

# Efecto del estrés térmico y la radiación ultravioleta durante la producción masiva de *Nomuraea rileyi*

## Effect of thermal stress and ultraviolet radiation during massive production of *Nomuraea rileyi*

Adriana Marcela Santos Díaz\*, Pedro Filipe de Brito Brandão\*\*, Laura Fernanda Villamizar Rivero\*\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.55943

### Resumen

El hongo entomopatógeno *Nomuraea rileyi* (aislamiento Nm006) ha demostrado un alto potencial para ser utilizado en el control biológico de gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Sin embargo, este microorganismo es altamente susceptible a condiciones abióticas de estrés, lo que dificulta el desarrollo tecnológico de un bioplaguicida. Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo del trabajo fue evaluar el efecto individual de temperatura y luz ultravioleta mediante choques de estrés implementados en el proceso de fermentación sólida. Los conidios obtenidos de los diferentes tratamientos se caracterizaron microbiológicamente (rendimiento y germinación), enzimática ( $\beta$ -esterasa, *N*-acetilglucosaminidasa y quimoelastasa proteasa Pr1) y biológicamente mediante un bioensayo. Los choques de temperatura no afectaron el rendimiento, germinación y actividad biológica del aislamiento, pero sí potenciaron la actividad  $\beta$ -esterasa y la actividad *N*-acetilglucosaminidasa en comparación con los conidios no expuestos. Con respecto a los choques con luz UV, éstos no mejoraron las características de los conidios de *N. rileyi*. Con base en los resultados, los choques térmicos a 5 °C y 45 °C, se seleccionaron para la fermentación del hongo, porque no afectaron negativamente ninguna característica y aumentaron las actividades enzimáticas  $\beta$ -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa de los conidios, lo que podría mejorar la actividad insecticida sobre *S. frugiperda*.

**Palabras claves:** hongo entomopatógeno, virulencia, estrés abiótico, bioplaguicida, tolerancia.

### Abstract

The entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* (isolate Nm006) is a possible microbial control agent against "fall armyworm" *Spodoptera frugiperda*. However, this fungus is affected by abiotic stress conditions that cause a slow development of the biopesticide. The objective of this study was to assess the individual effect of abiotic stress (temperature and UV light) during solid fermentation of *Nomuraea rileyi* Nm006. Conidia were produced under different stress conditions and then characterized microbiologically (yield and germination), enzymatically ( $\beta$ -esterase, *N*-acetylglucosaminidase and subtilin-like protease Pr1) and biologically against *Spodoptera frugiperda*. All the treatments were compare with conidia produced without stress. Yield and *N*-acetylglucosaminidase activity did not improve in conidia produced under temperature stress. Germination, efficacy and  $\beta$ -esterase activity were significantly higher in conidia exposed to thermal shock compared to unexposed conidia. UV light shocks did not improve any characteristics of Nm006. Thermal stress at 5 °C and 45 °C were select for fungus fermentation because conidia had higher enzymatic activity ( $\beta$ -esterase and *N*-acetylglucosaminidase) and any characteristic was negatively affect. This thermal stress could be a strategy to improve the insecticidal activity against *S. frugiperda*.

**Key words:** entomopathogen fungi, virulence, abiotic stress, biopesticide, tolerance.

**Recibido:** noviembre 26 de 2016    **Aprobado:** mayo 26 de 2017

\* Microbióloga industrial M.Sc, Líder de unidad de laboratorio, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Mosquera, Colombia, asantos@corpoica.org.co.

\*\* Microbiólogo Ph.D. Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, pfdeb@unal.edu.co.

\*\*\* Química Farmacéutica. Ph.D. Investigador Ph.D. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Mosquera, Colombia, lvillamizar@corpoica.org.co.

## Introducción

Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos, entre los que destacan los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria*, *Nomurea* y *Lecanicillium* (Pedrini et al., 2007; Shah & Pell, 2003; 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). Sin embargo, para que un hongo entomopatógeno sea considerado como un potencial biocontrolador, debe tener como características básicas: alta virulencia contra el insecto plaga, facilidad de producción masiva y la resistencia a condiciones ambientales extremas (Ali et al., 2009a; Rangel, 2011; Rangel et al., 2015). Teniendo en cuenta este potencial, durante las últimas décadas varios bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos han sido comercializados. Sin embargo, de las especies de hongos entomopatógenos actualmente conocidas, sólo 12 especies son utilizadas como principio activo de formulaciones, quedando disponible un número importante de microorganismos con potencial para su desarrollo (Srivastava et al., 2009).

El hongo *Nomurea rileyi* (Farlow), está distribuido en amplios agroecosistemas y frecuentemente ocasiona epizootias naturales sobre insectos del orden lepidóptera como *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), *Anticarsia gemmatalis* (Hübner), *Trichoplusia ni* (Hübner), entre otros (León & Pulido, 1991; Mallikarjuna et al., 2010; Rajan & Muthukrishnan, 2009; Ríos-Velasco et al., 2010). A pesar del potencial que ha demostrado *N. rileyi* para el control de insectos plagas, la información que existe es escasa, posiblemente debido a las dificultades que presenta este microorganismo para su producción masiva y a la baja estabilidad del mismo en condiciones de almacenamiento (Pavone et al., 2009). Por esta razón, a la fecha no se encuentra registrado ningún bioinsumo a base de este hongo ni en los EE.UU. (EPA, 2015), ni en Colombia (ICA, 2015). Una estrategia para incrementar la tolerancia de hongos entomopatógenos a condiciones drásticas es a través de la manipulación fisiológica, ya que los conidios producidos en condiciones de estrés desarrollan tolerancia, al factor evaluado y a otras condiciones o características diferentes (Andersen et al., 2006; Hallsworth & Magan, 1995; Rangel et al., 2015).

En ese sentido, el aislamiento colombiano de *N. rileyi* codificado como Nm006, se seleccionó por ocasionar una mortalidad del 95% sobre larvas de tercer instar de *S. frugiperda* en condiciones de laboratorio (Bosa et al., 2004), y posteriormente se estandarizó su producción

masiva y formulación como un concentrado emulsionable. Sin embargo, dicha formulación presentó una corta vida útil, con, 3,26 meses a 10 °C y de 1,27 meses a 20 °C (Zarate et al., 2010), valores inferiores a los reportados para varios bioplaguicidas a base de hongos entomopatógenos disponibles en el mercado (Copping, 2009). Por esta razón, el objetivo del presente trabajo fue evaluar y seleccionar condiciones abióticas de estrés que mejoren las características microbiológicas, enzimáticas y biológicas de los conidios de *N. rileyi* (Nm006), con miras a obtener un microorganismo más virulento y estable en condiciones de almacenamiento, el cual pueda ser utilizado como principio activo de un bioplaguicida.

## Materiales y métodos

**Cría masiva de *Spodoptera frugiperda*.** Para todos los ensayos de actividad biológica se utilizaron larvas de segundo instar (L2) de *S. frugiperda* provenientes de una colonia montada bajo condiciones controladas en la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), Colombia. Esta colonia se estableció con huevos y larvas colectados en un cultivo de maíz del departamento de Tolima, Colombia. Las larvas se mantuvieron a 25 °C y 60% de humedad (HR) con un fotoperiodo de 12:12 (luz: oscuridad) en una dieta semi-sintética a base de germen de maíz, hasta completar su desarrollo (Greene et al., 1976; Murcia et al., 2004).

**Microorganismo.** El hongo *Nomurea rileyi* Nm006 (aislado a partir de larvas de *S. 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.

**Producción masiva de conidios utilizando condiciones abióticas de estrés.** La producción masiva de *N. rileyi* se realizó utilizando la metodología previamente estandarizada por Villamizar et al. (2004). Se utilizaron bandejas con un sustrato a base de cereales, el cual se inoculó con una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios/mL; estas bandejas se incubaron a  $25 \pm 2$  °C durante 7 días. Posteriormente, cada factor de estrés fue implementado individualmente. Para los choques térmicos, las bandejas con el sustrato inoculado se expusieron a la temperatura de  $5 \pm 2$  °C,  $15 \pm 2$  °C,  $30 \pm 2$  °C y  $45 \pm 2$  °C, durante 1 hora. Para los choques con luz UV-B, las bandejas se irradiaron con una lámpara ultravioleta monocromática con una longitud de onda de 302 nm ubicada a 20 cm de altura ( $4920 \text{ mwatts/cm}^2$ ) durante 5, 10, 15, 30, 60 y 90 minutos. Terminada la exposición al factor de estrés,

las bandejas se incubaron nuevamente durante 7 días a  $25 \pm 2$  °C con luz constante. Finalizado el tiempo de fermentación se realizó un muestreo aleatorio del sustrato producido por el hongo siguiendo la metodología descrita por Kang *et al.*, (2005) y se determinó el rendimiento de la fermentación (conidios/g de sustrato) mediante recuento en cámara de Neubauer. Posteriormente, los conidios se separaron utilizando un tamizador eléctrico y se analizaron sus características microbiológicas, enzimáticas y biológicas.

El tratamiento control consistió en bandejas con el medio de producción inoculado de la forma anteriormente descrita e incubadas durante 14 días a  $25 \pm 2$  °C en condiciones de luz constante, las cuales no se sometieron a ningún choque. El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento.

**Caracterización microbiológica.** Para la caracterización microbiológica de los conidios se determinó el porcentaje de germinación (%) de tres muestras de 100 mg de conidios Nm006 en un medio de cultivo a base de agar extracto de malta y levadura (Agar YM) utilizando la metodología descrita por Santos *et al.*, 2012. El número de conidios germinados y no germinados se determinó mediante observación al microscopio de 10 campos ópticos, por unidad experimental.

**Caracterización enzimática.** Los conidios de *N. rileyi*, se caracterizaron enzimáticamente mediante la determinación de la actividad *N*-acetilglucosaminidasa, quimoelastasa proteasa (Pr1) y  $\beta$ -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, se pesaron 50 mg de éstos y se adicionaron a 1 mL de una solución de Tween® 80 al 1% (v/v). Esta mezcla se agitó fuertemente en vortex durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm a 4°C durante 10 minutos y el sobrenadante se utilizó para la cuantificación enzimática.

La actividad quitinolítica (actividad *N*-acetilglucosaminidasa, EC 3.2.1.14) se determinó utilizando como sustrato *p*-nitrofenil-*N*-acetilgluco-samina (1 mg/mL en tampón citrato 0,1M pH 5) siguiendo la metodología descrita por Villamizar *et al.*, (2001). Para la reacción enzimática, se adicionaron 100  $\mu$ L del sustrato a 20  $\mu$ L del extracto enzimático y se incubó por 30 minutos a  $35 \pm 2$  °C. Posteriormente, se adicionaron 150  $\mu$ L de NaOH-glicina (pH 10,4) y se determinó la absorbancia a 400 nm (Nanodrop® 1000). 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. La actividad proteolítica (actividad quimoelastasa proteasa Pr1, EC 3.4.21.62) se determinó utilizando como sustrato *N*-succinil-ala-ala-propil-fenialanina-*p*-nitroanilida disuelto en DMSO y 250  $\mu$ L de tampón Tris-HCl (2 mM, pH 8). Para la reacción enzimática, se adicionaron 20  $\mu$ L del sustrato a 20  $\mu$ L del extracto enzimático y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se determinó la absorbancia a 410 nm (Nanodrop® 1000). Una unidad de actividad quimoelastasa proteasa Pr1 se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1  $\mu$ mol de *p*-nitroanilida bajo las condiciones de la prueba. La actividad lipolítica (actividad  $\beta$ -esterasa, EC 3.1.1.3) se determinó utilizando como sustrato *p*-nitrofenil-palmitato (1 mg/mL en DMSO). Para la reacción enzimática, se adicionaron 100  $\mu$ L de *p*-nitrofenil-palmitato a 20  $\mu$ L del extracto enzimático y se incubó por 30 minutos a  $35 \pm 2$  °C. Posteriormente, se adicionaron 150  $\mu$ L de NaOH-glicina (pH 10,4) y se determinó la absorbancia a 400 nm (Nanodrop® 1000). Una unidad de actividad  $\beta$ -esterasa se definió como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 mmol de *p*-nitrofenol bajo las condiciones de la prueba.

**Caracterización biológica.** La actividad biológica de los conidios producidos utilizando diferentes condiciones abióticas de estrés, se determinó mediante un bioensayo siguiendo la metodología descrita por Espinel & Cotes (2008). 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. Con los conidios obtenidos bajo las diferentes condiciones de producción masiva se prepararon suspensiones ajustadas a una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL, las cuales se asperjaron por el haz y por el envés de las hojas (1 mL/hoja). El experimento contó con un diseño completamente al azar, con tres repeticiones por tratamiento, cada una con 10 unidades de muestreo correspondientes a un recipiente plástico con una hoja de higuera y una larva de segundo instar de *S. frugiperda* (30 larvas/tratamiento). Además, se realizó un testigo absoluto, para el cual, las hojas no recibieron ningún tratamiento. Los recipientes se incubaron a  $24 \pm 2$  °C y 50% HR. La mortalidad se determinó pasados 14 días y el resultado se corrigió con la mortalidad del testigo utilizando la fórmula de Schneider - Orelli para estimar el porcentaje de eficacia (Zar, 1999):

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

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

**Análisis estadístico.** La normalidad y la homocedasticidad de los resultados se determinaron mediante la prueba 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%). Se realizaron análisis de correlación de Pearson para las variables afectadas significativamente por tratamientos. Todos los análisis se realizaron con el programa Statistix versión 7.0 (Analytical Software, Florida, USA).

## Resultados y discusión

**Choque térmico.** Todos los tratamientos presentaron un crecimiento masivo de conidios sobre el sustrato y una esporulación homogénea. El tratamiento control (sin choque térmico) presentó un rendimiento de  $1,48 \times 10^9$  conidios/g, valor que no fue significativamente diferente ( $F= 0,08$ ,  $gl=4$ ,  $p=0,9861$ ) de los obtenidos en los cultivos expuestos a los diferentes choques térmicos (tabla 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 significativo sobre la conidiación de *N. rileyi*.

Con respecto a la viabilidad expresada como germinación, los conidios del tratamiento control presentaron una germinación de 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 numéricamente menores pero que no presentaron diferencias significativas con el control (tabla 1). 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. Este resultado sugiere que los choques con temperaturas superiores en un rango de 20 °C por encima o por debajo de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , que corresponde a la temperatura óptima de crecimiento del hongo (Céspedes *et al.*, 2008), no afectaron la capacidad de germinación de los conidios de *N. rileyi*, mientras que la exposición a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento afectaron negativamente la viabilidad del microorganismo. Este comportamiento sugiere que la exposición de un cultivo de *N. rileyi* a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento durante un corto tiempo (1 hora), no indujeron los

**Tabla 1.** Características microbiológicas, enzimáticas y biológicas de conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentación sólida y expuestos a choques de temperatura.

Tratamientos	Rendimiento	Germinación	Actividad Lipolítica (Enzima $\beta$ -esterasa)	Actividad Quitinolítica (Enzima N-acetilglucosaminidasa)	Eficacia
	(conidios/g)	(%)	*(UE)	*(UE)	(%)
Control	$1,48 \times 10^9$ a	90,41 a	0,26 c	7,58 ab	86,67 a
Choque a 5 °C	$1,64 \times 10^9$ a	83,07 ab	0,75 a	8,58 a	81,04 a
Choque a 15 °C	$1,73 \times 10^9$ a	75,40 bc	0,52 b	5,94 b	56,36 b
Choque a 35 °C	$1,70 \times 10^9$ a	72,80 c	0,68 ab	7,16 ab	51,32 b
Choque a 45 °C	$1,65 \times 10^9$ a	86,59 a	0,73 ab	6,91 ab	82,24 a

El análisis estadístico se realizó de forma independiente para cada variable. Tratamientos con la misma letra no presentaron diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

\*Unidad Enzimática UE (mmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto por mililitro a 35 °C).

sistemas de adaptación térmica y por el contrario retardaron el proceso de germinación. Comportamientos similares se han evidenciado para diferentes microorganismos como *Saccharomyces cerevisiae* (Amillastre *et al.*, 2012), *Beauveria bassiana* (Liu *et al.*, 2009) y *Paecilomyces farinosus* (Hallsworth & Magan, 1999), para los cuales la exposición por cortos periodos de tiempo a temperaturas cercanas a la óptima, disminuyeron la viabilidad.

La actividad quimoelastasa proteasa (Pr1) no se detectó en ningún extracto enzimático de los conidios de *N. rileyi* producidos bajo los diferentes choques de estrés ni en el tratamiento control, lo que posiblemente se debe a que la expresión de dicha enzima es inducida por el sustrato, siendo el mejor inductor la cutícula de insectos (Perinotto *et al.*, 2013; Small & Bidochka, 2005). De igual manera, la expresión de los genes involucrados en la síntesis de Pr1 están regulados por la relación C/N del medio de cultivo, comportamiento descrito ampliamente para *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Safavi, 2011; St Leger *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta lo anterior, es posible que el medio de cultivo utilizado en el presente estudio no favoreciera la expresión de esta enzima durante el proceso de fermentación, resultados similares a lo evidenciado para otros hongos entomopatógenos como *L. lecanii*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*, cuando fueron producidos en medios de cultivo con una baja relación de C/N (Charnley & St Leger, 1991; Fang *et al.*, 2005; Safavi, 2011; Sheng *et al.*, 2006).

Con respecto a la actividad  $\beta$ -esterasa, los conidios no expuestos (tratamiento control) presentaron una actividad de 0,26 UE, valor significativamente inferior ( $F=9,54$ ,  $gl=4$ ,  $p=0,0001$ ) a la actividad  $\beta$ -esterasa obtenida con los conidios expuestos a todos los choques térmicos. 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 (tabla 1), comportamiento que sugiere que el nivel basal de esta enzima aumentó debido a la condición de estrés utilizada durante el proceso de fermentación. Una alta producción y acumulación de esterases 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 (Ali *et al.*, 2009b).

Para la actividad *N*-acetilglucosaminidasa (actividad quitinolítica), los conidios sin exposición a choques térmicos (tratamiento control) presentaron una actividad enzimática de 7,58 UE, valor que no fue significativamente diferente ( $F=2,65$ ,  $gl=4$ ,  $p=0,0571$ ) a las actividades enzimáticas de los conidios obtenidos bajo los diferentes choques térmicos (tabla 1). ( $F=2,65$ ,  $gl=4$ ,  $p=0,0571$ ). Este resultado evidenció que la exposición a los choques térmicos no tuvo ningún efecto sobre la producción de esta enzima. 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 (Duo-Chuan, 2006; Seidl, 2008). También se ha evidenciado que aislamientos de hongos entomopatógenos que tengan una alta producción de quitinasas pueden presentar una alta actividad biológica, sin embargo, la correlación entre un aumento de esta actividad enzimática con la virulencia debe determinarse para cada hongo entomopatógeno (Bertholdo *et al.*, 2003).

La actividad biológica de los conidios obtenidos de las fermentaciones con y sin choques térmicos se describe en la tabla 1, en donde se puede observar que la eficacia de los conidios del tratamiento control fue del 86,67%. Este valor no fue significativamente diferente 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 con el tratamiento control. Los resultados obtenidos permiten 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 reportaron Safavi *et al.* (2007).

Con las variables que presentaron un efecto significativo cuando se implementaron los choques térmicos (eficacia, germinación y la actividad  $\beta$ -esterasa), se realizó un análisis de correlación y los coeficientes de correlación de Pearson para cada una de las interacciones se describen en la tabla 2. 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; Talaei-Hassanloui *et al.*,

**Tabla 2.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuestas (germinación, eficacia y actividad  $\beta$ -esterasa) de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006, producidos en fermentación sólida expuesta a choques térmicos.

	Germinación	Eficacia	Actividad $\beta$ -esterasa
Germinación	-----	0.8988	-0.1116
		p = 0,0001	p = 0,0253
Eficacia	0.8988	-----	-0.1043
	p = 0,0001		p = 0,0114
Actividad $\beta$ -esterasa	-0.1116	-0.1043	-----
	p = 0,0253	p = 0,0114	

2007; Tang & Hou, 2001). En ese sentido, Altre *et al.* (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 hospedero. En el presente estudio se evidenció una baja correlación lineal ( $r = -0,1043$  y  $p=0,0114$ ) entre la eficacia y la actividad  $\beta$ -esterasa, lo que indica que esta enzima no tuvo un efecto positivo sobre la 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 para *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).

**Choques de irradiación (Luz UV-B).** La implementación de choques de irradiación durante la fermentación de *N. rileyi* disminuyó el crecimiento y la esporulación del hongo. El tratamiento control presentó un rendimiento de  $1,48 \times 10^9$  conidios/g, valor que fue significativamente mayor ( $F= 17,5$ ,  $gl=20$ ,  $p=0,0000$ ) que el obtenido con los conidios producidos utilizando choques de irradiación con tiempos superiores a 30 minutos (tabla 3), lo que sugiere un efecto negativo sobre el desarrollo de *N. rileyi*. 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.

En *N. rileyi*, se demostró que la esporulación es altamente influenciada por la luz blanca (Boucias *et al.*, 2000), siendo esencial en el proceso de producción masiva. Por ejemplo, (Boucias *et al.*, 2000), evidenciaron que la esporulación del aislamiento F1-63 de *N. rileyi* se inhibió significativamente en oscuridad, mientras que cuando las cajas de Petri con el microorganismo se expusieron a luz constante se obtuvieron esporulaciones significativamente superiores. Lo anterior se denomina proceso de fotoesporulación, en donde la exposición a diferentes longitudes de luz durante un tiempo determinado induce la esporulación del microorganismo por medio de unas proteínas conocidas como fotorreceptores (Olmedo, 2013). Es posible que el comportamiento de *N. rileyi* frente a los choques de estrés con luz UV esté regulado por fotorreceptores, ya que cuando se implementaron los choques de irradiación UV-B se evidenció un descenso en la esporulación a medida que aumentó el tiempo de exposición. La luz ultravioleta posiblemente inhibió las respuestas de protección de los fotorreceptores, comportamiento observado por Corrochano & Garre (2010), quienes determinaron que tiempos de exposición a la luz UV-B superiores a 4 horas, disminuyen la producción de la enzima fotoliasa en *Phycomices* sp. y por lo tanto, la viabilidad y esporulación del hongo.

Para la variable germinación, los conidios obtenidos de la fermentación realizada sin la implementación de choques de irradiación, 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 no significativamente diferentes de 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 ( $F=8,17$ ,  $6$ ,  $p=0,0006$ ) (tabla 3). Estos resultados sugieren que la irradiación con Luz UV-B tiene un efecto negativo sobre la capacidad de germinación de los conidios producidos, el cual está directamente relacionado con el tiempo de exposición.

La reducción de la germinación 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). También se ha evidenciado que 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 (Murdoch *et al.*, 2013; Rodríguez *et al.*, 2010).

La actividad quimoelastasa proteasa (Pr1) no se detectó en ningún extracto enzimático de los conidios de *N. rileyi* producidos, cuando se implementaron los choques de luz UV ni en el tratamiento control, comportamiento evidenciado anteriormente cuando se implementaron los choques térmicos. Este resultado sugiere que el medio de producción masiva utilizado no induce la expresión de dicha enzima, posiblemente por un bajo contenido proteico. Sin embargo, fue adecuado para el crecimiento y la esporulación de *N. rileyi* (tabla 3).

Para la actividad lipolítica (enzima  $\beta$ -esterasa) los conidios no irradiados (tratamiento control) presentaron una actividad de 0,26 UE, valor significativamente inferior ( $F=15,7$ ,  $gl=6$ ,  $p=0,0000$ ) a la actividad  $\beta$ -esterasa obtenida con los conidios irradiados durante 5 minutos, lo que sugiere que este choque indujo la expresión y acumulación de esta enzima. Los conidios de las fermentaciones con choques de irradiación entre 15 y 60 minutos, presentaron una actividad lipolítica que no fue significativamente diferente de la actividad obtenida con los conidios no irradiados. El único choque de irradiación que causó un efecto significativamente deletéreo sobre la actividad  $\beta$ -esterasa fue el tiempo

**Tabla 3.** Características microbiológicas, enzimáticas y biológicas de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006 producidos en fermentación sólida expuestos a choques de luz ultravioleta UV-B.

Tratamientos (tiempo min de radiación a 302 nm)	Rendimiento	Germinación	Actividad Lipolítica (Enzima $\beta$ -esterasa)	Actividad Quitinolítica (Enzima N-acetilglucosaminidas)	Eficacia
	(conidios/g húmedo)	(%)	* (UE)	* (UE)	(%)
Control	$1,48 \times 10^9$ a	90,41 a	0,26 bc	7,58 a	86,67 a
5	$1,14 \times 10^9$ a	89,73 a	0,96 a	8,73 a	86,06 a
10	$1,00 \times 10^9$ a	88,00 a	0,63 ab	7,01 ab	84,89 a
15	$9,25 \times 10^8$ ab	85,63 a	0,49 abc	5,51 bc	79,89 a
30	$4,68 \times 10^8$ bc	86,49 a	0,47 abc	5,01 c	76,37 ab
60	$2,87 \times 10^8$ c	75,70 b	0,20 bc	4,34 c	66,08 b
90	$2,30 \times 10^8$ c	74,86 b	0,11 c	4,13 c	57,26 b

El análisis estadístico se realizó de forma independiente para cada variable. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

\*\*Unidad Enzimática UE (mmoles de *p*-nitrofenol liberados por minuto por mililitro a 35 °C).



**Tabla 4.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables respuestas (germinación, eficacia y actividades  $\beta$ -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa) de los conidios del hongo *N. rileyi* Nm006, producidos en fermentación sólida expuesta a choques de irradiación con luz UV-B.

	Geminación	Eficacia	Actividad $\beta$ -esterasa	Actividad <i>N</i> -acetilglucosaminidasa
Germinación	-----	0.8788	0.0519	0.3242
		p = 0,0450	p = 0,9339	p = 0,5946
Eficacia	0.8788	-----	0.0284	0.0246
	p = 0,0450		p = 0,9638	p = 0,9687
Actividad $\beta$ -esterasa	0.0519	0.0284	-----	0.39
	p = 0,9339	p = 0,9638		p = 0,5163
Actividad <i>N</i> -acetilglucosaminidasa	0.3242	0.0246	0.39	-----
	p = 0,5946	p = 0,9687	p = 0,5163	

de irradiación de 90 minutos con un valor de 0,11 UE (tabla 3). La exposición de los conidios desarrollados sobre el sustrato de producción masiva durante 5 minutos a la luz UVB aumentó 3,6 veces la actividad lipolítica con respecto a la de los conidios no expuestos a ningún choque, lo que sugiere que el nivel basal de esta enzima fue inducido por esta condición de estrés. Este resultado es interesante considerando que la alta producción de enzimas lipolíticas influye en el proceso de infección sobre el insecto plaga, donde la enzima  $\beta$ -esterasa actúa como iniciador en el proceso de infección sobre el insecto plaga degradando los ésteres grasos de la epicutícula (Pedrini et al., 2007).

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 ( $F=6,28$ ,  $gl=6$ ,  $p= 0,0001$ ) a las actividades enzimáticas de los conidios obtenidos de las fermentaciones con tiempos de irradiación superiores a 15 minutos (tabla 3). Como se describió anteriormente, la producción de las enzimas quitinolíticas 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 (Dhar & Kaur, 2009). Sin embargo, cuando se implementaron los choques de irradiación con tiempos superiores a 15 minutos se observaron 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.

El comportamiento de la actividad biológica de los conidios expuestos a los choques de irradiación fue similar al comportamiento de las variables rendimiento, germinación y actividades  $\beta$ -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa, ya que a medida que aumentó el tiempo de irradiación, se presentó una disminución en la eficacia (tabla 3). Con las variables eficacia, germinación y actividades  $\beta$ -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasase realizó un análisis de correlación de Pearson cuyos coeficientes de correlación para cada una de las interacciones se presentan en la tabla 4. El análisis 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 (tabla 2) y con lo descrito por otros autores (Altre et al., 1999; Safavi et al., 2007; Talaei-Hassanloui et al., 2007).

En el presente estudio no se evidenció una correlación lineal entre la eficacia y la actividad  $\beta$ -esterasa ( $r=0,0519$  y  $p=0,9339$ ), ni *N*-acetilglucosaminidasa ( $r=0,3242$  y  $p=0,5946$ ), lo que sugiere que el nivel basal de estas enzimas no está relacionado con la actividad biológica de los conidios de este aislamiento. Este resultado confirma que, aunque las lipasas son importantes en el proceso de infección de los hongos entomopatógenos (Pedrini et al., 2007), es posible que



su expresión no sea un factor determinante de la virulencia de los conidios del aislamiento de *N. rileyi* objeto del presente trabajo, resultado similar al observado cuando se implementaron los choques de temperatura.

La implementación de choques con luz UV-B durante el proceso de fermentación en el hongo *N. rileyi* no mejoró las características microbiológicas, enzimáticas y biológicas del microorganismo. Por esta razón, este factor de estrés no fue seleccionado para ser implementado en el proceso de producción masiva. Por otro lado, los choques térmicos, a las temperaturas de 5 °C y 45 °C, se seleccionaron porque no afectaron negativamente ninguna característica del microorganismo y aumentaron las actividades enzimáticas  $\beta$ -esterasa y *N*-acetilglucosaminidasa de los conidios. Dicha inducción enzimática podría mejorar la actividad insecticida del microorganismo sobre larvas de *S. frugiperda* y su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación de Colombia (COLCIENCIAS) el apoyo financiero de este trabajo.

#### Referencias bibliográficas

- Ali, S., Huang, Z., & Ren, S. (2009a). Media composition influences on growth, enzyme activity, and virulence of the entomopathogen hyphomycete *Isaria fumosoroseus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 131(1), 30–38.
- Ali, S., Huang, Z., & Ren, S. (2009b). Production and extraction of extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Isaria fumosoroseus* (Cordycipitaceae; Hypocreales). *Biocontrol Science and Technology*, 19(1), 81–89.
- Altre, J., Vanderberg, J., & Cantone, F. (1999). Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* Isolates to Diamond-back Moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73(3), 332–338.
- Amillastre, E., Aceves-Lara, C.A., Uribebarrea, J.L., Alfenore, S., & Guillouet, S.E. (2012). Dynamic model of temperature impact on cell viability and major product formation during fed-batch and continuous ethanolic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biore-source Technology*, 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. *Environmental Microbiology*, 8(9), 1625–1634.
- Bertholdo, L., Rossato, M., Terezinha, R., & Monteiro, N. (2003). Characterization of *Nomurea rileyi* strains using polymorphic DNA, virulence and enzyme activity. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(1), 13–18.
- Bosa, C., Chávez, D., Torres, L., París, A., Villamizar, L., & Cotes, A. (2004). Evaluación de aislamientos nativos de *Nomurea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 93–97.
- Boucias, D.G., Tigano, M.S., Sosa-Gomez, D.R., Glare, T.R., & Inglis, P.W. (2000). Genotypic properties of the entomopathogenic fungus *Nomurea rileyi*. *Biological Control*, 19(2), 124–138.
- Céspedes, Y., Pozo, E., García, I., & Méndez, A. (2008). Efecto de la temperatura sobre el hongo entomopatógeno *Nomurea rileyi* (Farlow) Samsom y su efectividad sobre *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith. *Revista de Protección Vegetal*, 23(3), 176–182.
- Charnley, A.K., & St Leger, R.J. (1991). The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis in insects., En: Cole G., Hoch H. (Eds.). *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. New York, USA, pp. 267–286.
- Copping, L. (2009). *The manual of biocontrol agents, the biopesticide manual*. Cuarta Edición. The British Crop Protection Council, Hampshire, Reino Unido.
- Corrochano, L., & Garre, V. (2010). Photobiology in the Zygomycota: Multiple photoreceptor genes for complex responses to light. *Fungal Genetics and Biology*, 47(11), 893–899.
- Dhar, P., & Kaur, G. (2009). Effects of carbon and nitrogen sources on the induction and repression of chitinase enzyme from *Metarhizium anisopliae* isolates. *Annals of Microbiology*, 59, 545–551.
- Duo-Chuan, L. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161, 345–60. EPA, 2015. Pesticides: Regulating pesticides. Recuperado de URL <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides>.
- Espinell, C., & Cotes, A. (2008). Sublethal effect of *Nomurea rileyi* on development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae). *IOBC/wprs Bollet*, 31, 257–260.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 363–370.
- Faria, M.R., & Wraight. (2007). Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3), 237–256.
- Fernandes, É.K.K., Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., & Roberts, D.W. (2015). Tolerance of entomopathogenic fungi

- to ultraviolet radiation: a review on screening of strains and their formulation. *Current Genetics*, 61(3), 427-440.
- 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(2), 273-281.
- Greene, G.L., Leppla, N.C., & Dickerson, W.A. (1976). Velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69(4), 487-488.
- Hallsworth, J., & Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 74(3), 261-266.
- Hallsworth, J.E., & Magan, N. (1995). Manipulation of intracellular glycerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology*, 141(5), 1109-1115.
- ICA (2015). Bioinsumos registrados al 28 de Febrero de 2015 Recuperado de <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Fertilizantes-y-Bio-insumos-Agricolas/Listado-de-Bioinsumos/2009/PRODUC-TOS-BIOINSUMOS-MAYO-13-DE-2008.aspx>
- Idnurm, A., & Heitman, J. (2005). Light controls growth and development via a conserved pathway in the fungal kingdom. *PLOS Biology*, 3(4), 615-626.
- Kang, S., Lee, S., Yoon, C., & Kim, S. (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, 135-139.
- Kaur, G., & Padmaja, V. (2009). Relationships among activities of extracellular enzyme production and virulence against *Helicoverpa armigera* in *Beauveria bassiana*. *Journal of Basic Microbiology*, 49(3), 264-274.
- León, M., & Pulido, J.I. (1991). Importancia del control natural del cogollero *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith p. En: Memorias Seminario *Spodoptera frugiperda* (El gusano cogollero) en sorgo, maíz y otros cultivos, p. 78-82.
- Liu, Q., Sheng-Hua, Y., & 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(1), 65-75.
- Magan, N. (2001). Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. En: Butt, T., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agent: Progress, Problems and Potential*. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K., p. 239.
- Mallikarjuna, D.R., Patil, R.K., Sujay, Y.H., & Ramegowda, G.K. (2010). Development and evaluation of wettable powder and oil based formulations of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson against *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal of Biological Control*, 24(3), 231-237.
- Murcia, M.G., Virla, E.G., & Defagó V. (2003). Evaluación de cuatro dietas artificiales para la cría de *Spodoptera frugiperda* destinada a mantener poblaciones experimentales de himenópteros parasitoides. *Boletín de Sanidad Vegetal de Plagas*, 29, 43-51.
- 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 Biology*, 117(7-8), 519-527.
- Olmedo, M. (2013). Regulation of transcription by light in *Neurospora crassa*: A model for fungal photobiology?. *Fungal Biology Reviews*, 27(1), 10-18.
- 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(2), 130-134.
- Pedrini, N., Crespo, R., & Juarez, M.P. (2007). Biochemistry of insect epicuticle degradation by entomopathogenic fungi. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146(1-2), 124-137.
- Perinotto, W.M.S., Angelo, I.C., Golo, P.S., Camargo, M.G., 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 Science and Technology*, 24(2), 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(2), 111-116.
- Rajan, T.S., & Muthukrishnan, N. (2009). Pathogenicity of *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson isolates against *Spodoptera litura* (Fabricius). *Journal Biological Control*, 23(1), 17-20.
- Rangel, D.E.N. (2011). Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6), 1281-1296.
- Rangel, D.E.N., Braga, G.U.L., Fernandes, É.K.K., Keyser, C. A., Hallsworth, J.E., & Roberts, D.W. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current Genetics*, 61(3), 383-404.
- 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. *The Journal of Research on the Lepidoptera*, 43, 7-8.

- Rodriguez, J., Hedtke, M., Kastner, C., Muller, S., & Fischer, R. (2010). Fungi, hidden in soil or up in the air: light makes a difference. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 585–610.
- Safavi, S.A. (2011). Successive subculturing alters spore-bound Pr1 activity, germination and virulence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Bio-control Science and Technology*, *21*, 883–891.
- Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Rasoulilian, G.R., Bandani, A.R., Butt, T.M., & Rasoulilian, G. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, *270*(1), 116–123.
- Santos, A., García, M., Cotes, A.M., & Villamizar, L. (2012). Efecto de la formulación sobre la vida útil de bio-plaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, *29*(3), 150–156.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews*, *22*(1), 36–42.
- Shah, P., & Pell, J.K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *61*(5-6), 413–423.
- 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*. *Current Microbiology*, *53*(2), 124–128.
- Small, C.N., & Bidochka, M.J. (2005). Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, *109*(3), 307–313.
- Srivastava, C.N., Maurya, P., Sharma, P., & Mohan, L. (2009). Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Bulletin of Entomological Research*, *39*(6), 341–355.
- St Leger, R.J., Cooper, R.M., & Charnley, A.K. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *Microbiology*, *132*, 1509–1517.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*(2), 1–6.
- Talaei-Hassanloui, R., Kharazi-pakdel, A., Goettel, M.S., Little, S., & Mozaffari, J. (2007). Germination polarity of *Beauveria bassiana* conidia and its possible correlation with virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, *94*(2), 102–107.
- Tang, L., & Hou, R.F. (2001). Effects of environmental factors on virulence of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, against the corn earworm, *Helicoverpa armigera* (Lep., Noctuidae). *Journal of Applied Entomology*, *125*(5), 243–249.
- 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). *Revista Colombiana de Entomología*, *30*(1), 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). *Revista Colombiana de Entomología*, *27*(1), 107–114.
- Zar, J. (1999). *Biostatistical Analysis*, Cuarta Edición. Editorial 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*. En: XXXIII Congreso Nacional de Control Biológico. pp. 399–403.