Análisis de Varianza para Rendimiento

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de choque a 5°C	0,000938889	1	0,000938889	0,03	0,8726

B:Tiempo de choque a UVB	0,000355556	1	0,000355556	0,01	0,9214
AB	0,0108	1	0,0108	0,30	0,5878
bloques	0,0912889	2	0,0456444	1,28	0,2986
Error total	0,748283	21	0,0356325		
Total (corr.)	0,851667	26			

R-cuadrada = 12,1389 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 porciento

Error estándar del est. = 0,188766

Error absoluto medio = 0,125185

Estadístico Durbin-Watson = 2,08808 (P=0,3686)

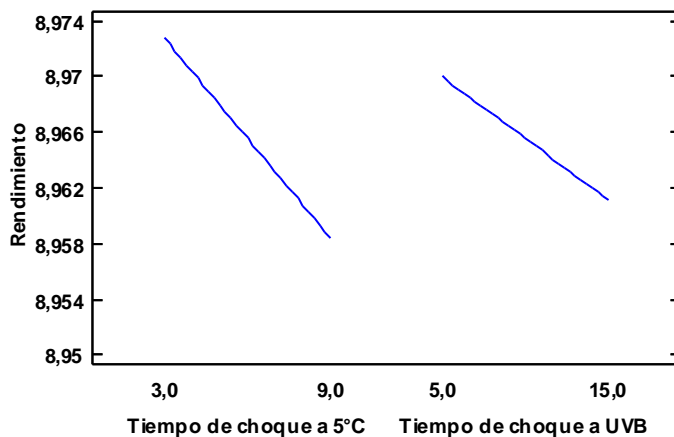
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,0459348

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Rendimiento en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 12,1389% de la variabilidad en Rendimiento. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 0,0%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,188766. El error medio absoluto (MAE) de 0,125185 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Gráfica de Efectos Principales para Rendimiento



Analizar Experimento - Germinación

Efectos estimados para Germinación (%)

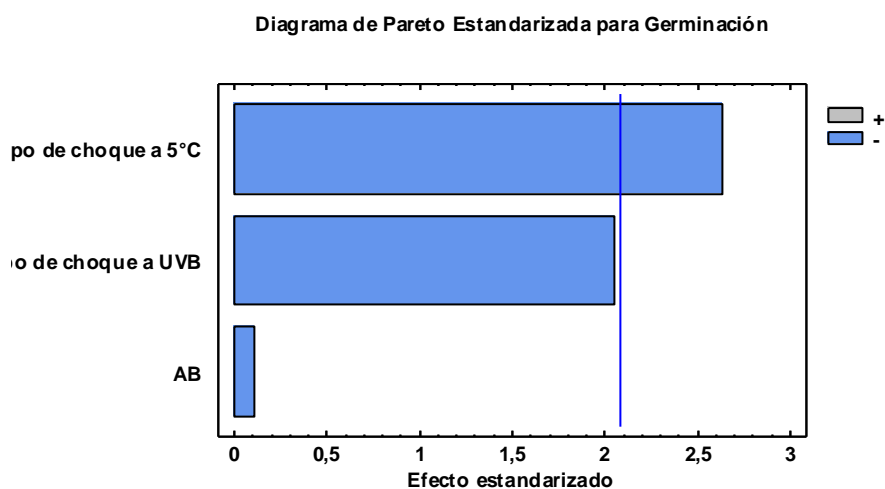
Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	81,9422	0,899675	
A:Tiempo de choque a 5°C	-5,79556	2,20375	1,0
B:Tiempo de choque a UVB	-4,52333	2,20375	1,0
AB	-0,295	2,69903	1,0
bloque	-2,29556	2,54467	1,33333
bloque	0,766667	2,54467	1,33333

Errores estándar basados en el error total con 21 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,33333. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.



Análisis de Varianza para Germinación

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de choque a 5°C	151,148	1	151,148	6,92	0,0157

B:Tiempo de choque a UVB	92,0725	1	92,0725	4,21	0,0528
AB	0,261075	1	0,261075	0,01	0,9140
bloques	18,4384	2	9,21921	0,42	0,6613
Error total	458,939	21	21,8542		
Total (corr.)	720,859	26			

R-cuadrada = 36,3345 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 21,176 porciento

Error estándar del est. = 4,67485

Error absoluto medio = 3,31418

Estadístico Durbin-Watson = 2,2751 (P=0,5564)

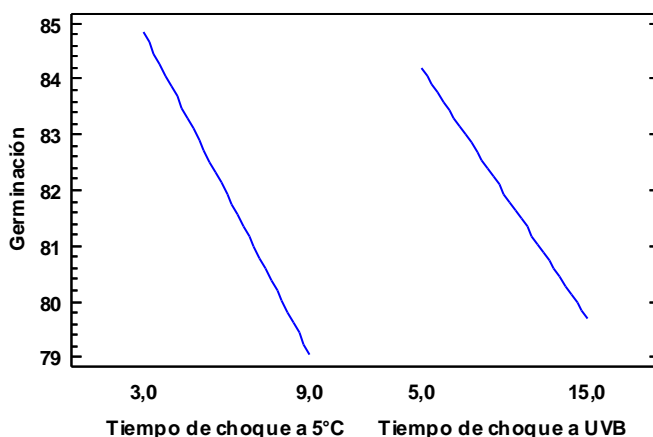
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,158937

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Germinación en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 1 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 36,3345% de la variabilidad en Germinación. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 21,176%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 4,67485. El error medio absoluto (MAE) de 3,31418 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Gráfica de Efectos Principales para Germinación



Analizar Experimento - Act n acetilglucosaminidasa**Efectos estimados para Act n acetilglucosaminidasa (UE)**

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	8,96778	0,278093	
A:Tiempo de choque a 5°C	-4,20333	0,681185	1,0
B:Tiempo de choque a UVB	-1,68667	0,681185	1,0
AB	-0,378333	0,834278	1,0
bloque	-0,253333	0,786565	1,33333
bloque	0,295556	0,786565	1,33333

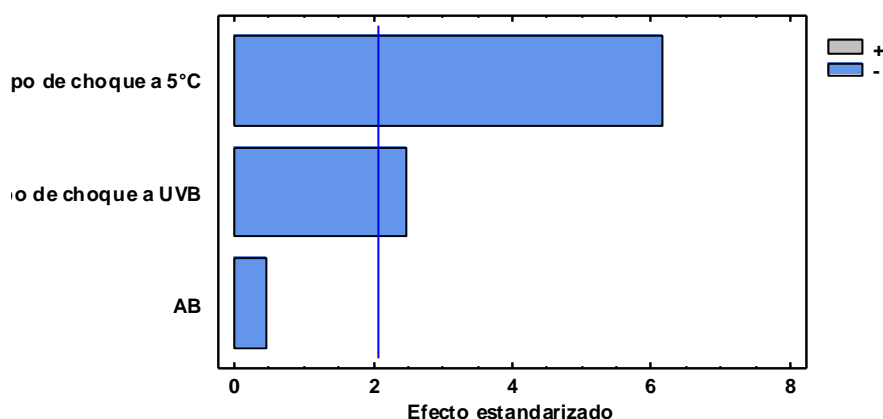
Errores estándar basados en el error total con 21 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,33333. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Act n acetilglucosaminidasa

**Análisis de Varianza para Act n acetilglucosaminidasa**

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de choque a	79,506	1	79,506	38,08	0,0000

5°C					
B:Tiempo de choque a UVB	12,8018	1	12,8018	6,13	0,0219
AB	0,429408	1	0,429408	0,21	0,6549
bloques	0,344956	2	0,172478	0,08	0,9210
Error total	43,8493	21	2,08806		
Total (corr.)	136,931	26			

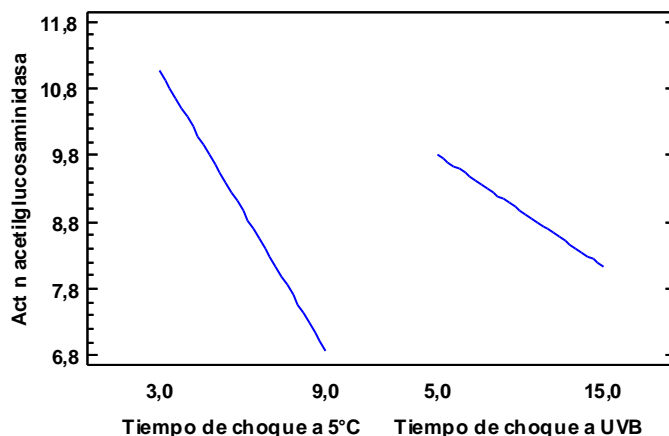
R-cuadrada = 67,9772 por ciento
R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 60,3528 por ciento
Error estándar del est. = 1,44501
Error absoluto medio = 0,963848
Estadístico Durbin-Watson = 2,22502 (P=0,5053)
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,124728

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Act n acetilglucosaminidasa en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 67,9772% de la variabilidad en Act n acetilglucosaminidasa. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 60,3528%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 1,44501. El error medio absoluto (MAE) de 0,963848 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Gráfica de Efectos Principales para Act n acetilglucosaminidasa



Analizar Experimento - Act b esterasa

Efectos estimados para Act b esterasa (UE)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	0,395926	0,0435567	
A:Tiempo de choque a 5°C	0,0422222	0,106692	1,0
B:Tiempo de choque a UVB	-0,06	0,106692	1,0
AB	0,165	0,13067	1,0
bloque	0,0037037	0,123197	1,33333
bloque	0,057037	0,123197	1,33333

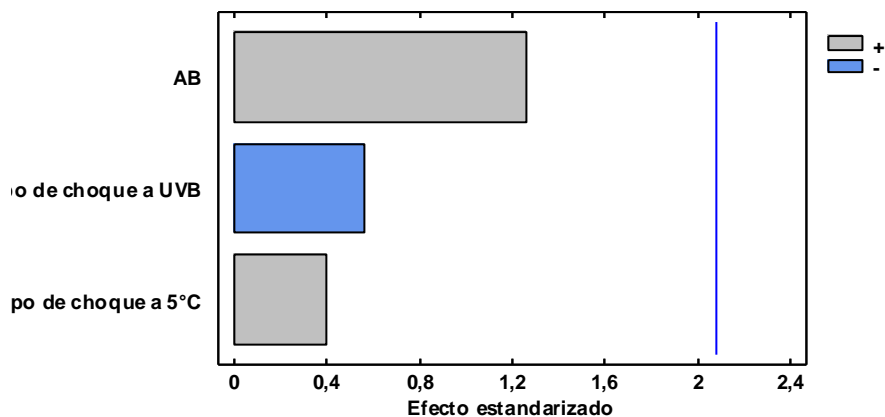
Errores estándar basados en el error total con 21 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,33333. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Act b esterasa



Análisis de Varianza para Act b esterasa

Fuente	Suma Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de choque a 5°C	0,00802222	1	0,00802222	0,16	0,6963

B:Tiempo de choque a UVB	0,0162	1	0,0162	0,32	0,5798
AB	0,081675	1	0,081675	1,59	0,2205
bloques	0,0156519	2	0,00782593	0,15	0,8593
Error total	1,0757	21	0,0512239		
Total (corr.)	1,19725	26			

R-cuadrada = 10,1523 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 por ciento

Error estándar del est. = 0,226327

Error absoluto medio = 0,15465

Estadístico Durbin-Watson = 2,33683 (P=0,6183)

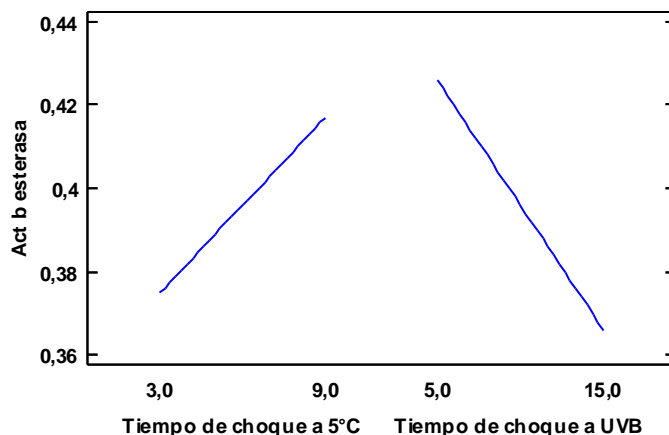
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,177345

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Act b esterasa en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 10,1523% de la variabilidad en Act b esterasa. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 0,0%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 0,226327. El error medio absoluto (MAE) de 0,15465 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Gráfica de Efectos Principales para Act b esterasa



Analizar Experimento - Mortalidad

Efectos estimados para Mortalidad (%)

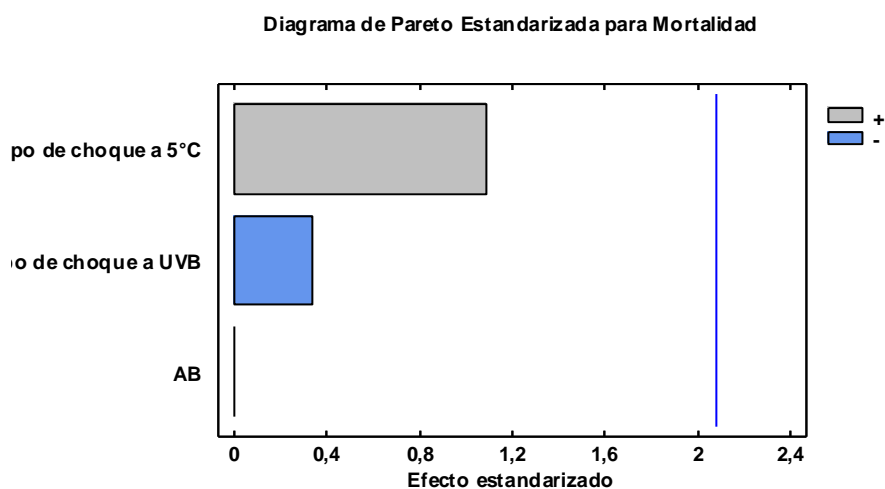
Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	87,2226	1,63316	
A:Tiempo de choque a 5°C	4,33444	4,0004	1,0
B:Tiempo de choque a UVB	-1,33444	4,0004	1,0
AB	-0,00166667	4,89947	1,0
bloque	-3,20741	4,61927	1,33333
bloque	2,41259	4,61927	1,33333

Errores estándar basados en el error total con 21 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,33333. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.



Análisis de Varianza para Mortalidad

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de choque a 5°C	84,5433	1	84,5433	1,17	0,2909

B:Tiempo de choque a UVB	8,01334	1	8,01334	0,11	0,7420
AB	0,00000833333	1	0,00000833333	0,00	0,9997
bloques	37,6645	2	18,8323	0,26	0,7724
Error total	1512,3	21	72,0144		
Total (corr.)	1642,52	26			

R-cuadrada = 7,92812 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 por ciento

Error estándar del est. = 8,48613

Error absoluto medio = 5,843

Estadístico Durbin-Watson = 2,71227 (P=0,9041)

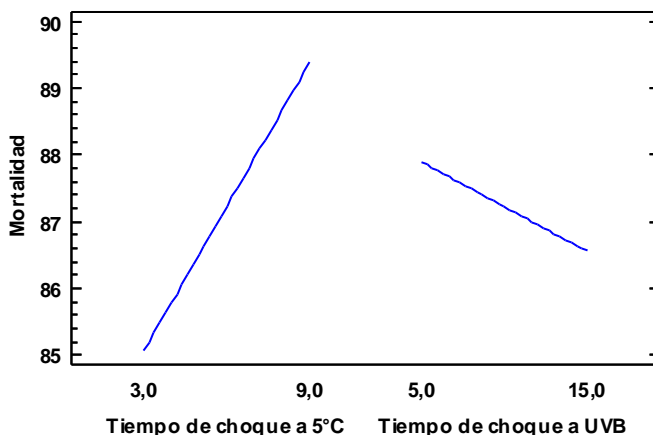
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,390845

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Mortalidad en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 7,92812% de la variabilidad en Mortalidad. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 0,0%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 8,48613. El error medio absoluto (MAE) de 5,843 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Gráfica de Efectos Principales para Mortalidad



Analizar Experimento - Eficacia

Efectos estimados para Eficacia (%)

Efecto	Estimado	Error Estd.	V.I.F.
promedio	84,1056	1,85359	
A:Tiempo de choque a 5°C	2,62556	4,54036	1,0
B:Tiempo de choque a UVB	-4,8	4,54036	1,0
AB	-4,8	5,56078	1,0
bloque	-2,11333	5,24276	1,33333
bloque	-1,46444	5,24276	1,33333

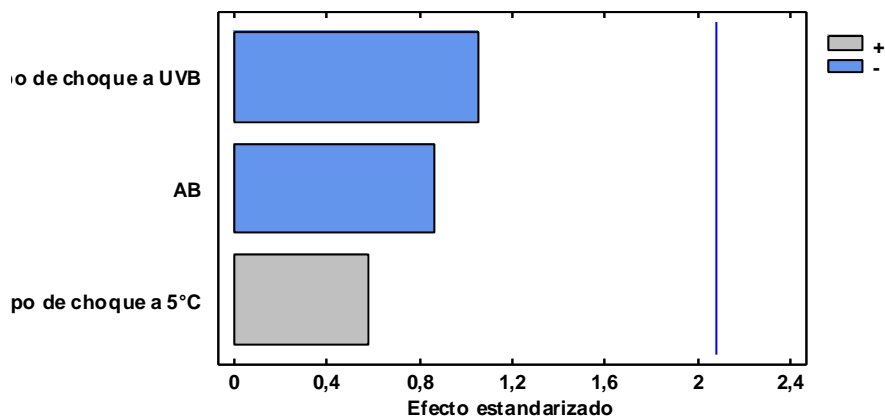
Errores estándar basados en el error total con 21 g.l.

El StatAdvisor

Esta tabla muestra las estimaciones para cada uno de los efectos estimados y las interacciones. También se muestra el error estándar de cada uno de estos efectos, el cual mide su error de muestreo. Note también que el factor de inflación de varianza (V.I.F.) más grande, es igual a 1,33333. Para un diseño perfectamente ortogonal, todos los factores serían igual a 1. Factores de 10 o más normalmente se interpretan como indicativos de confusión seria entre los efectos.

Para graficar los estimados en orden decreciente de importancia, seleccione Diagrama de Pareto de la lista de Opciones Gráficas. Para probar la significancia estadística de los efectos, seleccione Tabla ANOVA de la lista de Opciones Tabulares. Puede retirar efectos significativos pulsando el botón secundario del ratón, seleccionando Opciones de Análisis, y pulsando el botón de Excluir.

Diagrama de Pareto Estandarizada para Eficacia



Análisis de Varianza para Eficacia

Fuente	Suma de Cuadrados	de GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de choque a 5°C	31,0209	1	31,0209	0,33	0,5692

B:Tiempo de choque a UVB	103,68	1	103,68	1,12	0,3024
AB	69,12	1	69,12	0,75	0,3978
bloques	43,6754	2	21,8377	0,24	0,7923
Error total	1948,11	21	92,7669		
Total (corr.)	2195,6	26			

R-cuadrada = 11,2724 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 0,0 por ciento

Error estándar del est. = 9,63156

Error absoluto medio = 6,46984

Estadístico Durbin-Watson = 2,5015 (P=0,7680)

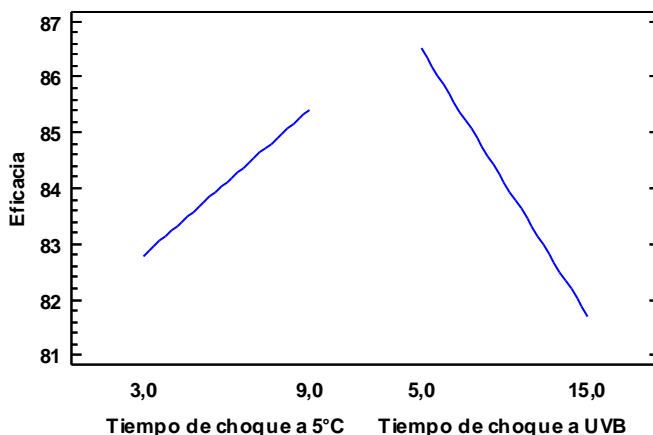
Autocorrelación residual de Lag 1 = -0,270382

El StatAdvisor

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de Eficacia en piezas separadas para cada uno de los efectos. entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 11,2724% de la variabilidad en Eficacia. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 0,0%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 9,63156. El error medio absoluto (MAE) de 6,46984 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Gráfica de Efectos Principales para Eficacia



OBJETIVO 2 - ESTABILIDAD EN CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO**VARIABLE GERMINACIÓN****Temperatura de almacenamiento a 8°C****GERMINACIÓN - ANOVA**

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	15	6480.38	432.025	20.1	0.0000
Within	32	688.32	21.510		
Total	47	7168.70			

Grand Mean 81.209 CV 5.71

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	23.5	15	0.0734
Cochran's Q	0.5310		
Largest Var / Smallest Var	221.59		

Component of variance for between groups 136.838
Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
CE10	92.903	CS10	90.530
CE11	89.590	CS11	83.060
CE12	88.883	CS12	73.733
CE13	88.263	CS13	52.767
CE20	87.387	CS20	89.010
CE21	87.377	CS21	80.533
CE22	84.220	CS22	73.400
CE23	82.553	CS23	55.133
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			2.6777
Std Error (Diff of 2 Means)			3.7868

GERMINACIÓN - PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY

Variable	Mean	Homogeneous Groups
CE10	92.903	A
CS10	90.530	A
CE11	89.590	A
CS20	89.010	A
CE12	88.883	A
CE13	88.263	A
CE20	87.387	AB
CE21	87.377	AB
CE22	84.220	AB
CS11	83.060	AB
CE23	82.553	AB
CS21	80.533	AB

CS12	73.733	B
CS22	73.400	B
CS23	55.133	C
CS13	52.767	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.7868
 Critical Q Value 5.242 Critical Value for Comparison 14.037
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Temperatura de almacenamiento a 18°C

GERMINACIÓN - ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	15	20535.2	1369.01	42.5	0.0000
Within	32	1031.7	32.24		
Total	47	21566.9			

Grand Mean 75.374 CV 7.53

Bartlett's Test of Equal Variances	Chi-Sq	DF	P
	27.6	15	0.0243
Cochran's Q	0.5304		
Largest Var / Smallest Var	144.58		

Component of variance for between groups	445.591
Effective cell size	3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
CE10	92.903	CS10	90.530
CE11	89.047	CS11	84.417
CE12	87.620	CS12	63.920
CE13	83.247	CS13	31.600
CE20	87.387	CS20	89.010
CE21	86.117	CS21	84.000
CE22	81.397	CS22	54.793
CE23	77.500	CS23	22.500
Observations per Mean		3	
Standard Error of a Mean	3.2782		
Std Error (Diff of 2 Means)	4.6361		

GERMINACIÓN - PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY

Variable	Mean	Homogeneous Groups
CE10	92.903	A
CS10	90.530	A
CE11	89.047	A
CS20	89.010	A
CE12	87.620	A
CE20	87.387	A
CE21	86.117	A
CS11	84.417	A
CS21	84.000	A

CE13	83.247	A
CE22	81.397	A
CE23	77.500	AB
CS12	63.920	BC
CS22	54.793	C
CS13	31.600	D
CS23	22.500	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.6361
 Critical Q Value 5.242 Critical Value for Comparison 17.185
 There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means
 are not significantly different from one another.

Temperatura de almacenamiento a 28°C

GERMINACIÓN - ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Between	15	41829.7	2788.64	103	0.0000
Within	32	863.9	27.00		
Total	47	42693.6			

Grand Mean 59.562 CV 8.72

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	15.5	15	0.4152
Cochran's Q	0.3572		
Largest Var / Smallest Var	51.989		

Component of variance for between groups 920.550
 Effective cell size 3.0

Variable	Mean	Variable	Mean
CE10	92.903	CS10	90.530
CE11	86.833	CS11	72.897
CE12	71.857	CS12	44.927
CE13	39.287	CS13	8.550
CE20	87.387	CS20	89.010
CE21	81.993	CS21	76.460
CE22	51.823	CS22	29.360
CE23	22.470	CS23	6.700
Observations per Mean			3
Standard Error of a Mean			2.9998
Std Error (Diff of 2 Means)			4.2423

GERMINACIÓN - PRUEBA DE COMPARACIÓN DE MEDIAS DE TUKEY

Variable	Mean	Homogeneous Groups
CE10	92.903	A
CS10	90.530	AB
CS20	89.010	AB

CE20	87.387	ABC
CE11	86.833	ABC
CE21	81.993	ABC
CS21	76.460	BC
CS11	72.897	C
CE12	71.857	C
CE22	51.823	D
CS12	44.927	DE
CE13	39.287	DE
CS22	29.360	EF
CE23	22.470	FG
CS13	8.5500	GH
CS23	6.7000	H

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 4.2423
Critical Q Value 5.242 Critical Value for Comparison 15.726
There are 8 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.

Bibliografía

- Abadias M, Usall J, Teixidó N & Viñas I (2003) Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* CPA-1 in isotonic solutions. *Phytopathology* 93: 436–442.
- Aguirre N, Espinel C, Villamizar L & Cotes AM (2009) Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Rev. Colomb. Entomol.* 35: 138–144.
- Ali S, Huang Z, QeZang W & Ren SX (2011) Production and regulation of extracellular proteases from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Cordycipitaceae; Hypocreales) in the presence of diamondback moth cuticle. *Pak. J. Zool.* 43: 1203–1213.
- Ali S, Huang Zhen & Ren S (2009) Media composition influences on growth, enzyme activity, and virulence of the entomopathogen hyphomycete *Isaria fumosoroseus*. *Entomol. Exp. Appl.* 131: 30–38.
- Ali S, Huang Z & Ren S (2009) Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae; Hypocreales). *Biocontrol Sci. Technol.* 19: 81–89.
- Ali S, Wu J, Huang Z & Ren SX (2010) Production and regulation of extracellular chitinase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Sci. Technol.* 20: 723–738.
- Al-Naama M, Ewaze JO, Green BJ & Scott J a. (2009) Trehalose accumulation in *Baudoinia compniacensis* following abiotic stress. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 63: 765–768.
- Altre J, Vanderberg J & Cantone F (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *J. Invertebr. Pathol.* 73: 332–338.

-
- Alves SB, Pereira RM, Stimac JL, & Sa E De (1996) Delayed germination of *Beauveria bassiana* conidia after prolonged storage at low , above-freezing temperatures *Entomologia* 575–582.
- Amillastre E, Aceves-Lara C-A, Uribelarrea J-L, Alfenore S & Guillouet SE (2012) Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 117: 242–250.
- Andersen M, Magan N, Mead A & Chandler D (2006) Development of a population-based threshold model of conidial germination for analysing the effects of physiological manipulation on the stress tolerance and infectivity of insect pathogenic fungi. *Environ. Microbiol.* 8: 1625–1634.
- Arriero C (2001) Producción y caracterización de principios activos de un bioplaguicida a base de *Nomuraea rileyi* para el control de Spodoptera frugiperda. Pontificia Universidad Javeriana. Departamento de Microbiología. Microbiología industrial
- Aus W, Jensen JM & Moore RF (1987) Effect of host species and light conditions on production by an isolate of *Nomuraea rileyi* of conidia. *J. Invertebr. Pathol* 69: 67–69.
- Avalos J & Estrada A (2010) Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genet. Biol.* 47: 930–938.
- Bertholdo L, Rossato M, Terezinha R & Monteiro N (2003) Characterization of *Nomuraea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. *Brazilian Arch. Biol. ans Technol.* 46: 13–18.
- Beys Silva W, Santi L, Correa A, Silva L, Bresciani F, Schrank A, Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* lipolytic activity plays a pivotal role in *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* infection. *Fungal Biol.* 114: 312–319.
- Beys Silva W, Mitidieri S, Schrank A & Vainstein MH (2005) Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.* 40: 321–326.
- Beys Silva W, Santi L, Bergerm M, Pinto A, Guimaraes J, Schrank A & Vainstein MH (2009) Characterization of a spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.* 44: 829–834.
- Beys Silva W, Santi L, Correa A, Silva L, Bresciani F, Schrank A & Vainstein MH (2010) The entomopathogen *Metarhizium anisopliae* can modulate the secretion of lipolytic enzymes in response to different substrates including components of arthropod cuticle. *Fungal Biol.* 114: 911–916.

- Bhanu Prakash G, Padmaja V & Siva R (2008) Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour. Technol.* 99: 1530–1537.
- Bosa C, Chávez D, Torres L, París A, Villamizar L & Cotes A (2004) Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 30: 93–97.
- Boucias DG, Tigano MS, Sosa-Gomez DR, Glare TR & Inglis PW (2000) Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Biol. Control* 19: 124–138.
- Braga G U, Flint SD, Messias CL, Anderson a J & Roberts DW (2001) Effects of UVB irradiance on conidia and germinants of the entomopathogenic Hyphomycete *Metarhizium anisopliae*: a study of reciprocity and recovery. *Photochem. Photobiol.* 73: 140–146.
- Braga GU, Flint SD, Messias CL, Anderson AJ & Roberts DW (2001) Effect of UV-B on conidia and germlings of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 105: 874–882.
- Braga GU, Rangel DEN, Flint SD, Miller CD, Anderson AJ & Roberts DW (2002) Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia* 94: 912–920.
- Bye N & Charnley AK (2008) Regulation of cuticle-degrading subtilisin proteases from the entomopathogenic fungi, *Lecanicillium* spp: implications for host specificit. *Arch. Microbiol.* 189: 81–82.
- Cagan L & Svercel M (2001) The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin to the european corn borer *Ostrinia nubilalis* HBN (Lepidoptera; Crambidae). *J. Cent. Eur. Agric.* 2: 229–234.
- Carbonell R, Yanis A, Pereiro G, Sousa J, Victoria F & Calvert L (2001) *Guia para el trabajo de campo en el manejo de plagas del arroz*. Cuarta Edi. CIAT.
- Caro L, Villamizar L, Espinel C & Cotes AM (2005) Efecto del medio de cultivo en la virulencia de *Nomuraea rileyi* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 31: 79–88.
- Castellanos J, Gonzalez M, Mier T, Aranda E & Conchita T (2007) Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera:Aleyrodidae). *Rev. Iberoam. Micol.* 24: 62–68.

- Charnley AK & Collins S (2007) Entomopathogenic fungi and their role in pest control. *Environmental and Microbial Relationships*, (Kubicek, C & Druzhinina, I, eds), pp. 159–187. Springer-Verlag.
- Charnley AK & St Leger RJ (1991) The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects. *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, (Cole, G & Hoch, H, eds), pp. 267–286. Plenum, New York, USA.
- Chelico L, Haughian JL & Khachatourians GG (2006) Nucleotide excision repair and photoreactivation in the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Beauveria brongniartii*, *Beauveria nivea*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus* and *Verticillium lecanii*. *J. Appl. Microbiol.* 100: 964–972.
- Chelico L & Khachatourians GG (2008) Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 93–100.
- Chen A, Shi Z, Zhang L & Taylor P (2008) The effects of some storage conditions on viability of *Lecanicillium lecanii* conidia to whitefly (Homoptera: Trialeurodes vaporariorum) The effects of. *Biocontrol Sci. Technol.* 18: 267–278.
- Chen C, J D & Loros J (2010) *Neurospora* illuminates fungal photoreception. *Fungal Genet. Biol.* 47: 922–929.
- Copping L (2009) *The Manual of Biocontrol Agents, The Biopesticide Manual*. Fourth Edi. The British Crop Protection Council, Hampshire, Reino Unido.
- Corrochano L (2011) Fungal photobiology: a synopsis. *IMA Fungus* 2: 25–28.
- Corrochano L & Garre V (2010) Photobiology in the Zygomycota: Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genet. Biol.* 47: 893–899.
- Costa E, Usall J, Teixidó N, Torres R & Viñas I (2002) Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *J. Appl. Microbiol.* 92: 873–878.
- Costa LB, Rangel DEN, Morandi M a B & Bettioli W (2012) Impact of UV-B radiation on *Clonostachys rosea* germination and growth. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 2497–2504.
- De Crecy E, Jaronski S, Lyons B, Lyons TJ & Keyhani NO (2009) Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. *BMC Biotechnol.* 9: 74.
- Daniel C (1994) Factorial One-Factor-at-a Time Experiments. *Am. Statistician* 48: 132–135.

- Devi KU, Sridevi V, Mohan CM, Padmavathi J & Murali M (2005) Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *J. Invertebr. Pathol.* 88: 181–189.
- Devi PSV & Prasad YG (2001) *Nomuraea rileyi* - a potential mycoinsecticide. *Biocontrol Potential its Exploit. Sustain. Agric. Vol. 2* 23–38.
- Devi UK, Reineke A, Rao UCM, Reddy NRN & Khan APA (2007) AFLP and single-strand conformation polymorphism studies of recombination in the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *Mycol. Res.* 111: 716–725.
- Duo-Chuan L (2006) Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161: 345–360.
- Eibes G, Lú.Chau T, Ruiz-Dueñas F, Feijoo G, Martinez M, Martinez A & Lema J (2009) Effect of culture temperature on the heterologous expression of *Pleurotus eryngii* versatile peroxidase in *Aspergillus* hosts. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32: 129–134.
- El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD & Gupta SC (1992) A semi-defined medium for culturing *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia* 2: 163–165.
- El-Sayed GN, Ignoffo CM, Leathers TD, Gupta SC (1993) Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *Mycopathologia* 122: 79–87.
- EPA (2012) Pesticides: Regulating pesticides. *line*.
<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>. (Accessed May 20, 2012).
- Espinel C & Cotes A (2008) Sublethal effect of *Nomuraea rileyi* on development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Insect Pathog. Insect Parasit. Nematodes. IOBC/wprs Bollet.* 31: 257–260.
- Evans HC & Hywel-Jones NL (1997) Entomopathogenic Fungi. *Soft Scale Insect - their Biology, Natural Enemies and Control*, pp. 5–27.
- Fanelli F, Schmidt M, Haidukowski M, Susca A, Geisen R, Logrieco A & Mule G (2012) Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biol.* 116: 241–248.
- Fang W, Leng B, Xiao Y, Jin K, Ma J, Fan Y, Feng J, Yang X & Zhang Y (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 363–370.
- Faria MR De & Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 43: 237–256.

- Feng M, Poprawski J & Khachatourians G (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control. *Biocontrol Sci. Technol.* 4: 3–34.
- Feofilova EP, Tereshina V, Memorskaya A, Khokhlova NS & Memorskaya A (2000) Different mechanisms of the biochemical adaptation of mycelial fungi to temperature stress: changes in the cytosol carbohydrate composition. *Microbiology* 69: 606–611.
- Fernandes EKK, Rangel DEN, Moraes AML, Bittencourt VREP & Roberts DW (2007) Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria* spp. isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 96: 237–243.
- Fernández JL (2003) Estimación de umbrales económicos para *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) en el cultivo del maíz. *line*. <http://www.inia.es/IASPV/2002/vol17-3/FERNANDEZ.pdf#search='spodopterauniversidadfernandezumbral> (Accessed May 17, 2012).
- Fernández M, Ortiz M, Galindo E & Serrano-Carreón L (2012) Cellular damage during drying and storage of *Trichoderma harzianum* spores. *Process Biochem.* 47.
- Fonseca AR, Nascimento J & Cristina M (2010) Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. *Ciencia Rural, Santa María.* 40: 1853-1859.
- Friedl M, Schmoll M, Kubicek C & Druzhinina I (2008) Photostimulation of *Hypocrea Martina atroviridis* growth occurs due to a cross-talk of carbon metabolism, blue light receptors and response to oxidative stress. *Microbiology* 154: 1229–1241.
- García F (2000) Manejo integrado del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. *I Curso Taller Int. Control Biológico. Compon. Fundam. del MIP en Agric. sostenible.* 151–161.
- García F, Mosquera MT, Vargas C & L. R (2002) Control biológico, microbiológico y físico de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) plaga del maíz y otros cultivos en Colombia. *Rev. Colomb. Entomol.* 28: 53–60.
- García F & Pulido F (1984) El gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*, su control y perspectivas para su manejo. *XI Reunión de maiceros de la zona andina. II Reunión latino americana del maíz. Ministerio de Agricultura. Instituto Colombiano Agropecuario. Programa Nacional de Maíz y Sorgo*, p. 35. Colombia.
- García I & Del Pozo E (1999) Aislamiento y producción de conidios de *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson y su virulencia en larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH). *Rev. Protección Veg.* 14: 95 –100.
- Gardner W & Fuxa J (1980) Pathogens for the suppression of the fall armyworm. *Florida Entomol.* 63: 439–447.

- Glare TR (1987) Effect of host species and light conditions on production of conidia by an isolate of *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 67–69.
- Gocheva Y, Tosi S, Krumova T, Slokoska L, Miteva J, VAssilev S & Angelova M (2009) Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctica. *Extremophiles* 13: 273–281.
- Grijalba E, Villamizar L & Cotes A (2009) Evaluación de la estabilidad de *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana* frente a la radiación ultravioleta. *Rev. Colomb. Entomol.* 35: 1–6.
- Hajek A & St Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 293–322.
- Hallsworth JE & Magan N (1996) Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2435–2442.
- Hegedus D & Khachatourian G (1988) Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol. Lett.* 10: 637–642.
- Hegedus DD & Khachatourians GG (1995) The impact of biotechnology on hyphomycetous fungi. *Biotechnol. Lett.* 17: 455–490.
- Hoballah ME, Degen T, Bergvinson D, Savidan A, Tamo C & Turlings TCJ (2004) Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical lowlands of Mexico. *Agric. For. Entomol.* 6: 83–88.
- ICA (2013) Bioinsumos registrados al 20 de junio de 2013. 12. <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/PRODUCTOS-BIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx> (Accessed May 9, 2013).
- Idnurm A & Heitman J (2005) Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLoS Biol.* 3: 615–626.
- Ignoffo CM (1981) The fungus *Nomuraea rileyi* as a microbial insecticide. *Microbial Control of pest and plant diseases.*, (Burgess, HD, ed), pp. 513–538. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Irfan M, Javed J & Syed Q (2011) UV mutagenesis of *Aspergillus niger* for enzyme production in submerged fermentation. *Pakistan J. Biochem. Mol. Biol.* 44: 137–140.
- Iskandarov US, Guzalova AG & Davranov KD (2006) Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the

- entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Biochem. Microbiol.* 42: 72–76.
- James R., Buckner J. & Freeman T. (2003) Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *J. Invertebr. Pathol.* 84: 67–74.
- Jenkins NE & Grzywacz D (2000) Quality control of fungal and viral biocontrol agents - assurance of product performance. *Biocontrol Sci. Technol.* 10: 753–777.
- Jiménez G (1980) Estudio preliminares tendientes al control microbiológico de *Spodoptera frugiperda* en algodón y otros cultivos. Universidad Nacional de Colombia.
- Karpenko Y, Redchitz T, Zheltonozhsky V, Dighton J & Zhdanova N (2006) Comparative Responses of Microscopic Fungi to Ionizing Radiation and Light. *Folia Microbiol. (Praha)*. 51: 45–49.
- Kaur G & Padmaja V (2009) Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *J. Basic Microbiol.* 49: 264–274.
- Khachatourians G (1991) Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. *Handbook of applied mycology (2): humans, animals and insects*, pp. 200–230. Elsevier, New York, USA.
- Khachatourians G & Qazi R (2008) Entomopathogenic fungi : biochemistry and molecular biology. *The Mycota VI*, (Brakhage, A & Zipfel, P, eds), pp. 33–60. Berlin, Alemania.
- Kim JJ, Roh J, Choi J, Wang Y, Shim H & Je Y (2010) Correlation of the aphicidal activity of *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant with enzymes. *Fungal Biol.* 114: 120–128.
- Kinay P & Yildiz M (2008) The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biol. Control* 45: 433–440.
- Kish LP, Samson RA & Allen GE (1974) The genus *Nomuraea* Maublanc. *J. Invertebr. Pathol.* 24: 154–158.
- Kuehl R (2001) *Diseño de experimento: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. International Thomson Editores, Ciudad de Mexico. Mexico.
- Lawrie J, Down VM & Greaves MP (2001) Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola*. *Biocontrol Sci. Technol.* 11: 283–295.

- Leach C & Trione E (1965) An action spectrum for light induced sporulation in the fungus *Ascochyta pisi*. *Plant Physiology* 4: 808–812.
- St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ & Roberts DW (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 6349–6354.
- León M & Pulido JI (1991) Importancia del control natural del cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith p. *Memorias Semin. Spodoptera frugiperda (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros Cultiv.* 78–82.
- Li J & Feng M-G (2009) Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycol. Res.* 113: 93–99.
- Li Q & Tian S (2006) Effects of trehalose on stress tolerance and biocontrol efficacy of *Cryptococcus laurentii*. *J. Appl. Microbiol.* 100: 854–861.
- Liu Q, Sheng-Hua Y, M F & Jiang X (2009) Physiological implication of intracellular trehalose and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95: 65–75.
- Logemann E, Tavernaro A, Schulz W, Somssich I & Hahlbrock K (2000) UV light selectively coinduces supply pathways from primary metabolism and flavonoid secondary product formation in parsley. *Plant Biol.* 97: 1903–1907.
- López-Llorca L & Olivares C (2002) Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycol. Res.* 106: 499.
- Lord J & Howard R (2004) A proposed role for the cuticular fatty amides of *Liposcelis bostrychophila* (Psocoptera: Liposcelidae) in preventing adhesion of entomopathogenic fungi with dry-conidia. *Mycopathologia* 154: 211–217.
- Lu Z, Laroche A & Huang H (2005) Isolation and characterization of chitinases from *V. lecanii*. *Can. J. Microbiol.* 51: 211–217.
- Magan N (2007) Fungi in extreme environments. *The Mycota VI*, (Kubicek, C & Druzhinina, IS, eds), pp. 85–103. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Magan N (2001) Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. *Fungi as biocontrol agent: progress, problems and potential.*, (Butt, T, Jackson, C, & Magan, N, eds), p. 239. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Matsumoto K (2006) Fungal chitinases. *Advances in Agriculture and Food Biotechnology*, p. 661.

- Melin P, Håkansson S, Eberhard TH & Schnürer J (2006) Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. *J. Appl. Microbiol.* 100: 264–271.
- Merzendorfer H & Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.* 206: 4393–4412.
- Montesbravo E (2005) Control biológico de *Spodoptera frugiperda* Smith en maíz. *line*. <http://www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/SPODOPTTE.htm> (Accessed May 3, 2012).
- Moore D, Brigde P, Higgins P, Bateman R & Prior C (1993) Ultra-violet radiation damage to *Metarhizium flavoviride* conidia and the protection given by vegetable and mineral oils and chemical sunscreens. *Annu. Appl. Biol.* 122: 605-6: 605–616.
- Moore E, Higgins P & Lomer C (1996) Effects of simulated and natural sunlight on the germination of conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and rozsygal and interactions with temperature. *Biocontrol Sci. Technol.* 6: 63–76.
- De Moraes C, Schrank A & Vainstein MH (2003) Regulation of extracellular chitinases and proteases in the entomopathogen and acaricide *Metarhizium anisopliae*. *Curr. Microbiol.* 46: 205–210.
- Morozova E, Baranova M, Kozlov V, Tereshina V, Memorskaya A & Feoflova E (2001) Peculiarities of exogenous dormancy of *Aspergillus niger* conidia. *Microbiology* 70: 527–534.
- Murdoch L, McKenzie K, Maclean M, MacGregor S & Anderson J (2013) Lethal effects of high-intensity violet 405-nm light on *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, and on dormant and germinating spores of *Aspergillus niger*. *Fungal Biol.* 117: 519–527.
- Negrete F & Morales J (2000) *Manejo del gusano cogollero del maíz utilizando extractos de plantas*. Primera Ed. CORPOICA, Montería, Colombia.
- Neves M, Jorge J, Francois J & Terenzi F (1991) Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 571: 249–264.
- Nicholson W, Schuerger A & Setlow P (2005) The solar UV environment and bacterial spore UV resistance: considerations for earth - to Mars transport by natural processes and human spaceflight. *Mutat. Res.* 571: 249–264.
- Nunes A, Martins N, Furlaneto M, de Barros N, Fonseca AR, Nascimento J & Cristina M (2010) Production of cuticle-degrading proteases by *Nomuraea rileyi* and its virulence against *Anticarsia gemmatalis*. *Cienc. Rural. St. María* 40: 1853–1859.

- Olmedo M (2013) Regulation of transcription by light in *Neurospora crassa*: A model for fungal photobiology? *Fungal Biol. Rev.* 27: 10–18.
- Osharov N & May GS (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiol. Lett.* 199: 153–160.
- Pavone D, Díaz M, Trujillo L & Dorta B (2009) A granular formulation of *Nomuraea rileyi* Farlow (Samson) for the control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *Interciencia* 34: 130–134.
- Pedrini N, Crespo R & Juárez MP (2007) Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 146: 124–137..
- Pendland J & Boucias DG (1997) In vivo growth of the entomopathogenic hyphomycete *Nomuraea rileyi*. *Micología* 89: 1.
- Peng C, Huang H, Ji X, Liu X, You J, Lu J, Cong L, Xu X & Ouyang P (2010) A temperature-shift strategy for efficient arachidonic acid fermentation by *Mortierella alpina* in batch culture. *Biochem. Eng. J.* 53: 92–96.
- Pérez M (2003) Control Biológico de *Spodoptera frugiperda* en maíz. Departamento de manejo integrado de plagas. INISAV. Playa Ciudad de la Habana. Cuba. <http://www.cied.org/bae/bae71/b71eht> (Accessed May 20, 2012).
- Perinotto WMS, Angelo IC, Golo PS, Camargo MG, Quinelato L, Vainstein M, Beys de Silva W, Salles C & Betterncourt V (2013) *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Moniliaceae) Pr1 activity: biochemical marker of fungal virulence in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 24: 123–132.
- Petlamul W & Prasertsan P (2012) Evaluation of strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the basis of their virulence, germination rate, conidia production, radial growth and enzyme activity. *Mycobiology* 40: 111–116.
- Petrocelli T & Slingerland J (2000) UV-B induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line WM35. *Oncogene* 19: 4480–4490.
- Petzold E, Himmelreich U, Mylonakis E, Rude T, Toffaletti D, Cox G, Miller J & Perfect J (2006) Characterization and regulation of the trehalose synthesis pathway and its importance in the pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 74: 5877–5887.
- Prabakaran M, Thennarasu V, Mangala R, Bharathidasan R, Chandrakala N & Mohan N (2009) Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. *Indian J. Sci. Technol.* 2: 46–49.

- Pucheta M, Flores A, Rodríguez S & de la Torre M (2006) Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31: 856–860.
- Purschwitz J, Muller S, Kastner C & Fischer R (2006) Seeing the rainbow: light sensing in fungi. *Curr. Opin. Microbiol.* 9: 566–571.
- Qazi SS & Khachatourians GG (2007) Hydrated conidia of *Metarhizium anisopliae* release a family of metalloproteases. *J. Invertebr. Pathol.* 95: 48–59.
- Qin L, Liu X, Li J, Chen H, Yao Q, Yang Z, Wang L & Chen K (2009) Protein profile of *Nomuraea rileyi* spore isolated from infected silkworm. *Curr. Microbiol.* 58: 578–585.
- Rajan TS & Muthukrishnan N (2010) Influence of various health drinks media on growth and sporulation of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates. *J. Biopestic.* 3: 463–465.
- Rajan TS & Muthukrishnan N (2009) Pathogenicity of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates against *Cnaphalocrocis medinalis* (Fabricius). *Annu. Plant Prot. Sci.* 17: 312–315.
- Rajan TS, Muthukrishnan N & Thangasamy P (2009) Growth and sporulation of *Nomuraea rileyi* isolates on nitrogen based media. *Madras Agric. J.* 96: 189–193.
- Rangel DEN (2011) Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1281–1296.
- Rangel DEN, Anderson AJ & Roberts DW (2008) Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol. Res.* 112: 1362–1372.
- Rangel DEN, Braga GUL, Anderson AJ & Roberts DW (2005) Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *J. Invertebr. Pathol.* 88: 116–125.
- Rangel DEN, Fernandes EKK, Braga GUL & Roberts DW (2011) Visible light during mycelial growth and conidiation of *Metarhizium robertsii* produces conidia with increased stress tolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* 315: 81–86.
- Ravensberg W (2011) *Progress in Biological Control: A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods*. Springer. Alemania.
- Riba G & Glandard A (1980) Mise au point d'un milieu nutritive pour la culture profonde du champignon entomopathogène *Nomuraea rileyi*. *Entomophaga* 25: 317–322.
- Ribera P & Paradelo C (1997) El sol y la piel: Fotoprotección y filtros solares. *Med. Integr.* 30: 64–71.

- Ríos-Velasco E, Chávez S & Gallegos G (2010) Natural epizootic of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson infecting *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Coahuila México. *J. Res. Lepid.* 43: 7–8.
- Rodríguez D (1984) Los entomopatógenos en el manejo integrado de plagas. *Memorias I Curso taller Internacional Control Biológico. Componente Fundamental del MIP en Agricultura Sostenible.*, p. 30.
- Rodríguez J, Hedtke M, Kastmer C, Müller S & Fischer R (2010) Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 585–610.
- Sabaratnam S & Traquair J a (2002) Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biol. Control* 23: 245–253.
- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasoulilian GR, Bandani AR, Butt TM & Reza Rasoulilian G (2007) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270: 116–123.
- Sahayaraj K, Karthick R & Namasivayam S (2008) Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African J. Biotechnol.* 7: 1907–1910.
- Samuels RI & Paterson IC (1995) Cuticle degrading proteases from insect moulting fluid and culture filtrates of entomopathogenic fungi. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 110: 661–669.
- Sankalia M, Mashru R, Sankalia J & Sutariya V (2004) Evaluación y optimización simultánea de papaína inmovilizada en gránulos de alginato entrecruzado mediante un diseño factorial 3x3 y la función de deseabilidad. *Ars Pharm.* 45: 253–279.
- Santi L, Beys Silva W, Pinto A, Schrank A & Vainstein MH (2009) Differential immunoproteomics enables identification of *Metarhizium anisopliae* proteins related to *Rhipicephalus microplus* infection. *Res. Microbiol.* 160: 824–828.
- Santos A, García M, Cotes AM & Villamizar L (2012) Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Rev. Iberoam. Micol.* 29: 150–
- Saxene D, Ben-Dov E, Mansherob R, Barak Z, Boussiba S & Zaritsky A (2002) A UV tolerant mutant of *Bacillus thuringiensis* spp. Kurstaki producing melanin. *Microbiology* 44: 25–32.
- Schmoll M, Esquivel E & Herrera-Estrella A (2010) *Trichoderma* in the light of day – Physiology and development. *Fungal Genet. Biol.* 47: 909–916.

-
- Schrank A & Vainstein MH (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Metarhizium anisopliae. Enzym. toxins* 56: 1267–1274.
- Seidl V (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol. Rev.* 22: 36–42.
- Shabana YM, Müller-Stöver D & Sauerborn J (2003) Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp. orthoceras for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biol. Control* 26: 189–201..
- Shah FA, Wang CS & Butt TM (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 251: 259–266.
- Shah P a & Pell JK (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 413–423.
- Sharma R, Chisti Y & Banejee U (2001) Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* 19: 627–662.
- Sheng J, Deng A, Li C, Bao W & Qiu G (2006) Cloning a cuticle-degrading serine protease gene with biologic control function from *Beauveria brongniartii* and its expression in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 53: 124–128.
- Sinha RP & Häder D-P (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* 1: 225–236.
- Small C-LN & Bidochka MJ (2005) Up-regulation of Prl, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 109: 307–313.
- Smith R, Pekrul S & Gula E (1981) Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothis zea*). *J. Invertebr. Pathol.* 38: 335–344.
- Smits N & Sinoquet H (2004) Fungal bioinsecticide survival in response to UVB in 3D digitized grapevine canopies: a simulation study. *4th International workshop on functional-structural plant model*, pp. 7–11.
- Srivastava CN, Maurya P, Sharma P & Mohan L (2009) Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomol. Res.* 39: 341–355.
- St Leger RJ (1995) The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogenesis of insects. *Can. J. Bot.* 73: 1199–1125.

- St Leger RJ, Cooper RM & Charnley a. K (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Microbiology* 132: 1509–1517.
- St Leger RJ, Goettel M, Roberts D & Staples R (1991) Prepenetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 58: 168–179.
- St Leger R J, Joshi L & Roberts D (1998) Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 709–713.
- St Leger RJ, Wang C & Fang W (2011) New perspectives on insect pathogens. *Fungal Biol. Rev.* 25: 84–88.
- Supakdamrongkul P, Bhumiratana A & Wiwat C (2010a) Characterization of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *J. Invertebr. Pathol.* 105: 228–235.
- Supakdamrongkul P, Bhumiratana A & Wiwat C (2010b) Optimization of extracellular lipase production from the biocontrol fungus *Nomuraea rileyi*. *Biocontrol Sci. Technol.* 20: 595–604.
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-pakdel A, Goettel MS, Little S & Mozaffari J (2007) Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *J. Invertebr. Pathol.* 94: 102–107.
- Tang L & Hou RF (2001) Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm , *Helicoverpa armigera* (Lep ., Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* 125: 243–249.
- Tereshina VM (2005) Thermotolerance in fungi: the role of heat shock proteins and trehalose. *Microbiology* 74: 247–257.
- Thakre M, Thakur M, Malik N & Ganger S (2011) Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. *J. Biopestic.* 4: 176–179.
- Tobar S, Vélez P & Montoya E (1996) Selección de aislamientos patógenicos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por resistencia a luz ultravioleta. *Congr. la Soc. Colomb. Entomol. Socolen* 17-19 de J: 76.
- Tucker S & Talbot N (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 385–417.
- USDA (2012) USDA National Nutrient Database for Standard Reference. <http://fnicsearch.nal.usda.gov/fnicsearch/result-list/fullRecord:lentil/>.

- Varela A & Morales E (1996) Characterization of some *Beauveria bassiana* isolates and their virulence toward the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei*. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 147–152.
- Vega-Aquino P, Sanchez-Peña S & Blanco C a (2010) Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 103: 145–149.
- Veluchamy S & Rollins J (2008) A CRY-DASH-type photolyase/cryptochrome from *Sclerotinia sclerotiorum* mediates minor UV-A-specific effects on development. *Fungal Genet. Biol.* 45: 1265–1276.
- Villamizar L, Arriero C, Bosa C & Cotes A (2004) Desarrollo de preformulados a base de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Rev. Colomb. Entomol.* 30: 99–105.
- Villamizar L, Cotes A & Uribe D (2001) Relación entre la actividad enzimática y la virulencia de *Metarhizium anisopliae* sobre la langosta llanera (Orthoptera: Acrididae). *Rev. Colomb. Entomol.* 27: 107–114.
- Villamizar L & Cotes AAMA (2003) Efecto de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*. *Rev. Colomb. Entomol.* 29: 121–126.
- Vimala D & Vimala Devi PS (1994) Conidia production of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* and its evaluation for control of *Spodoptera littura* (Fab) on *Ricinus communis*. *J. Invertebr. Pathol.* 63: 145–150.
- Vimala Devi PS, Chowdary a & Prasad YG (2001) Cost-effective multiplication of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (F) Samson. *Mycopathologia* 151: 35–39.
- Wang C & St Leger RJ (2007) The MAD1 adhesion of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachments to plants. *Eukaryot. Cell* 6: 808–816.
- Wattanalai R, Wiwat C, Boucias DG & Tartar A (2004) Chitinase gene of the dimorphic mycopathogen, *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 54–57.
- Wei G, Li Y, Du G & Chen J (2003) Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. *Biotechnol. Lett.* 25: 887–890.
- Wu JH, Ali S, Huang Z, Ren S & Cai S (2010) Media composition influences growth, enzyme activity and virulence of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *Pak. J. Zool.* 42: 451–459.

- Yang J, Huang X, Tian B, Wang M, Niu Q & Zhang K (2005) Isolation and characterization of a serine protease from the nematophagous fungus, *Lecanicillium psalliotae*, displaying nematocidal activity. *Biotechnol. Lett.* 27: 1123–1128.
- Yang J, Tian B, Liang L & Zhang K-Q (2007) Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75: 21–31.
- Yao S-L, Ying S-H, Feng M-G & Hatting JL (2010) In vitro and in vivo responses of fungal biocontrol agents to gradient doses of UV-B and UV-A irradiation. *BioControl* 55: 413–422.
- Yeo H, Pell JK, Alderson PG, Clark SJ & Pye BJ (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. *Pest Manag. Sci.* 59: 156–165.
- Ying S-H & Feng M-G (2004) Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. *J. Appl. Microbiol.* 97: 323–331..
- Zar J (1999) *Biostatistical Analysis*. Cuarta Edi. Prentice Hall, New Jersey. Estados Unidos.
- Zarate C, Cotes A & Villamizar L (2010) Estudio de la estabilidad en almacenamiento de tres formulaciones oleosas a base de *Nomuraea rileyi*. *XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico*, Vol. México, pp. 399–403.
- Zheng M, Du G, Guo W & Chen J (2001) A temperature-shift strategy in batch microbial transglutaminase fermentation. *Process Biochem.* 36: 525–530.