



“Evaluación de la producción de *Beauveria Bassiana* por fermentación en medio líquido para control biológico de *Tetranychus Urticae*, plaga del cultivo de rosas”

Luzón Betancourt, Mirla Yaninke

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Luis E. Trujillo, Ph.D.

Sangolquí

2023



MIRLA YANINKE LUZON BETANCOURT - TESIS MIRLA ANTIPLAGIO

Informe de originalidad

NOMBRE DEL CURSO

TESISTAS 2023

NOMBRE DEL ALUMNO

MIRLA YANINKE LUZON BETANCOURT



NOMBRE DEL ARCHIVO

MIRLA YANINKE LUZON BETANCOURT - TESIS MIRLA ANTIPLAGIO

SE HA CREADO EL INFORME

22 feb 2023

Resumen

Fragmentos marcados	3	0,3 %
Fragmentos citados o entrecorillados	1	0,2 %

Coincidencias de la Web

unitru.edu.pe	1	0,2 %
scielo.org.pe	1	0,1 %
springeropen.com	1	0,1 %
uce.edu.ec	1	0,1 %

1 de 4 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

...plaga T. urticae recolectada de la florícola BellaRo S.A. **ubicada en Tabacundo, cantón Pedro Moncayo, provincia Pichincha.**

Mejor coincidencia en la Web

Castro Sánchez, J. (2020). Diseño de Explotación de la Cantera Puruhantag, **ubicada en la Parroquia de Tabacundo, Cantón Pedro Moncayo, Provincia de Pichincha.**

Diseño de Explotación de la Cantera Puruhantag, ubicada en la ... <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/22349>

2 de 4 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

...Genetics of Beauveria bassiana Infection of Insects, 2016). Además, **enzimas como glucanasas y lipasas son importantes para la invasión y degradación del blanco.**

Mejor coincidencia en la Web

Beauveria bassiana actúa como parásito oportunista de hábitos patogénicos y saprófitos sobre diversos fitopatógenos limitando su actividad mediante la producción de **enzimas** quitinasas, **glucanasas**,...

Expresión de genes quitinasas de Beauveria ... - SciELO Perú http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172016000400011

3 de 4 fragmentos

Fragmento del alumno MARCADO

(Pham T. et al., **Production of Blastospore of Entomopathogenic Beauveria bassiana in a Submerged Batch Culture.**, 2009)

[Mejor coincidencia en la Web](#)

Pham TA, Kim JJ, Kim SG, and Kim K (2009) **Production of blastospore of entomopathogenic Beauveria bassiana in a submerged batch culture.**

Spore production of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana ... <https://appliedbiochem.springeropen.com/articles/10.1007/s13765-013-4175-5>

4 de 4 fragmentos

Fragmento del alumno CITADO

la expresión de dos genes de quitinasa a 0, 4 y 7 días, esto en **cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono** que contienen quitina: **quitina coloidal** 1,8%, **laminarina** 0,1%, **pulverizado de F**

[Mejor coincidencia en la Web](#)

La expresión de dos genes de quitinasas; el gen de la familia 18.4 (XM_008603039.1) y el gen CHIT1 (EU828354.1) de B. bassiana, se han evaluado mediante RT-qPCR a partir **de RNA** extraídos **a los 0, 4 y...**

Expresión de genes quitinasas de Beauveria bassiana frente a ... <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1172>



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “Evaluación de la producción de *Beauveria Bassiana* por fermentación en medio líquido para control biológico de *Tetranychus Urticae*, plaga del cultivo de rosas” fue realizado por la señorita **Luzón Betancourt, Mirla Yaninke**: el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente

Sangolquí, 23 de febrero de 2023



Luis Enrique Trujillo Toledo, PhD.

C.C.: 1755850276



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Luzón Betancourt, Mirla Yaninke**, con cédula de ciudadanía N°1725783540, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "**Evaluación de la producción de *Beauveria Bassiana* por fermentación en medio líquido para control biológico de *Tetranychus Urticae*, plaga del cultivo de rosas.**" es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos y científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando a las citas, bibliográficas.

Sangolquí, 23 de febrero del 2023

Luzón Betancourt, Mirla Yaninke

C.C.: 1725783540



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Luzón Betancourt, Mirla Yaninke, con cédula de ciudadanía n° 1725783540, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Evaluación de la producción de *Beauveria Bassiana* por fermentación en medio líquido para control biológico de *Tetranychus Urticae*, plaga del cultivo de rosas" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 23 de febrero del 2023

Luzón Betancourt Mirla Yaninke

C.C.: 1725783540

Dedicatoria

A dios, que me permitió levantarme cada día llena de luz y espiritualidad para compartir mi vida con los demás

A mi padre y madre, Carlos y Lorena, pilares en mi vida, ellos me enseñaron todo lo que se y por ellos el día de hoy puedo culminar con éxito este trabajo y etapa de mi vida, no tengo palabras para agradecerles por nunca dejar de creer en mí, en mis capacidades y en mi potencial.

A mi hermano, Carlos Andrés ejemplo para mi vida, al cual respeto y admiro todos los días, espero algún día ser un poco más como tú hermano.

A mi Dorita, abuelita gracias por llenarme de amor y bendiciones todos los días.

A mi querida Isis Cleopatra, gracias por reposar tu cabeza en mi hombro en los días más oscuros.

Agradecimiento

A mi padres y hermano, soporte en cada etapa de mi vida, me vieron con ilusión y amor todos los días de mi existencia, hoy soy grande por ustedes y les ofrezco todos mis logros hoy y siempre.

A toda mi familia, ejemplo de trabajo y superación, quienes me enseñaron sobre el esfuerzo, la caridad y humildad, me apoyaron en momentos difíciles y me llenaron de amor todos los días

A mi familia Álvarez-Yáñez, parte fundamental de mi desarrollo profesional y personal, ellos me han tomado la mano, curado mis heridas y secado las lágrimas en más de una ocasión.

A mis amigos Nash, Shell, Mario y Andrés mi fuente de felicidad estos años de universidad, me han brindado apoyo incondicional, amor y respeto. A Alex, Mery y Dani los he visto reír, llorar y crecer, me han hecho sentir parte de sus vidas y han llenado la mía.

A la Dra. Carina Proaño, ejemplo de cómo ser un buen profesional y buena persona, inspira a todos sus alumnos y en mi ha sembrado el valor necesario para ser una mujer en ciencia.

A David Ramírez por creer en mis capacidades y permitirme desarrollar este trabajo de investigación en la empresa BellaRo S.A., empresa donde incrementé mis habilidades profesionales y personales junto a todo el equipo de trabajo que siempre estuvo dispuesto a colaborar en mi investigación, en especial a Alexandra Bravo por compartir conmigo todos tus conocimientos.

Al Dr. Luis Trujillo mi tutor de investigación, quién me apoyo en todas las fases del proyecto.

Índice de contenidos

Resultado de análisis Google Assignments	2
Certificación	4
Responsabilidad de Autoría	5
Autorización de Publicación	6
Dedicatoria	7
Agradecimiento	8
Resumen	15
Abstract	16
Capítulo I: Introducción	17
Formulación del Problema	17
Justificación del Problema	17
Objetivos	19
Objetivo general	19
Objetivos Específicos	19
Capítulo II: Marco teórico	19
Plaga: Ácaro <i>Tetranychus urticae</i>	19
Control biológico: Hongos entomopatógenos	22
Beauveria bassiana	23
Método de producción de <i>B. Bassiana</i>	30
Fermentación Líquida	32
Capítulo III: Materiales y Métodos	36

Reactivación e identificación de <i>B. bassiana</i>	36
Activación de <i>B. bassiana</i>	36
Descripción macroscópica y microscópica	37
Reactivación de aislamientos de <i>B. Bassiana</i>	37
Caracterización molecular de la cepa de <i>B. bassiana</i> activada	38
Conservación de la cepa	40
Recuento de esporas.....	40
Medios y condiciones de cultivo	41
Diseño de fermentadores	41
Medios de cultivo	42
Ensayos de actividad enzimática	48
Cuantificación de actividad enzimática	48
Bioensayos.....	50
Recolección e identificación de Ácaros <i>T. urticae</i>	50
Desinfección y preparación de matrices experimentales	51
Preparación de diluciones	52
Diseño experimental	52
Primera etapa.....	53
Segunda etapa.....	54
Tercera Etapa	55
Capítulo IV: Resultados y Discusión	57
Identificación y reactivación del hongo entomopatógeno	57
Identificación macroscópica y microscópica de <i>B. bassiana</i>	57

Reactivación aislamiento <i>B. bassiana</i>	59
Identificación molecular de <i>B. bassiana</i>	60
Medios y condiciones de cultivo	63
Crecimiento de <i>B. bassiana</i> en cultivo líquido con diferentes fuentes de carbono	63
Crecimiento de <i>B. bassiana</i> en medio líquido con presencia y ausencia de quitina.	69
Bioensayos.....	74
Identificación morfológica de <i>T. urticae</i>	74
Preparación ensayos de susceptibilidad de <i>T. urticae</i>	75
Análisis estadísticos.....	76
Conclusiones.....	92
Recomendaciones	92
Bibliografía	93
Apéndices	108

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica de <i>T. urticae</i></i>	21
Tabla 2 <i>Características de fermentación en estado líquido y fermentación en estado sólido para <i>B. bassiana</i></i>	30
Tabla 3 <i>Producción de Quitinasas por <i>B. bassiana</i> en diferentes medios de cultivo</i> ...	35
Tabla 4 <i>Secuencia de los primers utilizados en la amplificación de la región ITS1- DNAr 5,8S-ITS2 del hongo</i>	39
Tabla 5 <i>Esquema referencial de fermentador para <i>B. bassiana</i></i>	42
Tabla 6 <i>Composición de medios de cultivo para la propagación de <i>Beauveria bassiana</i></i>	44
Tabla 7 <i>Composición de medios de cultivo para la propagación de <i>Beauveria bassiana</i> con cáscara de camarón desproteinizada como inductor de quitinasas</i>	47
Tabla 8 <i>Diluciones para la elaboración de la curva patrón de N- acetil - glucosamina (NAG)</i>	49
Tabla 9 <i>Tratamientos para la fermentación líquida de <i>B. bassiana</i> con distintas fuentes de carbono</i>	53
Tabla 10 <i>Codificación para tratamientos de fermentación líquida de <i>B. bassiana</i> con distintas fuentes de quitina</i>	54
Tabla 11 <i>Tratamientos para el control de <i>T. urticae</i> con <i>B. bassiana</i> a distintas concentraciones</i>	55
Tabla 12 <i>Tratamientos para el control de <i>T. urticae</i> con <i>B. bassiana</i></i>	56
Tabla 13 <i>Secuencia con alta similitud al hongo reactivado sobre la plaga <i>T. urticae</i></i> ..	61
Tabla 14 <i>Concentraciones de blastosporas con distintas fuentes de carbono</i>	67
Tabla 15 <i>Concentraciones letales para <i>B. basiana</i> sobre <i>T. urticae</i> en bioensayos a nivel de laboratorio</i>	82
Tabla 16 <i>Clasificación según Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), de los ingredientes activos presentes en los diferentes tratamientos</i>	87

Índice de figuras

Figura 1 <i>Ciclo de vida Tetranychus urticae</i>	20
Figura 2 <i>Mecanismo de corte de Endoquitinasa, exoquitinasa y N-Acetilglucosaminidasa</i>	28
Figura 3 <i>Estructura 3D de la quitinasas ARSEF2860 de B. bassiana</i>	29
Figura 4 <i>Caracterización morfológica del hongo entomopatígeno B. bassiana</i>	58
Figura 5 <i>Crecimiento de B. bassiana sobre T. urticae</i>	59
Figura 6 <i>Vista del amplicon de B. bassiana por electroforesis en gel de agarosa al 1%</i>	60
Figura 7 <i>Secuencias usadas para construir el árbol filogenético de B. bassiana rRNA/ITS, Árbol filogenético de B. bassiana rRNA/ITS</i>	62
Figura 8 <i>Crecimiento de B. bassiana en fermentadores de medio líquido con distintas fuentes de carbono</i>	63
Figura 9 <i>Nivel de blastosporas/ml de B. bassiana en distintos tiempos 0, 48, 96 y 168 h</i>	64
Figura 10 <i>Crecimiento de B. bassiana en diferentes medios líquidos con 3 fuentes de carbono</i>	66
Figura 11 <i>Crecimiento de B. bassiana en distintos medios con fuentes de quitina</i>	70
Figura 12 <i>Nivel de blastosporas/ml de B. bassiana en distintos medios con quitina para 0,24,48,72,96,120,144 y 168 h</i>	71
Figura 13 <i>Crecimiento de B. bassiana en diferentes medios líquidos con presencia de quitina y sacarosa al 3% p/v</i>	72
Figura 14 <i>Actividad enzimática quinolítica medida en diferentes medios con quitina y sacarosa al 3% p/v</i>	73
Figura 15 <i>Ácaro rojo Tetranychus urticae</i>	75
Figura 16 <i>Proceso de montaje de bioensayos y control de cobertura sobre T. urticae</i> 76	
Figura 17 <i>Resumen de fotografías de controles para bioensayos sobre T. urticae</i>	77

Figura 18 Susceptibilidad de <i>T. urticae</i> a distintas concentraciones de <i>B. bassiana</i> al séptimo día de aplicación	78
Figura 19 Porcentaje de Mortalidad y Reducción en la oviposición de <i>T. urticae</i> a <i>B. bassiana</i>	79
Figura 20 Modelo Probit aplicado para el % Mortalidad y % Reducción de la oviposición de <i>T. urticae</i> a <i>B. bassiana</i>	81
Figura 21 Valores de CL 50 para la mortalidad de <i>T. urticae</i> de distintos aislados de <i>B. bassiana</i>	82
Figura 22 Susceptibilidad de <i>T. urticae</i> a <i>B. bassiana</i> obtenida del medio líquido CMB, CMC y CP.....	85
Figura 23 Susceptibilidad de <i>T. urticae</i> a los agroquímicos Milbecnock 0,75 cc/l y Starmite 30 SC 0,35 cc/l.....	86
Figura 24 Susceptibilidad de <i>T. urticae</i> a <i>B. bassiana</i> obtenida de diferentes medios líquidos con presencia y ausencia de fuentes de quitina y acaricidas comerciales	88
Figura 25 Prueba Kruskal Wallis para establecer diferencias en % Mortalidad, % Reducción de la oviposición y Media de huevos por ácaros en diferentes tratamientos.....	89
Figura 26 Actividad enzimática y efecto de <i>B. bassiana</i> en diferentes medios de cultivo sobre <i>T. urticae</i>	90
Figura 27 Propuesta de método de producción de <i>B. bassiana</i> en medio líquido.....	91

Resumen

Las rosas representan uno de los cultivos más importantes en el país, siendo *T. urticae* la plaga más recurrente en rosas, dejando grandes impactos negativos en esta plantación, hongos entomopatógenos como *B. bassiana* son prometedores para el manejo integrado de plagas, donde se busca un control eficiente con menor impacto medio ambiental. En el presente trabajo se evaluó un aislado de *B. bassiana* activado sobre la plaga *T. urticae*, este fue identificado mediante claves macroscópicas y microscópicas, además de un análisis molecular. La fermentación líquida de *B. bassiana* permitió tener la disponibilidad del entomopatógeno a concentración de 1.5×10^9 con sacarosa al 3% p/v como fuente de carbono y sales basales que ayudaron a su crecimiento, se realizaron bioensayos a nivel de laboratorio que permitieron conocer la susceptibilidad de *T. urticae* al hongo, la concentración letal 50 para la mortalidad de *T. urticae* por *B. bassiana* es de $5,42E+07$, el mayor porcentaje de mortalidad fue superior al 50% a concentraciones 10^8 , además de la reducción de la oviposición en un 97% a la misma concentración, también se concluyó que la presencia de quitina en los medios líquidos mejoró la patogenicidad de *B. bassiana* sobre *T. urticae*, siendo la quitina coloidal el sustrato que permitió una mayor concentración de enzima extracelular.

Palabras Claves: Entomopatógenos, Control biológico, Conidios, Quitina

Abstract

Roses represent one of the most important crops in the country, being *T. urticae* the most recurrent pest in roses, leaving great negative impacts on this plantation, entomopathogenic fungi such as *B. bassiana* are promising for integrated pest management, where it is sought efficient control with less environmental impact. In the present work, an isolate of *B. bassiana* activated on the pest *T. urticae* was evaluated, it was identified by means of macroscopic and microscopic keys, as well as a molecular analysis. The liquid fermentation of *B. bassiana* made it possible to have the availability of the entomopathogen at a concentration of 1.5×10^9 with 3% w/v sucrose as a carbon source and basal salts that helped its growth, bioassays were carried out at the laboratory level that allowed knowing the susceptibility of *T. urticae* to the fungus, the lethal concentration 50 for mortality of *T. urticae* by *B. bassiana* is 5.42×10^7 , the highest percentage of mortality was higher than 50% at concentrations 10^8 , in addition to the reduction of oviposition in 97% at the same concentration, it was also concluded that the presence of chitin in liquid media improved the pathogenicity of *B. bassiana* on *T. urticae*, colloidal chitin being the substrate that allowed a higher concentration of extracellular enzyme.

Key Words: Entomathetics, Biological Control, Spore, |Chitin

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

Según la Corporación financiera nacional (2021), Ecuador posee alrededor de 237 empresas dedicadas al cultivo de flores, las cuales ocupan una superficie de 4 930 hectáreas. En un 67% de estas se cosechan Rosas *Rosa spp*, que en su mayoría son exportadas a destinos en el extranjero, principalmente Estados Unidos y diferentes países en Europa, haciéndolo uno de los cultivos de más importancia en el País.

Sin embargo, el cultivo de rosas es susceptible a diferentes enfermedades, por la presencia de hongos, bacterias y artrópodos. La araña roja de dos puntos *Tetranychus urticae* es una de las plagas económicamente más representativas del cultivo de flores tanto en invernadero como en campo abierto. El uso intensivo de acaricidas junto con el corto periodo de vida y abundante descendencia, resulta en el rápido apareamiento de poblaciones resistentes que dan problemas de persistencia, lo que nos lleva a buscar alternativas para el tratamiento de esta plaga (Ho Kwon et al. , 2015; Chacón et al. , 2020).

Justificación del Problema

Las prácticas agrícolas actuales consideran necesario el uso excesivo de agroquímicos para lograr cumplir los objetivos de producción, es de conocimiento público que el uso desmedido de los mismos, afecta a la salud humana, vida silvestre y medio ambiente (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Organizaciones como FAO/OMS cada día imponen sistemas más rigurosos para limitar el uso de pesticidas e insecticidas con la finalidad de reducir y prevenir el impacto negativo en el medio ambiente (Varona et al. , 2005; Toumi et al. , 2017). Incluso la normativa ecuatoriana sugiere que para el tratamiento de plagas en los cultivos se debe priorizar el uso de agentes, físicos, mecánicos y biológicos antes de los químicos.

En busca de soluciones con una mejor sinergia con el medio ambiente a bajo costo, el control biológico atrae gran atención. El concepto base es utilizar microorganismos benéficos para reducir la densidad de plagas invasoras, manteniendo relaciones simbióticas

con los cultivos de interés. Los controles biológicos además crecen según la densidad del objetivo de tal manera, que si la plaga se extiende el control biológico se extiende y si la plaga disminuye el control biológico también lo hará. Es imprescindible mencionar que con un correcto manejo resultan inofensivos para el ser humano. Este conjunto de características refleja una clara ventaja sobre los agroquímicos (Lambert , 2010).

El hongo entomopatógeno *B. bassiana*, es capaz de colonizar a más de 700 especies de artrópodos incluidos ácaros y trips, los que actualmente representan el mayor problema de plagas en el cultivo de rosas de invernadero (Dannon et al., 2020). Además, es un medio de control ambientalmente amigable, del cual únicamente se han reportado incidentes leves como reacciones alérgicas en personas que manipularon el hongo de manera inadecuada, siendo esto una ventaja sobre el uso de agroquímicos, más en Ecuador donde se conoce que sólo dos de cada diez productores agrícolas han sido capacitados para el uso y manejo de insumos agrícola y más del 34% de las personas responsables de la aplicación de suplementos son jornaleros (Mollacana y Gonzales, 2020).

La colonización de los insectos por *B. bassiana* se ve favorecida por la presencia de enzimas y metabolitos secundarios. Enzimas de especial interés como las quitinasas, capaces de hidrolizar la quitina presente en el exoesqueleto de artrópodos, son producidas por este hongo, haciéndolo un prometedor agente de biocontrol (Van Driesche y Abell, 2008).

La viabilidad del uso de controles biológicos como *B. bassiana*, a bajo costo y de fácil mantención está en desarrollar un proceso de producción que nos permita obtener altas concentraciones de hongo cuidando la presencia de metabolitos secundarios que aumenten su patogenicidad contra los insectos invasores. Este entomopatógeno ha sido producido por fermentación en estado sólido, fermentación en estado líquido y fermentación difásica, *Beauveria* reporta un crecimiento óptimo en bolsas de arroz, siendo un método eficiente, de bajo costo y estudiado ampliamente (Bautista et al., 2018), no obstante, la fermentación en estado líquido recientemente estudiada promete iguales o superiores

rendimientos, con propágulos infecciosos activos como blastosporas y conidios sumergidos. Además, este método busca mejorar los procesos de separación o cosecha, que resultan una desventaja cuando el hongo crece junto a una matriz sólida.

Objetivos

Objetivo general

- Evaluar la producción de *Beauveria bassiana* por fermentación en medio líquido para control biológico de *Tetranychus urticae*, plaga del cultivo de rosas.

Objetivos Específicos

- Caracterizar a nivel morfológico y molecular el hongo *B. bassiana* activado sobre la plaga *T. urticae* recolectada de la florícola BellaRo S.A. ubicada en Tabacundo, cantón Pedro Moncayo, provincia Pichincha.
- Identificar entre azúcar, melaza y licor fermentado de caña la fuente de carbono óptima para la fermentación líquida de *B. bassiana*.
- Determinar si la presencia o ausencia de fuentes de quitina en los medios de cultivo influyen en la actividad enzimática de quitinasas extracelulares de *B. bassiana*.
- Demostrar el antagonismo de *B. bassiana* sobre *T. urticae*, mediante bioensayos a nivel de laboratorio.
- Plantear un proceso productivo de *B. bassiana* que permita la disponibilidad del mismo

Capítulo II: Marco teórico

Plaga: Ácaro *Tetranychus urticae*

Más conocidos como ácaros araña de dos manchas, siguen siendo la plaga más importante en rosas de invernadero. Su ciclo de vida se desarrolla dentro de 7 – 8 días a 27,5 – 32,5°C y bajo humedad (55-60%), en climas fríos el ciclo de vida puede aumentar alrededor de 14 días, consta de cinco fases de desarrollo; huevo, larva, protoninfa,

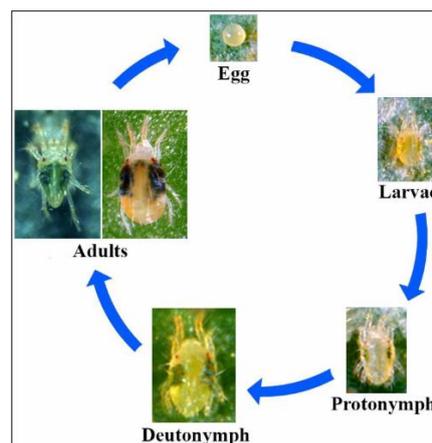
deutoninfa y adulto, estas incluyen tres periodos de inactividad (protocrisis, deutocrisis y teliocrisis) donde carecen de sensibilidad al acaricida (Edde, 2022).

Poseen un ciclo de vida corto y alto potencial reproductivo lo que provoca resistencia a muchos métodos de control químico, además, de una fácil distribución a lo largo de la planta (Chacón et al., 2020).

Cuando son adultos desarrollan dimorfismo sexual donde las hembras son ligeramente más grandes que los machos y tiene una forma ovoide a comparación, en contraste, los machos tendrán el extremo caudal más afilado que el de las hembras, con patas proporcionalmente más largas. Ambos, poseen dos manchas características que son la acumulación de partículas de desecho en el intestino del ácaro y su coloración dependerá del sustrato del que se alimenten (Auger et al., 2013).

Figura 1

Ciclo de vida *Tetranychus urticae*



Nota: El ciclo de vida de *T. urticae* consta de cinco etapas de desarrollo de huevo, larva, protoninfa, deutoninfa y adulto. *T. urticae* pasa de huevo a adulto en aproximadamente 7 días a 27°C y humedad del 55 al 60% (Namín, 2017)

Las hembras pueden comenzar la oviposición uno o dos días después de alcanzar la adultez, con una media de puesta de 5 a 12 huevos por día. Los cuales eclosionan en

alrededor de 5 días a temperatura y humedad favorables. Cada hembra puede poner de 100 a 150 huevos en su tiempo de vida (Namín, 2017).

Haque et al. (2009) estudió las etapas de desarrollo del ácaro de dos manchas *T. urticae* en plantas de frejol, llegó a la conclusión de que altas temperatura aceleran la tasa de desarrollo y reducen el tiempo de cambio de fase en el ciclo de vida de los ácaros, relata que a $28,53 \pm 3,17^{\circ}\text{C}$ el ciclo de vida se puede completar dentro de $4,22 \pm 0,46$ días, no obstante, en meses con temperaturas iguales o inferiores a 13°C el tiempo de desarrollo aumentaría a $28,33 \pm 2,36$ días.

T. urticae se alimenta principalmente del envés de la hoja, dejando un daño similar a la clorosis, la hoja afectada puede perder turgencia, enroscarse y finalmente caerse, este problema provoca que el botón floral no se desarrolle de manera efectiva (Onstad y Knolhoff, 2014).

La clasificación taxonómica de *Tetranychus urticae* es la siguiente:

Tabla 1

Clasificación taxonómica de T. urticae

Taxonomía	
Reino	Animalia
Filo	Artrópodo
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Orden	Prostigmata
Familia	Tetranychidae
Género	Tetranychus
Especie	<i>T. urticae</i>

Nota: (Morillo, 2020)

Control biológico: Hongos entomopatógenos

Existe un fenómeno ecológico de regulación donde las plantas y los animales mantienen un equilibrio con sus enemigos naturales, mediante bacterias, hongos, parásitos y depredadores benéficos. El uso de estos por el hombre se conoce como control biológico donde sirven de alternativa para tratar distintas plagas en los cultivos. Este método es autosostenible debido a que el agente de control mantiene su propia población, a medida que reduce la densidad de la plaga, si esta llegará a aumentar, el controlador también aumentaría y viceversa (Nicholls, 2008).

Los hongos entomopatógenos son microorganismos capaces de regular naturalmente poblaciones de insectos y arácnidos. Primero penetran la cutícula del objetivo, con la ayuda de metabolitos y enzimas, después colonizan el objetivo provocándoles la muerte; se conoce que aproximadamente el 60% de las enfermedades de los insectos son causadas por hongos. Se utilizan en reemplazo de insecticidas químicos, algunas especies de hongos como *B. bassiana* y *Metarhizium* han sido ampliamente estudiadas para el control de plagas, en el caso de *B. bassiana* ha sido capaz de controlar más de 40 plagas agrícolas y forestales eficazmente, siendo descrito por primera vez en 1835 por Agostino Bassi (Maniania et al. , 2008; Mantzoukas et al. , 2022).

Se ha estudiado el uso de hongos entomopatógenos contra *T. urticae* tanto *in vitro* como en invernaderos, Tamai et al. (2002) evaluó 45 aislamientos de hongos mitospóricos contra *T. urticae*, de estos 32 aislados de *B. bassiana* y 10 de *Metarhizium anisopliae*, 8 aislados de *B. bassiana* y 4 de *M. anisopliae* causaron mortalidad de más del 80% en concentraciones de 5×10^7 conidios/ml.

Dogan et al. (2017) evaluaron la susceptibilidad de *T. urticae* a 5 diferentes hongos incluidos *B. bassiana* y *Lecanicillium lecanii*, donde estos causarían mortalidad principalmente en adultos en un 80 a 90% en $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Beauveria bassiana

B. bassiana es un entomopatógeno, cosmopolita facultativo, saprófito, capaz de infectar a más de 700 especies de insectos de los principales órdenes (Keswani et al. , 2013; Ortiz-Urquiza & Keyhani, Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects, 2016). Sus colonias son blancas, luego amarillentas u ocasionalmente rojizas, el revés no tiene color, no obstante, en algunos casos puede tornarse de amarillo a rosado. Las esporas asexuales son de color blanco a amarillo, poseen su parte basal globosa en forma de matraz y un raquis de hasta 20 mm de largo, en su mayoría formando un zig-zag. Los conidios son globosos de forma elipsoidales, dispuestos como racimos similares a bolas de algodón generalmente de 2 -3 por 2- 2,5 μm . Las hifas tienen un diámetro que oscila entre 2,5 μm y 25 μm (Zimmermann, 2007; Dannon et al. , 2020).

Además de ser patógeno para insectos puede adaptarse a diferentes nichos ecológicos, sobrepasando la interacción insecto huésped. Crece como endófilo, estableciendo mutualismo con una amplia gama de plantas, siendo parte de la rizosfera vegetal, por lo que es posible el aislamiento de diferentes cepas a partir del suelo, insectos con muscardina blanca (enfermedad fúngica donde se visualiza la momificación de insectos por el desarrollo de los hongos) y plantas (Zimmermann, 2007; Xiao et al. , 2012; Ortiz-Urquiza & Keyhani, Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects, 2016; Ortiz-Urquiza, The Split Personality of *Beauveria bassiana*: Understanding the Molecular Basis of Fungal Parasitism and Mutualism, 2021).

Proceso de infección de *Beauveria bassiana*

1.- Adherencia del hongo: El ciclo patogénico de *B. bassiana* comienza con la unión del hongo a la cutícula de los insectos, varias de las etapas de desarrollo de este resultan infecciosas; incluyendo, hifas, conidios aéreos, blastosporas y conidios sumergidos, estos dos últimos son producidos en medios líquidos. La unión se debe a la hidrofobicidad, fuerzas electrostáticas y químicas de los conidios, además dependerán de las superficies cuticulares (Feng et al., 1994).

2.- Germinación: En la germinación es necesario que las enzimas fúngicas extracelulares degradan la cutícula del insecto, compuesta principalmente de quitina y proteínas, para facilitar la penetración de las hifas en el hemolinfoide del hospedador. La cutícula de los insectos en su mayoría está recubierta de sustancias importantes para el reconocimiento de hongos, como aminoácidos libres o péptidos, y puede desencadenar la unión y la germinación. La germinación de *B. bassiana* comienza después de aproximadamente 10 h y se completa en gran medida a las 20 h de 20 a 25°C (Mascarin y Jaronski, 2016).

3.- Penetración y proliferación del hongo en el insecto: La penetración se da con más facilidad en áreas delgadas y no esclerotizadas de la cutícula como articulaciones, entre segmentos o piezas bucales. Se da por medios mecánicos y por la producción de varias enzimas, incluyendo proteasas, quitinasas y lipasas. Al llegar las hifas a la hemolinfa rica en nutrientes, el hongo brota en blastosporas, diferentes a las producidas en medios líquidos, estas son unicelulares especializadas para la invasión del insecto, colonizan los tejidos internos y evaden el sistema inmunitario del huésped. La correcta invasión está relacionada con la producción de metabolitos toxicogénicos in vivo, enzimas antioxidantes y actividad vegetativa (Ortiz-Urquiza & Keyhani, Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects, 2016)

4. Muerte del insecto y producción de nuevos conidios: Las hifas van creciendo desde el interior del insecto hacia el exterior, involucran al menos la maquinaria enzimática usada para la penetración. La muerte del insecto inicia con la proliferación de las hifas en el hemocele, en condiciones óptimas de humedad y temperatura, el hongo emerge y produce conidios en la superficie del huésped (Zimmermann, 2007).

En algunos casos no se reporta la muerte del objetivo, sin embargo, *B. bassiana* puede tener efectos subletales como reducción de la fertilidad, fecundidad y desarrollo de huevos (Maniania et al., 2008).

Metabolitos Secundarios y Enzimas. Cuando los conidios del hongo germinan dentro del insecto forman blastosporas y secretan metabolitos secundarios que les ayudan en la infección y muerte del insecto, *B. bassiana* secreta metabolitos secundarios y pequeñas moléculas de gran interés, como beauvericina, bassiacridina, bassianolida, beauverolidas, oosporein, ácido oxálico, cristales de oxalato de calcio y muchos análogos de beauvericina (Wang et al., 2021).

La más reconocida por su patogenicidad es la beauvericina, un péptido capaz de unirse a cationes monovalentes para ser transportado a través de la membrana celular, con la finalidad de desacoplar la fosforilación oxidativa dándole así su reconocida actividad insecticida (Xu et al., 2008).

La bassiacridina es una proteína que ha mostrado acción tóxica en insectos, provocando una mortalidad cercana al 50 % en langostas expuestas a concentraciones bajas, los efectos de las fracciones cruda y pura se caracterizaron a nivel tisular y celular, resultante en la formación de manchas melanizadas en las tráqueas y sacos aéreos y de nódulos melanizados en contacto con el cuerpo graso. Además de alteraciones de la estructura fina de las células epiteliales de la tráquea, bolsas de aire y tegumento (Quesada-Moraga y Vey, 2004).

El péptido bassianolida producido de manera no ribosomal es reconocido por ser un factor de patogenicidad contra insectos, se conoce que la presencia de este péptido está asociada a clusters de genes específicos que se activa en presencia de estrés ambiental o de una íntima exposición a otros organismos (Rosas et al., 2020).

Debido a la naturaleza hidrófoba de las beauverolidas es poco probable que sean liberados por el hongo, estos metabolitos secundarios sirven activamente para eludir las respuestas inmunitarias del insecto, inhibiendo la fagocitosis de las células del hongo teniendo efectos citotóxicos (Vilcinskas et al., 1999), en estudios realizados en larvas de

Galleria mellonella esta toxina causó alteraciones en el citoesqueleto (Villegas-Mendoza et al., 2019).

Otro metabolito de interés es la oosporeína reconocida porque ejerce actividad antimicrobiana, antioxidante y citotóxica (Fan et al., 2017), además de que formulaciones ricas en este metabolito proporciona una medida eficaz de control de plagas, en particular contra *Aphididae*, *Delphacidae*, *Cicadellidae*, *Cercopidae*, *Aleyrodidae*, *Coccidae*, *Coleoptera* y *Lepidoptera* (Eyal, 1993).

Durante la fase de patogenia, las hifas en desarrollo de *B. bassiana* liberan enzimas hidrolíticas extracelulares que permiten que el hongo penetre el tegumento de los insectos, entre las primeras enzimas caracterizadas en *B. bassiana* se encuentran las quitinasas y proteasas (Ortiz-Urquiza & Keyhani, Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects, 2016). Además, enzimas como glucanasas y lipasas son importantes para la invasión y degradación del blanco.

Quitinasas

El Hongo *B. bassiana* durante el proceso de penetración produce enzimas extracelulares como quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas, las quitinasas permiten la degradación de la cutícula del objetivo (Zhu et al., 2008), participando activamente en diversas etapas de infección como germinación de los conidios, crecimiento de hifas y la penetración antes mencionada (Paredes et al., 2016).

La cutícula del insecto, es la barrera externa de protección que consta de una epicutícula exterior delgada con lípidos y proteínas, y una procutícula gruesa, con quitina y proteínas, la quitina además de encontrarse en insectos, también forma parte del exoesqueleto de hongos y diferentes crustáceos (Charnley, 2003).

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son glicosil hidrolasas con un peso molecular entre 20 y 90 kDa, que catalizan la degradación de la quitina, un homopolímero no ramificado de bajo peso molecular; constituido de 1, 4 N-acetilglucosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa)

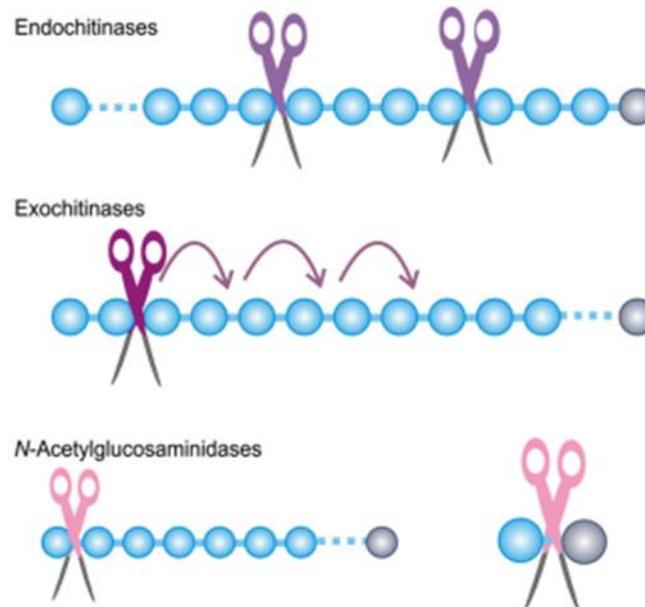
unidos por enlaces β -1,4; las quitinasas degradan la quitina hidrolizando el enlace β -(1, 4) (Hamid et al., 2013).

Es importante indicar que las quitinasas pueden ser divididas en dos categorías endoquitinasas y exoquitinasas, las endoquitinasas (EC3.2.1.14) son capaces de hidrolizar la quitina en sitios aleatorios internos, dando como resultado multímeros solubles de bajo peso molecular de N-Acetilglucosamina, estos pueden ser quitotetraosa, quitotriosa y diacetilquitobiosa, no obstante, las exoquitinasas hidrolizan los enlaces de forma progresiva, escindiendo el extremo de la cadena no reductora y el producto liberado es la diacetilquitobiosa, de esta forma no se generan monosacáridos ni oligosacáridos. Además, la β -(1,4)-N-acetyl-glucosaminidasas (GlcNAcase, EC3.2.1.30) o quitobiasas parte de las exoquitinasas, dividen diacetilquitobiosa, polímeros de la quitina incluidos quitotriosa y quitotetraosa, en monómeros de N-Acetilglucosamina (Sahai & Manocha, 1993; Seidl, 2008; Hoang Loc et al. , 2019).

Siendo posible medir la actividad enzimática de las quitinasas, mediante la cuantificación de azúcares reductores liberados de sustratos conocidos como la quitina coloidal.

Figura 2

Mecanismo de corte de Endoquitinasa, exoquitinasa y N-Acetilglucosaminidasa

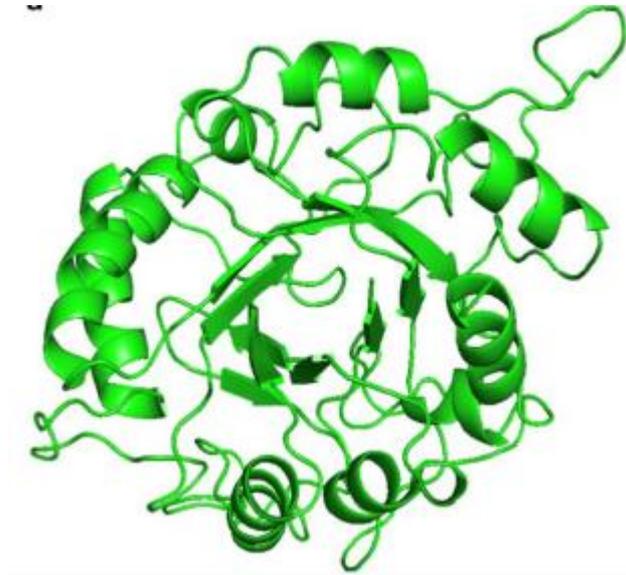


Nota: Se ilustra el corte en la Microfibrilla de quitina representada por círculos celestes, Endoquitinasas realizan cortes aleatorios que resultan en multímeros, las exoquitinasas liberan diacetilquitobiosa (N-acetylglucosamine más la terminal reductora), finalmente N-acetyl-glucosaminidasas que dividen la quitina en monómeros de N-Acetilglucosamina (Seidl, 2008).

Las quitinasas fúngicas pertenecen en su mayoría a la familia 18 de la superfamilia de glicohidrolasas, se han localizado extracelularmente, en el espacio periplásmico y en el plasma de diferentes hongos (Duo-Chuan, 2006). En algunos casos poseen 5 dominios: (1) dominio catalítico, (2) región del péptido señal N-terminal, (3) dominio de unión a quitina, (4) región rica en serina/treonina, y (5) región de extensión C-terminal. No obstante, la mayoría de las quitinasas fúngicas carecen de las regiones 3,4,5 aun así, mantiene su actividad enzimática (Hamid et al., 2013).

Figura 3

Estructura 3D de la quitinasas ARSEF2860 de B. bassiana



Nota: Bhagwat et al. (2020) desarrolló el modelo 3D de la enzima quitinasa creado por modelado de homología y validado por ERRAT, Verify 3D y RAMPAGE.

Genes codificadores de quitinasas como Bbchit1-1 y Bbchit1-2 han sido utilizados para la sobre expresión de quitinasas en *B. bassiana*, mejorando su patogenicidad dando concentraciones letales del 50 % y tiempos letales del 50 % significativamente más bajos de los transformantes en comparación con los valores de la cepa de tipo salvaje (Fang et al., 2005). Paredes et al. (2016) reportaría que los genes Bbchit1-1 y el gen de la familia 18.4 (XM_008603039.1) pueden utilizarse para la sobre expresión de quitinasas en *B. bassiana*.

Según la naturaleza de las quitinasas tendrán rangos de pH y temperatura óptimos, en su mayoría de observa que para la producción de quitinasas fúngicas la temperatura oscilan entre 25 – 30 °C y pH entre 4,81 y 7,94 (Sahai y Manocha, 1993) (Elawati et al., 2018).

Fang et al. (2005) purificó la endoquitinasa Bbchit de *B. bassiana*, reportando que su peso molecular es de aproximadamente 33 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 5,4, de

igual forma la quitinasa Chit37 de *B. bassiana* (cepa Bv062) reportada por Lovera et al. (2020) tuvo un peso molecular teórico de 36,7 kDa y un pI de 5,94. Bhagwat et al. (2020) aisló 15 diferentes tipos de quitinasas en su mayoría extracelulares y su peso molecular varió de 34,25 a 49,27 kDa, con un pI teórico de 4,81 a 7,94 respectivamente.

Método de producción de *B. Bassiana*

El cultivo de *B. bassiana* se ha evaluado con gran énfasis, ahora se conoce que medios de fermentación bifásica y sumergidos son los más viables para la producción en masa de este organismo, ambos tienen ventajas y desventajas, además que según el método usado en la producción se podrá tener un propágulo infeccioso de *B. bassiana* (Bautista et al., 2018). La tabla 2 detalla las principales diferencias entre estos métodos de producción.

Tabla 2

Características de fermentación en estado líquido y fermentación en estado sólido para B. bassiana

Característica	Fermentación Líquida	Fermentación Sólida	Cita
Propágulo infeccioso	Blastosporas, conidios sumergidos.	Conidios aéreos	(Pham T. et al., Production of Blastospore of Entomopathogenic Beauveria bassiana in a Submerged Batch Culture., 2009)

Característica	Fermentación Líquida	Fermentación Sólida	Cita
Resistencia del propágulo infeccioso	Blastosporas: paredes delgadas e inestables, problemas en el secado	Conidios aéreos: Paredes celulares más rugosas y gruesas, lo que le ofrece mayor resistencia.	(Loera et al., 2014)
Mano de obra	Menor tiempo y recursos humanos	Intensivo en mano de obra	(Feng et al., 1994)
Hidrofobicidad	Blastosporas: Hidrofílicas Conidios sumergidos: tanto hidrofílicas como hidrofóbicas	Conidios aéreos: Hidrofóbicas	(Holder et al., 2007)
Potencial zeta de la distribución de la carga electrostática	Blastosporas: +4 a -4 mV. Conidios sumergidos: +10 a -13 mV (Propágulos de 16 días, pH entre 3 y 9)	Conidios aéreos: +22 a -30 mV (Propágulos de 16 días, pH entre 3 y 9)	(Holder et al., 2007)
Tecnología	Uso de biorreactores con diferentes tecnologías	Uso de biorreactor rotatorio, o método de bandejas de baja tecnología y	(Mascarin et al., 2015)

Característica	Fermentación Líquida	Fermentación Sólida	Cita
		producción artesanal.	
Tiempo	Con el uso de biorreactores puede oscilar de 5 a 9 días	Con el uso de biorreactores ± 10 días. Producción artesanal ± 30 días.	(Mascarin et al., 2015)
Blanco	Más adecuadas para pequeños insectos que viven dentro de la capa límite de alta humedad.	Más adecuadas para insectos grandes, como saltamontes y orugas, que viven en un ambiente más seco.	(Mascarin y Jaronski, 2016)

Fermentación Líquida

En la fermentación líquida se generan blastosporas y conidios sumergidos, mediante diferentes fases de desarrollo, primero será la hinchazón y germinación de conidios, al cabo de esta etapa se formarán micelios y conidióforos, seguido de la ramificación del micelio y las primeras etapas de la conidiación, seguirá la conidiación masiva para finalizar con el desprendimiento de conidios en cultivo líquido (Feng et al., 1994).

Al tiempo, la conidiación sumergida incluye la producción de blastosporas durante las primeras 48 h de cultivo en un caldo definido, se ha reportado formulaciones líquidas donde la producción de *B. bassiana* contenía 40% de conidios y 60% de blastosporas en fermentación líquida (Mascarin y Jaronski, 2016).

Existen condiciones críticas para el diseño de biorreactores sumergidos, en el caso de *B. bassiana* para mayor producción de blastosporas, se recomienda altas tasas de

aireación y alta presión osmótica dada por el uso de diferentes osmolitos iónicos o no iónicos, incluidos carbohidratos y sales, lo que resulta en condiciones nutricionales apropiadas. Aumentar las tasas de aireación, mejorando la velocidad y eficiencia en la agitación permite el fácil acceso a los nutrientes por el hongo (Hongxia et al., 2015).

Pham T. et al. (2009) cultivo *B. bassiana* en fermentación líquida con el objetivo de llegar a su máxima esporulación, destacan la importancia del pH del medio fijándolo en 5,2, además de las fuentes de carbono y nitrógeno sugiriendo una relación C:N de 22:4 de sacarosa y casaminoácido, el cultivo fue realizado en matraces con agitación a 200 rpm a 25 °C al octavo día llegaron a la concentración de 8.54×10^8 esporas por ml.

Lohse et al. (2014) reportaron que el uso del medio TKI con 5% de fuente de carbono, medio reportado por primera vez por Thomas et al. (1987), se caracteriza por tener altas concentraciones de sal y fuente de carbono, ellos propusieron como fuente de carbono 5% de melaza de remolacha azucarera que posee 50% de sacarosa en su composición, la fermentación se llevó a cabo en un reactor de tanque agitado de 2 L a 25 °C con agitación de 200–600 rpm y 1 vvm a pH 5,5, el rendimiento reportado fue de $5,2 \times 10^{10}$ esporas totales/g de sacarosa.

Mascarin et al. (2015) describe que el crecimiento de *B. bassiana* en medios que contenían harina de semilla de algodón como fuente de nitrógeno, está siendo menos costosa que la caseína hidrolizada comúnmente utilizada, obtendría al tercer día altas concentraciones de blastosporas $> 1 \times 10^9$ /ml, cabe mencionar, que esta fue una modificación realizada en el medio desarrollado por Jackson et al. (1997).

Selección de sustrato: Fuentes de quitina.

El modo de infección de *B. bassiana* es posible por la degradación de la quitina presente en la cutícula del insecto, esto se da gracias a quitinasas y proteasas producidas por el hongo. *Beauveria* es conocida por la producción de quitinasas a través de fermentación sumergida y fermentación de sustrato sólido. La presencia de quitina coloidal,

compuestos ricos en quitina o residuos de la misma en el medio favorece al reconocimiento de está por el hongo y por ende a la producción de quitinasas extracelulares.

Smith & Grula (1983) describió que las quitinasas secretadas por *B. bassiana* pueden ser inducibles, esto debido al reconocimiento de d -glucosamina y N - acetilglucosamina liberadas por la esterilización de quitina en el medio de cultivo por el entomopatígeno.

Peredes et al. (2016) estudió la expresión de dos genes de quitinasa a 0, 4 y 7 días, esto en cultivos líquidos con diferentes fuentes de carbono que contienen quitina: quitina coloidal 1,8%, laminarina 0,1%, pulverizado de *F. oxysporum* 0,1% y pulverizado de hojas infectadas con *P. variabilis* 0,1%. Al 4 día encontraron mayor expresión del gen Chit1 y al día 7 se vería mayor expresión del segundo gen MO2Q184 en medios que contenían pulverizado de hojas infectadas con *P. variabilis* 0,1%, llegaría a la conclusión de que el hongo segrega quitinasas en diferentes estadios de su crecimiento además que el reconocimiento de secuencias del blanco ayuda a la expresión de quitinasas.

Elawati et al. (2018) evaluaron la producción de quitinasas extracelulares por *B. bassiana* donde utilizan un medio líquido con 0.3% de quitina coloidal, 0.1 g de peptona y 0.5 g de extracto de levadura, esto por cada 100 mL de medio líquido, donde el tiempo óptimo de incubación para el crecimiento y para la producción de la enzima quitinasa por *B. bassiana* fue al cuarto día con un peso de células secas de 0,31 g y actividad enzimática 0,585 (U/mL).

Amobonye et al. (2020) describió el potencial de *B. bassiana* para producir enzimas y metabolitos secundarios de interés, en la tabla 3 se resume la información recolectada acerca de las quitinasas.

Tabla 3

Producción de Quitinasas por B. bassiana en diferentes medios de cultivo

Cepa de Bb	Tipo de fermentación	Actividad/Peso molecular (kDa)	pH/Temperatura (°C)	Sustrato
Bb CG432	NR	NR/86	5.5/ 45	Quitina coloidal
Bb174	SSF	126 U gds^{-1} /Nr	5.0/ 48	Quitina coloidal
Bb 0062	SmF	97 U ml^{-1} /Nr	5.0/ 40	Quitina coloidal
Bb - unidentified	SmF	0.585 U ml^{-1} /Nr	NR/ NR	Quitina coloidal
Bb B02	SmF	449 U ml^{-1} /Nr	NR/ NR	Quitina coloidal

Nota: Bb: *Beauveria bassiana* ; SSF: fermentación en estado sólido; SmF: fermentación sumergida; NR no reportado.

Debido a los diferentes estudios donde la presencia de la quitina en el medio de cultivo ayuda a la producción de quitinasas, se ha considerado fuentes más accesibles de la misma. Es así que surgen diferentes alternativas de bajo costo y fácil acceso, entre las principales están los exoesqueletos de diferentes crustáceos. Además que los exoesqueletos de crustáceos son un problema medio ambiental, al existir en exceso en países que se dedican a la comercialización de estos, por lo que constantemente se evalúan procesos de degradación para los mismos (Zhang et al., 2021).

Se sabe que los caparazones duros de los crustáceos contienen entre un 15 y un 20 % de quitina, los crustáceos de caparazón más blando, como los camarones, contienen de 15 a 30 % de quitina, además de las proteínas esqueléticas y el material orgánico. En la

cutícula de insectos el porcentaje puede llegar al 60 % pero se considera que el contenido promedio de quitina en la cutícula es del 33% (Whistler, 1993).

Capítulo III: Materiales y Métodos

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal la reactivación y producción de una cepa de *B. bassiana* que ayude con el control de *T. urticae* en el cultivo de flores. Para lo cual se activó el hongo sobre unidades de *T. urticae*, seguido de la identificación microscópica, macroscópica y molecular del hongo. Para la producción del mismo se diseñaron diferentes medios líquidos con presencia y ausencia de fuentes de quitina, el proceso de diseño y evaluación de estos se describe a continuación. Las muestras, materiales y reactivos fueron proporcionados en su mayoría por la florícola BellaRo S.A., ubicada en el cantón Pedro Moncayo. Se contó con la colaboración de los laboratorios: Laboratorio multidisciplinario ESPE, Laboratorio Biotecnología Vegetal ESPE, Laboratorio IDgen, Centro de Nanociencia y Nanotecnología.

Tanto el material vegetal como las unidades de *T. urticae* fueron recolectados del Bloque G4 variedad freedom de la florícola BellaRo S.A., donde las 10 primeras camas que poseen 70 ± 5 plantas de *Rosas spp.* fueron otorgadas para el desarrollo de la investigación, por lo tanto, se suspendió el uso de acaricidas por dos meses, lo que permitió reducir posibles remanentes de agroquímicos tanto en ácaros como en hojas.

Reactivación e identificación de *B. bassiana*

Activación de B. bassiana

Del hongo *B. bassiana* conservado en refrigeración por el laboratorio de microbiología de BellaRo S.A. ubicado en vía Tabacundo Cajas Km 3.2, se pesó 0,1 gramos de polvo y se depositó en 9 ml de agua peptonada previamente esterilizada, se llevó al vórtex durante 30 segundos. Se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-3} , de la última dilución se tomaron 100 μ l para ser sembrados con ayuda de un asa digralsky de vidrio en

medio PDA suplementados con cloranfenicol 500 ppm, finalmente se incubaron por 7 días a 25°C.

Se hicieron re aislamientos hasta obtener cultivos puros, para lo cual con una aguja de inoculación se tomaron colonias y se sembraron en medio PDA con cloranfenicol 500 ppm. De los hongos aislados se realizó la caracterización microscópica y macroscópica utilizando las claves recolectadas en: Barnett & Hunter (1998), Humber (2012), García et al. (2018).

Descripción macroscópica y microscópica

Para la caracterización microscópica se usó la técnica de montaje para hongos filamentosos descrito por Harris (2000) con cinta esmerilada. Donde a partir, de un cultivo puro con 7 días de crecimiento, se toma una porción de cinta esmerilada la cual se acerca al micelio del hongo, después esta se pega en un portaobjetos el cual tenía una gota de azul de lactofenol para mejorar el contraste en el microscopio óptico. Para la identificación se tomará en consideración forma, disposición, agrupación, tamaño de conidios, disposición en general del hongo. Para la caracterización macroscópica se subcultivo los cultivos puros, a las 72 horas se comenzó a evaluar el crecimiento, color anverso y reverso de la colonia, aspectos, textura y velocidad de crecimiento (Bustamante, 2019).

Reactivación de aislamientos de *B. Bassiana*

Los aislamientos que cumplan con cabalidad todas las claves de identificación recolectadas, se tomaron para conocer su agresividad contra *T. urticae*.

Para la reactivación de la patogenicidad de los aislamientos de *B. bassiana*, se tomaron hojas con visible afectación de *T. urticae*, estas hojas fueron colocadas en un recipiente con una base de papel filtro humedecida con agua estéril, donde permanecieron por 2 días. Con ayuda del estereoscopio y de un pincel Corona RG595 0 humedecido se tomaron 60 unidades (ácaros) en 4 cajas Petri correctamente esterilizadas, para ser desinfectados con hipoclorito de sodio al 0,3%, mediante inmersión en la solución de 5 a 15

minutos, después se retiró el exceso de hipoclorito con ayuda de un embudo y papel filtro N°5 y se hicieron lavados sucesivos por un mínimo de tres veces con agua estéril, se hizo una última inmersión en alcohol al 70 % por 1 minuto, después 2 lavados adicionales con agua estéril. Finalmente, con ayuda de papel filtro MN617 90 mm se filtró la solución y los ácaros quedaron fijos en el papel, el papel filtro se colocó en una nueva caja Petri (Bustillo & Marin, 2002).

De las cajas con el aislamiento que cumple las claves de identificación se hicieron suspensiones en agua estéril con tween 80 al 0.01%. Para esto se vertió aproximadamente 2 ml de tween 80 al 0.01% en la caja petri y con la ayuda de un bisturí se raspo el hongo y se colocó en un tubo con 50 ml con 40 ml de tween 80 al 0.01%, se llevó al vórtex por 1 minuto y mediante la cámara de Neubauer se realizó el conteo de esporas, a partir de esta solución con concentración de esporas conocidas se hicieron inóculos de 1×10^6 esporas/ml, los cuales se conservaron en refrigeración hasta su uso.

De la suspensión del hongo se tomaron 10 ul y se depositaron sobre los ácaros fijos en el papel filtro, estos fueron evaluados con la ayuda del estereoscopio diariamente para identificar ácaros con signos visibles de infección por *B. bassiana* en el menor tiempo posible, estos insectos fueron separados con aguja bacteriológica y llevados a nuevas cajas Petri con PDA y cloranfenicol a 500 ppm. La cepa que mostró agresividad sobre *T. urticae* en el menor tiempo posible, fue identificada a nivel molecular.

Caracterización molecular de la cepa de *B. bassiana* activada

Extracción de ADN

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN descrito por Wilson (2001) modificado por el laboratorio de IDgen, donde brevemente sobre la cepa caracterizada y activada en *T. urticae*, se colocó 50 ul de agua estéril para hacer un raspado de micelio y tomar la muestra, de esta se obtuvo el ADN genómico según el protocolo de, se eliminó el ARN residual con ARNasa. La cuantificación y pureza del ADN se determinó mediante espectrofotometría donde la concentración de ADN siguió la relación de que un valor de absorbancia de 1.0

corresponde a 50 ug/mL de ADN de doble cadena en estado puro, además se calculó la relación A260/A280 para detectar posibles contaminantes.

Amplificación por PCR

Para la PCR se amplificó la región ITS1 – 5,8S – ITS2 del hongo, con ayuda de los primers específicos ITS1 e ITS4 descritos en la tabla 4 (Rehner y Buckley, 2005). La PCR se realizó con el protocolo descrito por (White et al., 1990).

Tabla 4

Secuencia de los primers utilizados en la amplificación de la región ITS1- DNAr 5,8S-ITS2 del hongo

Primers	Secuencia
ITS 1	5' TTCGTAGGTGAACCTGCGG '3
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC '3

Dentro de la cámara de flujo laminar con material estéril se preparó una solución de volumen final 120 ul, donde se añadió 62.5 ul de Green – Taq DNA Polymerase, 47.5 ul de agua ultrapura, 5 ul de primer ITS1 y 5 ul de primer ITS4, la solución se homogeneizó y se colocó en 3 tubos estériles, a dos de estos se les añadió 3 ul de ADN de las muestras el cuál se diluyó hasta una concentración aproximada de 20 ng/ul y en el blanco 3ul de agua ultrapura. Las muestras se llevarán al termociclador programado de la siguiente manera, fase inicial de desnaturalización a 95°C por 120 segundos, se hicieron 30 ciclos de amplificación los cuales tenían tres etapas, desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos, extensión a 72°C por 60 segundos, finalmente la fase de extensión a 72°C por 300 segundos.

El resultado de la PCR se evaluó mediante un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde se esperaba un fragmento de aproximadamente 600 pb como marcador molecular se usó ABM 100pb plus opti DNA marker.

Secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación estándar del ADN se realizó en Macrogen Corea Inc, mediante el método de Sanger, las secuencias fueron curadas y ensambladas en el programa Unipro UGEN, las secuencias ensambladas se compararon con la base de datos de nucleótidos de GenBank del NCBI con el uso de Blast.

Se realizó, además, una segunda búsqueda en Blast, para comparar con rRNA/ITS, Internal transcribed space region (ITS) from fungi type and reference matiral, del resultado de tomaron las 10 primeras secuencias y se realizó un árbol filogenético.

Conservación de la cepa

Se utilizó la metodología descrita en el laboratorio de microbiología de BellaRo S.A., para lo cual se colocó un papel filtro Quantitative Filter Paper - Grade 42 sobre medio PDA con cloranfenicol 500 ppm. Después se sembró por rallado el hongo activado, esto en total asepsia y en cámara de flujo laminar, se dejó incubar por un mínimo de 7 días. En la cámara de flujo laminar, se retiraron los papeles filtro y se depositaron en nuevas cajas petri sin medio. En el interior de la cámara casi cerrada con el máximo de flujo de aire, se dejaron los papeles secar por un mínimo de cuatro días, finalmente al cuarto día se cortó el papel filtro seco y se guardó en tubos eppendorf a 4°C (García et al., 2014).

Recuento de esporas

Se tomó una alícuota de la muestra de interés en un tubo eppendorf y se llevó al vórtex por 30 segundos. Se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-3} en Tween 80 al 0,01% con azul de lactofenol al 1%, de la última dilución se tomaron 8ul y se depositaron en la a la cámara de Neubauer, se dejó reposar la cámara por 10 minutos para que las esporas

sedimenten, finalmente, se llevó al microscopio para su visualización a 40x (Gómez et al., 2014).

El número de conidios se evaluó por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Conidias}}{\text{ml}} = \frac{\text{conidias contadas}}{\text{superficie (mm}^2\text{)} * \text{profundidad de la cámara (mm)} * \text{dilución}}$$

$$\text{superficie recontada (mm}^2\text{)} = 5 * 0,04(\text{mm}^2) = 0,2(\text{mm}^2)$$

$$\frac{\text{Conidias}}{\text{ml}} = \frac{\text{conidias contadas}}{0,2(\text{mm}^2) * 0,1 (\text{mm}) * \text{dilución}} * \frac{1000\text{ul}}{\text{ml}}$$

Medios y condiciones de cultivo

Se acopló una habitación aislada en el laboratorio de microbiología de BellaRo S.A. para colocar los fermentadores, en total se acoplaron 9 fermentadores, los cuales se ajustaron al mínimo de aireación para evitar exceso de espuma.

Diseño de fermentadores

Para la fermentación líquida de *B. bassiana*, se utilizó una botella boeco de 500 ml como base, con un tapón de caucho, al cual se le realizaron dos agujeros con un saco bocados n°3, estos sirven para la conexión del sistema dual de aireación y burbujeo y salida de aire, además para las conexiones fue necesario el uso de mangueras de 30 cm con dimensiones: 5 mm diámetro externo x 4 mm diámetro interno. Para el mecanismo dual de aireación y agitación se utilizaron motores de pecera (Power Tm 500) (Astorga, 2008). Todos los materiales fueron autoclavados a 121 °C, 15 psi por 20 minutos y ensamblados en la cámara de flujo laminar.

Tabla 5

Esquema referencial de fermentador para B. bassiana



Nota: Esquema de fermentador A: Motores de pecera (Power Tm 500); B: 1: Conexión con el motor de pecera (Power Tm 500), mecanismo dual de aireación y agitación; 2: salida de aire.

Medios de cultivo

Para el desarrollo del presente trabajo el crecimiento de *B. bassiana* se evaluó en dos etapas, en la primera se buscó conocer cuál es la fuente de carbono entre azúcar, melaza y licor fermentado de caña, donde se produce la mayor cantidad de esporas medidas en cámara Neubauer en tres tiempos distintos 72, 120 y 168 horas, Se realizó una comparación Anova junto a al test de Duncan y Tukey que permitió conocer la mejor fuente de carbono.

En la segunda fase se comparó el crecimiento de *B. bassiana* en 5 medios distintos descritos en la Tabla 6, de estos resalta el uso de fuentes de quitina en la fermentación. Para hacer un seguimiento al crecimiento de *B. bassiana*, se midió la cantidad esporas por cámara Neubauer cada 24 horas por un máximo de 7 días, además de la actividad enzimática por espectrometría.

Para la inoculación del hongo en los medios líquidos se tomó una pieza de papel filtro conservada a 4°C y se colocó en un tubo eppendorf con 1 ml de tween 80 al 0.01%, se llevaron al vórtex por 30 segundos, se tomó una alícuota de 100 ul y se sembró en medio Rosa bengala, al cabo de dos semanas se colocó 2 ml de Tween 80 al 0,01% para hacer un raspado de esporas con ayuda de un bisturí. Las esporas recolectadas se depositaron en un tubo Falcon con 23 ml de Tween al 0,01%. A esta solución se le realizó un conteo de esporas/ ml (Pham T. J. et al., 2009).

Se inocularon los diferentes medios de cultivo esterilizados de manera que tenga una concentración final de 1×10^6 esporas/ml, se ajustó el pH a 5.4 con la ayuda de NaOH y Ácido láctico (Cheong et al., 2020). La temperatura para el crecimiento y mantenimiento de los fermentadores se mantuvo a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, esto siguiendo las sugerencias de Fargues et al. (2018) donde para 65 aislamientos de *B. bassiana* la temperatura de crecimiento óptimo fue de 25 a 28 °C.

Medios de cultivo con distintas fuentes de carbono

Los medios a ser evaluados contienen diferentes fuentes de carbono descritas en la tabla 5, como fuente de nitrógeno se utilizará sulfato de amonio, además de diferentes sales basales (Thomas et al. , 1987; Feng et al. , 1994; Gandarilla et al. , 2013; Guitiérrez et al. , 2013; Lohse et al. , 2014; Mascarín et al. , 2015; Santos et al. , 2021).

Tabla 6

Composición de medios de cultivo para la propagación de Beauveria bassiana.

Sustrato	MA	MB	MC
Azúcar Morena (g)	30		
Melaza (g)		30	
Licor fermentado de caña de azúcar (g)			30
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	6	6	6
KH ₂ PO ₄ (g)	3,5	3,5	3,5
MgSO ₄ (g)	0,5	0,5	0,5
NaCl (g)	0,1	0,1	0,1
Ca(NO ₃) ₂ (g)	0,1	0,1	0,1
Cloranfenicol (ppm)	500	500	500

Nota: Las cantidades descritas hacen referencia a la preparación de un litro de medio. MA: medio líquido con azúcar morena como fuente de carbono, MB: medio líquido con melaza como fuente de carbono, MC: medio líquido con licor fermentado de caña como fuente de carbono.

Todos los medios fueron autoclavados a 121°C a 15 psi por 15 minutos, excepto el medio que contenía azúcar como fuente de carbono este se autoclavó a 115°C a 10 psi por 15 minutos.

Se tomaron 2 ml de medio líquido a las 72, 120 y 168 horas, después de la inoculación del hongo. El tubo donde se hizo la recolección será almacenado a 4 °C hasta su conteo, sin embargo, se recomienda no exceder las 2 horas a partir de la toma de muestra.

Medios de cultivo con fuentes de quitina

Para el desarrollo de este trabajo se evaluaron dos fuentes de quitina, la primera quitina comercial de la marca Sigma y la segunda exoesqueletos de camarón a distintas concentraciones.

Preparación de fuentes de quitina: Quitina coloidal

- Solvente ácido: Ácido clorhídrico – HCL

Se tomaron 20 gramos de quitina comercial (Chitin from shrimp shells practical grade, coarse flakes, C9213-500G), las hojuelas se trituraron y tamizaron para obtener un polvo lo más fino posible. Del polvo fino se tomaron 5 gramos y se colocaron en un vaso de precipitación de 250 ml, se añadió 50 ml de HCl al 37% p/p concentrado lentamente en agitación continua con la ayuda de una varilla de vidrio durante 5 minutos, se pasó a una bandeja con agua fría y hielo para minimizar el calor generado. La mezcla tendrá una consistencia sumamente viscosa, se agitó durante 1 minuto cada 5 minutos por 60 minutos en una campana extractora de olores químicos a temperatura ambiente, al finalizar este periodo se tendrá una mezcla quitina-HCl, *Notablemente* menos viscosa.

En un vaso de precipitación de 2000 ml con 1 litro de agua autoclavada a 4 °C, se añadió la hidrólisis ácida de la quitina para ser agitada durante 20 minutos, la solución tenía consistencia homogénea, viscosa y blanquecina. (Agrawal, 2012; Keed et al. , 2020).

La mezcla se pasó a través de un rectángulo de tela de algodón esterilizado en la en la estufa por 2 horas a 180 °C. El sedimento se recolectó y lavó por 5 veces con agua destilada a 4°C, hasta que el pH del filtrado se elevó a 7,0. La quitina coloidal tiene una consistencia blanda y pastosa, se almacenó en tubos Falcon y fueron esterilizados en autoclave y almacenado a 4 °C hasta su posterior uso (Kuddus & Ahmad, 2013; Murthy & Bleakley, 2012).

- Solvente ácido: Ácido fosfórico – H₃PO₄

Se tomaron 50 gramos de quitina comercial (Chitin from shrimp shells practical grade, coarse flakes, C9213-500G), las hojuelas se trituraron y tamizaron para obtener un polvo lo más fino posible. Del polvo fino se tomaron 20 gramos y se colocaron en un vaso de precipitación de 1000 ml, se añadió 200 ml de ácido fosfórico al 85 % lentamente en agitación continua por 5 minutos con la ayuda de una varilla de vidrio, se tapó el vaso con papel aluminio y se almacenó por 24 horas a 4°C (Thimoteo et al., 2017). Después de este periodo la mezcla se separó en 4 vasos los cuales fueron lavados sucesivamente con agua estéril a 4°C por un mínimo de 5 veces hasta que el pH del filtrado se elevó a 7,0. La quitina coloidal tiene una consistencia blanda y pastosa, se distribuyeron en tubos Falcon y fueron esterilizados en autoclave, para finalmente ser almacenados a 4 °C hasta su uso.

Preparación de fuentes de quitina: Exoesqueletos de camarón

Para la preparación del exoesqueleto de camarón se recolectaron 2 kilogramos de cáscaras del crustáceo, se lavaron con agua común por un mínimo de tres veces para retirar impurezas y material orgánico adherido. Los exoesqueletos se llevaron a la estufa de 4 a 6 ciclos a 80°C por tres horas cada uno, en cada ciclo se retiraba la bandeja y se homogeniza para su correcto secado. Finalmente, cuando el producto estaba a temperatura ambiente se van a trituraron y tamizaron las cáscaras hasta alcanzar un diámetro por partícula de 0,8mm a 1,5 mm.

Jiménez (2016) relata la importancia de la desproteización de los exoesqueletos en la producción de quitinasas por *B. bassiana* en fermentación líquida. Para la desproteización se hizo una solución de NaOH al 3.5%, la cual con ayuda de una plancha de calentamiento se llevó a 95°C, a esta temperatura se agregó la cáscara de camarón triturada en una proporción 1:10 (cáscara: solución), la mezcla se dejó en agitación constante por 2 horas. Después, se hicieron lavados sucesivos con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro. Finalmente, las muestras se filtraron y secaron en la estufa de 4 a 6

ciclos a 60°C por tres horas cada uno, en cada ciclo se retiraba la bandeja y se mezclaba para su correcto secado. (Escobar et al. , 2013; Garcia et al. , 2016).

Preparación de medios con quitina

Se repitió el proceso descrito en medios y condición de cultivos, con quitina coloidal al 2% como medio con inductores comerciales y medios con diferentes proporciones de harina de camarón previamente tratada, la tabla 16 muestra la composición de 1 litro de cultivo, sin embargo, se prepararon 100 ml de medio en boecos de 250 ml.

Tabla 7

Composición de medios de cultivo para la propagación de Beauveria bassiana con cáscara de camarón desproteïnizada como inductor de quitinasas

Sustrato	Control Negativo	Control positivo	CMA	CMB	CMC
Azúcar morena % (p/v).	3				
Quitina coloidal % (p/v).		2			
Harina de camarón desproteïnizada % (p/v).			2	3	4
(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	6	6	6	6	6
KH ₂ PO ₄ (g)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
MgSO ₄ (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
NaCl (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Ca(NO ₃) ₂ (g)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Cloranfenicol (ppm)	500	500	500	500	500

Nota: Cantidades necesarias para la elaboración de un litro de medio de cultivo. CN: Control Negativo, CP; Control Positivo, CMA: medio líquido con harina de camarón desproteínizada al 2%, CMB: medio líquido con harina de camarón desproteínizada al 3%, CMA: medio líquido con harina de camarón desproteínizada al 4%.

Cada 24 horas se tomaron muestras del medio líquido para contabilizar la cantidad de esporas producidas, además se recolectaron 2 ml de medio que fueron almacenados a -18°C para la evaluación de actividad enzimática.

Ensayos de actividad enzimática

Los tubos eppendorf con muestra se mantuvieron a -18°C hasta el análisis, después fueron descongelados en camas de hielo para ser centrifugados a 3500 rpm durante 20 minutos a 4°C.

Cuantificación de actividad enzimática

Preparación de reactivos

Reactivo DNS: Se pesó 2 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico, 3.2g de hidróxido de sodio (NaOH), 87.6g de tartrato de Na-K. Se disolvió el NaOH en un vaso de precipitación con 100 ml de agua destilada, se añadió en agitación continua el tartrato de Na-K hasta disolverlo completamente. La solución se aforó con agua destilada a 200 ml, finalmente se agregó el ácido 3,5-dinitrosalicílico. El reactivo se pasó en un frasco ámbar y se dejó en agitación por toda la noche, finalmente al siguiente día se filtró y almacenó a 4 °C hasta su uso (Bello et al., 2006).

Curva estándar para cuantificar la actividad enzimática de quitinasas

Para la elaboración de la curva estándar se realizó una solución stock de N-acetyl-glucosamine (NAG) a concentración de 1 mg/ml, se hicieron diluciones seriadas entre 0,01 y 0,15 mg/ml de NAG, tomando el Buffer fosfato (pH 5.4, 0.02M) como blanco y diluyente, las diluciones están descritas a continuación.

Tabla 8

Diluciones para la elaboración de la curva patrón de N- acetil - glucosamina (NAG)

N	N-acetil-glucosamina (NAG) mg/ml	Buffer fosfato (pH 5.5, 0.02M) [μl]	Solución stock NAG [μl]
1	0,00	1000	0
2	0.01	990	10
3	0,03	970	30
4	0,05	950	50
5	0,07	930	70
6	0,09	910	90
7	0,11	890	110
8	0,13	870	130
9	0,15	850	150

Nota: NAG N-acetil-glucosamina.

Se tomó una concentración de 1 ml de cada dilución, a la cual se añadió 1 ml de reactivo DNS, la mezcla se incubó a baño maría a 95°C por 10 minutos, después se enfrió con agua común hasta temperatura ambiente. Para finalmente ser evaluado mediante espectrofotometría a 540 nm (Kukule, 2017).

Los resultados se interpretaron mediante una recta de regresión lineal de Absorbancia vs Concentración, la ecuación resultante es $y = ax + b$, donde y es la absorbancia y x es la concentración de NAG.

Cuantificación de actividad enzimática en medio líquido

La actividad quitinolítica se midió de los diferentes medios de cultivo, por espectrofotometría se calculó la liberación de azúcares reductores resultantes de la degradación del sustrato Quitina coloidal 1%, para lo cual se utilizó la curva estándar

generada con N-acetil-β-D-glucosamina (NAG). La UI de actividad de quitinasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 umol de N-acetilglucosamina por ml en condiciones de ensayo estándar.

En un nuevo tubo de ensayo se colocará 500 ul de quitina coloidal 1% p/v (en tampón fosfato 0,02 M, pH 5,5) junto con los 500 ul de solución enzimática (extracto crudo previamente centrifugado). Se dejó incubar por 40 min a 40 °C. Después de este periodo se agregaron 3 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) para finalizar la reacción, esta solución se incubó de 5 a 10 minutos a 95°C antes de medida a 540 nm (Zarei et al. , 2011; Farag et al. , 2016; Akeed et al. , 2020).

Cálculo de unidades de actividad enzimática de quitinasas por ml de extracto

$$UI = \frac{[NAGA] * Vl * Fd}{Vc * t} * 1000$$

[NAGA]: Concentración de N-acetyl-glucosamine (NAG) producido

Vl: Volumen del ensayo

Fd: Factor de dilución

Vc: Volumen del extracto crudo enzimático

t: tiempo de ensayo

$$UI = \frac{\frac{mg \text{ NAGA}}{ml} * ml * Fd}{ml * min} * \frac{1000ug}{mg} = \frac{ug}{min - ml} = \frac{U}{ml}$$

Bioensayos

Recolección e identificación de Ácaros T. urticae

Se recolectaron manualmente hojas con síntomas visibles de *T. urticae*, los cuales son: menor turgencia, presencia de puntos amarillentos, presencia de telaraña, presencia de ácaros en el envés de las hojas, especialmente de tercio medio y bajo de plantas de rosas ubicadas en el Bloque G4 variedad freedom de la florícola BellaRo S.A.

Estas hojas se colocaron en cámaras húmedas, las cuales son contenedores plásticos con una base de papel absorbente humedecido con agua estéril, en esta matriz las hojas permanecerán por máximo 48 horas.

Para identificar a *T. urticae*, las hojas con visible presencia de ácaros, se colocaron en una caja Petri con el envés para arriba, se llevaron al estereoscopio y con la ayuda de un pincel Corona RG595 0 humedecido con agua estéril, se tomaron hembras y se colocaron en un portaobjetos de forma inmediata se colocó una gota de aceite de inmersión para inmovilizarla y poderla observar en el microscopio de campo óptico a 5x y 10x.

Desinfección y preparación de matrices experimentales

Para los bioensayos se utilizaron hojas de rosas, tomadas del tercio alto de plantas del Bloque G4, variedad freedom de la florícola BellaRo S.A., las cuales eran turgentes y de un color verde intenso sin señales de ninguna enfermedad. Se llevaron al laboratorio de microbiología donde para eliminar posibles contaminantes se hicieron un mínimo de tres lavados con agua común, después se remojó con cloro al 0.3% por 3 minutos, finalmente, se enjuagaron con agua estéril. Con ayuda de papel absorbente limpio se retiró el exceso de agua y con una tijera desinfectada con alcohol al 70 % se cortaron los bordes para formar un cuadrado, estos fueron colocados con el envés hacia arriba en cajas Petri que tenían una base de algodón humedecido con agua estéril, sobre los bordes de la hoja se colocó un cerco de vaselina o algodón para evitar que los ácaros dejen la matriz.

Se revisó en envés de las hojas infestadas con ácaros mediante el estereoscopio aumento 2x y con ayuda de un pincel fino se tomaron hembras adultas de *T. urticae* y se colocaron un mínimo de 8 hembras por matriz. Después se verificó que todas las hembras se encuentren en buen estado y no existan elementos extraños como tierra, basura, telaraña, además, se verificó que en las matrices no se encuentren ni huevos ni ácaros machos.

Preparación de diluciones

El producto de los fermentadores se filtró con papel filtro whatman n 5, se tomó una alícuota de 2 ml para medir su concentración en cámara de Neubauer mediante diluciones seriadas en tween 80 al 0.01% y azul de lactofenol al 1%.

Del líquido resultante del filtrado de concentración conocida se hicieron diluciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 UFC/ml con agua estéril llegando a un volumen final de 100 ml, a estas soluciones se les agregó 0,3 cc/l de Agral 90 y fueron depositadas en un atomizador desinfectado con alcohol al 70%.

Se utilizó el agroquímico Milbeknock al 0,75cc/L y Starmite 30 SC (0,35 cc/l) como control positivo de la mortalidad de ácaros, estos fueron diluidos en agua estéril adicional se les agregaron 0,3 cc/l de Agral 90, todos llegaron a un volumen final de 100 ml y fueron depositados en un atomizador desinfectado con alcohol al 70%. Para la solución blanco se utilizó agua estéril con 0,3 cc/l de Agral 90.

Para la aplicación de los tratamientos, las matrices de experimentación fueron colocadas en forma de un triángulo equilátero en el centro se puso un pedazo de papel hidrosensible para confirmar la cobertura en los bioensayos. Los atomizadores se elevaron a 30 cm de las cajas objetivo y se hicieron un mínimo de 5 aplicaciones, simulando un movimiento parabólico. El papel marcador debe mostrar una buena cobertura mas no estar pintado completamente, finalmente las hojas se llevaron al estereoscopio donde se revisó la cobertura sobre la matriz y sobre los ácaros. Se taparon las unidades experimentales y se colocaron en la incubadora a 25 ± 2 °C y 60 ± 5 h.r.

Las matrices se revisaron a las 24, 48, 72, 96 y 168 h, después de la aplicación se registraron números de individuos vivos, muertos, presencia de huevos y ninfas.

Diseño experimental

El presente trabajo se evaluó en tres etapas, la primera busca conocer cuál es la fuente de carbono en medio líquido que permite a *B. bassiana* alcanzar altas

concentraciones de esporas, en la segunda etapa se comparó medios con y sin presencia de quitina como fuente de carbono, en estos además de la concentración de esporas se midió, cantidad de proteínas y actividad enzimática. En la tercera y última etapa se evaluó la susceptibilidad de *T. urticae* y el porcentaje de reducción en la oviposición a diferentes concentraciones de *B. bassiana*, se tomó como blanco agua estéril con Agral 90 al 0,3cc/l, además de dos controles químicos. Todos los ensayos se describen a continuación.

Primera etapa

Se utilizó un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por tratamiento como variable de respuesta se cuantificó la cantidad de blastosporas producidas en fermentación líquida en un máximo de 7 días (168 h), se reportan en forma de promedios incluyendo el valor del error estándar.

Tabla 9

Tratamientos para la fermentación líquida de B. bassiana con distintas fuentes de carbono

Tratamiento	Blastosporas/ml			
	0 h	48 h	96 h	168 h
MA	MAI	MAII	MAIII	MAIV
MB	MBI	MBII	MBIII	MBIV
MC	MCI	MCII	MCIII	PMIV

Nota: MA: medio líquido con azúcar morena como fuente de carbono, MB: medio líquido con melaza como fuente de carbono, MC: medio líquido con licor fermentado de caña como fuente de carbono.

Los resultados se convirtieron a Log_{10} , raíz cuadrada e inversa con la finalidad de que sigan una distribución normal, la cual se verificó con la prueba Shapiro-Wilks (95%), el supuesto de homocedasticidad se evaluó con la prueba de Levene. Finalmente se realizó una prueba de varianza (ANOVA) con una confianza del 95% y las diferencias entre tratamientos se establecieron mediante los métodos de Duncan y Tukey ($p < 0,05$).

Segunda etapa

Se utilizó un diseño completamente al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones, como variable de respuesta se tomó la cantidad de blastosporas. Las unidades experimentales fueron los biorreactores diseñados en el laboratorio con una concentración inicial de hongo de 10^6 , concentración de proteína de cero y actividad enzimática de cero. Las mediciones se realizaron diariamente, los datos se reportan como promedios incluyendo el valor del error estándar.

Tabla 10

Codificación para tratamientos de fermentación líquida de B. bassiana con distintas fuentes de quitina.

Tratamiento	Blastosporas/ml						
	24 h	48 h	72h	96h	120h	144h	168h
CN	PCN	PCN	PCN	PCN	PCN	PCN	PCN
CP	PCP	PCP	PCP	PCP	PCP	PCP	PCP
CMA	PCMA	PCMA	PCMA	PCMA	PCMA	PCMA	PCMA
CMB	PCMB	PCMB	PCMB	PCMB	PCMB	PCMB	PCMB
CMC	PCMC	PCMC	PCMC	PCMC	PCMC	PCMC	PCMC

Nota: CN; Control Negativo, CP: control positivo, CMA: medio líquido con harina de camarón desproteinizada al 2%, CMB: medio líquido con harina de camarón desproteinizada al 3%, CMA: medio líquido con harina de camarón desproteinizada al 4%, P: promedio.

Los resultados se convirtieron a Log_{10} , raíz cuadrada e inversa con la finalidad de que sigan una distribución normal, la cual se verificó con la prueba Shapiro-Wilks (95%), el supuesto de homocedasticidad se evaluó con la prueba de Levene. Finalmente se realizó una prueba de varianza (ANOVA) con una confianza del 95% y las diferencias entre tratamientos se establecieron mediante los métodos de Duncan y Tukey ($p < 0,05$).

La actividad enzimática se midió en los extractos previos a ser utilizados en los bioensayos a las 168 h, se utilizaron pruebas no paramétricas para conocer cuál es la fuente de quitina que permite una mayor actividad enzimática.

Tercera Etapa

Modelo probit

Mediante un análisis probit se estableció las concentraciones letales al 50% (CL50) y 90% (CL90). Para esto se hicieron diluciones seriadas de *B. bassiana* obtenida en medio líquido sin fuentes de quitina (primera etapa), las cuales se describen en la Tabla 13, el tratamiento control se hizo con agua estéril, además a todas las soluciones se les agregó Agral 0.3cc/l.

Tabla 11

Tratamientos para el control de T. urticae con B. bassiana a distintas concentraciones.

Tratamiento	Hongo	Concentración conidios/ml	Repeticiones
A	<i>B. bassiana</i>	10 ⁶	3
		5x10 ⁶	3
		10 ⁷	3
		10 ⁸	3
Control	-	Agua auto clavada	3
	Total		12

Las unidades experimentales fueron cajas Petri con hojas de rosas y 10 unidades de *T. urticae*, los ensayos fueron revisados diariamente mediante el estereoscopio, sin embargo, se trabajó con los resultados a las 168 h.

Evaluación porcentaje de mortalidad y porcentaje de oviposición de hembras de *T. urticae* de todos los tratamientos

Para la etapa final se compararon 8 tratamientos, los cuales era dos controles agroquímicos Milbecnock (0.75cc/l) y STARMITE 30 SC (0,35 cc/l), un tratamiento control de agua estéril y 5 tratamientos con *B. bassiana* fermentada en medios con presencia y ausencia de quitina para lo cual se tomó la contracción estimada de CL50 en el modelo probit. A todas las soluciones se les agregó Agral 90 0.3cc/L.

Tabla 12

Tratamientos para el control de T. urticae con B. bassiana

Tratamiento	Descripción	Concentración <i>B. bassiana</i>	Dosis	Réplicas
A	Fuente de carbono: Azúcar 3%	1.00E+07	No aplica	3
B	Inductor: Quitina coloidal 2%	1.00E+07	No aplica	3
C	Inductor: Harina de camarón desproteinizada 2%	1.00E+07	No aplica	3
D	Inductor: Harina de camarón desproteinizada 3%	1.00E+07	No aplica	3
E	Inductor: Harina de camarón desproteinizada 4%	1.00E+07	No aplica	3
MT (Control positivo 1)	Agroquímico Milbecnock	No aplica	0,75 cc/l	3
ST (Control positivo 2)	Agroquímico Starmite 30 SC	No aplica	0,35 cc/l	3

Tratamiento	Descripción	Concentración <i>B.</i> <i>bassiana</i>	Dosis	Réplicas
Control	Agua estéril	No aplica	No	3
negativo			aplica	
	Total			21

Las unidades experimentales fueron cajas Petri con hojas de rosas y 10 hembras adultas de *T. urticae*, los ensayos fueron revisados diariamente mediante el estereoscopio, sin embargo, se trabajó con los resultados a las 168 h.

Mortalidad para *Tetranychus urticae*

$$\% \text{ Mortalidad} = \left[\frac{\text{individuos muerto}}{\text{individuos totales}} \right] 100\%$$

Fórmula de Abbott corregida

$$\% \text{ Mortalidad} = \left[\frac{\% \text{Mortalidad muestra} - \% \text{Mortalidad testigo}}{100 - \% \text{Mortalidad testigo}} \right] 100\%$$

Número de huevos por ácaro (Álvarez et al., 2008).

$$\text{Huevos por ácaro} = \left[\frac{\# \text{ de huevos}}{\# \text{ de ácaros vivos}} \right]$$

% Eficacia en la reducción de la oviposición (ERO) (Álvarez et al., 2008).

$$\% \text{ ERO} = \left[\frac{\text{Huevos por ácaro blanco} - \text{huevos por ácaro tratamiento}}{\text{Huevos por ácaro blanco}} \right] 100\%$$

Capítulo IV: Resultados y Discusión

Identificación y reactivación del hongo entomopatógeno

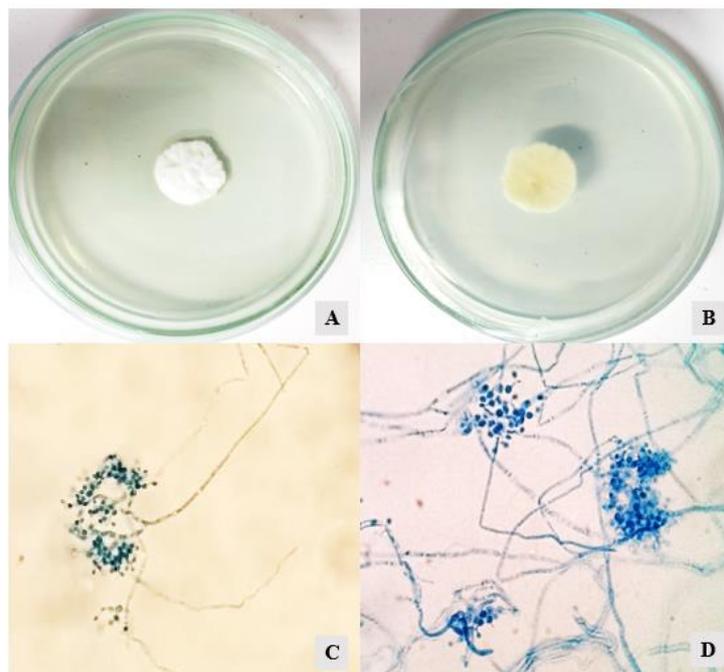
Identificación macroscópica y microscópica de B. bassiana

El aislado de *B. bassiana* presentó un crecimiento lento y circular en medio PDA suplementado con cloranfenicol 500 ppm como muestra la figura 4A y 4B. Al séptimo día a

25°C la colonia tenía un diámetro de 19 mm, aspecto algodonoso, en un principio totalmente blanco, a los 10 días tenía un aspecto polvoso y ocasionalmente amarillento. El revés de las colonias era de color blanco y amarillento en el centro, se observaba una textura uniforme. Para la identificación en microscópica se utilizó azul de lactofenol para mejorar el contraste, se observó conidios en agrupación similar al racimo de uvas, con forma globosa a elipsoidal (Fig. 4 B y C).

Figura 4

Caracterización morfológica del hongo entomopatógeno B. bassiana.



Nota: Vista del crecimiento de *B. bassiana* al 7 día de inoculación en medio PDA. A: vista anverso. B: Vista Reverso, C y D, Vista en microscopio de campo óptico de *B. bassiana* con aumento de 100x C: Vista de hifas, lisas con conidios dispuestos de manera globosa en racimos irregulares. D: Micelio septado con agrupaciones de conidióforos.

La descripción macroscópica y microscópica de *B. bassiana* coincidió con Gebremariam et al. (2021) quienes aislaron entomopatógenos de distintas muestras de suelo y los evaluaron en aumento 400x, donde los aislados de *Beauveria* revelaron conidios

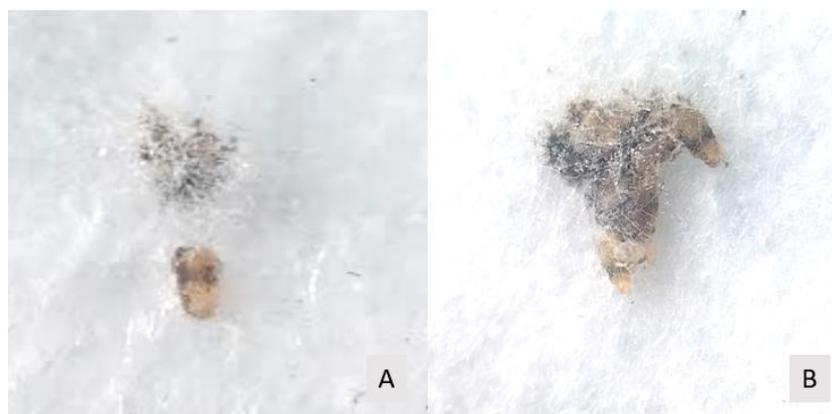
globosos a subglobosos con hifas hialinas y extensión en zig-zag del raquis. La morfología macroscópica de nuestro hongo coincidió con los 8 aislados de *Beauveria* realizados por Kulu et al. (2015) al crecer en PDA todas fueron de color blanco, textura suave y polvosa.

Reactivación aislamiento *B. bassiana*

La activación de *B. bassiana* se hizo sobre adultos de *T. urticae*, previamente desinfectados, estos fueron revisados diariamente en el estereoscopio a un aumento de 5x. Se reaisló a los ácaros que en el menor tiempo mostraban señales de muscardina blanca enfermedad causada por *B. bassiana* (Fig. 5 A y B).

Figura 5

Crecimiento de B. bassiana sobre T. urticae



Nota: Reactivación del hongo entomopatógeno *B. bassiana* sobre la plaga *T. urticae*. A: Ácaro de *T. urticae* hembra momificado al tercer día de la aplicación de *B. bassiana*, B: Ácaros hembras de *T. urticae* momificadas al quinto día de la aplicación de *B. bassiana*.

Al ser *Beauveria* un hongo saprófito, patógeno y simbiote, que no depende de los insectos huésped para completar su ciclo de vida, Ortiz Urquiza (2021) sugiere la activación del aislamiento sobre la plaga de interés, esto para conocer si existe patogenicidad hacia el objetivo, en este caso se observó la momificación de *T. urticae* por *B. bassiana* al tercer día de inoculación del hongo, fenómeno que se observa en la figura 5 A y B

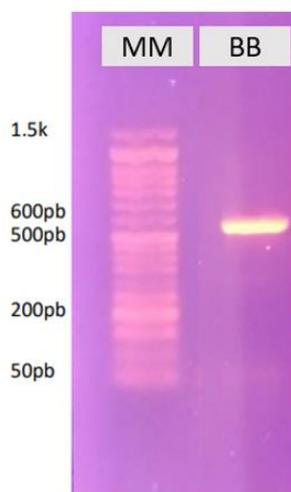
Identificación molecular de *B. bassiana*

La cuantificación del ADN tuvo como resultado 842,2 ng/ul, la pureza del ácido nucleico se verificó con la relación de absorbancia a 260 y 280 nm dando un valor de 1.9, el ADN obtenido se diluyó hasta 20 ng/ul para su posterior amplificación por PCR.

La amplificación realizada con los cebadores ITS1/ITS4 dio como resultado una banda de aproximadamente 600 pb, las que se visualizaron en gel de agarosa al 1%, el marcador de peso molecular utilizado fue ABM 100 pb plus opti DNA marker, este resultado coincide con lo calculado teóricamente basado en los cebadores utilizados y descritos con anterioridad en el capítulo de métodos.

Figura 6

*Vista del amplicon de *B. bassiana* por electroforesis en gel de agarosa al 1%.*



Nota: MM: marcador molecular ABM 100pb plus opti DNA marker, BB: Amplificación de la región de aproximadamente 600 pb correspondiente a de la región ITS1-5.8S-ITS4.

El amplicón de *B. bassiana* obtenido por PCR de la región ITS de rDNA dio como resultado un fragmento de alrededor de 531 pb, coincidiendo con Gebremariam et al. (2021) donde la amplificación de la región ITS produjo un tamaño de fragmento de aproximadamente 545 pb para los 8 aislamientos de *B. bassiana*, ellos relatan que la

amplificación de la región ITS1-5.8S-ITS4 permite una similitud de secuencia del 99 al 100% de los datos verificados en el presente proyecto mediante la herramienta Blast del NCBI/Genbank.

Análisis Bioinformático

Como resultado del análisis de la secuencia obtenida y su alineación en el programa Geneious Prime 2020.0.4, se obtuvo que la secuencia resultante tiene una longitud de 531 pb con una calidad de 99.8%. Una vez ensamblada la secuencia se comparó con la base de nucleótidos de GenBank parte del NCBI, herramienta Blast, esto permitió según se muestra en la tabla 13 corroborar la alta similitud que presenta el hongo activado con otras especies de *Beauveria*. El árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento de varias secuencias de este hongo depositadas en el GenBank, también demostró la cercanía de este aislado con otras especies de *Beauveria* (Fig. 8), este tiene un clado fuertemente respaldado con un valor de arranque del 95% y tiempo de separación con *B. bassiana* del 0.000.

Tabla 13

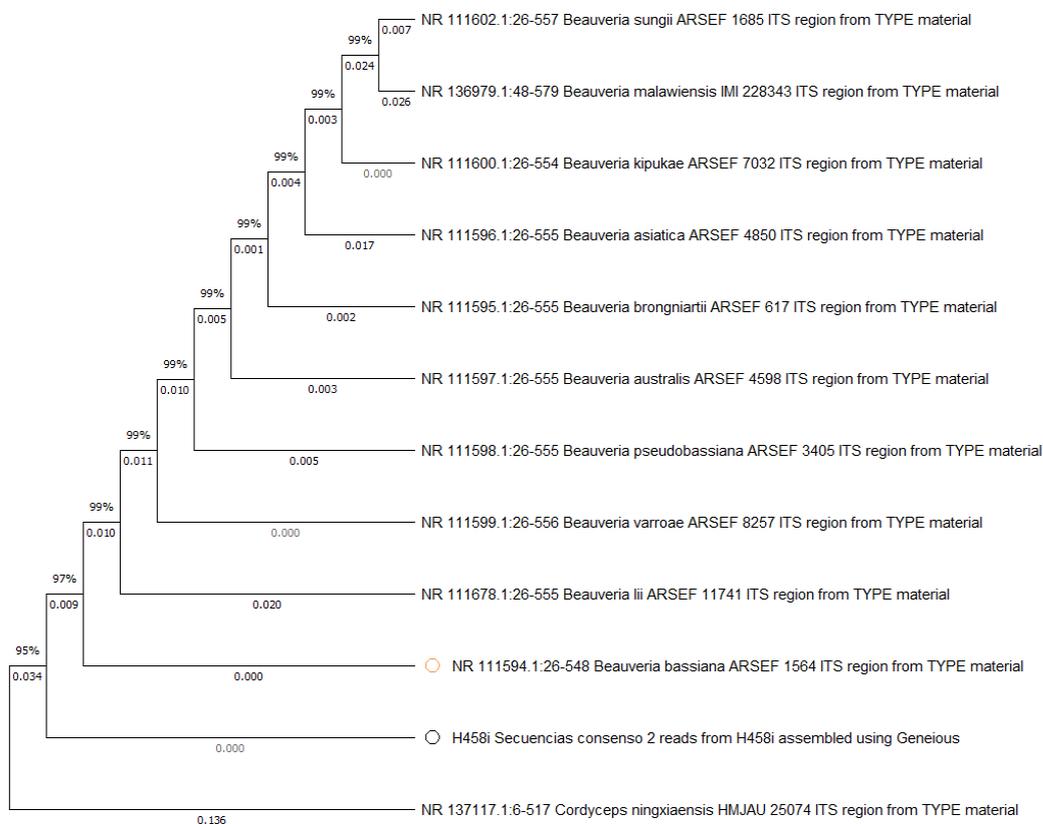
Secuencia con alta similitud al hongo reactivado sobre la plaga T. urticae

Nombre científico	Query Cover	E value	Porcentaje de identidad	N° Accesoión
<i>Beauveria bassiana</i>	100%	0.0	100%	MT586632.1

Figura 7

Secuencias usadas para construir el árbol filogenético de *B. bassiana* rRNA/ITS, Árbol filogenético de *B. bassiana* rRNA/ITS.

select all 10 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria bassiana ARSEF 1564 ITS region from TYPE material	Beauveria bassiana	931	931	98%	0.0	98.85%	548	NR_111594.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria lii ARSEF 11741 ITS region from TYPE material	Beauveria lii	913	913	99%	0.0	97.74%	555	NR_111678.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria varroae ARSEF 8257 ITS region from TYPE material	Beauveria varroae	913	913	99%	0.0	97.74%	556	NR_111599.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria australis ARSEF 4598 ITS region from TYPE material	Beauveria australis	902	902	99%	0.0	97.37%	555	NR_111597.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria brongniartii ARSEF 617 ITS region from TYPE material	Beauveria brongniartii	891	891	99%	0.0	96.99%	555	NR_111595.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria kipukae ARSEF 7032 ITS region from TYPE material	Beauveria kipukae	889	889	99%	0.0	96.99%	554	NR_111600.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria pseudobassiana ARSEF 3405 ITS region from TYPE material	Beauveria pseudobassiana	880	880	99%	0.0	96.62%	555	NR_111598.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria asiatica ARSEF 4850 ITS region from TYPE material	Beauveria asiatica	869	869	99%	0.0	96.24%	555	NR_111596.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria sungii ARSEF 1685 ITS region from TYPE material	Beauveria sungii	848	848	99%	0.0	95.51%	557	NR_111602.1
<input checked="" type="checkbox"/> Beauveria malawiensis IMI 228343 ITS region from TYPE material	Beauveria malawiensis	848	848	100%	0.0	95.51%	600	NR_136979.1



Nota: Las secuencias fueron alineadas usando Mega 11, el análisis de las secuencias en Mega 11 sugirió el modelo T92 (Tamura 3-parameter) + G, con un gamma de distribución de 0.05; H458i: Muestra *B. bassiana* reactivada sobre *T. urticae*.

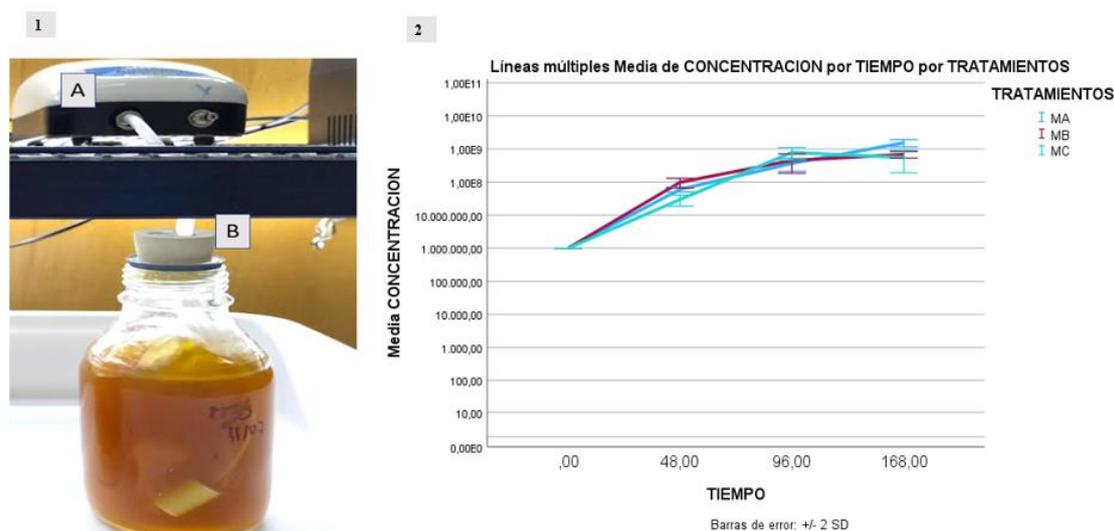
Medios y condiciones de cultivo

Crecimiento de B. bassiana en cultivo líquido con diferentes fuentes de carbono

Se evaluó el crecimiento en medio líquido de *B. bassiana* tomando como fuente de carbono, azúcar morena, melaza y licor fermentado de maíz (Fig. 8). La concentración de blastosporas/ml se midió en 0, 48, 96 y 168 horas (Apéndice n°1).

Figura 8

Crecimiento de B. bassiana en fermentadores de medio líquido con distintas fuentes de carbono.

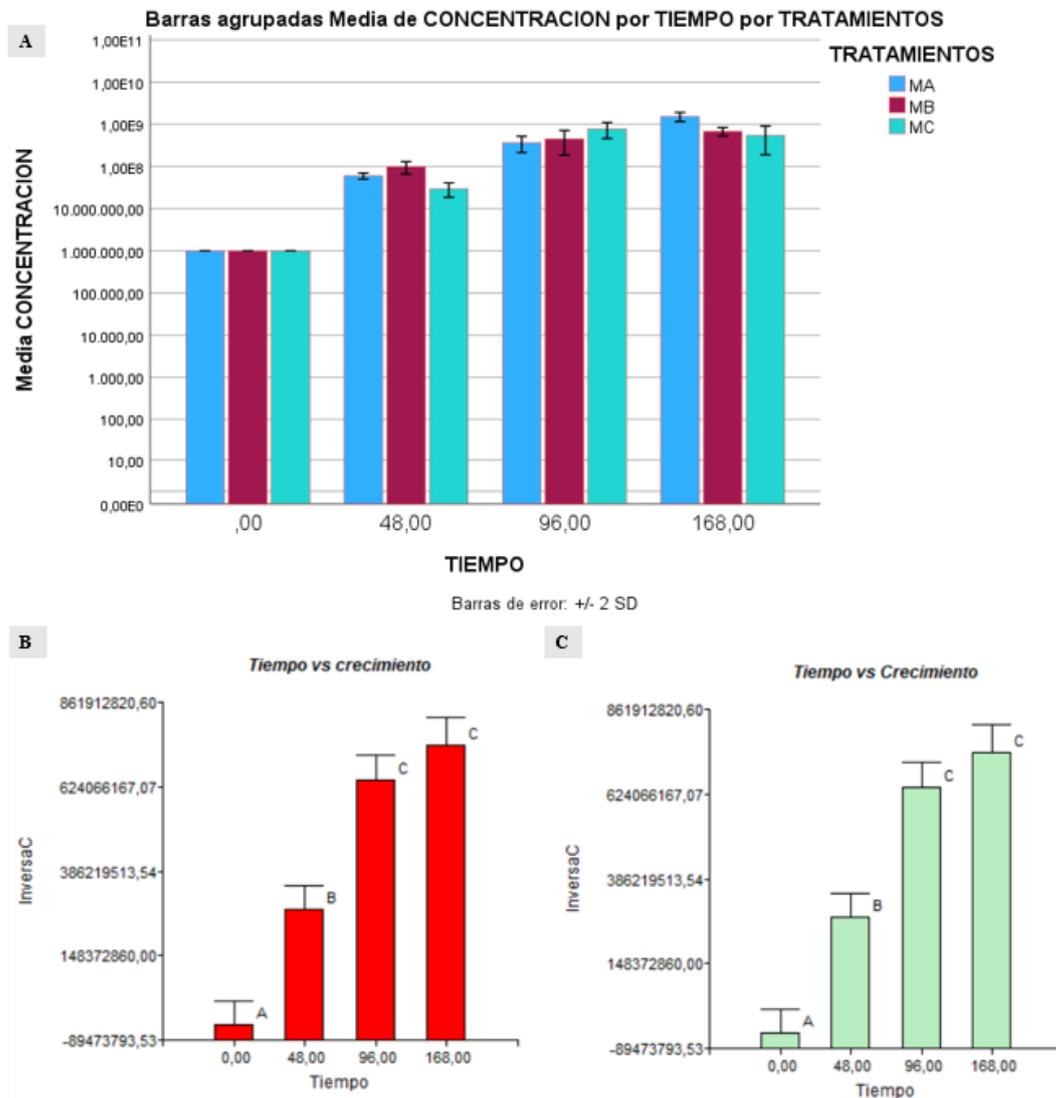


Nota: 1: Diseño de fermentadores, A: Motor de pecera para el flujo de aire y agitación B: Conexión para el sistema dual de agitación y aireación. 2: Curvas de crecimiento de *B. bassiana*, Tiempo vs concentración de medios con distintas fuentes de carbono.

El método de producción planteado en el presente trabajo permite obtener altas concentraciones de blastosporas, todas superiores a $1 \cdot 10^8$, además del filtrado de los medios de cultivo. Para evaluar el mejor medio de cultivo, primero se hizo una prueba comparativa del nivel de blastosporas/ml en los diferentes tiempos, 0, 48, 96 y 168 h como se observa en la figura 9, con al finalidad de conocer el tiempo al que los medios tiene un mayor porcentaje de esporulación.

Figura 9

Nivel de blastosporas/ml de *B. bassiana* en distintos tiempos 0, 48, 96 y 168 h.



Nota: MA: medio líquido con azúcar morena como fuente de carbono, MB: medio líquido con melaza como fuente de carbono, MC: medio líquido con licor fermentado de caña como fuente de carbono. A: Concentración promedio de blastosporas de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos de incubación. B: La prueba de comparación de Tukey separa a los resultados a 96 y 168 h (grupo c) con mayor cantidad de esporas por ml. C: La prueba de comparación de Duncan separa a los resultados a 96 y 168 h (grupo c) con mayor cantidad de esporas por ml.

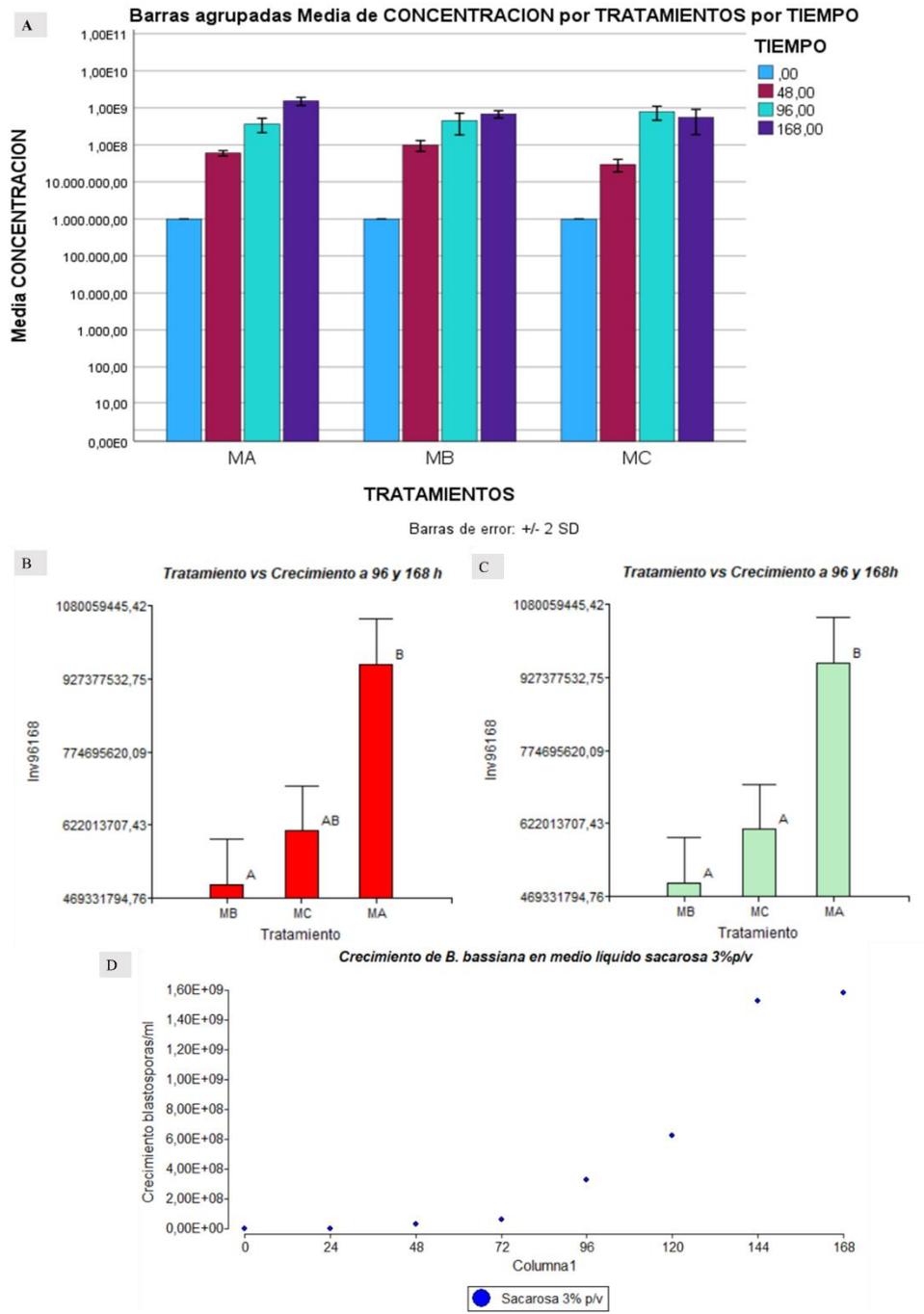
Las pruebas comparativas de Tukey y Duncan separan las concentraciones de blastosporas a las 96 y 168 h de fermentación indicando que poseen una media similar, estos resultados son fueron semejantes a la propuesta de García et al. (2013) quienes sugieren un tiempo óptimo en la fermentación para *B. bassiana* en medio líquido es de 4 días (96 horas), debido a que el hongo alcanza un 80% de la fase logarítmica de crecimiento.

Para Rini Indriyanti¹ et al. (2022) quienes probaron 6 medios líquidos para el crecimiento de *B. bassiana*, evaluados en un máximo de 30 días, describen que al 4 y 5 día de fermentación el hongo crece en la superficie del medio líquido, siendo un indicador de saturación del medio, fenómeno observado en los fermentadores del presente trabajo al 6 día. Ellos describen que al decimo día el hongo se asienta en el interior de la matriz y el crecimiento es pobre, sugiriendo que no se extiendan más los procesos fermentativos.

En la figura 10 se tomaron las concentraciones medidas a las 96 y 168 horas para comparar el nivel de blastosporas/ml en distintos tratamientos y conocer la fuente de carbono que permite una mayor concentración del entomopatógeno.

Figura 10

Crecimiento de *B. bassiana* en diferentes medios líquidos con 3 fuentes de carbono.



Nota: A: Concentración promedio de los medios líquidos para la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana*. B: La prueba de comparación de Tukey separa a los resultados de los medios MC y MA (grupo b) con mayor cantidad de esporas por ml C: La prueba de comparación de Duncan separa a los resultados del medio MA (grupo b) con mayor cantidad

de esporas por ml, D: Crecimiento de *B. bassiana* en sacarosa al 3% p/v mediciones tomadas cada 24h.

En la tabla 14 se describió a manera de resumen varias investigaciones que utilizaron distintas fuentes de carbono en la fermentación líquida de *B. bassiana*

Tabla 14

Concentraciones de blastosporas con distintas fuentes de carbono

Fuente de carbono	%P/v	Concentración	Tiempo de fermentación (horas)	Bibliografía
Sacarosa	3%	1,50E+09	168	
Melaza	3%	6,17E+08	168	
Licor fermentado de caña	3%	7,83E+08	96	
Sacarosa	3%	5,67E+07	120	Pham T et al. (2009)
Glucosa	4-10%	[1E+08 - 1E+09]	120	Mascarin et al. (2011)
Glucosa	20%	2E+09	120	Mascarin et al. (2011)
Melaza de remolacha azucarera	5%	2.6E+09	120	Lohse et al. (2014)
Melaza	2%	1.2E+09	96	García et al. (2013)

Fuente de carbono	%P/v	Concentración	Tiempo de fermentación (horas)	Bibliografía
Harina de maíz	2%	8,54E+08	192	Pham T et al. (2009)
Glucosa + Licor fermentado de maíz	5% + 2%	1.8E+09	72	Chong et al. (2011)

En el presente trabajo se utilizó sacarosa, melaza y licor fermentado de caña al 3% como fuente de carbono, estas fueron elegidas debido a su bajo costo y fácil acceso, todas dieron resultados de concentración en blastosporas/ml superiores a 10^8 , lo que nos indica que son una buena fuente de carbono.

Garcia et al. (2013) evaluaron un medio de cultivo con melaza al 3% como fuente de carbono para *Beauveria* el cual llegó a la concentración de $1.2E+09$ blastosporas/ml a 96 horas, está siendo superior a la observada en el presente trabajo, no obstante, la diferencia en el crecimiento se puede dar por la desigualdad en el sistema de agitación y aireación, en su estudio ellos mantienen dos sistemas de agitación y temperatura superior a los 25°C.

Como se observa en la tabla 13 el aumento de la concentración % p/v de la fuente de carbono está relacionada al incremento de blastosporas/ml en menor tiempo de fermentación, en el presente trabajo se llegó a un pico de concentración al 3% de sacarosa de $1E+09$ en 168 h, 96 horas adicionales de fermentación del ensayo realizado por Mascarin et al. (2011) donde en medios con glucosa al 20% obtuvieron un rendimiento superior a 1×10^9 blastosporas/ml a las 72 h. Nuestros resultados también tomaron 48 horas de fermentación adicionales a los resultados reportados por Lohse et al. (2014) en medio líquido con 5% p/v de sacarosa con un rendimiento de 2.6×10^9 esporas/ml a las 120h, esto sugiere que para tener mayores concentraciones del entomopatógeno en menor tiempo

debemos incrementar el % p/v de la fuente de carbono hasta un mínimo del 5% p/v. Incluso, estudios como el de Chong et al. (2011) nos sugieren que se puede obtener un mejor rendimiento de blastosporas combinando fuentes de carbono de distintas naturalezas.

Además de la reducción en el tiempo de fermentación, Mascarin et al. (2018) reporta que el aumento en la fuente de carbono está íntimamente relacionado con la estabilidad de las esporas, aun cuando se mantienen las concentraciones en $1E+09$ mejora notablemente la resistencia a distintas condiciones ambientales y aumenta de la patogenicidad de los propágulos infecciosos.

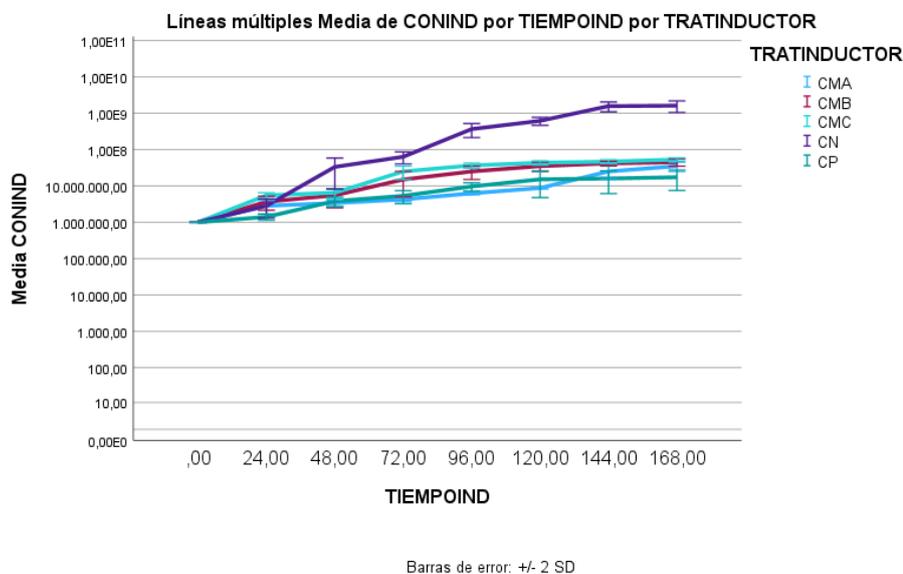
Para la fuente de nitrógeno y sales basales muchos autores sugieren el uso de harinas para reducir costos en el medio, no obstante Elías-Santo et al. (2021) relata su experiencia con 6 tipos de harina para sustituir fuentes de nitrógeno y sales basales, los cuales llegan a concentraciones inferiores a $1E+09$. En consecuencia, en el presente trabajo se optó por $(NH_4)_2SO_4$ 0.6% p/v y diferentes sales de uso agrícola de fácil acceso como KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $NaCl$, $Ca(NO_3)_2$ para una correcta suplementación del medio de cultivo.

Crecimiento de B. bassiana en medio líquido con presencia y ausencia de quitina.

Se evaluó el crecimiento en medio líquido de *B. bassiana* tomando como fuente de carbono, azúcar morena y diferentes fuentes de quitina (Fig. 12).

Figura 11

Crecimiento de B. bassiana en distintos medios con fuentes de quitina

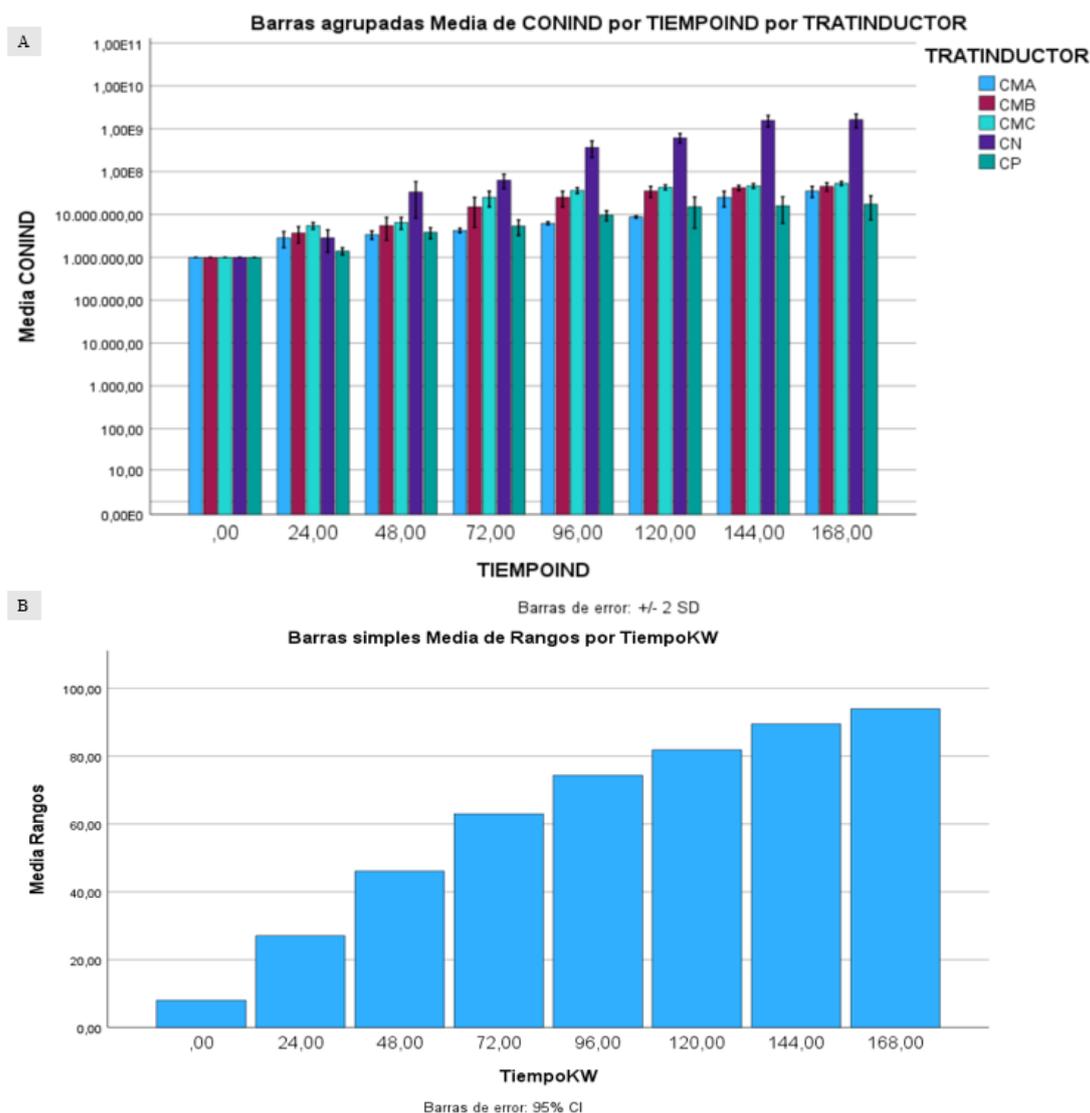


Nota: CP: control positivo, CN; control negativo, CMA: medio líquido con harina de camarón desproteïnizada al 2%, CMB: medio líquido con harina de camarón desproteïnizada al 3%, CMA: medio líquido con harina de camarón desproteïnizada al 4%.

Se utilizó quitina coloidal y cáscaras de camarón como única fuente de carbono, lo que repercutió en el crecimiento de *B. bassiana* alcanzando una concentración máxima de 5×10^7 a los 7 días de fermentación, a comparación de sacarosa al 3% con una concentración de 1×10^9 en el mismo tiempo. Según Poria et al. (2021) el extracto de levadura, el extracto de malta, la caseína, el sulfato de amonio, la quitina coloidal y las escamas de quitina se consideran fuentes de nitrógeno, usadas en la producción de quitinasas. Esto resulta clave para entender la baja en la concentración de blastosporas en medios que no disponían de sacarosa y únicamente fuentes de quitina, debido a que las relaciones C:N son imprescindibles para el crecimiento de *B. bassiana*, sugiriendo probar medios combinados para un óptimo desarrollo del entomopatógeno, no obstante, el uso de fuentes de quitina, ayuda a que el hongo aumente su agresividad sobre *T. urticae* en los bioensayos, como se observa en la figura 25.

Figura 12

Nivel de blastosporas/ml de *B. bassiana* en distintos medios con quitina para 0,24,48,72,96,120,144 y 168 h.



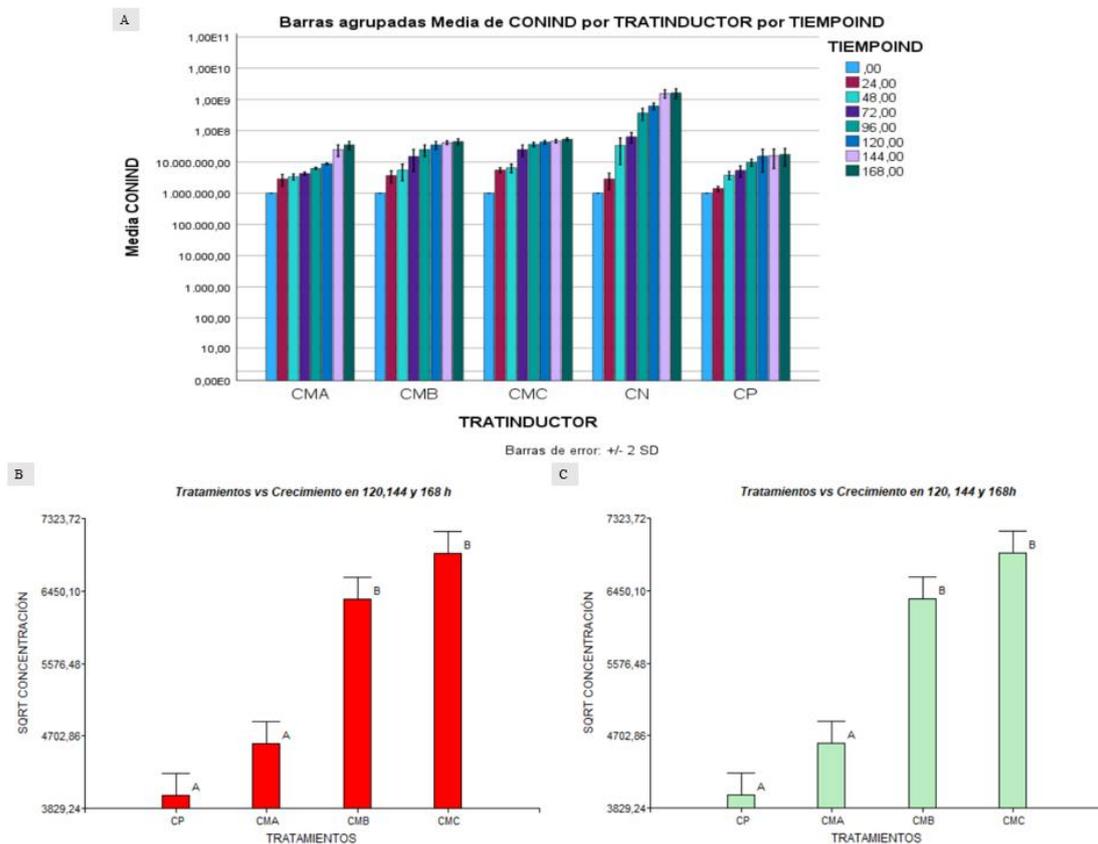
Nota: A: Concentración promedio de blastosporas de *Beauveria bassiana* a diferentes tiempos de incubación en medios con ausencia y presencia de quitina. B: Prueba de Kruskal - Wallis para diferencia de nivel de blastosporas/ml de *B. bassiana* en distintos tiempos, separa a las medias a las 96,120,144 y 168 h con mayor crecimiento.

La prueba de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal Wallis, agrupa a las mediciones de blastosporas a las 96,120,144 y 168 horas con la misma media, por lo que se

infiere que desde las 96 h no hay cambios representativos en la concentración de blastosporas. Elhakim, Mohamed, & Elazouni (2020), estudió el crecimiento de *B. bassiana*, en fermentación líquida con quitina coloidal al 3% p/v llegaron al máximo de su crecimiento a las 96 horas de fermentación, valor que coincide con el del presente trabajo.

Figura 13

Crecimiento de B. bassiana en diferentes medios líquidos con presencia de quitina y sacarosa al 3% p/v.

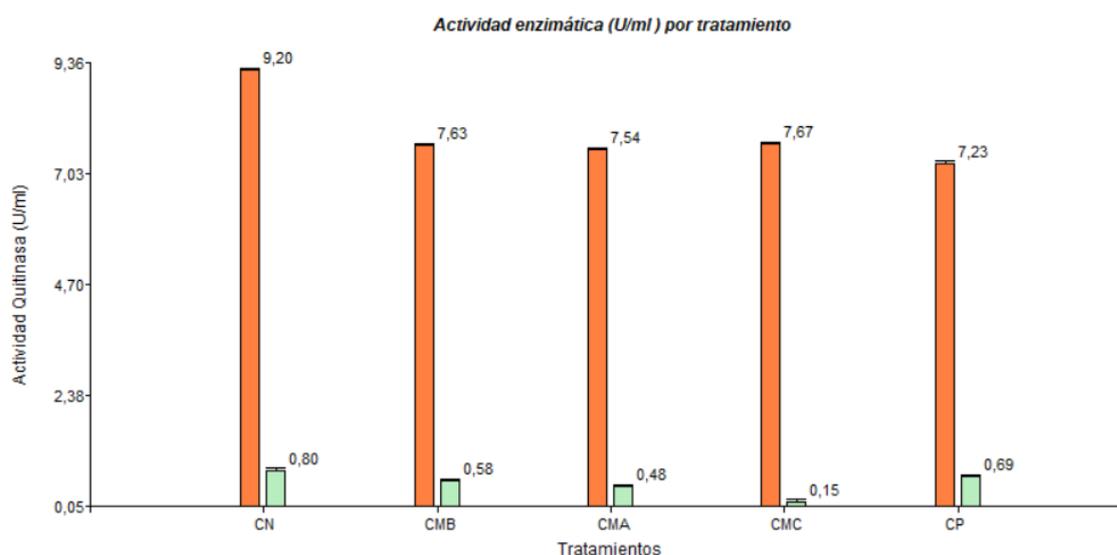


Nota: A: Concentración promedio de los medios líquidos con presencia y ausencia de quitina para la producción de blastosporas de *Beauveria bassiana*. B: La prueba de comparación de Tukey separa a los resultados de los medios CMB y CMC (grupo b) con mayor cantidad de esporas por ml B: La prueba de comparación de Duncan separa a los resultados del medio CMB y CMC (grupo b) con mayor cantidad de esporas por ml.

La mayor concentración de blastosporas/ ml coincidió con los % p/v de cáscara de camarón desproteínizado más altos evaluados en el presente trabajo de 3 y 4 % llegando a un máximo de $5 \cdot 10^7$ blastosporas/ml.

Figura 14

Actividad enzimática quinolítica medida en diferentes medios con quitina y sacarosa al 3% p/v



Nota: Crecimiento de *B. bassiana* en diferentes medios convertidos a log base 10 (anaranjado), Actividad quinolítica en U/ml (verde) medidos a las 144h.

Los medios con mayor actividad enzimática, agrupados por la prueba Kruskal Wallis fueron el medio CN, CP y CMB, que corresponden al medio con sacarosa al 3%, con quitina coloidal al 2% y con cáscara de camarón al 3%. El medio con mayor actividad enzimática con respecto al nivel de blastosporas/ ml fue el que contenía quitina coloidal esto se debe a la disponibilidad de la quitina en el medio, esta forma soluble es más accesible para que el hongo produzca las quitinasas. Además, es la fuente más recomendada para los procesos de producción enzimática (Elawati et al., 2018). No obstante, el medio con sacarosa al 3%, tuvo un mayor desarrollo de biomasa, por consecuente también alcanzó altas concentraciones de enzima, estudios como el realizado por González et al. (2010) sugieren

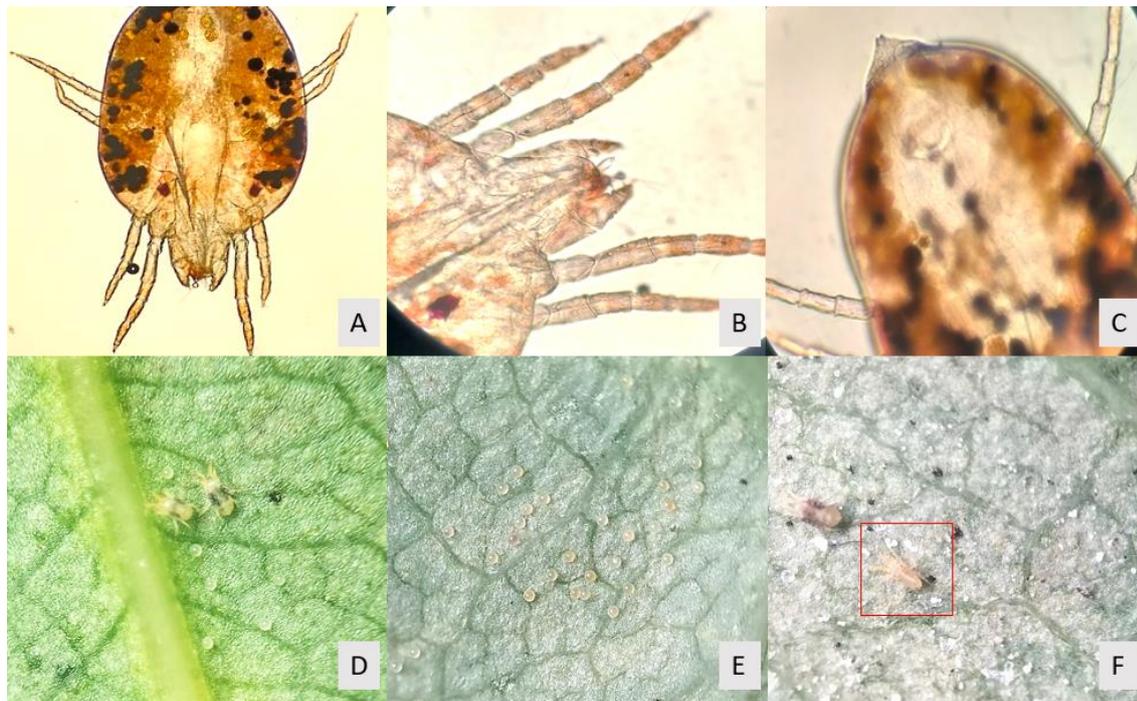
que los medios se suplementen con quitina coloidal, manteniendo fuentes de carbono accesibles para el hongo, esto da como resultado altos niveles de biomasa y de actividad enzimática. Barreto & Castro (2011) propone que las fuentes de carbono en pequeños porcentajes ayudan al desarrollo de la biomasa fúngica la cuál al crecer degradará la fuente de quitina, incrementando los niveles de actividad enzimática y los propágulos infecciosos al mismo tiempo, por lo que se recomienda combinar la sacarosa y la fuente de quitina en los medios líquidos.

En el presente trabajo se observó que el medio con cáscara de camarón desproteinizada al 4%, tiene la menor concentración de actividad enzimática, esto puede deberse al incremento en NaCl presente en las cáscaras, según Vahed et al. (2013) concentraciones desde 2M – 3M de NaCl pueden inhibir del 50% al 90% de la actividad quinolítica. Además, al incrementar el porcentaje de cáscaras en el medio, se eleva la posibilidad de encontrarse algún residuo o agente contaminante presente en las mismas capaz de inhibir la actividad enzimática, Amar et al. (2016) reportaron que iones metálicos como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ag^+ y Hg^{2+} , además de agentes químicos y solventes orgánicos inhiben la actividad enzimática de las quitinasas.

Bioensayos

Identificación morfológica de T. urticae

El ácaro araña hembra tiene una forma elipsoidal, de varios colores, entre rojo, amarillo verdoso o casi translucido (Fig. 15 A), presenta dos manchas características que se intensifican según la alimentación del ácaro (Fig. 15 C). El macho tiene un extremo caudal elipsoidal y es visiblemente más pequeño que las hembras. El tamaño osciló entre 0.4 a 0.6 mm (Fig. 15 F).

Figura 15**Ácaro rojo *Tetranychus urticae***

Nota: A. Vista ante dorsal de un hembra *T. urticae* en aceite de inmersión en microscopio de campo óptico con un aumento de 10x B. Vista superior de *T. urticae* región pro dorsal con aumento 40x, se muestran las 4 patas principales y las divisiones en tarso y tibia C. Vista inferior de *T. urticae* región del opistosoma con aumento de 40x. D. Hembras adultas de *T. urticae* en el reverso de hoja de Rosas E. Huevos de *T. urticae* F. Macho subrayado en rojo junto a una hembra donde resalta el dimorfismo corporal

Preparación ensayos de susceptibilidad de *T. urticae*

Se adaptaron los bioensayos de tal forma que permitan el desarrollo y mantenimiento de *T. urticae* por 7 días, matrices fotografiadas en la figura 16 C. El montaje de las unidades de cría se observa en la figura 16 A, donde se parte con hojas turgentes y sin señal visible de ninguna enfermedad y se colocan 10 hembras adultas de *T. urticae*, después se aplica el tratamiento como se describe en materiales y métodos (Fig. 16 D y E). Son revisadas diariamente -ensayos con signos de contaminación se descartaron- a las 168 h se calculó el % de Mortalidad y % de Reducción de oviposición de *T. urticae*, con las hembras susceptibles al ensayo.

Figura 16

Proceso de montaje de bioensayos y control de cobertura sobre T. urticae



Nota: A. Rectángulos de hojas de rosas en algodón humedecido, con bordes de algodón para evitar que las hembras salgan de la hoja B. Control de aplicación de solución con un fragmento de hoja hidrosensible C. Unidades de experimentación con 10 hembras de *T. urticae* por cada hoja y ensayos por triplicado. D. Hoja de rosas con 10 hembras de *T. urticae* en vista 2x. E. Vista de control de cobertura de *T. urticae* con espectrofotómetro a 5x.

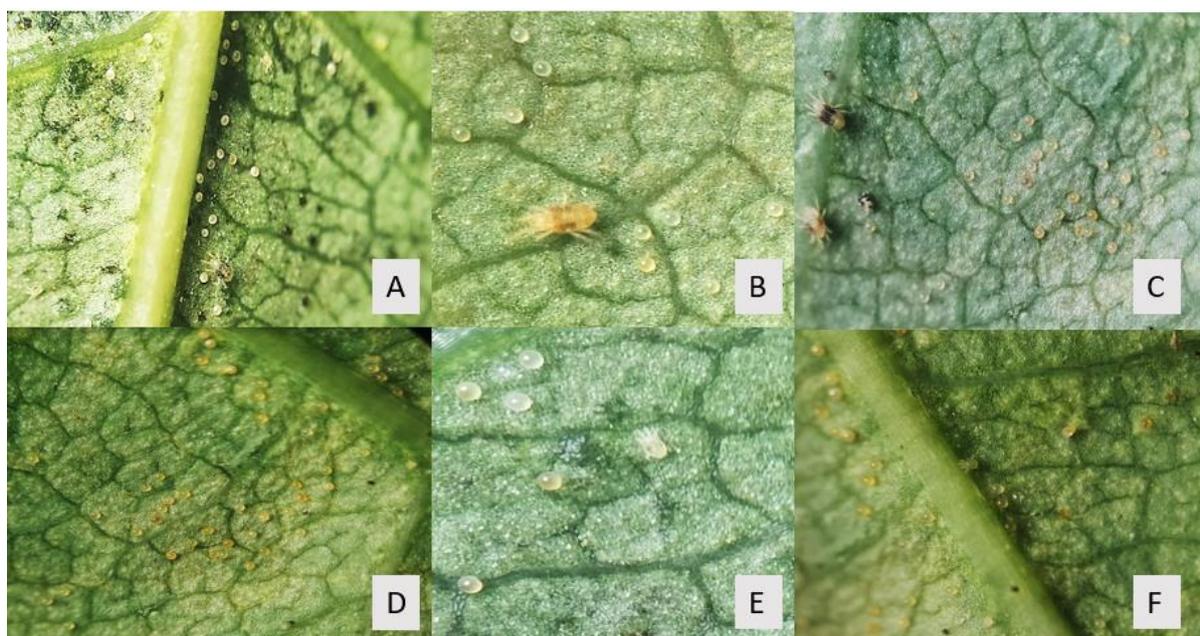
Análisis estadísticos

Para analizar la susceptibilidad de *T. urticae* a diferentes concentraciones de *B. bassiana*, se hizo un modelo probit aplicado a la mortalidad de hembras y a la reducción en la oviposición de hembras de *T. urticae*, las concentraciones del hongo aplicadas fueron 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 y 1×10^8 , los ensayos fueron revisados diariamente y los porcentajes calculados al séptimo día de aplicación, el análisis estadístico se llevó a cabo en la plataforma SPSS.

En la figura 17 podemos observar una recopilación de imágenes de los controles para diferentes bioensayos, donde resalta la presencia de hembras en un buen estado, presencia de huevos y ninfas en algunos casos. La figura 18 es un resumen de fotografías que evidencia la susceptibilidad de *T. urticae* a diferentes concentraciones de blastosporas de *B. bassiana* obtenido mediante fermentación líquida con azúcar morena al 3% como fuente de carbono.

Figura 17

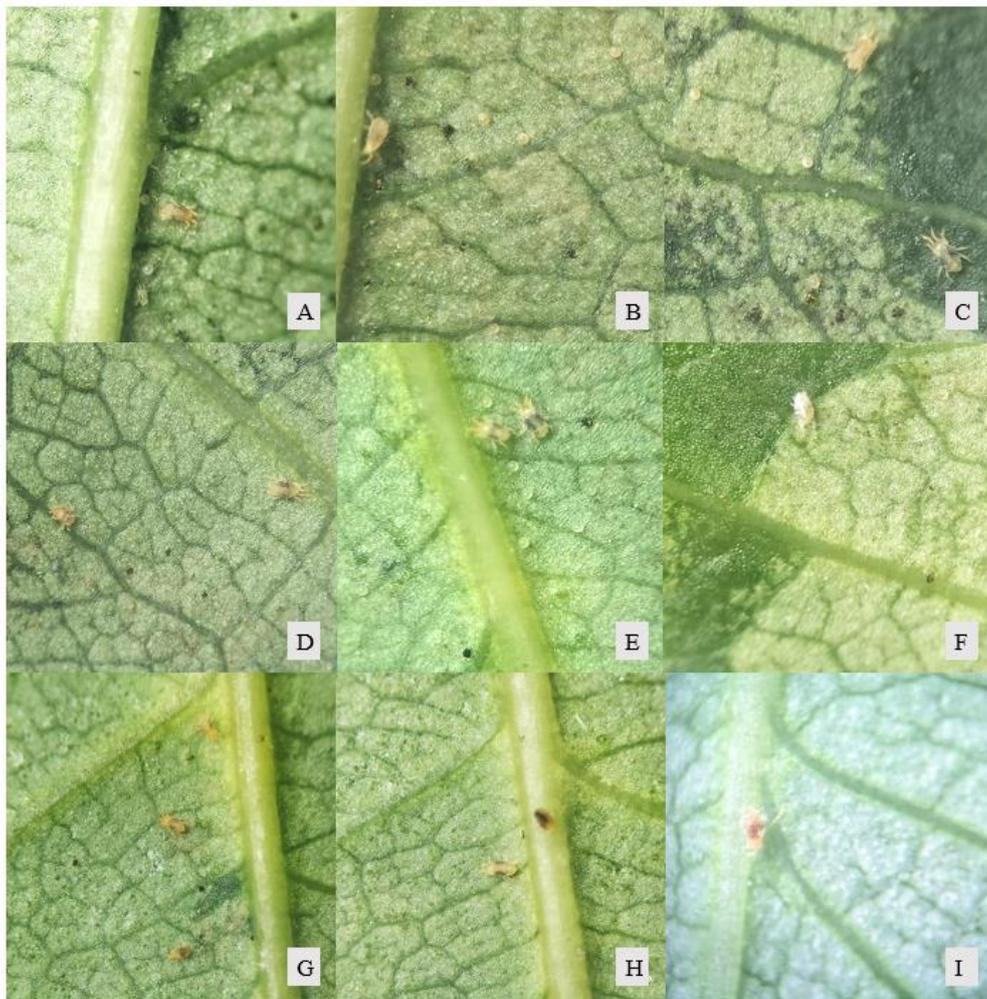
Resumen de fotografías de controles para bioensayos sobre *T. urticae*.



Nota: Hembras de *T. urticae* en unidades control de bioensayos de susceptibilidad a *B. bassiana*, A: Hembra adulta con dos larvas y 22 huevos, B: Hembra adulta con 9 huevos, C: 2 hembras y 29 huevos, D: Huevos de diferentes tonalidades de *T. urticae*, E: Larva de *T. urticae* al primer día de eclosión, F: huevos y larvas de *T. urticae*. La media de oviposición por hembras de *T. urticae* es de 12 huevos por ácaro, límite inferior de 9 y límite superior de 15 huevos por ácaro.

Figura 18

Susceptibilidad de *T. urticae* a distintas concentraciones de *B. bassiana* al séptimo día de aplicación

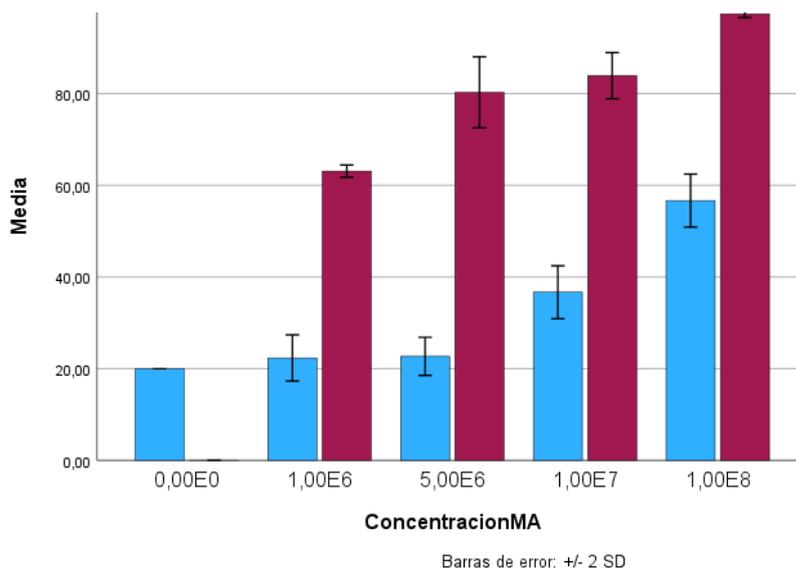


Nota: A, B, y C: Susceptibilidad de *T. urticae* a solución de *B. bassiana* a 1×10^6 , las hembras se encuentran en buen estado, sin embargo, se evidencia una reducción en la oviposición en promedio de 4.375 huevos por ácaro. D, E y F: Susceptibilidad de *T. urticae* a solución de *B. bassiana* a 1×10^7 , reducción en la oviposición en promedio de 2.3 huevos por ácaro y aumento de la mortalidad de hembras de *T. urticae*, G, H e I: Susceptibilidad de *T. urticae* a solución de *B. bassiana* a 1×10^8 , la tasa de oviposición medida en huevos por ácaro se reduce a menos de uno y aumenta la mortalidad hasta el 50%, I: momificación de *T. urticae* por *B. bassiana*.

Las fermentación líquida de *B. bassiana* permitió la obtención de blastosporas y medio de cultivo los cuales resultaron de alta patogenicidad contra *T. urticae* (Fig 19), coincidiendo con lo descrito por Hwi-Geon et al. (2017), quienes evaluaron la susceptibilidad de *T. urticae* a tres tipos de propágulos infecciosos de *B. bassiana* incluidos filtrado de cultivo, conidios aéreos y blastosporas, las soluciones fueron ajustadas a 10^8 esporas/ml, donde las blastosporas de la cepa *Beauveria bassiana* 2R-3-3-1 exhibieron los más altos niveles de patogenicidad cercano al 100% de mortalidad al séptimo día post tratamiento, siendo estos los mejores resultados junto a los productos del cultivo líquido, ellos sugieren que ambos tiene potencial para ser agentes biológicos, fenómeno evaluado en este trabajo con el porcentaje de Mortalidad y la alteración en parametros poblacionales de *T. urticae* (Tabla 14).

Figura 19

Porcentaje de Mortalidad y Reducción en la oviposición de T. urticae a B. bassiana



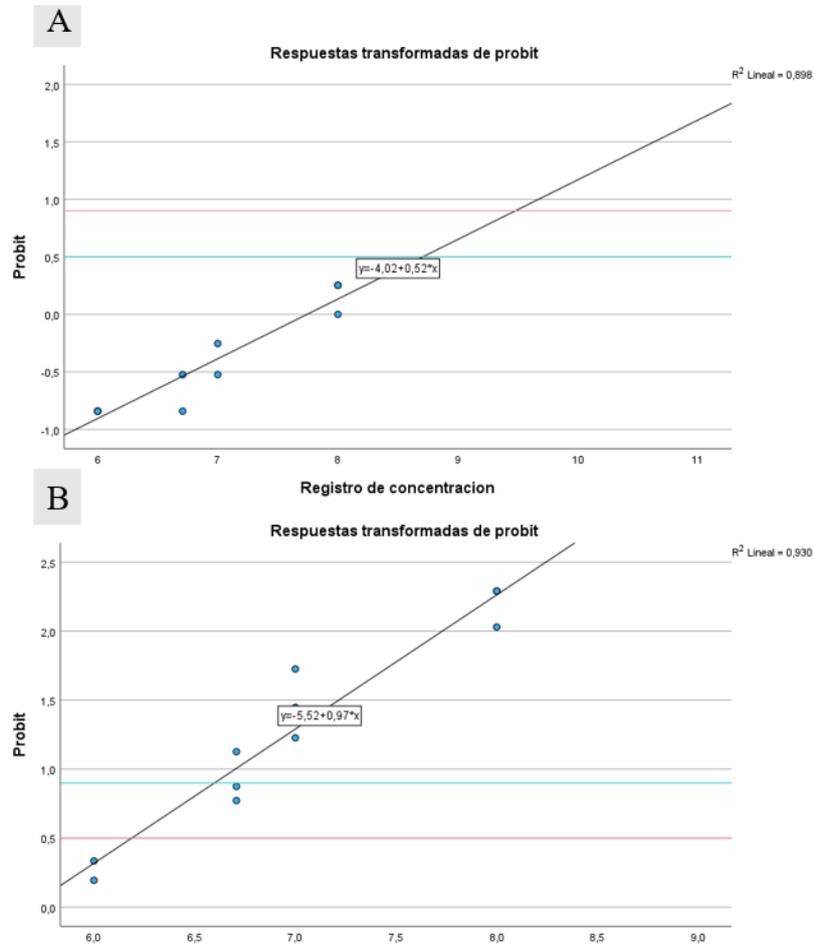
Según Alfaro (2019), Al Khoury et al. (2020) y Draganova y Simova (2010), la mortalidad de *T. urticae* aumenta a medida que incrementa la concentración del entomopatógeno en los ensayos, fenómeno observado en el presente estudio alcanzando una mortalidad cercana al 50% a concentración 10^8 blastosporas/ml. Para Draganova & Simova (2010), diferentes aislados de *B. bassiana* a concentraciones de 10^6 , 10^7 , 10^8 ,

ocasionarían un 100% en la mortalidad de *T. urticae* teniendo la concentración 10^8 el menor LT50. Efecto que no se pudo observar en el presente trabajo, esto se puede dar debido a que solo trabajamos con un aislamiento, siendo una variante de *B. bassiana*, destacando así la importancia de aislar *B. bassiana* de diferentes insectos y ecosistemas. Este resultado también fue descrito por Alfaro (2019), donde en ensayos aplicados para *Tetranychus merganser* a concentraciones del entomopatógeno 10^8 tendrían una media de mortalidad en $50\% \pm 2$, no obstante, dos de los once aislamientos Bb14 y Bb16 alcanzan porcentajes de mortalidad cercano al 100% al quinto día post- infección. Finalmente, el ensayo realizado por Castillo et al. (2020) a *T. urticae* con concentraciones de 10^8 describe una mortalidad de alrededor del 60%, siendo este valor cercano al observado en el presente estudio.

Además de la mortalidad varios autores evalúan el cambio en la dinámica poblacional de *T. urticae*, estos parámetros pueden ser disminución en la fecundidad, expresando en la figura 20 como reducción en la oviposición, disminución de la longevidad de adultos, retraso en el ciclo de vida, reducción de eclosión y viabilidad de huevos. La fecundidad será evaluada más adelante mediante el modelo Probit descrito en la figura 20, no obstante, es interesante recalcar que se observó que a medida que se aumenta la concentración del entomopatógeno en los tratamientos se reduce la eclosión de huevos de los mismos. Esto sugiere que se haga un ensayo donde se cambien las unidades experimentales de hembras adultas por huevos de menos de 24h para conocer el efecto de *B. bassiana* en la eclosión de huevos, este es un fenómeno ya antes estudiado por Bugeme et al. (2014) donde el porcentaje de la eclosión de huevos de *T. urticae* tratados con concentraciones 3×10^5 , 1×10^6 , 3×10^6 , 1×10^7 fueron 60.2 ± 2.5 , 50.8 ± 2.1 , 34.7 ± 0.9 , 27.4 ± 0.9 respectivamente.

Figura 20

Modelo Probit aplicado para el % Mortalidad y % Reducción de la oviposición de T. urticae a B. bassiana



Nota: A: Modelo Probit para el % de Mortalidad de *T. urticae* a *B. bassiana*, la regresión tiene un coeficiente de determinación de 0.898, B: Modelo Probit para el % de Reducción de oviposición de *T. urticae* a *B. bassiana*, la regresión tiene un coeficiente de determinación de 0.930.

Tabla 15

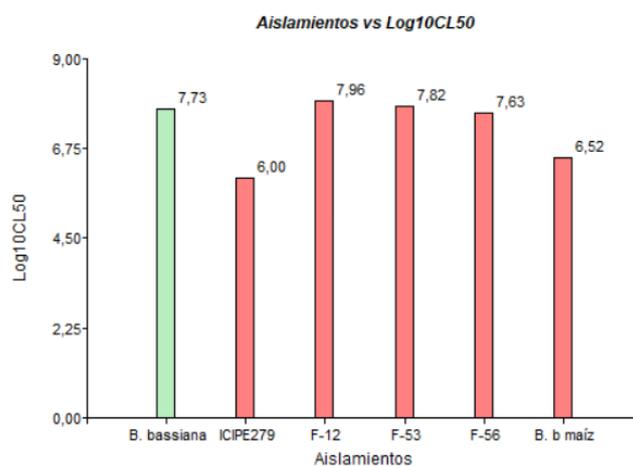
Concentraciones letales para *B. bassiana* sobre *T. urticae* en bioensayos a nivel de laboratorio.

Prueba	Límites de confianza					
	CL50 (bls/ml)	CL90 (bls/ml)	CL50		CL90	
			Inferior (blastosporas/ml)	Superior (blastosporas/ml)	Inferior (blastosporas/ml)	Superior (blastosporas/ml)
	Mortalidad	5,42E+07	1,51E+10	1,66E+07	1,70E+09	7,71E+08
Reducción oviposición	5,50E+05	9,85E+06	2,48E+04	1,44E+06	4,80E+06	4,83E+07

Nota: bls: blastosporas

Figura 21

Valores de CL 50 para la mortalidad de *T. urticae* de distintos aislados de *B. bassiana*.



Nota: Gráfico resumen de distintos CL50 convertidos a log10, en verde está representado el valor encontrado en el presente estudio de 5,42E+07 blastosporas/ml, el aislamiento ICIPE279 tiene un CL50 0.1E+07 conidios/ml y fue reportado por (Bugeme et al., 2014), el aislamiento F-12, F-53, F-56 tienen un CL50 de 9.12 E+07, 6.6 E+07, 4.3 E+07, conidios/ml

y fue reportado por (Yanar et al., 2018), el aislamiento B. b maíz tienen un CL50 de $3,3 \times 10^6$ conidios/ml y fue reportado por (Elhakim et al. 2020), Tabla 19, Apéndice 11.

En la figura 21 se observa los datos correspondientes a CL50 de esta investigación y los reportados por otros autores. El CL50 obtenido en el presente estudio fue de $5,42 \times 10^7$, valor que se encuentra dentro del rango de $[3.3 \times 10^6 - 9.12 \times 10^7]$ obtenidos por los autores mencionados. Por lo que se puede inferir que el CL50 hallado es un buen indicador de que el aislado controla a *T. urticae*. Se reitera que la letalidad que ejerce *B. bassiana* sobre *T. urticae* depende de la cepa y aislado con el que se desarrollen los bioensayos.

Varios efectos subletales de *B. bassiana* sobre *T. urticae* han sido ampliamente reportados (Seyed-Talebi y otros, 2012), en el presente trabajo se evaluó la disminución en la fertilidad de las hembras adultas de *T. urticae* mediante los valores de reducción en la oviposición los cuales tuvieron un CL50 en concentraciones $5,50 \times 10^5$. En un estudio realizado por Kheradmand et al. (2022) trabajaron con dosis subletales de *B. bassiana* LC10 6.76×10^2 , LC20 8.74×10^3 y LC30 55.38×10^3 conidios/ml, donde en todas las concentraciones observaron cambios en los parámetros poblacionales de *T. urticae*, como disminución de la longevidad de adultos, disminución de la fecundidad, disminución en la tasa reproductiva neta. Este fenómeno fue ampliamente observado en el presente estudio, donde en concentraciones bajas como altas existe reducción en la oviposición de hembras de *T. urticae*, el resultado más eficiente con respecto a la disminución en la fertilidad fue con la concentración de 10^8 blastosporas/ml dando un porcentaje de reducción de oviposición del 97% y fecundidad expresada en huevos/ácaro/día de 0.3, estos cambios en los parámetros poblacionales sugiriendo la viabilidad del producto para el manejo integrado de plagas.

Wekesa et al. (2006) recopiló información sobre la mortalidad, fecundidad y fertilidad de huevos de *Tetranychus evansi*, donde sometieron a deutoninfas a la concentración subletal de 1.1×10^5 y monitorearon la oviposición de las hembras sobrevivientes de la infección fúngica, las hembras tratadas con el hongo tendrían reducción de la fecundidad (huevos/ácaro) en 6 ± 1 con respecto al blanco que alcanzaría un 14 ± 2 huevos por ácaro.

Datos similares se obtuvieron en esta investigación donde el blanco tendría una media de fecundidad en 11.83 huevos por ácaro con un máximo de 14.6 huevos por ácaro comparado con el tratamiento con la más baja concentración del entomopatógeno $1.0E10+6$ donde la fecundidad se redujo a 4.375 huevos por ácaro.

Susceptibilidad de *T. urticae* a *B. bassiana* obtenida de diferentes medios líquidos con presencia y ausencia de quitina.

Para analizar el porcentaje de mortalidad y reducción de la oviposición se trabajó con cinco medios de cultivo CP, CN, CMA, CMB y CMC, además un control negativo agua estéril y un control positivo con los agroquímicos Milbecnock 0,75 cc/l y Starmite 30 SC 0,35 cc/l. Se fijó para los productos biológicos la concentración de hongo 1×10^7 , esta concentración en el presente trabajo representa el CL50 en Mortalidad y CL90 en reducción de la oviposición resultante del modelo Probit (Tabla 14). Los datos registrados no siguieron una distribución normal por lo que se tomó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis con comparación múltiple de a pares y nivel de significancia al 0.05, para conocer los mejores tratamientos (Fig. 25).

Figura 22

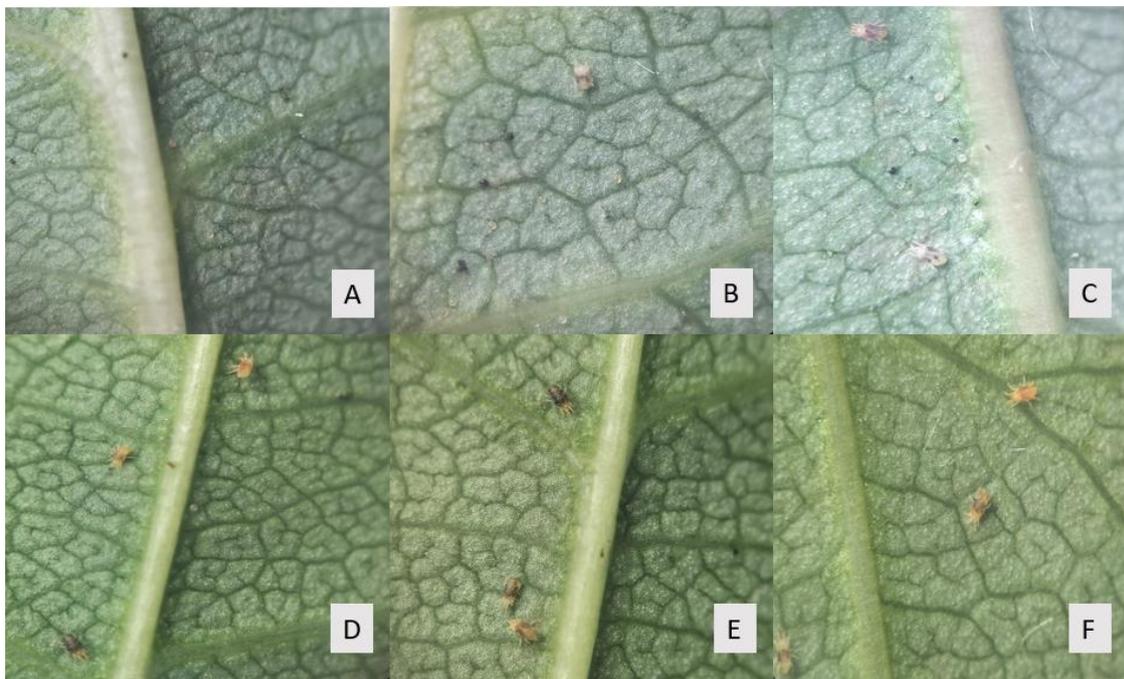
Susceptibilidad de T. urticae a B. bassiana obtenida del medio líquido CMB, CMC y CP.



Nota: A, B y C Susceptibilidad de *T. urticae* a *B. bassiana* de medio CMB, promedio huevos por ácaro 2, porcentaje de mortalidad del 32,63. D, E y F Susceptibilidad de *T. urticae* a *B. bassiana* de medio CMC promedio de huevos por ácaro en 3 y porcentaje de mortalidad en 5.24%, G, H e I Susceptibilidad de *T. urticae* a *B. bassiana* de medio CP promedio de huevos por ácaro en 1.8 y porcentaje de mortalidad en 10%.

Figura 23

Susceptibilidad de *T. urticae* a los agroquímicos Milbecnock 0,75 cc/l y Starmite 30 SC 0,35 cc/l.



Nota: A, B y C susceptibilidad de *T. urticae* al agroquímico Starmite 30 SC 0,35 cc/l, media de huevos por ácaro 3 y mortalidad del 47.37%. D, E y F susceptibilidad de *T. urticae* al agroquímico Milbecnock 0,75 cc/l, media de huevos por ácaro 0,26 y mortalidad del 28%.

Tabla 16

Clasificación según Insecticide Resistance Action Committee (IRAC), de los ingredientes activos presentes en los diferentes tratamientos

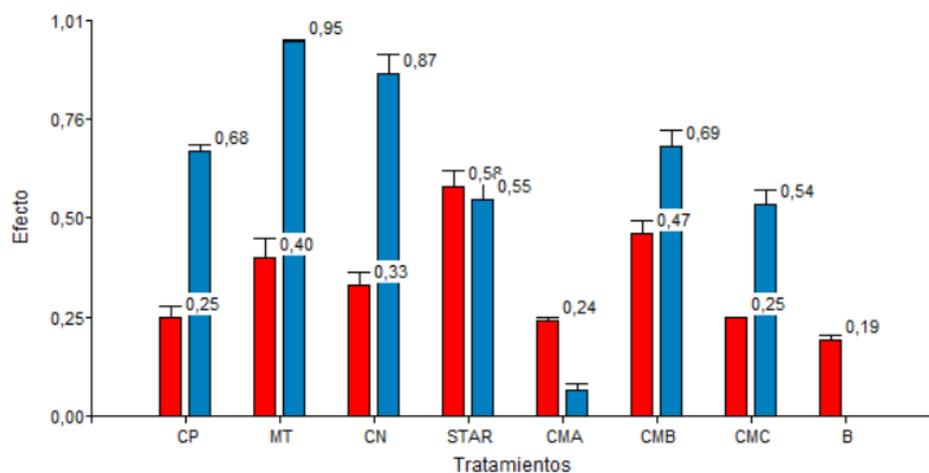
Nombre comercial	Ingrediente activo	Dosis	Ingrediente activo (g)/L o Kg	Clasificación Acorde Irac	Modo de acción
Starmite 30 SC	Cyenoxyprafe n	0,35 cc/l	314g/l	Grupo 25A	Sobre el sistema respiratorio
Milbecnok	Milbemectin	0,75 cc/l	9.3g/l	Grupo 6	Sobre el sistema nervioso y muscular
Beauveria bassiana	Modo de acción desconocido	10 ⁷ blastosporas /ml		UNF* Modo de acción incierto	Multisistémico

Nota: Grupo 25: Inhibidores del transporte de electrones en el complejo mitocondrial II,

Grupo 6 Moduladores alostéricos del canal de cloro dependiente de glutamato

Figura 24

Susceptibilidad de T. urticae a B. bassiana obtenida de diferentes medios líquidos con presencia y ausencia de fuentes de quitina y acaricidas comerciales



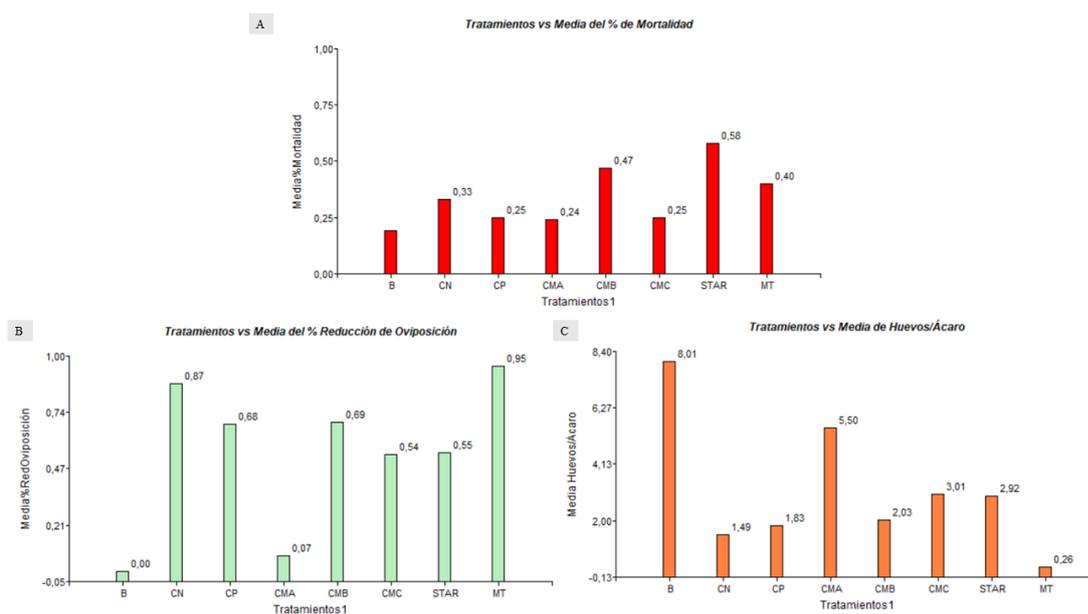
Resumen % de Mortalidad sobre *T. urticae* por *B. bassiana* y controles de los agroquímicos en barras color rojo, Resumen %Reducción en la oviposición de *T. urticae* provocado por *B. bassiana* en barras color azul, además se evaluaron dos controles de agroquímicos MT: Milbecnock 0,75 cc/l y STAR: Starmite 30 SC 0,35 cc/l y un tratamiento control (B).

Los valores más altos de mortalidad y reducción en la oviposición se dieron por los controles químicos, MT: Milbecnock 0,75 cc/l y STAR: Starmite 30 SC 0,35 cc/l a comparación de los tratamientos biológicos, no obstante, Sun et al. (2022) describen la alta resistencia que se genera la cyetpyrafen por *T. urticae*, en el caso de *B. bassiana* Khoury et al. (2020) describe un aumento en la resistencia midiendo el CI50 en 28.82 veces después de 40 generaciones de *T. urticae* tratadas con el entomopatógeno, no obstante varios acaricidas comerciales sostienen cambios de hasta 10000 veces después del mismo número de generaciones. Por lo que es recomendable el uso de controles biológicos contra *T. urticae* haciendo los tratamientos más sostenible en tiempo y espacio, Además Seyed et al. (2014), Castillo et al. (2020), López et al. (2022) , reportan ejemplos de sinergia de

Beauveria con distintos acaricidas comerciales, con este tipo de investigaciones se sugiere que estos no deben ser excluyentes debido a que se alcanza un mayor control cuando se une *B. bassiana* a las rotaciones de los cultivos.

Figura 25

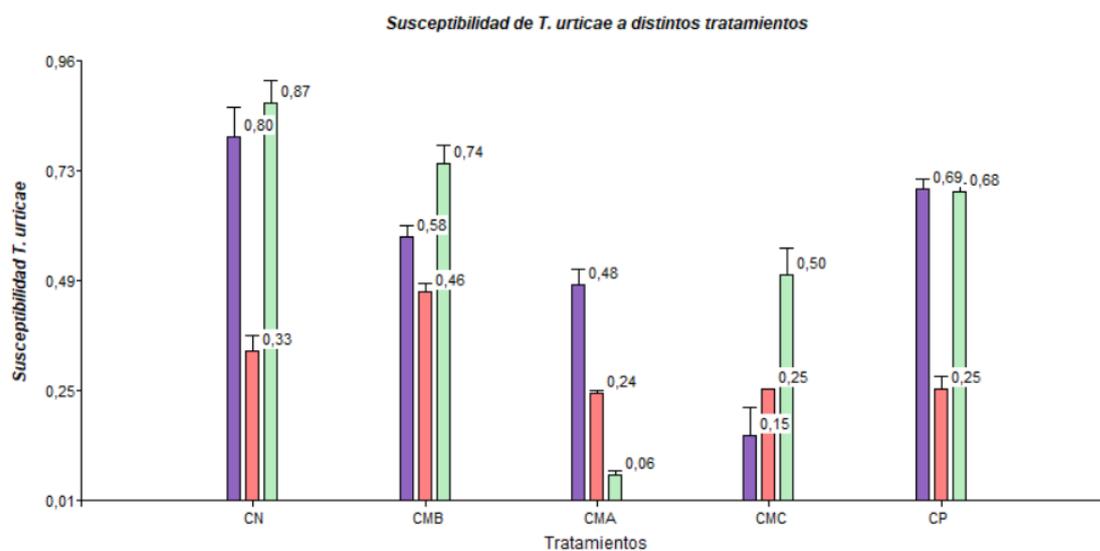
Prueba Kruskal Wallis para establecer diferencias en % Mortalidad, % Reducción de la oviposición y Media de huevos por ácaros en diferentes tratamientos



Nota: A: La prueba no paramétrica Kruskal Wallis separa al tratamiento biológico CN y CMB, a los tratamientos con agroquímicos MT y STAR con mayor porcentaje de mortalidad, B: La prueba no paramétrica Kruskal Wallis separa al tratamiento biológico CP, CN y CMB, al tratamiento con agroquímico MT con mayor porcentaje de reducción en la oviposición, C: La prueba no paramétrica Kruskal Wallis separa al tratamiento biológico CP, CN y CMB, al tratamiento con agroquímico MT con menor cantidad de huevos por ácaros.

Figura 26

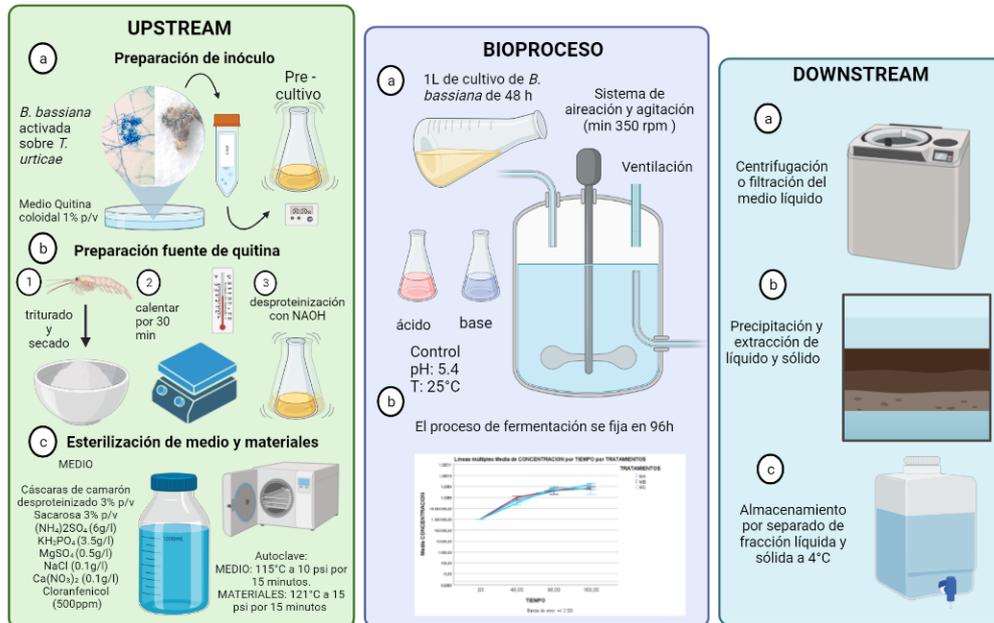
Actividad enzimática y efecto de B. bassiana en diferentes medios de cultivo sobre T. urticae



Nota: Las barras violetas representan la actividad enzimática quitinasa en (U/ml) de distintos tratamientos a las 144 h de fermentación, las barras rojas representan la mortalidad de *T. urticae* a distintos tratamientos, mientras que las barras verdes representan el porcentaje de reducción de oviposición de *T. urticae*.

Los tratamientos biológicos con mayores porcentajes de Mortalidad y reducción en la oviposición, son CN, CP y CMC, los cuales corresponden a la mayores concentración de actividad quinolítica extracelular, expresada en (U/ml).

Figura 27

Propuesta de método de producción de *B. bassiana* en medio líquido

La propuesta para la biodisponibilidad de *B. bassiana* como un posible control biológico para la plaga *T. urticae*, parte de una cepa activada sobre la plaga de interés, la cuál se mantendrá en agar quitina coloidal 1%p/v, de esta cepa se hará un pre cultivo en medio líquido con sacarosa al 5% p/v como fuente de carbono con un volumen final de 1 Litro. Al tiempo se preparan las cáscaras de camarón, trituradas, secadas y desproteinizadas con un tratamiento térmico y en solución de NaOH. Todos los medios y materiales serán autoclavados para reducir el riesgo de contaminación.

El bioproceso tendrá un tiempo de fermentación de máximo 96h, a 25°C. El pH se ajustará a 5.4 antes de empezar la reacción y no se modificará mientras transcurre el proceso de fermentación, el fermentador será alimentado con el pre cultivo ocupando un 10% del volumen total, en el ejemplo descrito se considera un bioproceso que ponga a disponibilidad 10 litros del entomopatógeno, por lo que será alimentado con 1 litro de pre cultivo de 2 días de fermentación. Al retirar el cultivo del medio, se hará un proceso de centrifugación con esto se busca separa la biomasa del cultivo. El líquido se utilizará sobre

las plantas de interés y los residuos sólidos se solubilizarán y enviarán al suelo de los cultivos.

Conclusiones

- Se caracterizó el aislamiento de *B. bassiana* con un crecimiento lento y circular, aspecto algodonoso, de color blanco en el anverso y amarillento en el reverso, los conidios se agrupaban en forma de racimo de uvas, con una silueta globosa y elipsoidal, el amplicon de *B. bassiana* obtenido por PCR de la región ITS de rDNA dio un fragmento de alrededor de 531 pb, la secuencia ensamblada se comparó con la base de nucleótidos del Genbank dando un porcentaje de identidad del 100% con *Beauveria bassiana*.
- La fuente de carbono que permitió una mayor concentración del entomopatógeno fue azúcar morena con $1,50E+09$ a las 168 horas de fermentación.
- La concentración letal 50 para la mortalidad de *T. urticae* por *B. bassiana* se estimó en $5,42E+07$, el mayor porcentaje de mortalidad fue superior al 50% y se alcanzó con concentraciones de entomopatógeno de $1,50E+08$, además el porcentaje de reducción de oviposición a la misma concentración fue del 97%.
- La presencia de quitina en el medio líquido según su naturaleza, induce a mayor actividad enzimática quinolítica por *Beauveria*, siendo la quitina coloidal la fuente de quitina con mejores resultados, además las fuentes de quitina en el medio líquido incrementan la patogenicidad de *B. bassiana* sobre *T. urticae*.
- Se planteó el proceso productivo de *B. bassiana* en medio líquido con sacarosa al 3% p/v como fuente de carbono suplementado con cáscaras de camarón al 3% p/v, a 25°C durante 96 h con un sistema dual de aireación y agitación.

Recomendaciones

Se recomienda aislar *B. bassiana* de diferentes ecosistemas, suelos e insectos para determinar cuál cepa es más patogénica sobre el objetivo de la investigación.

En nuestra investigación contamos con altos porcentajes de blastosporas, sin embargo, se sugiere el aumento en la fuente de carbono en al menos un 5% p/v para llegar a altas concentraciones de entomopatógeno en menor tiempo de fermentación, con gran agresividad.

Los bioensayos sobre *T. urticae* deben monitorearse diariamente y no mantenerse a temperaturas menores de 20°C, debido a que estas retrasan el ciclo de vida del ácaro.

La cobertura de los distintos tratamientos a los bioensayos debe respetar un movimiento parabólico alejados por lo menos 30 cm del objetivo, debido a que un exceso de aplicación puede debilitar a los ácaros incrementando la mortalidad en los blancos.

Se recomienda el uso de antiespumantes en los medios de cultivo líquidos para evitar desperdicio del medio de cultivo, además nunca exceder $\frac{3}{4}$ de volumen total de los fermentadores.

Se recomienda tratar las muestras por triplicado y hacer cuantificación enzimática y de proteínas el mismo día de la extracción, debido a que esto evita que las muestras se degraden.

Se recomienda hacer un perfil de metabolitos secundarios y enzimas, para tener una idea clara del control que ejecuta *B. bassiana*.

Bibliografía

Al Houry, C., Guillot, J., & Nemer, N. (2020). Susceptibility and development of resistance of the mite *Tetranychus urticae* to aerial conidia and blastospores of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Systematic applied Acarology*, 25(3), 429-443. <https://doi.org/https://doi.org/10.11158/saa.25.3.5>

- Alfaro, E. (2019). Susceptibilidad de *Tetranychus merganser* (Acari: Tetranychidae) a cepas de hongos entomopatógenos. Evaluación para su uso potencial como control Biológico en el cultivo Papayo PAPAYO (Carica papaya). En E. Alfaro. Mestría en ciencias en bioprospección y sustentabilidad agrícola en el trópico.
- Amar, B., Ibrahim, T., Hisbam, M., & Rafik, A. (2016). Effect of Metal Ions, Chemical Agents, and Organic Solvent on *Bacillus* Sp.R2 Chitinase Activity. *Procedia Technology*, 22, 465-470. <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2016.01.090>
- Amobonye, A., Bhagwat, P., Pandey, A., Singh, S., & Pillai, S. (2020). Biotechnological potential of *Beauveria bassiana* as a source of novel biocatalysts and metabolites. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(7), 1019-1034. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1805403>
- Astorga, M. (2008). En *Evaluación de la fermentación sumergida del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana como parte de un proceso de escalamiento y producción de bioplaguicidas*. (págs. 16-20). Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Auger, P., Migeon, A., Ueckermann, E., Tiedt, L., & Navajas, M. (2013). Evidence for synonymy between *Tetranychus Urticae* and *Tetranychus Cinnabarinus* (acari, prostigmata, tetranychidae): review and new data. *Acarologia*, 53(4), 383-415. <https://doi.org/10.1051/acarologia/20132102>
- Barreto, A., & Castro, C. (2011). Cuantificación de la actividad enzimática tipo quitinasa de actinomicetos y su capacidad antagónica frente a hongos fitopatógenos. *Pontificia Universidad Javeriana*, 1, 18-25.
- Bautista, E., Mesa, L., & Gómez, M. (2018). Alternativas de producción de bioplaguicidas microbianos a base de hongos: el caso de América Latina y El Caribe. *Scientia Agropecuaria*, 9(4), 585-604.

- Bello, D., Carrera, E., & Díaz, Y. (2006). Determinación de azúcares reductoras totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de azúcar*, 40(2), 45-50. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223120664006>
- Bernardo, C., Pereira Junior, R., Luz, C., Mascarin, G., & Kamp Fernandes, E. (2020). Differential susceptibility of blastospores and aerial conidia of entomopathogenic fungi to heat and UV-B stresses. *Fungal Biol*, 124(8), 714-722. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.04.003>
- Bugeme, D., Knapp, M., Boga, H., Ekesi, S., & Maniania, N. (2014). Susceptibility of developmental stages of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) to infection by *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 34(3), 190-196. <https://doi.org/10.1017/S1742758414000381>
- Bustamante, R. A. (2019). En *Evaluación de Beauveria bassiana en el control biológico de larvas de la*. Bogota: Universidad de la Salle .
- Castillo, O., Guzmán, A., Santillan, M., & Tamayo, F. (2020). Interaction between predatory mites (Acari: Phytoseiidae) and entomopathogenic fungi in *Tetranychus urticae* populations. *BioControl*, 65(4), 433-445. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10004-3>
- Cazaux, M., Navarro, M., Bruinsma, K., Zhuroy, V., Negrave, T., Van Leeuwen, T., . . . Grbic, M. (2014). Application of Two-spotted Spider Mite *Tetranychus urticae* for Plant-pest Interaction Studies. *J Vis Exp*, 4(89). <https://doi.org/10.3791/51738>
- Chacón, J., Cerna, E., Aguirre, L., Ochoa, Y., Ail, C., & Landeres, J. (2020). Resistance of Four Rose Varieties to *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) under Greenhouse Conditions. *Florida Entomologist*, 103(3), 404-407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1653/024.103.0315>

- Charnley, A. (2003). Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40, 241-321.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)40006-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)40006-3)
- Cheong, P., Glare, T., Rostas, M., Haines, S., Brookens, J., & Ford, S. (2020). Lack of involvement of chitinase in direct toxicity of *Beauveria bassiana* cultures to the aphid *Myzus persicae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107276>
- Chong, M., Maldonado, M., Hernández, J., Galán, L., & Sandoval, F. (2011). Study of *Beauveria bassiana* growth, blastospore yield, desiccation-tolerance, viability and toxic activity using different liquid media. *African Journal of Biotechnology*, 10(30), 5736-5742. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2264>
- Dannon, H., Dannon, A., Douro - Kpindou, K., Zinsou, A., Houndete, A., Toffa-Mehinto, J., . . . Manuele, T. (2020). Toward the efficient use of *Beauveria bassiana* in integrated cotton insect pest management. *Journal of Cotton Research*, 3(24).
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s42397-020-00061-5>
- Draganova, S., & Simova, S. (2010). Susceptibility of *Tetranychus urticae* Koch. (Acari: Tetranychidae) to Isolates of Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*. *Pestic. Phytomed.*, 25(1), 51-57. <https://doi.org/10.2295/PIF1001051D>
- Duo-Chuan, L. (2006). Review of Fungal Chitinases. *Mycopathologia*, 161(6), 345–360.
<https://doi.org/10.1007/s11046-006-0024-y>
- Edde, P. (2022). 4. Arthropod pests of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). En *Field Crop Arthropod Pests of Economic Importance* (págs. 208-274). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818621-3.00003-3>

- Elawati, N., Pujiyanto, P., & Kusdiyantini, E. (2018). Production of extracellular chitinase *Beauveria bassiana* under submerged fermentation conditions. *Journal of Physics: Conference Series*, 1025. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1025/1/012074>
- Elhakim, E., Mohamed, O., & Elazouni, I. (2020). Virulence and proteolytic activity of entomopathogenic fungi against the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control* volume, 30. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00227-y>
- Elías-Santo, M., Alfaro-Álvarez, J., Quintero-Zapata, I., Luna Olvera, H., Pereyra-Alfárez, B., Galán-Wong, L., . . . Gandarilla, F. (2021). Diseño y evaluación de medios líquidos para la producción de Blastosporas de *B. bassiana*. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 24, 1-10. <https://doi.org/10.56369/tsaes.3457>
- Ernst, O. &. (2010). Linearization of the Bradford Protein Assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 38, 1918. <https://doi.org/https://doi.org/10.3791/1918>
- Escobar, D., Ossa, C., Quintana, M., & Ospina, W. (2013). Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica*, 18(1), 260-266. <https://doi.org/https://doi.org/10.22517/23447214.7555>
- Eyal, J. (1993). Novel toxin producing fungal pathogen and uses. *European Patent*. <https://doi.org/No.0570089A1>
- Fan, Y., Liu, X., Keyhani, N., Tang, G., Pei, Y., Zhang, W., & Tong, S. (2017). Regulatory cascade and biological activity of *Beauveria bassiana* oosporein that limits bacterial growth after host death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(9), E1578–E1586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616543114>
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., . . . Pei, Y. (2005). Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain

Virulence. *Appl Environ Microbiol*, 71(1), 363-70.

<https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.363-370.2005>

Fargues, J., Goettel, M., Smits, N., Ouedrago, A., & Rugier, M. (2018). Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins.

Mycologia, 89(3), 383-392.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/00275514.1997.12026797>

Feng, M., Poprawski, T., & Khachatourians, G. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. <https://sci-hub.wf/10.1080/09583159409355309>, 4(1), 3-34.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09583159409355309>

Gao, Y., Reitz, S., Wang, J., Xu, X., & Lei, Z. (2012). Potential of a strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) as a biological control agent against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). *Biocontrol Sci Tech*, 22(4), 491–5.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09583157.2012.662478>.

Garcia , C., Gonzáles, M., & Medrano, H. (2013). Study of the mixing conditions in bioreactor for blastospores production of *Beauveria bassiana*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 47.

<https://doi.org/https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.35118>

García, M., Zavaleta, L., Valdez, N., & Roldan, M. (2014). Conservation of the mycelia of the medicinal mushroom *Humphreya coffeata* (Berk.) Stey. in sterile distilled water.

Elsevier, 1(9), 19-22. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.04.002>

Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2021). Phenotypic, molecular, and virulence characterization of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) Vuillemin, and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin from soil samples of Ethiopia for the

development of mycoinsecticide. *Heliyon*, 7(5).

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07091>

Gómez, H., Zapata, A., Torres, E., & Tenorio, M. (2014). *Manual de producción y uso de hongos entomopatógenos*. . Laboratorio de entomopatógeno SCB - SENASA.

González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., Gonzáles, N., & Miranda, I. (2010). Caracterización bioquímica de aislamientos de trichoderma spp. promisorios como agentes de control biológico. i. expresión de actividad quitinasa. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1).

Hamid, R., Khan, M., Ahmad, M., Adbin, M., Musarrat, J., & Javed, S. (2013). Chitinases: An update. *J Pharm Bioallied Sci*, 5(1), 21–29. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.106559>

Hemingway, J., Field, L., & Vontas, J. (2002). An overview of insecticide resistance. *Science*, 4(298), 96-7. <https://doi.org/10.1126/science.1078052>

Holder , D., Kirkland, B., Lewis, M., & Keyhani, N. (2007). Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology (Reading)*, 153(10), 3448-3457. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008524-0>.

Hongxia, L., Xusheng, Z., Mingxin, G., Hui, L., & Zhiming, Z. (2015). Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia. *BMC Microbiology*, 15(267). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12866-015-0592-4>

Hwi-Geon, Y., Dong-Jun, K., Ji-Hoon, L., Ji-In, M., Won-Seok, G., & Soo-Dong , W. (2017). Comparative Evaluation of Conidia, Blastospores and Culture Filtrates from Entomopathogenic Fungi against *Tetranychus urticae*. *Int. J. Indust. Entomol*, 35(1), 58-62. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7852/ijie.2017.35.1.58>

INEC. (2016). *Información Ambiental en la Agricultura 2016*.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.17>

- Jiménez, S. (2016). Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de quitina como inductor. Universidad de Papaloapan.
- Kheradmand, K., Sedaratian-Jahromi, A., Heidari, M., Talaei-Hassanloui, R., & Havasi, M. (2022). Biological responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) to sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Bulletin of Entomological Research*, 112(1), 70-77. <https://doi.org/10.1017/S0007485321000523>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2020). Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Kukule, M. (2017). Analysis of chitinase activity. College of Bowling Green.
- Kulu, I., Latief, A., Afandhi, A., & Nooraidawati. (2015). Morphological and Molecular Identification of *Beauveria bassiana* as Entomopathogen Agent from Central Kalimantan Peatland, Indonesia. *ChemTech*, 8(4), 2079-2084.
- Lambert , N. (2010). Biological control of pests: applicability in Quebec. Quebec: University of Sherbrooke.
- Loera, O., López, M., & Rodríguez , D. (2014). Production of conidia of *Beauveria bassiana* in solid-state culture: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(3), 1549-7801. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.857293>
- Lohse, R., Jakobs-Schönwandt , d., & Patel , A. (2014). Screening of liquid media and fermentation of an endophytic *Beauveria bassiana* strain in a bioreactor. *AMB Expr*, 4(47). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13568-014-0047-6>
- López, B., Martínez, E., Marco, V., & Pérez, I. (2022). Compatibility of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* with etoxazole, spiroadiclofen and spiromesifen against

Tetranychus urticae. *Biological Control*, 169.

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104892>.

Maniana, N., Bugeme, D., Wekesa, V., Delalibera, I., & Knapp, M. (2008). Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), pests of horticultural crops. *Experimental and Applied Acarology*, 46((1-4)), 259–274. <https://doi.org/10.1007/s10493-008-9180-8>

Mascarin, G. M., Jackson, M. A., Koberi, N. N., Behle, R. W., & Delalibera Júnior, Í. (2015). Liquid culture fermentation for rapid production of desiccation tolerant blastospores of *Beauveria bassiana* and *Isaria fumosorosea* strains. *Journal of Invertebrate Pathology*, 127, 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.001>

Mascarin, G., Iwanicki, N., Ramirez, J., Delalibera, Í., & Dunlap, C. (2011). Transcriptional Responses of *Beauveria bassiana* Blastospores Cultured Under Varying Glucose Concentrations. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.644372>

Mascarin, G., Koberi, N., Jackson, M., Dunlap, C., & Delalibera, J. (2018). Nitrogen sources affect productivity, desiccation tolerance and storage stability of *Beauveria bassiana* blastospores. *J Appl Microbiol*, 124(3), 810-820. <https://doi.org/10.1111/jam.13694>

Mascarin, M., & Jaronski, S. (2016). The production and uses of *Beauveria bassiana* as a microbial insecticide. *World J Microbiol Biotechnol*, 32(11), 1-26. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2131-3>

Mollacana, E., & Gonzales, F. (2020). Control of pesticides in Ecuador: An underrated problem? *Bionatura*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.17>

Mollocana, E., & Gonzales, F. (2020). *Revista Latinoamericana de Biotecnología y Ciencias de la Vida*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.17>

- Morales, C., Moura, G., Alan, M., Hall, D., Sánchez, S., & Arthurs, S. (2018). Comparison of aerial conidia and blastospores from two entomopathogenic fungi against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) under laboratory and greenhouse conditions. *Biocontrol Science and Technology* , 28, 737-749.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1487028>
- Morillo, C. (2020). "Evaluación de la dinámica poblacional del ácaro (*Tetranychus urticae*) en el cultivo de rosas (*Rosa* sp.) En Cayambe, Pichincha." Ibarra: Universidad Técnica del Norte .
- Namín, H. (2017). *Tetranychus urticae* biology, life cycle and host plants. En *Characterization of Acaricide Resistance, Plant-Mediated RNAi Against Two-Spotted Spider Mites (Tetranychus urticae Koch), and Assessing Off- and Non-Target Effects* (págs. 1-10). Western University .
- Nicholls, C. (2008). Control Biológico . En *Control biológico de insectos un enfoque agroecológico* (págs. 3-10). Editorial universidad de Antioquia.
- Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Stamatis, P., & Hens, L. (2016). Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. *Frontiers in public health*, 4, 148. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fpubh.2016.00148>
- Nowakowski, A., Wobig, W., & Petering, D. (2014). Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *HHS Author Manuscripts*, 6(5), 1068–1078.
<https://doi.org/10.1039/c4mt00033a>
- Onstad, D., & Knolhoff, L. (2014). Chapter 9 - Arthropod Resistance to Crops. En *Insect Resistance Management (Second Edition)* (págs. 293-326). Academic Press.

- Ortiz Urquiza, A. (2021). The Split Personality of *Beauveria bassiana*: Understanding the Molecular Basis of Fungal Parasitism and Mutualism. *mSystems*, 6(4).
<https://doi.org/10.1128/mSystems.00766-21>
- Paredes, M., Nolasco, O., Acuña, R., & Guitiérrez, I. (2016). Expresión de genes quitinasas de *Beauveria bassiana* frente a sustratos de *Fusarium oxysporum* y *Peronospora variabilis*. *Scientia Agropecuaria*, 7(3), 239 – 244.
<https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.03.11>
- Pham, T. J., Kim, J. J., Kim, S. G., & Kim, K. (2009). Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture. *Mycobiology*, 37(3), 218-224. <https://doi.org/https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.3.218>
- Pham, T., Kim, J., Kim, S., & Kim, K. (2009). Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture. *Mycobiology*, 37(3), 218-224. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.3.218>
- Pham, T., Kim, J., Kim, S., & Kim, K. (2009). Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture. *Mycobiology*, 37(3), 218-24. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2009.37.3.218>
- Poria, V., Rana, A., Kumari, A., Grewal, J., Pranaw, K., & Singh, S. (2021). Current Perspectives on Chitinolytic Enzymes and Their Agro-Industrial Applications. *Biology (Basel)*, 10(12), 1319. <https://doi.org/10.3390/biology10121319>
- Quesada-Moraga, E., & Vey, A. (2004). Bassiacridin, a protein toxic for locusts secreted by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Mycol Res*, 108(4), 441-52.
<https://doi.org/10.1017/s0953756204009724>. PMID: 15209284.
- Rehner, S., & Buckley, E. (2005). A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia*, 97, 84–89.

- Rini Indriyanti¹, D., Yusuf Alfien¹, M., Harnina Bintari, S., Setiati, N., Sumantri, G., & Prarastyani, H. (2022). *Beauveria bassiana* Growth and Development in Various Liquid Media. *Journal of Biology & Biology Education*, 14(3), 428-434.
<https://doi.org/https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v14i3.39705>
- Rosas , N., Martínez, M., & Villegas, J. (2020). Detección de bassianolida y beauvericina en cepas de *Beauveria bassiana* y su participación en la actividad patogénica hacia *Spodoptera* sp. *Biotechnia*, 22(3).
<https://doi.org/https://doi.org/10.18633/biotechnia.v22i3.1060>
- Safavi, S., Shah, F., Pakdel, A., Rasoulian, G., Bandani, A., & Butt, T. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116-223.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x>
- Sahai, A., & Manocha, M. (1993). Quitinasas de hongos y plantas: su implicación en la morfogénesis y la interacción huésped-parásito. *FEMS Microbiology Reviews*, 11(4), 317–338. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1993.tb00004.x>
- Sato, Y., Jang, S., Takeshita, K., Itoh, H., Koike, H., Tago, K., . . . Kikuchi , Y. (2021). Insecticide resistance by a host-symbiont reciprocal detoxification. *Nat Commun*, 5;12(1), 6432. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26649-2>
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse. *Fungal Biology Reviews*, 22(1), 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2008.03.002>
- Sewify, G., Belal, M., & Al-Awash , S. (2009). Use of the Entomopathogenic Fungus, *Beauveria bassiana* for the Biological Control of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier. *Biol Pest Control.*, 19(2), 157–63.
<https://doi.org/https://n9.cl/n0dna>

- Seyed, F., Kheradmand, K., & Talaei, K. (2014). Synergistic effect of *Beauveria bassiana* and spirodiclofen on the two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Phytoparasitica*, 42(3), 405-412. <https://doi.org/10.1007/s12600-013-0377-y>
- Seyed-Talebi, F., Kheradmand, K., Talaei-Hassanloui, R., & Talebi-Jahromi, K. (2012). Sublethal effects of *Beauveria bassiana* on life table parameters of two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Biocontrol science and technology*, 22(3), 293-303. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/09583157.2012.655709>
- Solis, A., Guitiérrez, M., González, H., Medrado, & Galán, J. (2006). Toxicidad de blastosporas de *Beauveria Bassiana* (vuill) contra palomilla del manzano *Cydia Pomonella* l. (Lepidoptera: Tortricidae). *Folia Entomol Mex*, 45(2), 195-200.
- Sun, J., Li, C., Jiang, J., Song, C., Wang, C., Feng, K., . . . He, L. (2022). Cross resistance, inheritance and fitness advantage of cyetpyrafen resistance in two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 183(105062). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105062>
- Thimoteo, S., Glogauer, A., Faoro, H., de Souza, E., Huergo, L., Moerschbacher, B., & Pedrosa, F. (2017). A broad pH range and processive chitinase from a metagenome library. *Braz J Med Biol Res.* , 50(1), 1-13. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165658>
- Thomas, K. C., Khachatourians, G., & Ingledew, W. (1987). Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology*, 33(1), 12–20. <https://doi.org/10.1139/m87-003>
- Vahed, M., Motalebi, E., Rigi, G., Akbari, K., Reza, M., Sadeghi, M., & Ahmadian, G. (2013). Improving the Chitinolytic Activity of *Bacillus pumilus* SG2 by Random Mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol*, 23(11), 1519-1528. <https://doi.org/10.4014/jmb.1301.01048>

- Van Driesche, R., & Abell, K. (2008). Classical and Augmentative Biological Control. *Encyclopedia of Ecology (Second Edition)*, 4(1), 486-492.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63768-0.00039-1>
- Vilcinskas, A., Jegorov, A., Landa, Z., Götz, P., & Matha, V. (1999). Effects of beauverolide L and cyclosporin A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Elsevier*, 122(1), 83–92. [https://doi.org/10.1016/s0742-8413\(98\)10082-8](https://doi.org/10.1016/s0742-8413(98)10082-8)
- Villegas-Mendoza, J., Rosas-García, N., Mireles-Martínez, M., Santiago-Adame, R., Rodríguez-Castillejos, G., Camacho-Corona, M., & Morales-San Claudio, P. (2019). Evaluación antimicrobiana de un extracto metanólico de *Beauveria bassiana* contra bacterias patógenas de importancia nosocomial. *Ars Pharmaceutica*, 60(3), 169-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.30827/ars.v60i3.9219>
- Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. *Front Microbiol*, 12(1-11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343>
- Wekesa, V., Knapp, M., Maniania, N., & Boga, H. (2006). Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. *Journal of applied Entomology*, 130(3), 155-159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2006.01043.x>
- Whistler, R. (1993). CHAPTER 22 - CHITIN. En R. Whistler, *Industrial Gums (Third Edition)* (págs. 601-604). Academic Press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal. En *In PCR Protocols : A guide to Methods and Applications* (pág. 315±322). San Diego, U.S.A.

- WU, S., GAO, Y., XU, X., Goettel, M., & Lei, Z. (2015). Compatibility of *Beauveria bassiana* with *Neoseiulus barkeri* for control of *Frankliniella occidentalis*. *J Integr Agric.*, *14*(1), 98–105. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60731-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60731-5)
- Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E., Gunatilaka, A., Stock, S., & Molnár, I. (2008). Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem Biol*, *15*(9), 898-907. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.07.011>
- Yanar, D., Yanar, Y., Belguzar, S., Eser, I., & Karamese, U. (2018). Efficacy of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* isolates against the two-spotted spider mite, *Tetranychus Urticae* koch (acari: tetranychidae). . *Applied ecology and environmental research* , *16*(6), 7903-7911. https://doi.org/10.15666/aeer/1606_79037911
- Zhang, X., Yuan, J., Liu, F., & Xiang, J. (2021). Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View and Application. *Mar Drugs*, *15*;19(3), 53. <https://doi.org/10.3390/md19030153>. PMID: 33804177
- Zhu, Y., Pan, J., Qiu, J., & Guan, X. (2008). Solation and characterization of a chitinase gene from entomopathogenic fungus *Verticillium Lecanii*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *39*, 314-320. <https://doi.org/ISSN 1517-8382>
- Zimmermann, G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. *Biocontrol Science and Technology*, *17*(6), 553–596. <https://doi.org/10.1080/09583150701309006>

Apéndices