PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

Optimización de la producción de esporas de *Beauveria bassiana* AgR F504 para el control de *Plutella xylostella*

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

WILSON JAVIER VÁSQUEZ MUÑOZ

Quito, 2020

DEDICATORIA

En memoria de:

Arturo Vásquez

Luzmila Espín

Tulio Navarrete

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, Wilson Vásquez, por enseñarme el valor del trabajo y humildad. A mi madre, Laura Muñoz por siempre apoyarme y enseñarme a ser mejor persona. A mis hermanas Laura y Carla por ser mis hermanas.

A Carlos Vásquez, por ser un ejemplo de persistencia y persona.

A mi abuelita Adriana por ser ejemplo de esfuerzo dedicación y cariño.

A Hugo Muñoz, por ser alguien que me llena de sueños y ambición.

A mis mejores amigos y hermanos Gabriel Ávalos y Cristian Barros por su increíble e inimaginable amistad de más de una década.

A mi enamorada, Ana Garcés, por acompañarme en este proceso, con paciencia, amor y sobre todo risas y alegría

A mis compañeros de clase, amigos y futuros colegas: Esteban Carrera, Salomé Valarezo, Retana Lozada, Mateo Salazar, Melany Paredes y Karen Rodríguez; por todas las risas, y los mejores momentos dentro y fuera de la universidad.

A Trevor y Lynn Jackson, por su hospitalidad, amistad y confianza al permitirme realizar el trabajo en AgResearch-Nueva Zelanda. A Laura Villamizar por su apoyo en todo el proceso práctico de mi tesis. A Gloria Barriga por apoyarme en todo momento, por ser alguien que siempre me ayudó en el desarrollo de mi tesis.

A mis profesoras, Elena Granda, por ser como mi madre en la universidad, a mi Directora de Disertación, Jeniffer Yánez su apoyo incondicional, por su comprensión y dedicación a cualquier problema académico y personal.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por su apoyo económico para el cumplimiento de esta disertación, a todas las autoridades y profesores de la Carrera de Microbiología por siempre ser comunicativos con los estudiantes.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN 8
2. ABSTRACT 9
3. INTRODUCCIÓN 10
3.1 Plutella xylostella 10
3.2 HONGOS ENTOMOPATÓGENOS 12
3.3 Beauveria bassiana 12
3.3.1 MODO DE ACCIÓN DEL HONGO 13
3.3.2 PRODUCCIÓN INDUSTRIAL 14
4. MATERIALES Y MÉTODOS 17
4.1 REACTIVACIÓN DE CEPA DE *BEAUVERIA BASSIANA* AGR F504. 17
4.2 FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA DE ESPORAS DE *Beauveria bassiana* AGR F504 PRODUCIDOS EN DIFERENTES SUSTRATOS 17
4.3 EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y RENDIMIENTO DE ESPORAS DE *Beauveria bassiana* AGR 504 EN CRECIMIENTO EN DIFERENTES SUSTRATOS 18
4.3.1 GERMINACIÓN 19
4.3.2 RENDIMIENTO 21
4.4 EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA 21
4.4.1 ACTIVIDAD INSECTICIDA (BIOENSAYO) 21
4.5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACCIÓN ENZIMÁTICA 23
4.5.1 SOLUCIÓN DE ESPORAS 23
4.5.2 SOLUCIÓN DE EXTRACTO DE MEDIO DE CULTIVO 23
4.5.3 VALORACIÓN DE LA ACCIÓN DE LAS QUITINASAS 23
4.6 ANÁLISIS DE DATOS 24
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 25
5.1 REACTIVACIÓN DE LA CEPA Y FERMENTACIÓN SEMISÓLIDA 25
5.2 EVALUACIÓN DE LA GERMINACIÓN Y RENDIMIENTO 26
5.2.1 EFECTO DE LOS SUSTRATOS EN LA GERMINACIÓN 26
5.3 EFECTO DE LOS SUSTRATOS EN EL RENDIMIENTO 28
5.4 CUANTIFICACIÓN DE QUITINASAS 28
5.5 EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA 31
5.6 CÁLCULO DEL LD_{50} 33
6. CONCLUSIONES 35
7. ANEXOS 40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de varianza del porcentaje de germinación de las esporas de *Beauveria bassiana* 26
Tabla 2. Promedios y desviación estándar de la germinación de *Beauveria bassiana* para la interacción sustrato por tiempo 27
Tabla 3. Promedio y desviación estándar de la germinación de *Beauveria bassiana* agr f504 para el tratamiento sustratos 27
Tabla 4. Análisis de varianza del rendimiento de *Beauveria bassiana* en tres sustratos..... 28
Tabla 5. Promedios y desviación estándar de la cantidad de esporas de *Beauveria bassiana* (conidios/mm2) producidas en diferentes sustratos.. 28
Tabla 6. Análisis de varianza de la producción de nitrofenil, quitobiosidasa y quitotriosa de *Beauveria bassiana* (unidad/ g) producidos en diferentes sustratos y muestras 29
Tabla 7. Promedios de nitrofenil, quitoviosidasa, quitotriosa de *Beauveria bassiana* (unidad/g) producidos en diferentes sustratos 30
Tabla 8. Promedios y desviación estándar de nitrofenil, quitobiosidasa y quitotriosa obtenido de diferentes muestras..... 30
Tabla 9. Promedios y desviación estándar de la interacción de nitrofenil, quitobiosidasa y quitotriosa de *Beauveria bassiana* (unidad/g) obtenidos de dos muestras y cultivados en tres sustratos..... 31
Tabla 10. Análisis de varianza de la mortalidad de *P. xylostella* por la infección de *Beauveria bassiana* producida en tres sustratos y cinco concentraciones diferentes 31
Tabla 11. Promedios y desviación estándar de la mortalidad de *P. xylostella* ocasionada por *Beauveria bassiana* en tres sustratos al sexto día..... 32
Tabla 12. Promedios de mortalidad (%) de *P. xylostella* al día seis ocasionado por *Beauveria bassiana* en 5 diluciones..... 32
Tabla 13. Promedios de mortalidad (%) de *P. xylostella* al día seis ocasionado por *Beauveria bassiana* producido en tres sustratos y cinco diluciones ... 33
Tabla 14. Valores de LD_{50} de la concentración mínima de *Beauveria bassiana* para eliminar al 50 % de la población de larvas en distintos medios de cultivo 34

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable germinación (%). 40
Anexo 2. Datos originales para el cálculo de la geminación en tres tiempos diferentes 42
Anexo 3. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable rendimiento (conidios/g). 43
Anexo 4. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable quitinasa nitrofenil..... 44
Anexo 5. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable quitinasa quitobiosidasa. 45
Anexo 6. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable endoquitinasa..... 46
Anexo 7. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable actividad insecticida. 46

1. RESUMEN

Plutella xylostella es una de las plagas cosmopolitas más destructivas del mundo, generando pérdidas de más de cuatro billones de dólares. Su control es difícil, por su capacidad de adaptación y resistencia a insecticidas. El manejo de esta plaga es de interés agrícola; durante los últimos años, el uso de hongos entomopatógenos ha presentado varias ventajas por los diferentes mecanismos que tienen para infectar a las larvas de los insectos. *Beauveria bassiana*, ha sido considerada uno de los mejores hongos entomopatógenos, y potenciar su cultivo masivo, se ha vuelto necesario para controlar esta plaga de manera adecuada. Este estudio tiene como objetivo evaluar la virulencia *in-vitro* de esporas de *Beauveria bassiana* AgR F504 para el control de *Plutella xylostella* y para esto se evaluó diferentes parámetros de virulencia de las esporas obtenidas en tres diferentes substratos: arroz, avena y medio de cultivo Sabouraud. Los criterios de virulencia evaluados fueron: germinación, mediante el conteo de esporas germinadas; el rendimiento, evaluando la cantidad de conidios por gramo producido; la capacidad enzimática, mediante espectrofotometría y la capacidad insecticida con la realización de un bioensayo con larvas del insecto. Los resultados que se obtuvieron variaron dependiendo del substrato donde creció el hongo, en el caso de la germinación, los mejores resultados lo obtuvieron el sustrato de avena y el medio Sabouraud. En el caso del rendimiento del hongo, fue en arroz donde se demostró mejores resultados; para la capacidad enzimática, se observaron diferentes respuestas, dependiendo de la enzima con la cual se trabajaba. La capacidad insecticida fue evaluada en un bioensayo que reportó a las esporas obtenidas de avena como efectivas a concentraciones menores, ya que eliminaron al 50 % de la población de *P. xylostella,* valores analizados mediante LD_{50}. Este estudio indica que, al seleccionar un sustrato para la reproducción de *B. bassiana* se deben tomar en cuenta diferentes criterios como es la capacidad de germinación que tiene cada una de las esporas en los sustratos de donde provienen su capacidad insecticida y el costo de producción. Sin embargo, la experimentación en campo es necesaria para confirmar los datos reportados a nivel de laboratorio e invernadero.

Palabras clave: *Beauveria bassiana, hongos* entomopatógenos, bioinsecticida *Plutella xylostella*, virulencia.

2. ABSTRACT

Plutella xylostella is one of the most destructive cosmopolitan pests in the world, generating losses of more than four billion dollars each year. Its control is challenging, thanks to its adaptability and resistance to insecticides. The control of this pest is a subject of agricultural importance, in which the use of entomopathogenic fungi has several advantages, due its multiple mechanisms they have to infect the larvae of insects, *Beauveria bassiana* has been considered one of the best entomopathogenic fungi and promoting its mass cultivation is necessary to control this pest adequately. This study aims to evaluate the in vitro virulence of *Beauveria bassiana* AgR F504 spores for the control of *Plutella xylostella* to accomplish these objective, different virulence parameters of the spores where evaluated on spores grown in three different substrates: rice, oats and Sabouraud culture. The evaluation criteria were germination, by counting germinated spores; the yield, evaluating the amount of conidia per gram produced; the enzymatic capacity, by spectrophotometry, and the insecticidal capacity by a bioassay with insect larvae of *P. xylostella*. The results that were obtained varied depending on the substrate where the fungus grew, in the case of germination, the best results were obtained with the oat substrate and the Sabouraud medium. In the case of the yield of the fungus, it was in rice where the best results were shown; for the enzymatic capacity, different responses were observed, depending on the enzyme with which it was worked. The insecticidal capacity was evaluated in a bioassay that reported spores obtained from oats as effective at lower concentrations, since they eliminated 50% of the population of *P. xylostella*, values analyzed by LD_{50}. This study shows that, when selecting a substrate for the reproduction of *B. bassiana*, different criteria should be taken into account, such as the germination capacity of each of the spores in the substrates from which their insecticidal capacity and the cost of production come. However, field experimentation is necessary to confirm the data reported at the laboratory and greenhouse level.

Keywords: *Beauveria bassiana,* entomopathogenic fungi, bioinsecticide, *Plutella xylostella*, virulence.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Plutella xylostella

Plutella xylostella es una de las plagas cosmopolitas más destructivas del mundo cuyo control costó alrededor de cuatro billones de dólares a la economía mundial en el año 2012 (Zalucki et al., 2012). *Plutella xylostella,* también conocido como polilla del repollo, es un insecto de la familia *Plutellidae*, orden *Lepidoptera,* y es plaga muy importante de plantas de la familia Brassicaceae (CABI, 2014; Sarfraz, Dosdall y Keddie, 2006). Este insecto es endémico de Europa y se expandió al planeta después del brote reportado en 1958, donde se identificó la plaga en zonas de Europa Oriental, con reportes de barcos que navegaban en el Mar del Norte y en el Océano Atlántico; esta rápida diseminación y adaptabilidad de la plaga junto al cultivo de las crucíferas, tiene como consecuencia la presencia del insecto en todo el mundo (CABI, 2014; French y White, 1960).

El ciclo biológico de *P. xylostella* (metamorfosis) se divide en cuatro fases: huevos, estado larvario, pupa y adulto. Este ciclo lo cumple en alrededor de 17 a 42 días, esto depende de la temperatura a la que se encuentre (CABI, 2014). Los huevos de *P. xylostella* en promedio eclosionan después de 5.6 días, son de color amarillo y visibles a simple vista. El estado larvario se divide en cuatro instares, esto sucede entre 7.8 a 19.5 días aproximadamente antes de empupar. El estado de pupa dura alrededor de siete días, en esta etapa, la larva se envuelve en su seda y cuelga de las hojas de la planta. En la etapa adulta, el insecto es apto para su reproducción apenas dos horas después de salir de la pupa, las hembras producen huevos durante 10 días después de salir de la pupa, cada hembra oviposita de 159 a 288 huevos (CABI, 2014). En Malasia se han registrado ciclos de vida de 16 días, por el contrario, en zonas con temperaturas más bajas se ha registrado ciclos de hasta seis semanas, por ello, se reconoce su gran adaptación en todo el mundo (CABI, 2014). Estudios han mostrado que, las hembras solo ovipositan cuando se encuentran en la planta hospedera correcta. Cuando *P. xylostella* se encuentra en cultivos de crucíferas comienza una acelerada reproducción; las hembras se vuelven más longevas, como consecuencia mayor cantidad de huevos son producidos en su ciclo de vida, los huevos producidos tienen una mayor taza de eclosión, por ende la población

tiene un crecimiento rápido y dominante por hembras (Golizadeh, Kamali, Fathipour, y Abbasipour, 2009; Saeed et al., 2019) . Este insecto tiene requerimientos específicos a la hora de alimentarse, cuando se encuentra en estado larvario buscan nutrientes específicos como son los glucosinolatos, sinigrina y glucobrassicina, mismos que se encuentran en las plantas brasicáceas. Estos nutrientes también actúan como estimulantes para ovipositar y reproducirse, incrementando exponencialmente su incidencia en el cultivo (Sarfraz, Dosdall y Keddie, 2006).

En el cultivo de las crucíferas, se cosechan las hojas y las flores, como es el caso de la lechuga (*Lactuca sativa*) y el brócoli (*Brassica oleracea*) respectivamente, haciéndolo más sensible a cualquier tipo de control fitosanitario con insecticidas sintéticos, ya que, estos productos se aplican a flores y hojas (CABI, 2014). El uso de gran variedad de estos insecticidas es cada vez más común, especialmente, por la resistencia adquirida de *P. xylostella* a los ingredientes activos de nuevos insecticidas.

El tratamiento más común para combatir esta plaga es la aplicación de insecticidas sintéticos, en el Ecuador el uso de moléculas como: tiametoxam, lambdacihalotrina y abamectinas, son las más comunes y son utilizadas en múltiples aplicaciones durante el cultivo, como consecuencia, *P. xylostella* ha manifiestado resistencia a la mayoría de estos químicos, como pasó con el insecticida dicloro difenil tricloroetano (DDT), que, por el uso indiscriminado provocó que *P. xylostella* llegue a ser el primer insecto con resistencia al mismo (Sarfraz, Keddie y Dosdall, 2005; Furlong, Wright y Dosdall, 2013; Massarolli et al., 2019). Además, *P. xylostella* es el primer insecto que presenta resistencia a las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (bacteria entomopatógena), logrando inhibir la toxina *Cry* (responsable de la capacidad insecticida), mediante la producción de enzimas *Cry1Ac* y *Cry1c*, este tipo de adaptaciones por parte de *P. xylostella* lo ha vuelto resistente a plantas transgénicas con la toxina de *B. thurigensis* (plantas *Bt*-) integrada en su sistema (Sarfraz et al., 2006a).

Sin embargo, cabe destacar que *P. xylostella* tiene varios enemigos naturales, entre ellos, los hongos entomopatógenos (Duarte et al., 2016). Es por esto que, el uso de microorganismos entomopatógenos es una alternativa para

su control, dentro de ellos, el que tiene mejores características es *Beauveria bassiana* (Kang, Lee, Yoon, y Kim, 2005).

3.2 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son apenas el 1% de todos los organismos del reino Fungi, su evolución ha permitido que se encuentren en todos los ambientes de la naturaleza, siendo los causantes de enfermedades de varias especies de artrópodos. Dentro de los hongos entomopatógenos existen dos grandes grupos los Hipocreales y Entomoromycota. Estos dos grupos son especializados en la infección de artrópodos por penetración, usando sus esporas como ancla a la epicutícula del animal, cuya germinación es lograda mediante la secreción de diferentes enzimas y por presión mecánica por parte de las hifas. Los grupos de los Hipocreales y Entomoromycota presentan un ciclo de vida igual. Comienza por el contacto del hongo a un hospedero susceptible, se adhiere a la cutícula y la penetra. Deben sobrepasar e impedir el sistema inmune del hospedero, finalmente el hongo debe ser transmitido a otro hospedero. Esta interacción ha co-evolucionado entre el hongo y su hospedero para responder a la selección natural y maximizar sus aptitudes (Chandler, 2017). Dentro del grupo de los Hipocreales, el complejo de *B. bassiana* es el agronómicamente más importante por su capacidad de adaptación, producción y estabilidad (Dubovskiy, Whitten, Yaroslavtseva, Greig y Kryukov, 2013).

3.3 Beauveria bassiana

Es un hongo anamórfico de la familia *Clavicipitaceae*, presenta conidióforos curvos con racimos densos, hifas hialinas y esporas holoblásticas. En el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés), la colonia crece de manera lenta, con apariencia lanosa y de color blanco, las hifas aéreas son algodonosas y cuando la colonia tiene más de siete días se forma una capa polvorienta de esporas (Fernandes, Costa, Moraes, Zahner y Pinheiro Bittencourt, 2006).

B. bassiana fue por primera vez descrito hace más de 180 años, identificado como un patógeno del gusano de seda. Este hongo se encuentra en diferentes ambientes: suelo, plantas e insectos, ya que, puede estar dispuesto

como micelio saprófito, como propágulos inactivos o como hongos endófitos de plantas (Imoulan, Hussain, Kirk, El Meziane y Yao, 2017).

B. bassiana es el hongo más usado para el control de insectos plaga, por la inducción de resistencia frente a estos insectos y microorganismos fitopatógenos (Fernandes, Costa, Moraes, Zahner y Pinheiro Bittencourt, 2006). *B. bassiana* cuando es utilizado como insecticida presenta un mecanismo de acción complejo, pues existen alrededor de 300 toxinas que son liberadas en el momento de la penetración, esta es la razón por la cual presenta un índice de resistencia bajo por parte del insecto diana (Mascarin y Jaronski, 2016).

3.3.1 Modo de acción del hongo

B. bassiana, actúa en siete pasos: 1. La espora o conidio debe adherirse a la cutícula, para esto presenta hidrofobinas que ayudan a realizar interacciones hidrofóbicas con la capa más externa de los insectos. De estas, dos proteínas han sido caracterizadas Hyd1 y Hyd2. La Hyd1 y la Hyd2 se encuentran solo en la capa externa de las esporas y se ubican en la base de la zona de geminación de la espora, indicando que son proteínas necesarias para comenzar la adherencia del hongo hacia el insecto. 2. El conidio forma un tubo germinativo y apresorio. 3. La cutícula es penetrada por presión mecánica y degradación enzimática. 4. Se habilita el crecimiento del hongo dentro del hemocele, tejidos internos del insecto, donde cambia el crecimiento como blastoesporas unicelulares, estas estructuras son de menor tamaño e ideales para su transporte dentro del cuerpo del insecto. 5. Estas células se alimentan de los interiores del insecto hasta matarlo. 6. El hongo produce y secreta toxinas específicas que degradan las estructuras internas de la larva. 7. El hongo sale del cadáver del insecto a diseminar sus esporas en el ambiente y así seguir su ciclo. Para que se considere una invasión exitosa el hongo debe sobrepasar la acción del sistema inmune del huésped (Valero-Jiménez, Wiegers, Zwaan, Koenraadt y van Kan, 2016).

El ingreso y la degradación de la cutícula son las fases que determinan la virulencia del hongo y se producen en la parte más externa del insecto. Uno de los componentes más importantes de la cutícula es la quitina, que es un polisacárido no ramificado construido por monómeros de N-acetilglucosamina.

La quitina constituye parte de la pared celular de hongos y del exoesqueleto de artrópodos (Muthukrishnan, Merzendorfer, Arakane y Yang, 2016). Para los artrópodos, el uso de quitina como polímero principal, es por la demandante versatilidad de la cutícula en respuesta al estrés del ambiente, a los que han sido sujeto durante millones de años de evolución en ambientes tanto acuáticos como terrestres. La presencia de grupos amida dentro de este polímero de quitina incrementa las oportunidades de enlaces de hidrógeno, lo que confiere la posibilidad de unirse con otros grupos funcionales del insecto (Harrison, Bonning, Harrison, y Bonning, 2010).

La quitina puede ser degradada por las quitinasas de *B. bassiana*, las que han demostrado tener una función crucial en la capacidad de virulencia. Los grupos más importantes de toxinas son las quitinasas (Dubovskiy et al., 2013). La sobre expresión de quitina Bbchit1 incrementa la virulencia por duplicar la eficiencia y acelerar la infección, otras quitinasas como la Chi1 y Chi2, también son muy importantes para la infección del hongo (Valero-Jiménez et al., 2016).

Las quitinasas son polisacáridos compuestos por N-acetylglucosamina estas son enzimas muy importantes, ya que, son las encargadas de causar la hidrólisis de la cutícula de la larva facilitando la penetración de otras estructuras del hongo. Además, ayudan a la germinación las esporas de *B. bassiana* cuando están frente al patógeno (García-Estrada, Cat y Santamarta, 2016). Las quitinasas más importantes son: quitobiosidasa, endoquitinasa y N-acetilquitobiosidasa; las enzimas quitobiosidasa y N-acetilquitobiosidasa son enzimas que degradan la cutícula de la larva relacionándose directamente con la virulencia de *B. bassiana*; las endoquitinasas son enzimas responsables de la degradación de la componentes de la quitina que se encuentran en los tejidos internos del cuerpo del insecto, al momento de la degradación se dividen en unidades de bajo peso molecular volviéndolas solubles (Maryam, Reza, y Gausul, 2015).

3.3.2 Producción industrial

La producción de esporas se lo realiza en su mayoría por una fermentación en estado sólido, esta fermentación involucra el crecimiento del microorganismo a propagar y un sustrato húmedo el cual le proveerá de agua y

elementos esenciales para su crecimiento. Los medios de cultivo tienen tres diferentes fases: solido, líquido y gaseoso. Lo que permite que el microrganismo se desarrolle de manera óptima (Berovic, 2019).

Durante las últimas décadas, este tipo de producción de microorganismos se ha incrementado, ya que necesita menos energía para producir altos rendimientos. La mayor ventaja de este tipo de fermentación sobre otros, es el bajo costo de los sustratos, ya que son provenientes de residuos agrícolas o productos menos costosos, como el arroz, debido a su abundancia y precio bajo lo hace ideal para la fermentación sólida. Esta fermentación tiene también sus limitaciones, como es la baja cantidad de agua que limita el rango de microorganismos que se pueden producir, entre otros (Berovic, 2019).

La fermentación a gran escala de *B. bassiana* tiene variables que deben manejarse correctamente para que sea un controlador efectivo, tales como: forma de aplicación, estabilidad, costo y viabilidad del propágulo. Estas características se las obtiene dependiendo de la formulación que se realice, ya sea sólida, semisólida o líquida (Gola, Kaushik, Mishra y Malik, 2019).

La fermentación semisólida de *B. bassiana* se ha realizado en sustratos como arroz y avena por su amplia disponibilidad y bajo costo (Jaronski, 2013). El sustrato de producción en estos casos, también puede ser usado en la formulación, ya que éste pueden contener metabolitos secundarios del hongo en crecimiento que pueden aumentar la eficiencia del producto (Grzywacz, Moore, y Rabindra, 2013). El sustrato de producción puede estimular la producción de enzimas, la rapidez de crecimiento, la estabilidad y la virulencia de esporas de *B. bassiana* (Mejía, 2018).

Plutella xylostella es una de las plagas más destructivas y económicamente importantes del mundo, su capacidad de adaptación y resistencia a métodos fitosanitarios convencionales lo convierte en un problema para la agricultura mundial (Furlong, Wright, y Dosdall, 2013b). Trabajos de investigación se han realizado para buscar una alternativa a este problema, entre ellos: búsqueda de nuevas moléculas insecticidas con mayor especificidad (Haseeb, Liu, y Jones, 2004), uso de toxinas de bacterias entomopatógenas (de Oliveira Pimenta et al., 2020), multiplicación de depredadores naturales (Cordero

y Cave, 1992), entre otras. En el caso de los hongos entomopatógenos, se ha demostrado que, por sus diferentes mecanismos de acción, es eficiente en controlar a *P. xylostella* (Wang, You, y Wang, 2015). Dentro de los hongos en discusión *B. bassiana* uno de los hongos más versátiles por su rápida y simple manera de producción, por su alta resistencia a cambios de temperatura y humedad y su gran capacidad de esporulación (Singh et al., 2015). La forma de producción del hongo tiene la misma importancia que hongo *per se*, es por ello que conocer el comportamiento de este microorganismo en diferentes sustratos, es de gran importancia, debido a que de él dependen factores como virulencia, rendimiento y viabilidad, características cruciales para identificarlo como controlador de plagas (Mascarin y Jaronski, 2016).

Me hace falta en la introducción algo que introduzca los medios de cultivo y por qué se utilizarán los seleccionados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la virulencia *in vitro* de esporas de *Beauveria bassiana* AgR F504 para el control de *Plutella xylostella*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar el rendimiento y calidad de esporas de *B. bassiana* AgR F 504 en medios de cultivo a base de arroz y avena, y en el medio comercial Sabouraud.

- Probar *in-vitro* la virulencia de esporas de *B. bassiana* AgR F 504 obtenidos, en el control de larvas de *Plutella xylostella.*

- Determinar la cantidad de quitinasas producidas por las esporas de *B. bassiana* AgR F 504 en los tres medios de cultivos utilizados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se realizó en el Centro de Investigaciones AgResearch, ubicado en la ciudad de Lincoln, provincia de Canterbury, Nueva Zelanda. Este centro se encarga de desarrollar alternativas de producción para la agricultura del país y mundial.

4.1 Reactivación de cepa de *Beauveria bassiana* AGR F504

La cepa de *B. bassiana* AgR F504 fue proporcionada por AgResearch donde se mantuvo conservada en PDA, a 4 °C. El hongo fue reactivado en medio de cultivo Sabouraud e incubado durante siete días a 24 °C para verificar su viabilidad (L. Villamizar, comunicación personal, 20 de julio de 2019)

4.2 Fermentación semisólida de esporas de *Beauveria Bassiana* AgR F504 producidos en diferentes sustratos

La producción de esporas por fermentación semisólida evaluó dos sustratos de uso industrial, avena y arroz, y como control se utilizó el medio de cultivo comercial Sabouraud, el mismo que maneja el laboratorio AgResearch para la producción del hongo (Homolka, 2013).

Se preparó una suspensión de esporas mediante el raspado del micelio superficial de cajas Petri con medio Sabouraud, incubadas durante siete días a 24°C. Para llegar a la concentración requerida, realizamos diluciones seriadas en base 10 mediante conteos en cámara de Neubauer hasta obtener la concentración de 10^7 esporas por mL (Wolk et al., 2000).

Los medios semisólidos de arroz y avena fueron preparados a una concentración de 10% en agua destilada, y el medio Sabouraud se preparó siguiendo instrucciones del fabricante (ThermoFisher, 2014). Cada medio de cultivo fue vertido en bandejas de aluminio de 31 x 26 x 0.63 cm, suficiente para recibir 200g de medio. Estas bandejas fueron previamente autoclavadas y posteriormente inoculadas con 5 mL de la suspensión de esporas de *B. bassiana* AgR F504 (Figura 1).



Figura 1. Bandeja de aluminio con sustrato de arroz previo al autoclavado.

Después de la inoculación, las bandejas fueron cubiertas con plástico elástico e incubadas a 23°C en obscuridad durante 14 días. Pasados los primeros siete días, se removió el plástico y se reemplazó por papel servilleta, para permitir la deshidratación del medio.

Se realizaron cortes circulares de 78.54mm^2 con un sacabocado de forma aleatoria en diferentes partes de la superficie del medio. Se tomaron tres muestras por bandeja que fueron homogeneizadas mecánicamente con 5mL de Tween 80 al 0,1% contenidos en tubos Falcon® de 10mL. Para conteo de esporas en diferentes tiempos

Después de los 14 días, esporas fueron recuperados mediante barrido de la superficie del medio deshidratado con una espátula. Luego fueron envasados en tubos plásticos, guardados bajo condiciones de refrigeración y utilizados para todos los ensayos realizados en la tesis.

4.3 Evaluación de la germinación y rendimiento de esporas de *Beauveria bassiana* Agr 504 en crecimiento en diferentes sustratos

En el medio de cultivo deshidratado se realizaron cortes circulares de 10mm^2 con un sacabocado limpio. Las tres muestras obtenidas fueron disueltas en tubos Falcon® de 10mL con 5mL de Tween 80 al 0,1%, y agitadas mecánicamente. Después se realizaron diluciones seriadas para el recuento en cámara de Neubauer de las esporas presentes (Mejía, 2018).

4.3.1 Germinación

La geminación determina la calidad de esporas, para esto, se evaluó las esporas obtenidas de las bandejas de fermentación. Pasados los 14 días de incubación, se obtuvo 10mg de esporas de los tres medios de cultivo mediante raspado superficial. Esporas se suspendieron en 990µL de solución Tween 80 al 0,5%, se diluyeron en serie hasta 10^{-4} y posteriormente, se los sembró por superficie en cajas Petri con medio agar agua + Tritón. Las diluciones fueron sembradas por triplicado desde 10^{-1} hasta 10^{-4}. En cada caja Petri se vertió 100µL y luego se incubó a 23°C. Los datos de esporas germinadas fueron registrados después de 14 días en tres tiempos (16, 20 y 24 horas).

Las esporas fueron observadas mediante microscopio compuesto con 400x de aumento total. Para el montaje se añadió una gota de azul de lactofenol sobre el medio de cultivo. Las cajas Petri reposan por un minuto hasta que el tinte sea absorbido por el agar. Después se realizaron cortes de aproximadamente 1 cm^2 de la superficie del agar, en la misma zona donde se colocó la gota del colorante. El porcentaje de esporas fue obtenido después de contabilizar 100 esporas por cada sustrato diluido. Se diferenció las esporas geminadas y no germinadas, donde se consideró como esporas germinadas aquellas que presentaron tubo germinativo como se observa en la figura 2 (Bustillo, s.f.; Mejía, 2018).

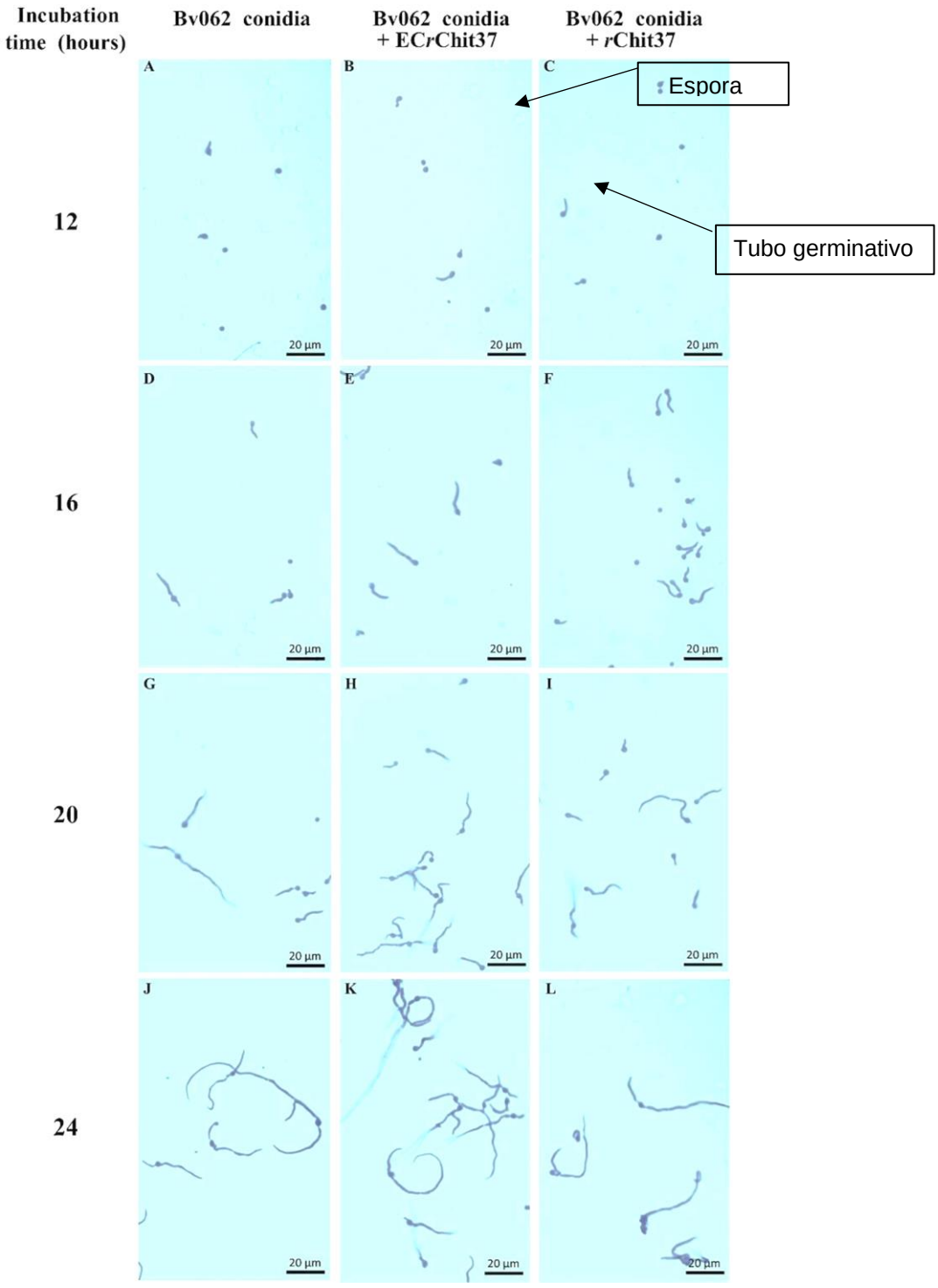


Figura 2. Desarrollo del tubo germinativo de esporas de *Beauveria bassiana* (Bv062) solo y en combinación con rChit37, en aumento total 400X. Se observa el crecimiento progresivo del tubo germinativo desde la hora 12 hasta la 24 en intervalos de cuatro horas y en tres tratamientos(Lovera, Belaich, Villamizar, Patarroyo, y Barrera, 2020)



Figura 3. Esporas con tubo germinativo (aumento total 400x) (Lovera et al., 2020)

4.3.2 Rendimiento

Para cuantificar el rendimiento en esporas sobre gramo (con/g), se utilizaron las mismas diluciones para el ensayo anterior, contabilizando las esporas en cámara de Neubauer (dilución 10^{-4}). Con estos datos se calculó la cantidad de esporas que existe por gramo seco. Los conteos de este ensayo fueron realizados por triplicado (Mejía, 2018).

4.4. Evaluación de la virulencia

4.4.1 Actividad insecticida (bioensayo)

Para la actividad insecticida se utilizaron larvas de *P. xylostella* obtenidas de una cría de más de seis meses de generaciones constantes. Para la cría de una generación nueva se introdujeron 80 adultos por jaula con malla de tela. En cada jaula se ubicaron cuatro bebederos de agua con miel orgánica en una proporción 1:10 y, además, se incorporaron 12 plantas de col (*Brassica oleracea*), de un mes de edad, las cuales fueron mantenidas bajo invernadero en ambiente controlado (80% de humedad y 20°C). Se prepararon dos jaulas para obtener suficientes larvas y fueron mantenidas por tres semanas en invernadero hasta obtener larvas en instar tres, como se muestra en la figura 3.



Figura 2. Jaula para la cría de *P. xylostella*. Interior de la jaula con 12 plantas de col y bebederos de agua y miel, para la producción de nuevas generaciones de *P. xylostella*.

El bioensayo consistió en infectar 12 larvas de *P. xylostella* en segundo o tercer instar con soluciones de diferentes concentraciones de esporas de *B. bassiana* Agr F504 (Fernández, Londoño y Jaramillo, 2009). Las larvas fueron ubicadas en un recipiente plástico desechable de 5 onzas y se alimentaron con un disco de 2 cm de diámetro de hojas de col orgánica fresca cortadas con un sacabocados estéril. Cada uno de los recipientes con 12 larvas y el disco de col fueron considerados una unidad experimental. Los discos de col fueron sumergidos en las soluciones de esporas provenientes de los tres sustratos experimentados (avena, arroz y Sabouraud) diluidos en agua destilada. De cada solución se obtuvieron cuatro diluciones, desde la menos concentrada con 10^4 hasta la más concentrada 10^8. Los discos de col fueron sumergidos por un minuto y después reposaron al ambiente sobre papel toalla nueva hasta la evaporación del diluyente. Como control se utilizó agua destilada.

Los tratamientos (diluciones por sustrato) y el control fueron realizados por triplicado y se los ubicó en una incubadora entomológica a 24°C, en completa oscuridad durante siete días. Se evaluó el número de larvas vivas y muertas (sin movimiento) en cada uno de los recipientes y el registro de datos se realizó los días dos, cuatro y siete.

La dosis letal media o LD_{50} (por sus siglas en inglés) en este experimento fue la concentración mínima de esporas de *B. bassiana*, capaz de eliminar el 50% de la población de *P. xylostella* (CCSSO, 2006). La LD50 fue calculada mediante el uso el análisis probit de los datos utilizando el programa Biostat.

El bioensayo fue considerado correcto cuando la tasa de mortalidad del control al final de la evaluación fue menor al 5%. Esto demuestra que el diluyente no intervino en la mortalidad de las larvas y el efecto de la mortalidad solo es ocasionado por las soluciones probadas (Mejía, 2018).

4.5 Cuantificación de la acción enzimática

4.5.1 Solución de esporas

Se pesaron 10mg de esporas recuperados de los medios de cultivo de la fermentación semisólida, se adicionó 0.9mL de solución Tween 80 al 1%, y esta suspensión se agitó por una hora a 3000rpm a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos (Mejía, 2018).

4.5.2 Solución de extracto de medio de cultivo

Los extractos de medio de cultivo también se obtuvieron de las bandejas donde se realizó la fermentación semi sólida en avena, arroz y agar Sabouraud. Con una paleta de acero previamente autoclavada, se tomó 10mg del medio de cultivo procurando no hacer contacto con el micelio del hongo. El medio recuperado se ubicó en tubos Falcon® de 1.5mL, donde se agregó 9mL de solución Tween 80 al 1% y se agitó hasta su homogenización completa (Nayibe y Maldonado, 2018).

4.5.3 Valoración de la acción de las quitinasas

Para la evaluación de acción de las quitinasas (quitobiosidadas, quitotriosa y N-acetilbiosidasa) se utilizó el kit de ensayo de quitinasas (The Chitinase Assay Kit). Esta prueba se basa en la hidrólisis enzimática de sustratos de quitinasas, donde se libera p-nitrofenol (4-nitrofenol), que, por ionización en pH básico, se puede medir por espectrofotometría a 405 nm (Sigma-Aldrich, s.f.).

Las soluciones preparadas tanto de esporas como de medios de cultivo, fueron calentadas por una hora a 37°C, los grupos reductores fueron medidos

en un espectrofotómetro de placa (BMG Labtech FLOUstar Omega), a una longitud de onda de 405nm, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los valores fueron calculados en unidades de quitinasas por mililitro con la siguiente fórmula.

$$\frac{units}{ml} = \frac{(A_{405}\, sample - A_{405}\, blank) \times 0.05 \times 0.3 \times DF}{A_{405}\, standard \times time \times V_{enz}}$$

Units: una unidad resulta 1.0 mmol de p-nitrofenil del sustrato por minute a un pH de 4.8 y a una temperatura de 37°C

A^{405} sample: absorbancia de la muestra a 405nm

A^{405} blank: absorbancia del blanco a 405nm

0.05: ≠mole/ml de p-nitrofenol en la solución estándar

0.3: volumen final de la placa de 96 pocillos después de añadir la solución stop

DF: factor de dilución a la que se realizó el ensayo

A^{405} standard: absorbancia de la solución estándar a 405nm

Time: minutos

Venz: volumen de la muestra

4.6 Análisis de datos

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar en arreglo factorial para las variables germinación y cuantificación de quitinasas y para el bioensayo. Mientras que, para el rendimiento de esporas se utilizó un diseño de bloques completamente al azar no factorial.

Previo al análisis de la variancia, se realizó la prueba de normalidad para las variables evaluadas. Cuando no existió normalidad en los datos, se realizó la transformación de estos utilizando la raíz cuadrada. Los datos transformados se utilizaron para el análisis estadístico al 5 y 1% y se presenta el ADEVA en las tablas.

Cuando los factores en estudio, las interacciones y los tratamientos presentaron diferencias estadísticas, se realizó el análisis funcional (Post hoc), utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey (5%). Para este análisis se utilizó los valores originales (no transformados). Además, se calcularon los promedios y desviación estándar para las diferentes variables.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Reactivación de la cepa y fermentación semisólida

El micelio blanco, la textura algodonosa, el borde entero y la superficie convexa son las características de las colonias de *B. bassiana* reactivadas (Figura 4), esta descripción macroscópica concuerda con lo descrito por Carranza Díaz (2011). Mientras que, las esporas se presentaron hialinas, lisas y de forma globosa (García, 2014).

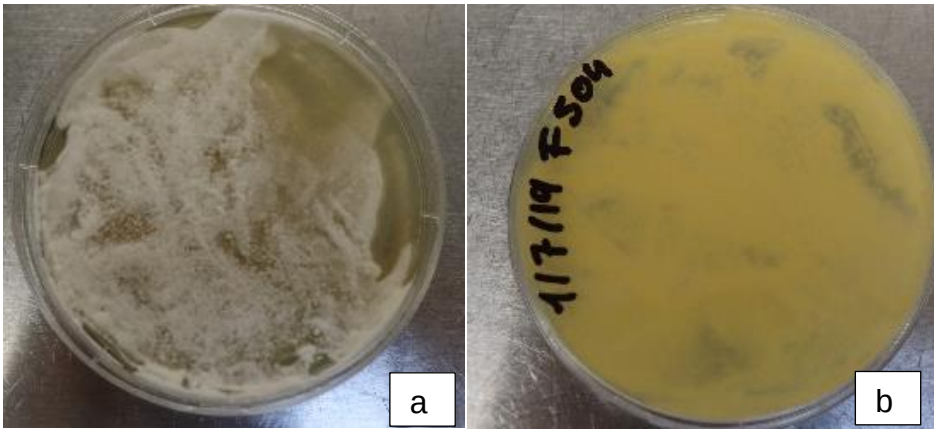


Figura 3. Crecimiento de *Beauveria Bassiana* AgR F504. Medio de cultivo Sabouraud presenta micelio de color blando (a. anverso), después de siete días de incubación a 20°C (b. reverso).

Las bandejas de fermentación obtuvieron la concentración de esporas deseada (10^8), presentando crecimiento fúngico blanco y puro, que cubrió totalmente la superficie de los sustratos (Figura 5).

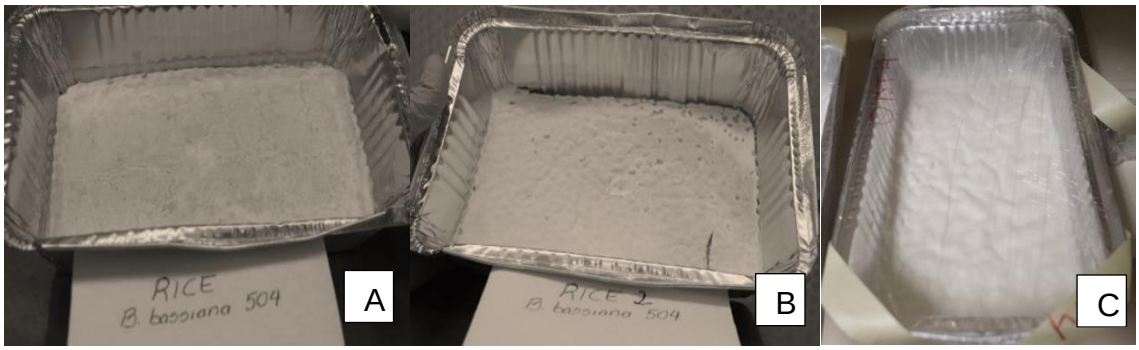


Figura 4. Bandejas con crecimiento de *Beauveria Bassiana* AgR F504. Sustrato de arroz semisólido (A y B). Sustrato de avena semisólido (C).

5.2 Evaluación de la germinación y rendimiento

5.2.1 Efecto de los sustratos en la germinación

La calidad de esporas se evaluó mediante el porcentaje de germinación (Figura 6) y el ANOVA resultante presenta diferencias altamente significativas para todos los factores en estudio (Tabla 1).



Figura 5. Esporas germinadas de *Beauveria bassiana* AgR F504. Esporas y tubos germinativos teñidos con azul de lactofenol, observadas con aumento total de 400x.

Tabla 1. Análisis de varianza del porcentaje de germinación de las esporas de *Beauveria bassiana*

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios
Total	107	32679.07	
Sustratos (S)	2	15529.86	7764.93**
Tiempo (T)	2	7018.09	3509.045**
S x T	4	3314.88	828.72**
Rep	11	535.35	48.6681818
E.E.	88	6280.89	71.37375

** Significancia estadística al 1%

Los promedios de germinación en los tres sustratos (Tabla 2), presentan al medio Sabouraud y al sustrato avena, dentro del mismo rango (a). Sin embargo, la germinación en Sabouraud y avena fue más alta que en arroz. Esto puede producirse por las diferencias nutricionales de los medios de cultivo, el nitrógeno por ejemplo, es uno de los elementos importantes para la germinación, por su participación en la composición de proteínas y el carbono en carbohidratos, en este sentido la relación de carbono/nitrógeno de la avena es 19:1 mientras que la relación en el arroz es de 43:1 (Cliquet y Jackson, 1999).

Estos resultados coinciden con lo descrito por (Mejía, 2018), donde en la prueba de germinación de *B. bassiana* se pudo observar diferencias significativas en los conidios por gramo entre la avena y el arroz.

Tabla 2. Promedios y desviación estándar de la germinación de *B. bassiana AgR F504* para la interacción sustrato por tiempo

Sustrato x tiempo	Germinación (%)	
Sabouraud 24h	99.2 ± 0.5	a
Avena 24h	97.4 ± 1.9	ab
Sabouraud 20h	95.3 ± 3.0	abc
Avena 16h	87.4 ± 10.0	bcd
Sabouraud 16h	84.6 ± 5.2	cd
Avena 20h	82.7 ± 4.2	d
Arroz 24h	80.8 ± 9.7	de
Arroz 20h	70.8 ± 15.7	e
Arroz 16h	46.2 ± 11.0	f

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05)

Para que la germinación pueda comenzar existe un número de factores bióticos y abióticos que son esenciales, dentro de los elementos orgánicos necesarios para iniciar la germinación encontramos glucosa, fosfatos y aminoácidos (Sephton-Clark y Voelz, 2018). Según datos reportados por Mejía (2018), las esporas de *B. bassiana* obtenidas en arroz contienen 3.28 mg/g de glucosa y las de avena 2.97 mg/g. Sin embargo, estudios han demostrado que la cantidad de glucosa que tiene la espora no determina su germinación (Iskandarov, Guzalova, y Davranov, 2006). Tomando en cuenta los mencionado anteriormente, podemos observar en la tabla 3 el comportamiento de las esporas obtenidas de distintos sustratos.

Tabla 3 Promedio y desviación estándar de la germinación de *B. bassiana* AgR F504 para el tratamiento sustratos

Sustratos	Germinación (%)	
Sabouraud	93.06 ± 7.1	a
Avena	89.17 ± 8.8	a
Arroz	65.2 ± 19.0	b

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05)

5.3 Efecto de los sustratos en el rendimiento

La cantidad de esporas producidas fueron evaluadas por el análisis de la varianza y no se obtiene diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 4), lo que indica que, la cantidad de esporas producidas son similares independientemente de que sustrato provenga, no obstante para la producción masiva de estos hongos se debe considerar que si existe una diferencia práctica entre la cantidad de esporas contabilizadas en los diferentes sustratos (tabla 5), siendo así que, se debe considerar tanto la producción de esporas como su germinación (Rodríguez-Gómez, Loera, Saucedo-Castañeda, y Viniegra-González, 2009).

Tabla 4. Análisis de varianza del rendimiento de *B. bassiana* AgR F504 en tres sustratos

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios
Total	11	1.23×10^{19}	
Trat	2	7.75×10^{17}	3.9×10^{17ns}
Rep	3	5.87×10^{18}	1.96×10^{18}
E.E.	6	5.68×10^{18}	9.46×10^{17}

Tabla 5. Promedios y desviación estándar de la cantidad de esporas de *Beauveria bassiana* AgR F504 (conidios/mm^2) producidas en diferentes sustratos

Tratamiento	Rendimiento (conidios/mm^2)
Arroz	$4.55 \times 10^9 \pm 9.83 \times 10^8$
Sabouraud	$4.49 \times 10^9 \pm 1.61 \times 10^9$
Avena	$3.99 \times 10^9 \pm 5.30 \times 10^8$

5.4 Cuantificación de quitinasas

Los análisis de varianza de la producción de las tres quitinasas en los sustratos estudiados (Tabla 6) encuentran diferencias altamente significativas para los tratamientos sustratos, muestras y su interacción.

En la tabla 7 se presentan los promedios de producción de estas enzimas en los diferentes sustratos, siendo el medio Sabouraud el que presenta los

promedios más altos, la diferencia entre Sabouraud y la avena y el arroz es de más del doble, esto puede darse porque existe una correlación entre el valor nutricional de los medios de cultivo con respecto a la producción de enzimas, en este caso el medio Sabouraud es el medio con mayor complejo nutricional con la presencia de peptona, glucosa, mismos que tienen mayor incidencia en el crecimiento y desarrollo de *B. bassiana* como lo describe Safavi *et al*., (2007). Los promedios de quitinasas (unidad/g) producidos en el sustrato Sabouraud, lo presentan como el sustrato que induce a una mayor producción de esta enzima (Tabla 7), ya que, en todos los análisis se presentan más del doble de la cantidad que produce el arroz y la avena. Esto puede deberse a que las altas cantidades de carbono y nitrógeno mejoran la expresión de quitinasas (Karthik, Akanksha, Binod y Pandey, 2014). El medio de cultivo utilizado contiene como fuente de carbono la peptona, que es una molécula de fácil asimilación para *B. bassiana.* En el caso de la quitobiosidasa y quitotriosa, el arroz presenta mayor producción de estas dos enzimas, el arroz tiene mayor cantidad de glucósidos por cada gramo de harina de arroz, esto puede marcar la diferencia entre la producción enzimática en comparación a la avena (Safavi et al., 2007).

Tabla 6. Análisis de varianza de la producción de Nitrofenil, Quitobiosidasa y Quitotriosa de *B. bassiana AgR F504* (unidad/ g) producidos en diferentes sustratos y muestras

	Nitrofenil			Quitobiosidasa			Quitotriosa		
F de V	**gl**	**SC**	**CM**	**gl**	**SC**	**CM**	**gl**	**SC**	**CM**
Total	35	45.61		35	9.15		11	1.43	
Sustrato	2	13.39	6.695 **	2	0.51	0.26**	2	0.12	0.06**
Muestra	1	18.31	18.31**	1	7.76	7.76**	1	1.16	1.16**
Sust x Mues	2	13.42	6.71**	2	0.63	1.31**	2	0.13	0.065**
Rep.	5	0.02	0.004	5	0.02	0.0038	1	0.0031	0.0031
E.E.	25	0.48	0.0192	25	0.23	0.01	5	0.01	0.002
C.V. %	18.7			15.48			10.65		

** Significancia estadística al 1%

Tabla 7. Promedios y desviación estándar de Nitrofenil, Quitoviosidasa y Quitotriosa producidos por *B. bassiana AgR F504* (unidad/ g) en diferentes sustratos

Sustratos	Nitrofenil (unidad/g)	Quitobiosidasa (unidad/g)	Quitotriosa (unidad/g)
Sabouraud	1.6 ± 1.65 a	1.02 ± 1.05 a	0.58 ± 0.64 a
Arroz	0.37 ± 0.42 b	0.57 ± 0.65 b	0.23 ± 0.27 b
Avena	0.24 ± 0.22 b	0.35 ± 0.32 c	0.20 ± 0.19 c

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05*)*

El análisis estadístico de la cantidad de quitinasas (Tabla 8), presentó una clara diferencia entre la cantidad de quitina que existe en las esporas en comparación con el medio de cultivo. Esto se debe a que, el hongo cultivado en un medio semisólido produce esporas en la superficie y el micelio crece dentro del medio de cultivo (Dubovskiy et al., 2013). Aunque, el micelio sea una estructura del hongo no secreta enzimas. Después de observar los datos se puede reconocer que, la diferencia entre las unidades de quitina por gramo (Tabla 8) en la media más baja (avena x medio), es 21 veces mayor que lo encontrado en el medio de cultivo Sabouraud x espora. Esto descarta el uso del medio de cultivo como un ingrediente que puede ser añadido a los productos biológicos para incrementar su capacidad biocontroladora.

Tabla 8. Promedios y desviación estándar de Nitrofenil, Quitobiosidasa y Quitotriosa obtenido de diferentes muestras

Muestra	Nitrofenil (unidad/g)	Quitobiosidasa (unidad/g)	Quitotriosa (unidad/g)
Espora	1.45 ± 1.27 a	1.27 ± 0.64 a	0.65 ± 0.38 a
Medio	0.02 ± 0.01 b	0.3 ± 0.01 b	0.03 ± 0.01 b

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05*)*

En la tabla 9, podemos observar que, el análisis de las interacciones de los medios de cultivo con el origen de la muestra, confirma lo observado en la tabla 7 y 8, donde las esporas en medio Sabouraud tienen una producen mayor cantidad de quitinasas, seguido por sustrato arroz y por último la avena.

Tabla 9. Promedios y desviación estándar de la interacción de Nitrofenil, Quitobiosidasa y Quitotriosa de *B. bassiana* AgR F504 (unidad/ g) obtenidos de dos muestras y cultivados en tres sustratos

Sustrato x Muestra	Nitrofenil (unidad/g)	Quitobiosidasa (unidad/g)	Quitotriosa (unidad/g)
Sab x Espora	3.17 ± 0.17 a	2.01 ± 0.26 a	1.13 ± 0.05 a
Arroz x Espora	0.73 ± 0.73 b	1.13 ± 0.42 b	0.45 ± 0.15 b
Avena x Espora	0.45 ± 0.01 c	0.66 ± 0.05 c	0.37 ± 0.04 b
Sab x Medio	0.02 ± 0.01 d	0.3 ± 0.0043 d	0.03 ± 0.01 c
Arroz x Medio	0.01 ± 0.003 d	0.01 ± 0.0028 d	0.01 ± 0.0028 c
Avena x Medio	0.04 ± 0.0015 d	0.04 ± 0.002 d	0.04 ± 0.0009 c

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05*)*

5.5 Evaluación de la virulencia

La mortalidad de *P. xylostella* por efecto de *B. bassiana* se analizó en los días cuatro y seis después de la inoculación (Tabla 10). En el día cuatro no existieron diferencias estadísticas con respecto a la mortalidad del insecto tanto para tratamientos como para su interacción. Mientras que, para el sexto día los efectos para sustratos, diluciones y su interacción fueron evidentes.

Tabla 10. Análisis de varianza de la mortalidad de *P. xylostella* por la infección de *B. bassiana AgR F504* producida en tres sustratos y cinco concentraciones diferentes

		Mortalidad (%)			
		Dia 4[1]		Día6 [1]	
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Suma de cuadrados	Cuadrado medio
Total	44	89.85		150.94	
Sustrato	2	4.14	2.07 [ns]	6.84	3.42**
Dilución	4	15.19	3.7975 [ns]	112.24	28.06**
Sust x Dil	8	22.31	2.78875[ns]	15.21	1.90**
Rep.	2	0.48	0.24	1.60	0.80
E.E.	28	47.73	1.70	15.02	0.54
C.V. (%)		25.5		9.46	

** Diferencias estadísticas al 1 %; ns: no existen diferencias estadísticas; [1] Datos transformados utilizando raíz cuadrada

En la tabla 11 se aprecian tres rangos para la mortalidad de *Plutella*, obteniéndose el mayor porcentaje cuando *B. bassiana* fue cultivado en avena (61.1 %), mientras que, la mortalidad del insecto cuando *Beauveria* fue cultivado en arroz fue del 46.38%.

Tabla 11. Promedios y desviación estándar de la mortalidad de *P. xylostella* ocasionada por *B. Bassiana* AgR F504 en tres sustratos al sexto día

Sustratos	Mortalidad (%)	
Avena	61.11 ± 28.81	a
Sabouraud	52.22 ± 29.29	ab
Arroz	46.38 ± 28.25	b

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05)

El mayor porcentaje de mortalidad del insecto, observado a los seis días después de la inoculación, se obtuvo en la concentración de 10^8 esporas de *B. bassiana*, alcanzando un 95,37% (Tabla 12). En general, estos resultados indican que a mayor concentración de la espora del hongo se incrementa la mortalidad de los insectos esto concuerda con lo expuesto por Mascarin y Jaronski (2016).

Tabla 12. Promedio y desviación estándar de la mortalidad de *P. xylostella* causada por *B. bassiana* en cinco diluciones

Concentración de esporas	**Mortalidad (%)**	
1.0E+08	95.37 ± 6.05	a
1.0E+07	65.74 ± 22.61	b
1.0E+06	45.66 ± 12.07	c
1.0E+05	36.11 ± 12.50	cd
1.0E+04	23.48 ± 11.83	d

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05)

El análisis de la interacción entre la concentración y el sustrato (Tabla 13), no encontró diferencias estadísticas en cuanto a la mortalidad en la dilución 10^8, todas forman parte de una misma categoría. Sin embargo, esta es la más relevante, ya que, en la mayoría de los productos biocontroladores la

concentración más recomendada es 10^8 (Mascarin y Jaronski, 2016). Esto indica que, aunque la expresión de quitinasas es importante para la capacidad insecticida de *B. bassiana*, no es el factor principal (Sánchez-Pérez et al., 2014). La prueba enzimática reporta que Sabouraud es el medio de cultivo que presenta la mayor cantidad de quitinasas, pero, cuando se encuentra en concentraciones bajas, es el sustrato menos efectivo (Tabla 13). Este comportamiento se observa en todos los sustratos y ratifica el análisis reportado en la tabla 12. Sin tomar en cuenta los sustratos, la concentración es un factor homogéneo, mientras menor la concentración menor mortalidad existe, esto se debe a que *B. bassiana* tiene que infectar a su huésped con altas cantidades de esporas, ya que *P. xylostella* tiene mecanismos de defensa que logran impedir la infección completa de la larva (Sánchez-Pérez et al., 2014).

Tabla 13. Promedios de mortalidad (%) de *P. xylostella* al día 6 ocasionado por *B. bassiana* AgR F504 producido en tres sustratos y cinco diluciones

Dilución	Mortalidad (%)
Arroz x10^8	97.22 ± 4.81 a
Avena x x10^8	97.22 ± 12.73 a
Sabouraud x10^8	91.67 ± 8.34 a
Avena x10^7	86.11 ± 12.73 a b
Sabouraud x10^7	69.44 ± 12.73 a b c
Avena x10^6	55.56 ± 12.73 b c d
Sabouraud x10^6	44.45 ± 4.81 c d
Sabouraud x10^5	44.44 ± 12.73 c d
Arroz x10^7	41.67 ± 14.43 c d
Arroz x10^6	36.98 ± 11.64 d e
Avena x10^5	33.34 ± 14.43 d e
Avena x10^4	33.33 ± 0.0 d e
Arroz x10^5	30.56 ± 9.62 d e
Arroz x10^4	25.99 ± 9.8 d e
Sabouraud x10^4	11.11 ± 9.62 e

Medias con letra similar son significativamente iguales (p> 0,05)

5.6 Cálculo del LD_{50}

El análisis probit reportó que la LD_{50} del arroz es 10 veces mayor que la de avena y de Sabouraud. Este valor indica el potencial de formulación del producto, ya que, mientras menor sea la dosis necesaria existe mayor eficiencia por conidio (Gola et al., 2019). En este estudio (Tabla 14), el análisis de la LD_{50} nos indica en qué tipo de sustrato, el hongo produce una espora con mayor

virulencia para el control de *P. xylostella,* en este caso se puede identificar que las esporas provenientes de la avena y de Sabouraud necesitan 10 veces menos concentración para eliminar al 50% de la población de la larva, esto puede darse por la germinación, como podemos observar en la evaluación de las quitinasas las esporas provenientes de sustratos de arroz tienen mayor cantidad de quitinasas, pero la geminación es menor que en el caso del arroz y la avena.

Tabla 14. Valores de LD_{50} de la concentración mínima de *B. bassiana* AgR F504 para eliminar al 50 % de la población de larvas en distintos medios de cultivo

	Avena	**Arroz**	**Sabouraud**
LD_{50}	2.06×10^5	1.50×10^6	7.32×10^5
Error Experimental	0.2	0.97	0.07

El sustrato donde creció *B. bassiana* influye mucho en las características de la espora que se produce, es el caso del arroz, donde los conidios poseen mayor cantidad de quitinasas, pero no tienen la misma capacidad insecticida que la avena. La capacidad de germinación de las esporas de *B. bassiana* cuando crecen en arroz, es uno de los factores que deben ser tomado en cuenta, cuando se realiza una producción en masa, ya que los substratos utilizados deben ser de bajo costo por el volumen a realizar y eficientes al momento de la producción de esporas de buena calidad.

Este estudio se realizó en ambiente controlado (invernadero) y para extrapolar los datos obtenidos, se recomienda realizar pruebas en campo para contrastar los resultados conseguidos en laboratorio y así, generar información válida para el agricultor.

6. CONCLUSIONES

1. El rendimiento y calidad de esporas de *B. bassiana* AgR F 504 cultivadas en medio Sabouraud se presentan con los mejores promedios de producción y germinación. Sin embargo, para la producción masiva de este hongo, el medio de cultivo de arroz se considera ideal, ya que presenta características aceptables de calidad y rendimiento, por ser, además, un material económico y de fácil acceso.

2. La cantidad de quitinasas producidas por las esporas de *B. bassiana* AgR F 504 difiere dependiendo del sustrato donde se cultiva, siendo el medio Sabouraud, el que presenta el mejor rendimiento en comparación a los sustratos de avena y arroz.

3. No se encontró evidencia de que el medio de cultivo donde crecen los hongos puede ser utilizado como aditivo a los formulados de *B*. *bassiana* ya que, la cantidad de quitinasas presentes en los medios de cultivo no fue representativa, en comparación a la cantidad de enzimas que se encontró en las esporas.

4. Es importante tomar en cuenta todos los factores para seleccionar un sustrato durante la producción en masa de *B. bassiana*, ya que, se observó que, aunque el medio de arroz presente mejores características enzimáticas, no tiene buena capacidad germinativa, lo cual disminuye su capacidad insecticida.

5. *P. xylostella* mostró susceptibilidad a *B. bassiana*, lo que indica que es un controlador efectivo para enfrentar a la plaga, no obstante, se deberá realizar investigaciones enfocados a la producción masiva y su resultado cuando es probado en cultivos *in-vivo*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Berovic, M. (2019). Cultivation of Medicinal Mushroom Biomass by Solid-State Bioprocessing in Bioreactors. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 169, pp. 3–25). https://doi.org/10.1007/10_2019_89

Bustillo, E. (n.d.). Aspecto microscópico de la germinación a las 24 horas de incubación en... | Download Scientific Diagram. Retrieved September 2, 2020, from https://www.researchgate.net/figure/Figura-2-Aspecto-microscopico-de-la-germinacion-a-las-24-horas-de-incubacion-en_fig4_276059241

CABI. (2014). Plutella xylostella (diamondback moth). Retrieved October 17, 2019, from https://www.cabi.org/isc/datasheet/42318#top-page

Carranza Díaz, Z. (2011). *Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más competentes en medio de cultivo sólido*. ICAp-BD-UAEH.

CCSSO. (2006). Respuestas OSH: ¿Qué es un LD50 y LC50? Retrieved September 2, 2020, from http://www.ccsso.ca/oshanswers/chemicals/ld50.html

Chandler, D. (2017). Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi. In *Microbial Control of Insect and Mite Pests* (pp. 69–89). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803527-6.00005-6

Cliquet, S., & Jackson, M. A. (1999). Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of Paecilomyces fumosoroseus blastospores. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *23*(2), 97–102. https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900698

Cordero, J., & Cave, R. D. (1992). Natural enemies of Plutella xylostella (Lep.: Plutellidae) on crucifers in Honduras. *Entomophaga*, *37*(3), 397–407. https://doi.org/10.1007/BF02373113

de Oliveira Pimenta, I. C., da Silva Nunes, G., de Magalhães, G. O., dos Santos, N. A., Pinto, M. M. D., & De Bortoli, S. A. (2020). Effects of a Bt-based insecticide on the functional response of Ceraeochrysa cincta preying on Plutella xylostella. *Ecotoxicology*, *29*(7), 856–865. https://doi.org/10.1007/s10646-020-02244-x

Duarte, R. T., Gonçalves, K. C., Espinosa, D. J. L., Moreira, L. F., De Bortoli, S. A., Humber, R. A., & Polanczyk, R. A. (2016). Potential of Entomopathogenic Fungi as Biological Control Agents of Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae) and Compatibility With Chemical Insecticides. *Journal of Economic Entomology*, *109*(2), 594–601. https://doi.org/10.1093/jee/tow008

Dubovskiy, I M, Whitten, M. M. A., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., & Kryukov, V. Y. (2013). Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? *PLoS ONE*, *8*(4), 60248. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060248

Dubovskiy, Ivan M., Whitten, M. M. A., Yaroslavtseva, O. N., Greig, C., Kryukov,

V. Y., Grizanova, E. V., … Butt, T. M. (2013). Can Insects Develop Resistance to Insect Pathogenic Fungi? *PLoS ONE*, *8*(4), e60248. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060248

Fernandes, E. K. K., Costa, G. L., Moraes, Á. M. L., Zahner, V., & Pinheiro Bittencourt, V. R. E. (2006). Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of Beauveria bassiana isolates obtained from Boophilus microplus tick. *Parasitology Research*, *98*(4), 324–332. https://doi.org/10.1007/s00436-005-0058-y

French, R. A., & White, J. H. (1960). THE DIAMOND-BACK MOTH OUTBREAK OF 1958. *Plant Pathology*, *9*(3), 77–84. https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1960.tb01156.x

Furlong, M. J., Wright, D. J., & Dosdall, L. M. (2013a). Diamondback Moth Ecology and Management: Problems, Progress, and Prospects. *Annual Review of Entomology*, *58*(1), 517–541. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153605

Furlong, M. J., Wright, D. J., & Dosdall, L. M. (2013b). Diamondback Moth Ecology and Management: Problems, Progress, and Prospects. *Annual Review of Entomology*, *58*(1), 517–541. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153605

García-Estrada, C., Cat, E., & Santamarta, I. (2016). Beauveria bassiana as biocontrol agent: Formulation and commercialization for pest management. In *Agriculturally Important Microorganisms: Commercialization and Regulatory Requirements in Asia* (pp. 81–96). https://doi.org/10.1007/978-981-10-2576-1_5

García, A., García, C., Leshe, J., & Molina, R. (2014). Salud Pública Aislamiento y caracterización morfológica de los hongos entomopatógenos Beauveria bassiana y metarhizium anisopliae. In *HORIZONTE SANITARIO* (Vol. 10). Retrieved from http://www.revistas.ujat.mx/index.php/horizonte/article/view/229

Gola, D., Kaushik, P., Mishra, A., & Malik, A. (2019). Production and shelf life evaluation of three different formulations of Beauveria bassiana in terms of multimetal removal. *Biotechnology Research and Innovation*. https://doi.org/10.1016/j.biori.2019.06.001

Golizadeh, A., Kamali, K., Fathipour, Y., & Abbasipour, H. (2009). Life Table of the Diamondback Moth, Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) on Five Cultivated Brassicaceous Host Plants. In *J. Agric. Sci. Technol* (Vol. 11). Retrieved from Journal of Agricultural Science and Technology website: http://jast.modares.ac.ir/article-23-9848-en.html

Grzywacz, D., Moore, D., & Rabindra, R. J. (2013). Mass Production of Entomopathogens in Less Industrialized Countries. In *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens* (pp. 519–561). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00015-7

Harrison, R. L., Bonning, B. C., Harrison, R. L., & Bonning, B. C. (2010). Proteases as Insecticidal Agents. *Toxins*, *2*(5), 935–953.

https://doi.org/10.3390/toxins2050935

Haseeb, M., Liu, T. X., & Jones, W. A. (2004). Effects of selected insecticides on Cotesia plutellae, endoparasitoid of Plutella xylostella. *BioControl*, *49*(1), 33–46. https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000009377.75941.d7

Imoulan, A., Hussain, M., Kirk, P. M., El Meziane, A., & Yao, Y. J. (2017, December 1). Entomopathogenic fungus Beauveria: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, Vol. 20, pp. 1204–1212. https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.08.015

Iskandarov, U. S., Guzalova, A. G., & Davranov, K. D. (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. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *42*(1), 72–76. https://doi.org/10.1134/S000368380601011X

Jaronski, S. T. (2013). Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. In *Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens* (pp. 357–413). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391453-8.00011-X

Kang, S. W., Lee, S. H., Yoon, C. S., & Kim, S. W. (2005). Conidia production by Beauveria bassiana (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*, *27*(2), 135–139. https://doi.org/10.1007/s10529-004-7871-8

Karthik, N., Akanksha, K., Binod, P., & Pandey, A. (2014). Production, purification and properties of fungal chitinases-A review. In *Indian Journal of Experimental Biology* (Vol. 52). Retrieved from http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/29743/1/IJEB 52%2811%29 1025-1035.pdf

Lovera, A., Belaich, M., Villamizar, L., Patarroyo, M. A., & Barrera, G. (2020). Enhanced virulence of Beauveria bassiana against Diatraea saccharalis using a soluble recombinant enzyme with endo- and exochitinase activity. *Biological Control*, *144*, 104211. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104211

Maryam, A., Reza, M., & Gausul, A. (2015). COMPARATIVE STUDY FUNGAL CHITINASE OF BEAUVERIA BASSIANA STRAIN HFW-05 AND BACTERIAL CHITINASE OF MICROMONOSPORA SP. L5 USING BIOINFORMATICS ANALYSIS. Retrieved August 12, 2020, from https://www.sid.ir/en/Seminar/ViewPaper.aspx?ID=27644

Mascarin, G. M., & Jaronski, S. T. (2016, November 1). The production and uses of Beauveria bassiana as a microbial insecticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 32. https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3

Massarolli, A., Bersani, B. C. G., Roza, F. H. D., Butnariu, A. R., Pereira, M. J. B., & Foerster, L. A. (2019). Evaluation of Leaf Consumption and Determination of Economic Injury Level Caused by Plutella xylostella (L.)

(Lepidoptera: Plutellidae) in Brassica oleracea var. acephala (Brassicales: Brassicaceae). *Journal of Economic Entomology*, *112*(4), 1805–1811. https://doi.org/10.1093/jee/toz113

Mejía, C. (2018). *Potenciación de conidios de Beauveria bassiana como principio acivo de un bioplaguicida para el contrl de larvas de Diatraea sp.* Retrieved from http://bdigital.unal.edu.co/70950/1/1010176025.2018.pdf

Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y., & Yang, Q. (2016). Chitin metabolic pathways in insects and their regulation. In *Extracellular Composite Matrices in Arthropods* (pp. 31–65). https://doi.org/10.1007/978-3-319-40740-1_2

Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of Beauveria bassiana acting on larvae and adults of Tenebrio molitor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(3), 513–518. https://doi.org/10.1007/s11274-008-9917-x

Saeed, S., Jaleel, W., Naqqash, M. N., Saeed, Q., Zaka, S. M., Sarwar, Z. M., … Sharma, G. K. (2019). Fitness parameters of Plutella xylostella (L.) (Lepidoptera; Plutellidae) at four constant temperatures by using age-stage, two-sex life tables. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *26*(7), 1661–1667. https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.08.026

Safavi, S. A., Shah, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasoulian, G., Bandani, A. R., & Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. *FEMS Microbiology Letters*, *270*(1), 116–123. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x

Sánchez-Pérez, L. de C., Barranco-Florido, J. E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J. F., Ramos-López, M. Á., Sánchez-Pérez, L. de C., … Ramos-López, M. Á. (2014). Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, *02*(02), 65–76. https://doi.org/10.4236/aer.2014.22007

Sarfraz, M., Dosdall, L. M., & Keddie, B. A. (2006a, July). Diamondback moth-host plant interactions: Implications for pest management. *Crop Protection*, Vol. 25, pp. 625–639. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.09.011

Sarfraz, M., Dosdall, L. M., & Keddie, B. A. (2006b, July 1). Diamondback moth-host plant interactions: Implications for pest management. *Crop Protection*, Vol. 25, pp. 625–639. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.09.011

Sarfraz, Muhammad, Keddie, A. B., & Dosdall, L. M. (2005). Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella* : A review. *Biocontrol Science and Technology*, *15*(8), 763–789. https://doi.org/10.1080/09583150500136956

Sephton-Clark, P. C. S., & Voelz, K. (2018). Spore Germination of Pathogenic Filamentous Fungi. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 102, pp. 117–157). https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.10.002

Singh, H. B., Keswani, C., Ray, S., Yadav, S. K., Singh, S. P., Singh, S., & Sarma, B. K. (2015). *Beauveria bassiana: Biocontrol Beyond Lepidopteran*

Pests. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14499-3_10

Valero-Jiménez, C. A., Wiegers, H., Zwaan, B. J., Koenraadt, C. J. M., & van Kan, J. A. L. (2016). Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana. *Journal of Invertebrate Pathology*. https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.11.011

Wang, L., You, M., & Wang, H. (2015). *Biocontrol of Diamondback Moth, Plutella xylostella, with Beauveria bassiana and Its Metabolites*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-14499-3_11

Zalucki, M. P., Shabbir, A., Silva, R., Adamson, D., Shu-Sheng, L., & Furlong, M. J. (2012). Estimating the Economic Cost of One of the World's Major Insect Pests, <I>Plutella xylostella</I> (Lepidoptera: Plutellidae): Just How Long Is a Piece of String? *Journal of Economic Entomology*, *105*(4), 1115–1129. https://doi.org/10.1603/ec12107

8. ANEXOS

Anexo 1. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable germinación (%).

Sustrato	Bandeja	Tiempo	Réplica	Germinación (%)
Rice	1	16	1	55.04587156
Rice	1	16	2	46.04316547
Rice	1	16	3	51.2
Rice	1	16	4	57.00934579
Rice	1	16	5	28.03030303
Rice	1	16	6	50.4587156
Rice	2	16	7	35.18518519
Rice	2	16	8	61.0619469
Rice	2	16	9	47
Rice	2	16	10	26.08695652
Rice	2	16	11	50.98039216
Rice	2	16	12	46.01769912
Rice	1	20	1	87.37864078
Rice	1	20	2	69.84126984
Rice	1	20	3	93.45794393
Rice	1	20	4	80.95238095
Rice	1	20	5	84.89208633
Rice	1	20	6	68.6440678
Rice	2	20	7	48.14814815
Rice	2	20	8	62.39316239
Rice	2	20	9	74.32432432
Rice	2	20	10	52.734375
Rice	2	20	11	80.35714286
Rice	2	20	12	46.01769912

Rice	1	24	1	83.48623853
Rice	1	24	2	95.04950495
Rice	1	24	3	88.18181818
Rice	1	24	4	88.63636364
Rice	1	24	5	80.32786885
Rice	1	24	6	89.21568627
Rice	2	24	7	77.48344371
Rice	2	24	8	67.26190476
Rice	2	24	9	68.69565217
Rice	2	24	10	68.5483871
Rice	2	24	11	72.85714286
Rice	2	24	12	89.42307692
Oat	1	16	1	74.79674797
Oat	1	16	2	82.30769231
Oat	1	16	3	78.52348993
Oat	1	16	4	77.23577236
Oat	1	16	5	76.47058824
Oat	1	16	6	79.13669065
Oat	2	16	7	97.56097561
Oat	2	16	8	96.22641509
Oat	2	16	9	99.25925926
Oat	2	16	10	96.07843137
Oat	2	16	11	98.1981982
Oat	2	16	12	92.95774648
Oat	1	20	1	86.23853211
Oat	1	20	2	84.57446809
Oat	1	20	3	87.34177215
Oat	1	20	4	79.48717949
Oat	1	20	5	78.19548872
Oat	1	20	6	76.2195122
Oat	2	20	7	82.11382114
Oat	2	20	8	90.90909091
Oat	2	20	9	78.84615385
Oat	2	20	10	81.30841121
Oat	2	20	11	84.11214953
Oat	2	20	12	83.03571429
Oat	1	24	1	97.56097561
Oat	1	24	2	96.22641509
Oat	1	24	3	99.25925926
Oat	1	24	4	96.07843137
Oat	1	24	5	98.1981982
Oat	1	24	6	92.95774648
Oat	2	24	7	100
Oat	2	24	8	99.13793103
Oat	2	24	9	97.01492537
Oat	2	24	10	98.0952381

Oat	2	24	11	96.55172414
Oat	2	24	12	98
Sabouraud	1	16	1	78.6407767
Sabouraud	1	16	2	87.96296296
Sabouraud	1	16	3	85.2173913
Sabouraud	1	16	4	84.32835821
Sabouraud	1	16	5	90.90909091
Sabouraud	1	16	6	91.74311927
Sabouraud	2	16	7	82.72727273
Sabouraud	2	16	8	73.45132743
Sabouraud	2	16	9	84.34782609
Sabouraud	2	16	10	81.74603175
Sabouraud	2	16	11	85.40145985
Sabouraud	2	16	12	89.04109589
Sabouraud	1	20	1	87.82608696
Sabouraud	1	20	2	95.3271028
Sabouraud	1	20	3	99.26470588
Sabouraud	1	20	4	97.45762712
Sabouraud	1	20	5	93.44262295
Sabouraud	1	20	6	96.15384615
Sabouraud	2	20	7	98.68421053
Sabouraud	2	20	8	94.82758621
Sabouraud	2	20	9	95.53571429
Sabouraud	2	20	10	96.69421488
Sabouraud	2	20	11	93.79844961
Sabouraud	2	20	12	94.67455621
Sabouraud	1	24	1	99.37106918
Sabouraud	1	24	2	98.21428571
Sabouraud	1	24	3	99.375
Sabouraud	1	24	4	99.2481203
Sabouraud	1	24	5	99.23664122
Sabouraud	1	24	6	99.29577465
Sabouraud	2	24	7	100
Sabouraud	2	24	8	99.0990991
Sabouraud	2	24	9	98.48484848
Sabouraud	2	24	10	99.2481203
Sabouraud	2	24	11	100
Sabouraud	2	24	12	99.29078014

Anexo 2. Datos originales para el cálculo de la geminación en tres tiempos diferentes

Sustrato	Bandeja	Tiempo		Réplica	Germinación 16h (%)	Germinación 20h (%)	Germinació 24h (%)
Rice	1	16		1	55.04587156	87.37864078	83.4862385
Rice	1	16		2	46.04316547	69.84126984	95.0495049
Rice	1	16		3	51.2	93.45794393	88.1818181
Rice	1	16		4	57.00934579	80.95238095	88.6363636
Rice	1	16		5	28.03030303	84.89208633	80.3278688
Rice	1	16		6	50.4587156	68.6440678	89.2156862
Rice	2	16		7	35.18518519	48.14814815	77.4834437
Rice	2	16		8	61.0619469	62.39316239	67.2619047
Rice	2	16		9	47	74.32432432	68.6956521
Rice	2	16		10	26.08695652	52.734375	68.5483871
Rice	2	16		11	50.98039216	80.35714286	72.8571428
Rice	2	16		12	46.01769912	46.01769912	89.4230769
Oat	1	16		1	74.79674797	86.23853211	97.5609756
Oat	1	16		2	82.30769231	84.57446809	96.2264150
Oat	1	16		3	78.52348993	87.34177215	99.2592592
Oat	1	16		4	77.23577236	79.48717949	96.0784313
Oat	1	16		5	76.47058824	78.19548872	98.1981982
Oat	1	16		6	79.13669065	76.2195122	92.9577464
Oat	2	16		7	97.56097561	82.11382114	100
Oat	2	16		8	96.22641509	90.90909091	99.1379310
Oat	2	16		9	99.25925926	78.84615385	97.0149253
Oat	2	16		10	96.07843137	81.30841121	98.0952381
Oat	2	16		11	98.1981982	84.11214953	96.5517241
Oat	2	16		12	92.95774648	83.03571429	98
Sabouraud	1	16		1	78.6407767	87.82608696	99.3710691
Sabouraud	1	16		2	87.96296296	95.3271028	98.2142857
Sabouraud	1	16		3	85.2173913	99.26470588	99.375
Sabouraud	1	16		4	84.32835821	97.45762712	99.2481203
Sabouraud	1	16		5	90.90909091	93.44262295	99.2366412
Sabouraud	1	16		6	91.74311927	96.15384615	99.2957746
Sabouraud	2	16		7	82.72727273	98.68421053	100
Sabouraud	2	16		8	73.45132743	94.82758621	99.0990991
Sabouraud	2	16		9	84.34782609	95.53571429	98.4848484
Sabouraud	2	16		10	81.74603175	96.69421488	99.2481203
Sabouraud	2	16		11	85.40145985	93.79844961	100
Sabouraud	2	16		12	89.04109589	94.67455621	99.2907801

Anexo 3. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable rendimiento (Conidios/g).

Repetición	Tratratam.	Rend (Conidios/g)	Rend (Conidios/g) raíz	Rend (Conidios/g) Log
1	arroz	3466666667	58878.40578	9.539912085
1	avena	3573333333	59777.36472	9.553073531
1	Sabouraud	3813333333	61752.19294	9.58130477
2	arroz	4106666667	64083.27915	9.613489453
2	avena	3946666667	62822.50128	9.596230448
2	Sabouraud	6213333333	78824.70002	9.793324653
3	arroz	4906666667	70047.60286	9.690786555
3	avena	3680000000	60663.00355	9.565847819
3	Sabouraud	2586666667	50859.28299	9.412740467
4	arroz	5733333333	75718.77794	9.758407192
4	avena	4746666667	68896.05697	9.676388735
4	Sabouraud	5360000000	73212.02087	9.72916479

Anexo 4. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable quitinasa Nitrofenil.

Sustrato	**Muestra**	**Réplica**	**Nitrofenil (Unidad/g)**
Rice	Espora	1	0.94998169
Rice	Espora	2	0.97006056
Rice	Espora	3	0.99766901
Rice	Espora	4	0.46557887
Rice	Espora	5	0.49318732
Rice	Espora	6	0.52330563
Oat	Espora	1	0.43671549
Oat	Espora	2	0.4455
Oat	Espora	3	0.47185352
Oat	Espora	4	0.43044085
Oat	Espora	5	0.45428451
Oat	Espora	6	0.45553944
Sabouraud	Espora	1	3.06579296
Sabouraud	Espora	2	2.93151549
Sabouraud	Espora	3	3.1059507
Sabouraud	Espora	4	3.41089859
Sabouraud	Espora	5	3.19254085
Sabouraud	Espora	6	3.30046479
Rice	Medio	1	0.00627465
Rice	Medio	2	0.00752958
Rice	Medio	3	0.0125493

Rice	Medio	4	0.00878451
Rice	Medio	5	0.01129437
Rice	Medio	6	0.01380423
Oat	Medio	1	0.03764789
Oat	Medio	2	0.03513803
Oat	Medio	3	0.03513803
Oat	Medio	4	0.03890282
Oat	Medio	5	0.03764789
Oat	Medio	6	0.03639296
Sabouraud	Medio	1	0.02509859
Sabouraud	Medio	2	0.03513803
Sabouraud	Medio	3	0.0338831
Sabouraud	Medio	4	0.01631408
Sabouraud	Medio	5	0.01756901
Sabouraud	Medio	6	0.01756901

Anexo 5. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable quitobiosidasa.

Sustrato	Muestra	Réplica	Unidad/g
Rice	Espora	1	1.48151613
Rice	Espora	2	1.57427419
Rice	Espora	3	1.48674194
Rice	Espora	4	0.77733871
Rice	Espora	5	0.71593548
Rice	Espora	6	0.73814516
Oat	Espora	1	0.66237097
Oat	Espora	2	0.71070968
Oat	Espora	3	0.70548387
Oat	Espora	4	0.60358065
Oat	Espora	5	0.61141935
Oat	Espora	6	0.64146774
Sabouraud	Espora	1	1.71406452
Sabouraud	Espora	2	1.72712903
Sabouraud	Espora	3	1.94922581
Sabouraud	Espora	4	2.20659677
Sabouraud	Espora	5	2.09685484
Sabouraud	Espora	6	2.37251613
Rice	Medio	1	0.01045161
Rice	Medio	2	0.01306452
Rice	Medio	3	0.01306452
Rice	Medio	4	0.01698387
Rice	Medio	5	0.01698387
Rice	Medio	6	0.01698387
Oat	Medio	1	0.0378871
Oat	Medio	2	0.0405

Oat	Medio	3	0.04180645
Oat	Medio	4	0.0431129
Oat	Medio	5	0.0405
Oat	Medio	6	0.0431129
Sabouraud	Medio	1	0.02874194
Sabouraud	Medio	2	0.03396774
Sabouraud	Medio	3	0.02482258
Sabouraud	Medio	4	0.02612903
Sabouraud	Medio	5	0.02220968
Sabouraud	Medio	6	0.02351613

Anexo 6. Datos utilizados para los análisis estadísticos de la variable endoquitinasa

Sustrato	**Muestra**	**Réplica**	**Quitotriosa (unidad/g)**
Rice	Espora	1	0.561
Rice	Espora	2	0.34584
Oat	Espora	1	0.396
Oat	Espora	2	0.34056
Sabouraud	Espora	1	1.0956
Sabouraud	Espora	2	1.16952
Rice	Medio	1	0.01188
Rice	Medio	2	0.01584
Oat	Medio	1	0.03828
Oat	Medio	2	0.0396
Sabouraud	Medio	1	0.033
Sabouraud	Medio	2	0.0198

Anexo 7. Datos transformados, utilizados para los análisis estadísticos de la variable Actividad Insecticida.

Rep	**Sustrato**	**Dilución**	**% mortalidad P*. xylostella*** **(4d)**	**% mortalidad *P. xylostella*** **(6d)**	**% mortalidad *P. xylostella*** **(4d) RAIZ X +10**	**% mortalidad P. xylostella (6d) RAIZ X +10**
1	Sabouraud	4	0.00	16.67	3.16	5.16
1	Sabouraud	5	8.30	58.33	4.28	8.27
1	Sabouraud	6	16.67	50.00	5.16	7.75
1	Sabouraud	7	66.67	83.33	8.76	9.66
1	Sabouraud	8	41.67	83.33	7.19	9.66
1	Avena	4	0.00	33.33	3.16	6.58
1	Avena	5	0.00	41.67	3.16	7.19

1	Avena	6	66.67	41.67	8.76	7.19
1	Avena	7	16.67	75.00	5.16	9.22
1	Avena	8	33.33	91.67	6.58	10.08
1	Arroz	4	8.30	16.67	4.28	5.16
1	Arroz	5	16.67	25.00	5.16	5.92
1	Arroz	6	12.40	27.60	4.73	6.13
1	Arroz	7	16.67	25.00	5.16	5.92
1	Arroz	8	8.33	91.67	4.28	10.08
2	Sabouraud	4	0.00	0.00	3.16	3.16
2	Sabouraud	5	0.00	41.67	3.16	7.19
2	Sabouraud	6	33.33	41.67	6.58	7.19
2	Sabouraud	7	16.67	66.67	5.16	8.76
2	Sabouraud	8	66.67	100.00	8.76	10.49
2	Avena	4	16.67	33.33	5.16	6.58
2	Avena	5	8.33	16.67	4.28	5.16
2	Avena	6	16.67	66.67	5.16	8.76
2	Avena	7	16.67	83.33	5.16	9.66
2	Avena	8	16.67	100.00	5.16	10.49
2	Arroz	4	9.50	26.50	4.42	6.04
2	Arroz	5	16.67	25.00	5.16	5.92
2	Arroz	6	16.67	33.33	5.16	6.58
2	Arroz	7	16.67	50.00	5.16	7.75
2	Arroz	8	8.33	100.00	4.28	10.49
3	Sabouraud	4	8.30	16.67	4.28	5.16
3	Sabouraud	5	33.30	33.33	6.58	6.58
3	Sabouraud	6	33.33	41.67	6.58	7.19
3	Sabouraud	7	16.67	58.33	5.16	8.27
3	Sabouraud	8	16.67	91.67	5.16	10.08
3	Avena	4	16.67	33.33	5.16	6.58
3	Avena	5	0.00	41.67	3.16	7.19
3	Avena	6	8.33	58.33	4.28	8.27
3	Avena	7	16.67	100.00	5.16	10.49
3	Avena	8	0.00	100.00	3.16	10.49
3	Arroz	4	15.70	34.80	5.07	6.69
3	Arroz	5	41.00	41.67	7.14	7.19
3	Arroz	6	16.67	50.00	5.16	7.75
3	Arroz	7	8.33	50.00	4.28	7.75
3	Arroz	8	16.67	100.00	5.16	10.49