

“Inducción de protección cruzada en los conidios libres al someterlos directamente a condiciones de estrés oxidante”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

M. en B. JOSÉ MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ

Matrícula: 2153806192

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesores: Dr. Javier Barrios González

Dr. Paul Misael Garza López

Iztapalapa, Ciudad de México, 20 de diciembre de 2019.



El presente proyecto se realizó en el Laboratorio W-104 del área de fermentaciones microbianas del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Básicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con la referencia 001466.

Así mismo, se contó con el Apoyo de CONACyT, con el otorgamiento de la Beca para Estudios Doctorales No. 593706.

Iztapalapa, D. F. a 20 de diciembre de 2019.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad

Iztapalapa aprobó la tesis

“Inducción de protección cruzada en los conidios libres al someterlos directamente a condiciones de estrés oxidante”

Que presentó:

M. en B. José Miguel Angel Castillo Minjarez

Comité tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Javier Barrios González

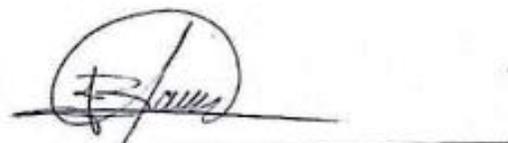
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Paul Misael Garza López

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Jurado:

Presidente



Dr. Javier Barrios González

Secretario



Dr. Paul Misael Garza López

Vocal



Dra. Noheми Garcia Ortiz

Vocal



Dra. Lilianha Dominguez Malfavón

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el soporte que me brindaron durante esta etapa de mi vida.
- A mi director de tesis, el Dr. Octavio Loera, por creer en mí, por aceptar dirigirme y formarme en este camino y por todo el apoyo que siempre me brinda.
- A mis asesores, Dr. Misael Garza y Dr. Javier Barrios, por compartirme su tiempo, su solidaridad, las sugerencias, su experiencia y conocimiento.
- A mis otras sinodales, Dra. Nohemi García y Dra. Lilianha Domínguez por aceptar ser parte de esta etapa tan importante para mí, por brindarme su tiempo y conocimientos.
- A la coordinación y comisión del posgrado en Biotecnología por todo el soporte brindado en este tiempo.
- A mis compañeros y doctores, la pandilla del laboratorio W-104, de todos me llevo bonitos recuerdos y aprendizaje; sobre todo ese espíritu de solidaridad y de muchos, su amistad.
- A mi familia, porque con su amor son la más grande manifestación de la presencia de Dios en mi vida. Ésto es dedicado a ustedes: papá, mamá, hermanas, sobrinos y Blacky.
- A las personas que estuvieron tan cerca de mí en los momentos felices pero sobre todo, en los complicados. Me siento honrado de contar con su amistad, esa que perdura en el tiempo, ustedes saben quiénes son. En especial, Vicky, Nemi, Neko, Emmanuel, Daniel y Arturo ¡Muchas gracias por todo!
- A la música por brindarme cordura y motivación.
- A mi Dios, por permitirme llegar hasta aquí y manifestarme su amor en los que me rodean.

Contenido

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico.....	5
1.2 Ciclo infectivo.....	6
1.2.1 Adhesión del conidio, germinación y formación del apresorio.....	7
1.2.2 Penetración de la cutícula y la epidermis.....	7
1.2.3 Propagación en el hemocele y nueva esporulación.....	7
1.3 Inconvenientes de los bioplaguicidas.....	8
1.4 Rasgos deseables y calidad de los conidios de HE.....	9
1.5 Mejoramiento de la calidad de hongos entomopatógenos.....	9
1.6 Estrés oxidante en las células y glutatión como mecanismo de defensa.....	10
2. ANTECEDENTES.....	12
3. JUSTIFICACIÓN.....	14
4. HIPÓTESIS.....	15
5. OBJETIVOS.....	15
5.1 Objetivo General.....	15
5.2 Objetivos específicos.....	15
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
7.1 Microorganismos.....	17
7.2 Propagación y conservación de las cepas.....	17
7.2.1 Propagación.....	17
7.2.2 Conservación de las cepas.....	17
7.3 Cuantificación de conidios.....	18
7.4 Tratamiento de los conidios con atmósfera enriquecidas de oxígeno (pulsos oxidantes).....	18
7.5 Primera parte: Estudio del efecto en la calidad al aplicar pulsos oxidantes directamente sobre los conidios.....	20
7.5.1 Experimento 1. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes sobre los conidios en medio de cultivo (cultivos con alta abundancia de conidios o con estado de conidiación avanzada).....	20
Efecto de los pulsos oxidantes sobre la germinación de los conidios libres.....	23

Efecto de los pulsos oxidantes sobre la infectividad de los conidios libres.....	23
7.5.2 Experimento 2. Evaluación del efecto de los pulsos sobre los conidios libres. .	23
7.5.3 Experimento 3. Evaluación simultanea del efecto de los pulsos oxidantes en la calidad de los conidios libres y los conidios en medio de cultivo.....	25
7.5.4 Experimento 4. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la germinación de los conidios libres.	25
7.5.5 Experimento 5. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la infectividad de los conidios libres.....	27
7.6 Segunda parte: Acercamiento a la explicación del fenómeno.....	28
7.6.1 Experimento 6. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre los niveles del glutatión en los conidios libres.....	28
7.7 Análisis estadístico.....	31
8. RESULTADOS	31
8.1 Primera parte: Corroboración del efecto positivo en la calidad al aplicar pulsos oxidantes directamente sobre los conidios.	31
8.1.1 Experimento 1. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes sobre los conidios en medio de cultivo (cultivos con alta abundancia de conidios o con estado de conidiación avanzada).	31
8.1.2 Experimento 2. Evaluación del efecto de los pulsos sobre los conidios libres. .	41
8.1.3 Experimento 3. Evaluación simultanea del efecto de los pulsos oxidantes en la calidad de los conidios libres y en la calidad de los conidios en medio de cultivo.	46
8.1.4 Experimento 4. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la germinación de los conidios libres.	49
8.1.5 Experimento 5. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la infectividad de los conidios libres.....	52
8.2 Segunda parte: Acercamiento a la explicación del fenómeno.....	59
8.2.1 Experimento 6. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes en la concentración de glutatión de los conidios libres.	59
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	63
10. CONCLUSIONES	75
11. PERSPECTIVAS	76
11.1 Estudios de biología molecular.....	76
11.2 Estudios bioquímicos.....	76
11.3 Aplicación.....	76
12. BIBLIOGRAFÍA.....	77
13. ANEXOS.....	86

13.1 Determinación del Índice de conidiación (I_c)	86
13.2 Cromatogramas obtenidos para la medición de del nivel de glutatión oxidado y reducido en las muestras.	93
13.3 Resultados de la determinación del a_w de los medios utilizados para realizar las pruebas de resistencia a estrés osmótico (V_o y G_o).....	98
13.4 Artículo	98

RESUMEN

Existe interés en incrementar la efectividad de los hongos entomopatógenos utilizados como alternativa a los plaguicidas químicos para el control biológico. Hay investigaciones que indican que el tratamiento del micelio con pulsos oxidantes es una estrategia exitosa, ya sea para inducir la conidiación o para mejorar la calidad. Sin embargo, se desconocía si se podrían incrementar las características de calidad de los conidios al someterlos directamente a los pulsos oxidantes, lo cual representaría una estrategia novedosa que podría implementarse en procesos de producción comercial. Este trabajo es un primer esfuerzo para determinar si los conidios modifican su calidad al ser tratados directamente con pulsos oxidantes. Como material biológico, se emplearon cuatro cepas pertenecientes a tres de los géneros más utilizados en los productos comerciales: *Metarhizium robertsii* Xoch8.1, *Beauveria bassiana* Tac1.1, *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 y *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302. La investigación fue dividida en dos partes, la primera estuvo enfocada en el estudio del efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad, es decir, corroborar el fenómeno. La segunda parte estuvo dirigida a establecer una posible explicación del fenómeno. De este modo, los conidios de cada uno de los hongos se sometieron a pulsos oxidantes y se evaluaron diferentes características de calidad para determinar si éstas se modificaban con respecto a los controles (conidios que permanecieron en condiciones atmosféricas normales (21% de oxígeno)). Además, se midieron las concentraciones de glutatión en los diferentes sistemas de estudio, para determinar si el tratamiento oxidante generaba estrés oxidante en los conidios. En resumen los resultados indicaron que:

- ✓ Los pulsos con 26% de oxígeno generan condiciones de estrés oxidante en los conidios libres.
- ✓ El glutatión presente en los conidios libres podría funcionar como un mecanismo de defensa ante el estrés oxidante.
- ✓ Los conidios libres responden al estrés oxidante y modifican sus características de calidad.
- ✓ La respuesta positiva al estrés depende de la especie y de la dosis del tratamiento.
- ✓ La estrategia propuesta mejoró de manera simultánea, diferentes características de calidad de los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1 y *B. bassiana* Tac1.1.

En esta investigación se presenta evidencia indicando que los conidios libres, a pesar de la baja actividad metabólica en su estado de latencia, responden a estímulos ambientales externos, lo cual se puede aprovechar para modificar de manera positiva su calidad. En conclusión con la estrategia propuesta:

- ❖ La calidad de los conidios libres se modifica por las condiciones de estrés oxidante que se generan con los pulsos.
- ❖ Se puede inducir protección cruzada en los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1 y *B. bassiana* Tac1.1, como respuesta al factor de estrés empleado.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico

El creciente uso de bioplaguicidas en la producción agrícola ha permitido la mitigación de algunos problemas que surgen por el uso excesivo de los plaguicidas químicos (Duc *et al.*, 2015, Miranda-Hernández *et al.*, 2016), como los daños a la salud humana (Allen y Levy, 2013, Kamel, 2013), al medio ambiente (Jennings y Li, 2014, Smalling *et al.*, 2013) y el desarrollo de plagas resistentes (Lai y Su, 2011).

Los hongos forman parte de los microorganismos que de manera natural son capaces de infectar insectos y causarles la muerte (entomopatógenos), tal interacción ocurre desde hace miles de años (Glare, 2004; Kalia *et al.*, 2011). Los hongos utilizan a los insectos como fuente de nutrición de formas diferentes, por biotrofia (nutrición que se deriva sólo de las células vivas, que cesa una vez que la célula ha muerto), necrotrofia (utilización de los tejidos muertos para alimentarse) y hemibiotrofia (combinación de ambas, inicialmente biotrófico y después necrotrófico) (Vega *et al.*, 2009). Una vez que el hongo ha infectado a un insecto, la enfermedad puede transmitirse a otros individuos a través de estructuras reproductivas conocidas como conidios que lo ayudan a su diseminación, estableciéndose un ciclo infectivo que puede generar una epizootia (Inglis *et al.*, 2001; Wraight *et al.*, 2007; Moreira, 2012).

Por la capacidad de infectar a los insectos, los hongos entomopatógenos (HE) se han utilizado como agentes de control biológico de plagas y sus conidios son la base de los formulados de varios productos bioplaguicidas. Además, son considerados de baja toxicidad para mamíferos, tienen efecto limitado en insectos no blanco y presentan un amplio espectro de insectos plaga para atacar (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011; Rechcigl y Rechcigl, 1999; Singh *et al.*, 2011). A pesar de ello, es muy poco probable que cualquier preparación comercial de un solo HE pueda ser universal, es decir, que pueda ser utilizado con éxito en todas las condiciones que se producen

en el campo (Lacey y Kaya, 2007). Dentro de los HE más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Cordyceps fumosorosea* (antes *Isaria fumosorosea* o *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (de Faria y Wraight, 2007).

1.2 Ciclo infectivo

Los hongos entomopatógenos infectan a los insectos hospederos penetrando a través de la cutícula o por medio de los orificios del cuerpo, han desarrollado múltiples mecanismos especializados para la degradación enzimática del tegumento y para la superación de compuestos de defensa de los insectos, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia (Inglis *et al.*, 2001; Vega *et al.*, 2009). El proceso infectivo (figura 1.1) consiste en cuatro etapas fundamentales: 1. Adhesión del conidio, germinación y formación del apresorio, 2. Penetración de la cutícula y la epidermis, 3. Propagación en el hemocele, 4. Una vez muerto el insecto, germinación atravesando la cutícula del insecto y nueva esporulación (Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

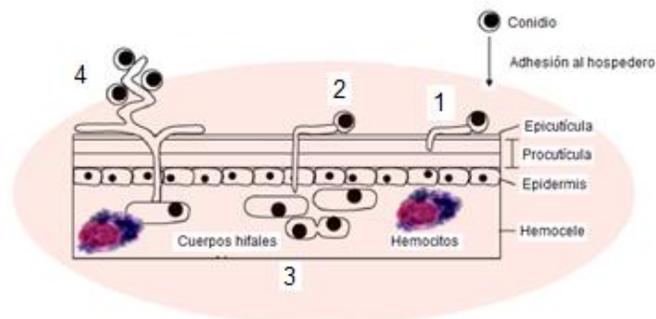


Figura 1.1 Esquema del ciclo infectivo (modificado de Ortiz-Urquiza *et al.*, 2015).

1.2.1 Adhesión del conidio, germinación y formación del apresorio

En esta etapa, los conidios se adhieren fuertemente y de forma inespecífica a la cutícula del insecto. Esta adhesión está mediada por proteínas ricas en cisteína, conocidas como hidrofobinas y que se encuentran distribuidas en la superficie de los conidios. El proceso de adhesión ocurre en tres etapas sucesivas: adsorción de la espora a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto; la adhesión o consolidación de la interfase entre la espora pregerminada y la epicutícula; y finalmente, la germinación y desarrollo hasta la formación del apresorio para comenzar la fase de penetración (Boucias *et al.*, 1988; Inglis *et al.*, 2001; Téllez-Jurado *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2010).

1.2.2 Penetración de la cutícula y la epidermis

La penetración es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos, uno físico y uno químico; el primero consiste en la presión mecánica ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como lipasas, proteasas y quitinasas, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo (Ferron, 1978; Inglis *et al.*, 2001; Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

1.2.3 Propagación en el hemocele y nueva esporulación

Una vez atravesado el exoesqueleto, comienza la invasión del sistema circulatorio del insecto (hemolinfa o hemocele), aquí los hongos realizan transición dimórfica de micelio a blastosporas, con las que colonizan los diversos órganos provocando una septicemia. En esta etapa, uno de los mecanismos con los que cuenta el hongo para superar los sistemas de defensa del insecto, es la síntesis de moléculas tóxicas como las destruxinas (inducen parálisis tetánica) y beauvericinas (la primera producida por *M. anisopliae* y la segunda por *B. bassiana* y *C. fumosorosea*). También, para evitar el ataque del sistema inmune del insecto, los hongos suelen

prescindir de la formación de pared celular y se desarrollan como protoplastos, evadiendo su reconocimiento por los hemocitos circulantes en el hemocele. La micosis induce síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, inanición, comportamientos alterados y parálisis. La muerte del insecto sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido y desnutrición. Las hifas proliferan dentro del insecto y cuando las condiciones de humedad y temperatura son las adecuadas, emergen nuevamente al exterior del cadáver del insecto, donde conidian. Bajo condiciones favorables, los nuevos conidios se dispersarán e infectarán a otros insectos (Ferron, 1978; Inglis *et al.*, 2001; Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

1.3 Inconvenientes de los bioplaguicidas

Hay dificultades en la aplicación de los bioplaguicidas, pues han existido casos en que los productos que han sido colocados en el mercado se han ubicado como débiles y con poca eficacia (Jenkins y Grzywacz, 2003). La afectación en la eficacia de los productos podría deberse a que cuando se aplican en campo, existen condiciones ambientales adversas para los conidios, provocando que estos pierdan viabilidad, virulencia o impidan el establecimiento del proceso infectivo, tales condiciones ambientales adversas podrían incluir altas temperaturas, la radiación solar (Inglis *et al.*, 2001; Lacey *et al.*, 2001), la hipersalinidad y los ambientes deficientes de agua que causan estrés osmótico (Martínez-Villarreal *et al.*, 2016). Por otra parte, también se enfrentan a los mecanismos de defensa de los insectos que incluyen respuestas de comportamiento, aumento de la temperatura corporal, el acicalamiento y la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Todos estos aspectos, pueden evitar el establecimiento de la infección (Inglis *et al.*, 2001; Miranda-Hernández *et al.*, 2016; Ortiz -Urquiza *et al.*, 2015; Vega *et al.*, 2009).

1.4 Rasgos deseables y calidad de los conidios de HE

La selección de HE candidatos para la producción comercial debe tomar en cuenta múltiples criterios, implicando que los rasgos deseables de los HE sean considerados de manera integral. Así, es deseable tener una producción de HE eficiente (en cuanto a rendimiento y a costos), que no exista efecto negativo sobre organismos no blanco y una alta infectividad y velocidad con la que pueden causar la muerte del insecto objetivo (Posada y Vega, 2005; Ravensberg, 2011). Sin embargo, existen otros rasgos de calidad a considerar. La calidad de un agente de control biológico se puede definir como la capacidad para funcionar como se pretende después de la liberación en el campo (Leppla, 1984). En el caso de los HE, se deben identificar los factores que afectan este aspecto, como es el caso de las condiciones adversas ambientales. Por esa razón, los aspectos relacionados con la sensibilidad de los conidios o su resistencia a factores bióticos y abióticos adversos son tan importantes como la producción eficiente y la alta virulencia, ya que esos rasgos determinan su persistencia en el medio ambiente (Posada y Vega, 2005; Ravensberg, 2011). Por lo tanto, no es recomendable hacer una selección basada solamente en un sólo aspecto. Una alta producción e infectividad deben ser acompañadas de buenas características de sobrevivencia en el hábitat (Hallsworth y Magan, 1995; Vandenberg *et al.*, 2004), así como también es importante la estabilidad genética (Tarocco *et al.*, 2005). Todos estos aspectos tienen un impacto en la eficacia final de los productos bioplaguicidas.

1.5 Mejoramiento de la calidad de hongos entomopatógenos

Se han propuesto estrategias para generar características deseables en los conidios, de tal manera que se mejore su calidad, es decir, que se mejoren los rasgos que les permitan resistir de mejor manera las condiciones ambientales adversas y se incremente su potencial como candidatos para la producción en masa y su aplicación en campo. En este sentido, se sabe que las condiciones físicas, químicas y nutricionales impuestas durante el crecimiento de hongos afectan la virulencia,

la termotolerancia y la resistencia a la radiación UV-B, etc. (Muñiz-Paredes *et al.*, 2016; Rangel *et al.*, 2015).

Se puede afectar la fisiología, el crecimiento y la conidiación de un mismo microorganismo cuando se cultiva en medios distintos o con diferentes sustratos (Kamp y Bidochka, 2002; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009; Mascarín *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2015). Además, al someter el micelio a un estrés sub-letal se induce el fenómeno conocido como “protección cruzada”, en donde los conidios generados pueden adquirir resistencia, no sólo contra este factor de estrés, sino también contra otros tipos de factores de estrés (Miranda-Hernández *et al.*, 2016, Rangel, 2011).

1.6 Estrés oxidante en las células y glutatión como mecanismo de defensa

Las células tienen un sistema (figura 1.2) para mantener un balance o equilibrio oxidoreducción (homeostasis redox) entre las moléculas oxidantes y antioxidantes. El estrés oxidante se genera cuando hay un desequilibrio debido al aumento de oxidantes y por una disminución de antioxidantes (Boveris *et al.*, 2008; Salas-Silva *et al.*, 2017).

Como parte de las moléculas oxidantes se encuentran las especies derivadas del oxígeno, llamadas especies reactivas de oxígeno (ERO), se producen de manera controlada dentro de la célula, para la función primaria de transducción de señales tendiente a la regulación de la expresión génica, ya que pueden modificar químicamente los residuos de aminoácidos de proteínas clave en la señalización, induciendo cambios conformacionales que permiten exponer sitios catalíticos, secuencias de localización nuclear o dominios de unión al ADN (Salas-Silva *et al.*, 2017). Las ERO también son necesarias para mantener funciones fisiológicas relevantes como la diferenciación, la proliferación, la sobrevivencia, el metabolismo, etc. (Miranda *et al.*, 2013; Salas-Silva *et al.*, 2017). Dentro de las ERO, el superóxido (O_2^\bullet) es producido por sistemas metabólicos como la respiración y es transformado por la súper oxido dismutasa (SOD) a peróxido de

hidrógeno (H_2O_2). El peróxido puede producir al radical hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), que es capaz de oxidar a los ácidos nucleicos, a las proteínas y a los lípidos, generando disfunción celular, mutaciones y la muerte. Para controlar el efecto nocivo del radical hidroxilo, en la célula el H_2O_2 es reducido a H_2O por la catalasa y por el glutatión (Valko *et al.*, 2016; Salas-Silva *et al.*, 2017).

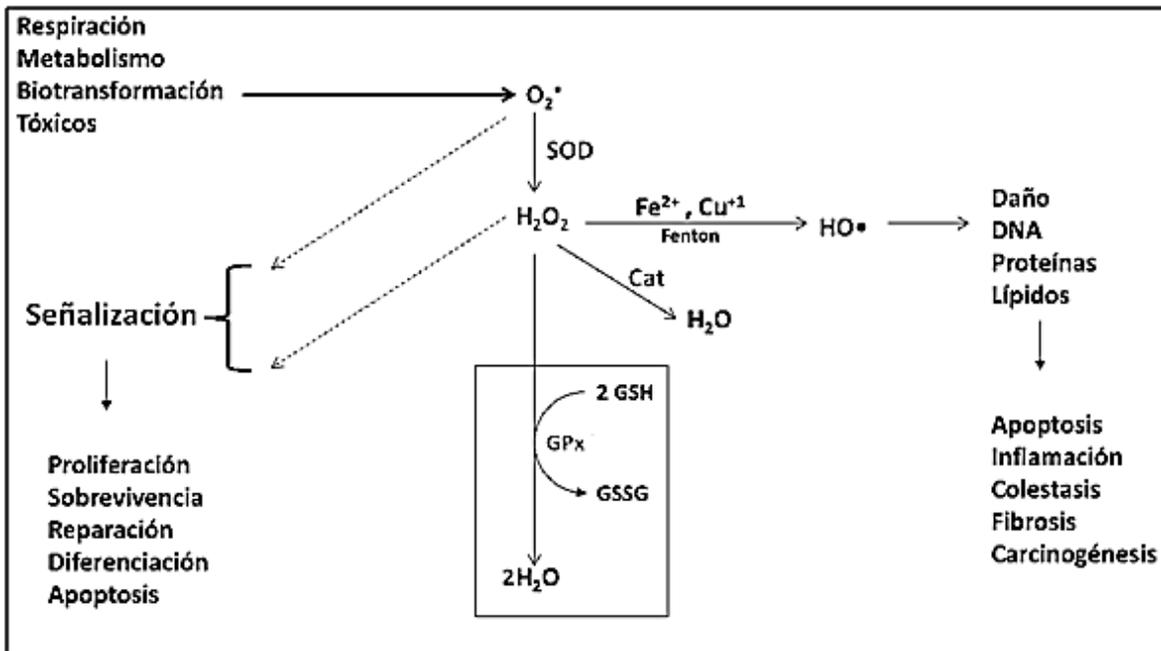


Figura 1.2 Sistema para mantener la homeostasis oxido-reducción en la célula (modificado de Salas-Silva *et al.*, 2017).

El glutatión es un sistema celular no enzimático que actúa para desintoxicar de ERO. Es un tripéptido soluble compuesto por residuos de los aminoácidos glicina, glutamato y cisteína que contiene un grupo tiol libre, que le permite la transferencia de electrones a radicales de oxígeno (Fernández-Checa y García-Ruiz, 2008; Marschall y Tudzynski 2016; Schafer y Buettner 2001). En el recuadro de la figura 1.2, se puede observar la reacción oxido-reducción mediante la cual el H_2O_2 es reducido a H_2O . La forma reducida del glutatión (GSH, figura 1.3) es el donador de los equivalentes reductores de la reacción y pasa su forma oxidada (GSSG, figura 1.3). La reacción se lleva a cabo en presencia de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (Cárdenas-Rodríguez *et al.*,

2008). En los conidios, cuya actividad metabólica es mínima, ya que contiene al menos una mitocondria y toda la maquinaria necesaria para llevar a cabo la respiración (Novodvorska *et al.*, 2016; Stade y Brambl, 1981), el glutatión está presente y es importante en la etapa de latencia de *Neurospora crassa* (Fahey *et al.*, 1975).

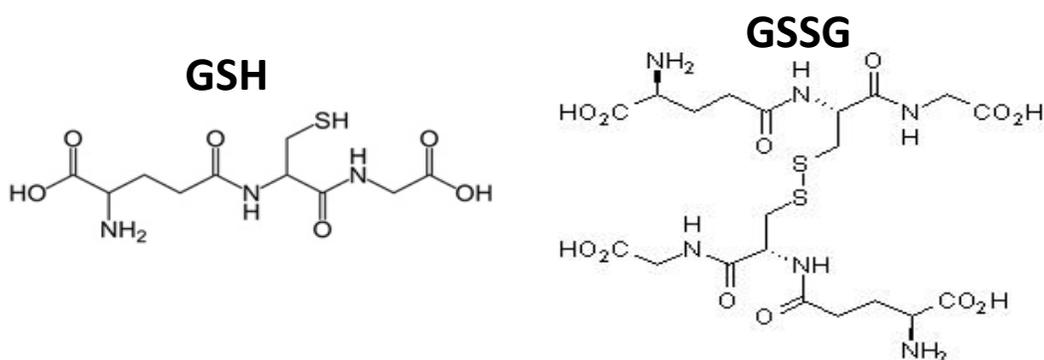


Figura 1.3 Glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG).

2. ANTECEDENTES

Existen diferentes investigaciones en las que con la finalidad de mejorar las características deseables de los hongos entomopatógenos para el control biológico, se han empleado pulsos con atmósferas enriquecidas de oxígeno (pulsos oxidantes) como un factor de estrés sub-letal. Todas estas investigaciones han seguido la estrategia de aplicar el factor de estrés en cultivos de no más de 72 h. De esa manera, la forma del hongo que prevalece en el medio de cultivo, es la vegetativa y el efecto positivo se observa en la conidiación o en los conidios que se generan posteriormente. Tlecuitl-Beristain *et al.*, (2010) al aplicar pulsos con 26% de oxígeno sobre *Metarhizium lepidiotae* incrementaron 100% la producción de conidios, con respecto a lo producido por los controles (21% de oxígeno), sin alterar las características de calidad evaluadas (germinación, hidrofobicidad e infectividad contra *Tenebrio molitor*). De igual manera, en la investigación de García-Ortiz *et al.*, (2015) con el mismo hongo entomopatógeno, aplicando pulsos con 30% de oxígeno, la producción

de conidios se incrementó 86%. Además, este efecto positivo fue acompañado por el mejoramiento de la termotolerancia de los conidios sin alterar otras características de calidad como la viabilidad, hidrofobicidad e infectividad contra *Tenebrio molitor*. En otra investigación, Miranda-Hernández *et al.*, (2014), estudiaron en la cepa *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302 y en la cepa *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 (antes conocidas como *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 e *Isaria fumosorosea* CNRCB, respectivamente), los efectos de los pulsos con 26% de oxígeno sobre la producción de conidios y la calidad de éstos. Encontraron que *C. fumosorosea* incrementó su producción casi 5 veces, mientras que *C. javanica* la disminuyó un 50%, en comparación con los controles. En cuanto a las características de calidad, en ambas cepas se incrementó la infectividad contra larvas de *Galleria mellonella* y se mejoraron la tasa de germinación y la resistencia al estrés térmico y al estrés osmótico. Por su parte, Garza-López *et al.*, (2012), determinaron que en *Beauveria bassiana*, las atmósferas de oxígeno modificadas (16 y 26% de oxígeno) generaron daño celular, indicando que el tratamiento produjo estrés oxidante. Ahora se sabe que los pulsos generan estrés oxidante en el micelio, debido a la generación de ERO (Garza-López *et al.*, 2012, Pérez-Guzmán *et al.*, 2016).

Por otra parte, Castillo-Minjarez, (2015), al estudiar el efecto de los pulsos con 26% de oxígeno sobre cultivos de *C. fumosorosea* ARSEF3302 y *C. javanica* CHE-CNRCB303, en este caso con conidiación avanzada (es decir, que en el medio de cultivo, los hongos se encontraban principalmente en forma de conidios), se observó que incrementó la infectividad sobre *G. mellonella*, la viabilidad y la termotolerancia. Este hallazgo fue un indicio de que se podrían mejorar las características de calidad de los conidios, si éstos son sometidos directamente a los pulsos oxidantes. Esto implicaría contar con una nueva estrategia para el mejoramiento de los hongos entomopatógenos.

3. JUSTIFICACIÓN

Ante el interés actual de incrementar la efectividad de los hongos entomopatógenos utilizados como alternativa a los plaguicidas químicos para el control biológico, las estrategias para el mejoramiento de las características deseables de los conidios cobran una gran importancia. En este sentido, las investigaciones indican que el tratamiento del micelio con pulsos oxidantes ha dado buenos resultados, ya sea como inductores de la conidiación o como mejoradores de la calidad. Sin embargo, si se pudiesen incrementar las características de calidad de los conidios al someterlos directamente a los pulsos oxidantes, representaría una estrategia novedosa que podría implementarse en procesos de producción de bioplaguicidas, ya que se aplicaría directamente en los conidios cosechados utilizados en la preparación de formulaciones de control biológico, evitando modificaciones y ajustes de los métodos de generación de conidios que tiene cada productor industrial. Ante los indicios de que se puede mejorar la calidad de los conidios con esta estrategia en el género *Cordyceps*, se requiere realizar más investigaciones para estudiar el fenómeno en otros géneros ampliamente utilizados para el control de plagas, como *Metarhizium* y *Beauveria*. Si el fenómeno existe, sería interesante conocer si se debe a que el tratamiento podría generar condiciones de estrés oxidante en el conidio, tal como ocurre en la aplicación en el micelio.

4. HIPÓTESIS

Se puede inducir protección cruzada en los conidios libres al ser tratados directamente con pulsos con atmósferas enriquecidas de oxígeno debido a las condiciones de estrés oxidante que se generan.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

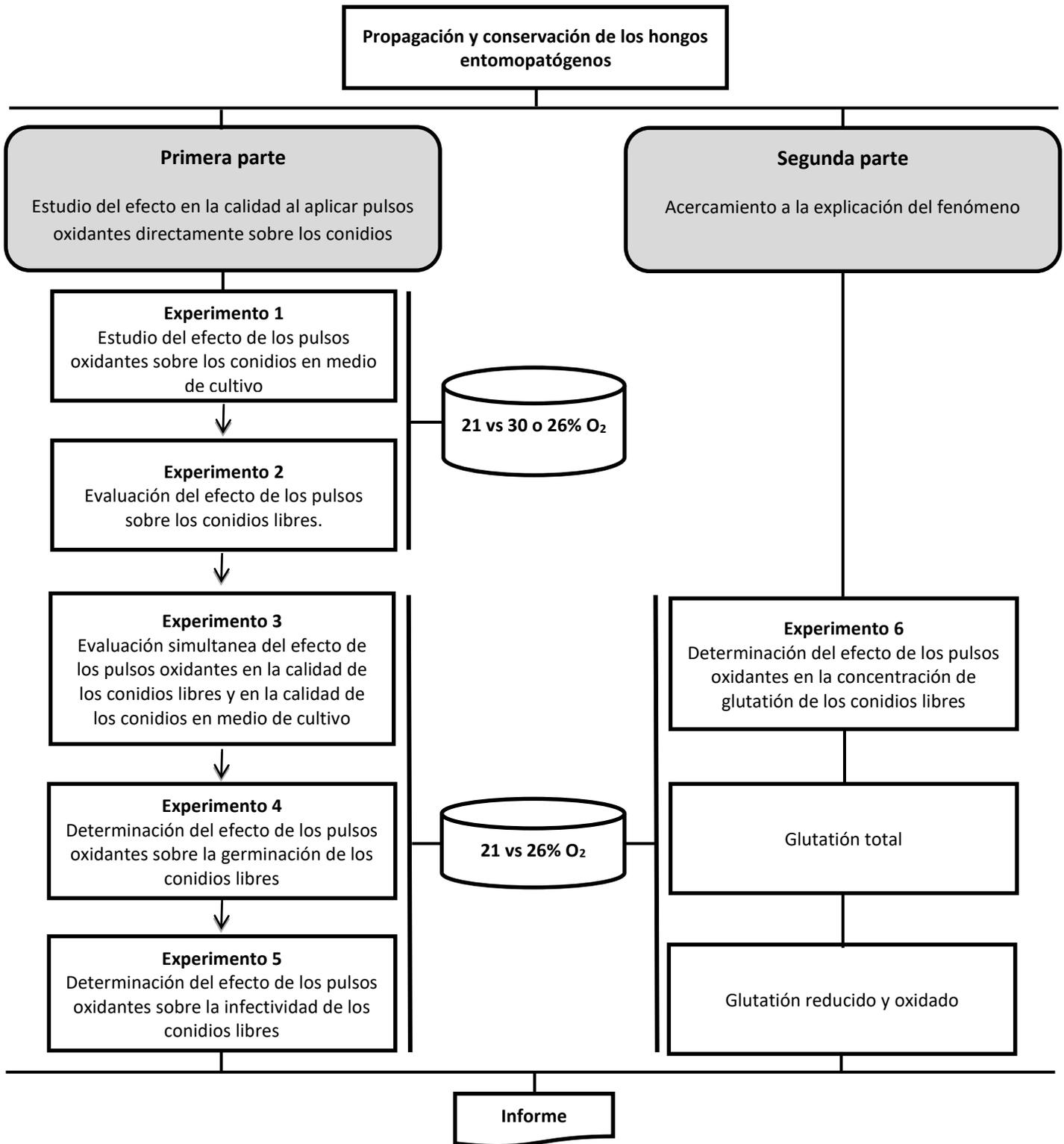
Determinar el efecto en la calidad de los conidios libres de los hongos entomopatógenos al someterlos a condiciones de estrés oxidantes.

5.2 Objetivos específicos

- Conservar las cepas a largo plazo.
- Cuantificar el efecto de la aplicación de pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios, en los cultivos con estado de conidiación avanzada, de *Metarhizium robertsii* Xoch8.1, *Beauveria bassiana* Tac1.1, *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 y *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302.
- Cuantificar el efecto de la aplicación de pulsos oxidantes en la calidad de los conidios libres de los hongos estudiados.
- Comparar el efecto del tratamiento en los conidios en medio de cultivo vs los conidios libres.
- Determinar el efecto que tiene la aplicación de los pulsos oxidantes sobre las concentraciones de glutatión en los conidios libres.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La investigación se dividió en dos partes compuestas de seis experimentos en total:



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Microorganismos

Para los estudios se utilizaron los hongos *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302 (Cf), que fue obtenido de la colección de Hongos Entomopatógenos del Servicio de Investigación Agrícola (ARSEF) de Ithaca, Nueva York; *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 (Cj), obtenida de la colección de hongos entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) de Colima, México; y *Metarhizium robertsii* Xoch8.1 (Mr) y *Beauveria bassiana* Tac1.1 (Bb), aislados en la Ciudad de México de la delegación Xochimilco y Tláhuac, respectivamente (Estefes-Chávez, 2015).

7.2 Propagación y conservación de las cepas

7.2.1 Propagación

Se emplearon dos tipos de medio de cultivo para la propagación inicial de las cepas. Primero, se realizó la siembra de las cepas en placas con medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), las cajas se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 días hasta que se presentó un césped abundante de conidios. Posteriormente, se tomaron conidios de los cultivos en ADS y se sembraron en el medio de cultivo superficial compuesto de harina de avena (Sol Campestre®, Productos del Campo, México), 33.3 g/L; peptona de carne (Bioxon, México), 10 g/L; y agar bacteriológico (Bioxon, México), 15 g/L (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010) y que para este trabajo será nombrado APA. Una vez que se generaron los conidios (8-9 días), se obtuvieron las muestras para realizar la conservación de las cepas.

7.2.2 Conservación de las cepas

Se aplicaron dos métodos para conservar a las cepas: Agua desionizada estéril y Liofilización, como se detalla a continuación.

7.2.2.1 Agua desionizada estéril

Se esterilizaron viales de vidrio con 4 mL de agua desionizada, en estos se colocaron 6 trozos de aproximadamente 5 mm² de medio de cultivo ADS esporulado y se almacenaron a 4°C (López-Lastra *et al.*, 2002). Estos conservados fueron los empleados en el trabajo de rutina para propagar las cepas de estudio en el medio APA y generar las muestras para los diferentes experimentos realizados.

7.2.2.2 Liofilización

En condiciones de esterilidad, los conidios obtenidos en el medio APA, se cosecharon con 20 mL de Tween 80 al 0.05%, raspando la superficie del cultivo con una espátula estéril. La suspensión se mezcló con leche descremada (Svelty®) al 10%, suficiente para obtener una suspensión de conidios con una concentración de 1×10^8 con/mL. Se agregó 1 mL de suspensión a cada ampolleta y se congeló con nitrógeno líquido. Las ampolletas tapadas con algodón se colocaron en una liofilizadora (Scientz 10N®) durante 12 horas a -60°C y 4 Pa. Finalmente, se retiraron los viales, se sellaron con mechero y se almacenaron a temperatura ambiente (García-Ortiz, 2012).

7.3 Cuantificación de conidios

En los experimentos en donde se requirió la cuantificación se hizo con el siguiente procedimiento, los conidios se extrajeron del medio de cultivo APA con Tween 80 al 0.05% y se contaron en cámara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania), mediante un microscopio óptico (Boeco, Alemania). A partir de los extractos con Tween 80, una vez conocida la concentración de conidios, se prepararon las suspensiones requeridas para cada experimento (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

7.4 Tratamiento de los conidios con atmósfera enriquecidas de oxígeno (pulsos oxidantes)

Se probaron dos condiciones atmosféricas utilizando una modificación de la técnica descrita por Tlecuitl-Beristain *et al.*, (2010):

- 1) *Atmósfera normal o de control (21% de O₂)*. Para cada cepa estudiada, los controles se realizaron de la siguiente manera: se emplearon botellas serológicas (120 mL; Distbrand, Ciudad de México, México) que contenían el material de estudio, se cubrieron con tapones de algodón, lo que permitió el intercambio gaseoso libre en la atmósfera normal ambiental (21% de O₂) durante el período experimental.
- 2) *Atmósfera rica en oxígeno (26% o 30% de O₂)*. Simultáneamente, las botellas serológicas utilizadas para la atmósfera rica en oxígeno, conteniendo el material de estudio, se trataron de la siguiente forma: se les intercambiaron el tapón de algodón por uno de goma, o se colocó desde el inicio el tapón de goma (dependiendo del experimento realizado), y se sellaron con Parafilm (American Can Co., Neenah, WI). Estas unidades experimentales (UE) se sometieron a los pulsos oxidantes (figura 7.1) a través de una aguja insertada en el tapón de goma y a su vez conectada a un tanque con la mezcla de gas correspondiente, se dejó fluir el gas en la botella durante 1 minuto (20 cm³/s). Una segunda aguja insertada a través del tapón permitió una purga del gas que fluyó durante este período, por lo que la atmósfera se reemplazó en cada pulso. La mezcla de gases contenía ya sea 26% de O₂ y 74% de N₂, o 30% de O₂ y 70% de N₂ (Fabricados por Praxair México), según el caso.



Fig. 7.1 Sistema de aplicación de pulsos oxidantes.

7.5 Primera parte: Estudio del efecto en la calidad al aplicar pulsos oxidantes directamente sobre los conidios.

7.5.1 Experimento 1. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes sobre los conidios en medio de cultivo (cultivos con alta abundancia de conidios o con estado de conidiación avanzada).

Con la finalidad de cuantificar la producción de conidios máxima (Con_{max}) y el efecto que tienen los pulsos oxidantes en ésta (A) y en la calidad (B) de los conidios generados por cada cepa, se diseñó este experimento.

7.5.1.1 Propagación

Se propagó cada cepa en 50 mL de medio APA, contenido en matraces Erlenmeyer de 250 mL, después de 8-9 días de incubación a $27 \pm 2^\circ\text{C}$, los conidios se extrajeron del medio de cultivo con Tween 80 al 0.05% y se prepararon suspensiones (1×10^8 con/mL).

7.5.1.2 Estado de conidiación de los cultivos

La producción de conidios (Con) se determinó como la cantidad de conidios por centímetro cuadrado de superficie de agar (con/cm²); tales datos se emplearon para calcular los índices de conidiación (Ic), que es un parámetro que describe el estado de conidiación de los sistemas de cultivo, ya que su valor numérico representa la cantidad de veces que se ha incrementado una cantidad inicial de conidios (inóculo) (Ci). Para el cálculo de los Ic , se empleó la ecuación $Ic = C/Ci$, donde C es la concentración de conidios en un tiempo determinado y Ci la concentración de conidios del inóculo inicial (Castillo-Minjarez, 2015). Así, el efecto de los pulsos oxidantes en la producción de conidios se determinó comparando los Ic obtenidos bajo las diferentes condiciones atmosféricas estudiadas.

7.5.1.3 Generación de UE con 21% de O₂

En condiciones de esterilidad, se tomaron 100 μl (aproximadamente 1×10^7 conidios de las suspensiones con 1×10^8 con/mL y se inocularon en botellas serológicas que contenían 10 mL del medio de cultivo APA; cada botella se agitó manualmente para distribuir el

inóculo en la superficie del medio, posteriormente se colocaron tapones de algodón estériles y se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el tiempo requerido (Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010; Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

7.5.1.4 Pulsos oxidantes

Por lo descrito en los antecedentes (página 16), el hongo *M. robertsii* Xoch8.1 fue expuesto a pulsos con 30% de O_2 y el resto de hongos estudiados se sometieron a pulsos oxidantes con 26% de O_2 . Se iniciaron pulsos oxidantes sobre las unidades experimentales (UE) bajo condiciones atmosféricas normales (21% de O_2) en al menos dos horas de cultivo diferentes para cada cepa (tabla 7.1). En estos tiempos, a las UE correspondientes se les intercambié el tapón de algodón por el de goma y después de la aplicación del pulso se continuaron incubando a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el tiempo requerido. De manera simultánea y con UE del mismo lote, se determinó el *Ic* y se realizaron las pruebas de calidad en los conidios; tanto en las condiciones atmosféricas normales como en las condiciones enriquecidas con oxígeno (26 o 30% de O_2). Las diferentes determinaciones se realizaron 24 h posteriores de haber iniciado un sólo pulso oxidante, con la finalidad de evaluar el efecto a corto plazo. Por otro lado, también se hicieron las determinaciones a las 24 h posteriores de haber acumulado cuatro pulsos a razón de 1 pulso/día (96 h después de haber aplicado el primer pulso oxidante), con el objetivo de evaluar el efecto de los pulsos a largo plazo. De este modo, los tiempos de muestreo para evaluar *Ic* y la calidad, fueron los siguientes:

Tabla 7.1 Tiempos de inicio de los pulsos oxidantes en los cultivos y tiempos para realizar las determinaciones de *Ic* y calidad.

Hongo	Tiempo de inicio del pulso (h)	Tiempo de evaluación a corto plazo (h)*	Tiempo de evaluación a largo plazo (h)**
<i>M. robertsii</i> Xoch8.1	120	144	216
	144	168	240
<i>B. bassiana</i> Tac1.1	120	144	216
	144	168	240
	240	264	336
	312	336	408
<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB303	144	168	240
	240	264	336
<i>C. fumosorosea</i> ARSEF3302	144	168	240
	240	264	336

*Evaluación a corto plazo: 24 h posteriores de haber aplicado un sólo pulso. **Evaluación a largo plazo: 24 h posteriores de haber aplicado cuatro pulsos a razón de 1 pulso/día (96 h totales de cultivo).

NOTA 1: En la sección de resultados de este experimento se explica por qué se tienen tiempos diferentes de inicio de pulsos para las diferentes cepas.

Cada punto de muestreo se evaluó por triplicado y se empleó un control negativo (UE sin inóculo) para cada condición de cultivo. Se hicieron gráficas de tiempo vs *Ic* para comparar la producción de conidios bajo las condiciones atmosféricas estudiadas. También, se realizaron gráficas de tiempo vs viabilidad para comparar la calidad obtenida en las diferentes condiciones de estudio (Castillo-Minjarez, 2015).

7.5.1.5 Pruebas de calidad

Para determinar el efecto de los pulsos oxidantes en la calidad de los conidios, se realizaron las pruebas siguientes:

7.5.1.5.1 Viabilidad (V)

Se prepararon suspensiones 1×10^4 con/mL de cada cepa y de cada condición de estudio, se tomaron 30 μ L (300 conidios aproximadamente) y se inocularon en placas de Petri con ADS, a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 60 h y se realizó el conteo de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) presentes. Se determinó el porcentaje de viabilidad teniendo como base que 300 conidios corresponden al 100% de viabilidad (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

7.5.1.5.2 Resistencia al estrés osmótico (V_o)

Se evaluó la viabilidad de los conidios de las diferentes condiciones atmosféricas y de las distintas especies, como ya se ha descrito anteriormente, en este caso se inocularon los 30 μ L de las suspensiones 1×10^4 con/mL en placas de Petri con ADS adicionado con NaCl 0.5 M (Miranda-Hernández *et al.*, 2014). La concentración de sal dio una actividad de agua (a_w) de 0.98, que se midió utilizando un dispositivo de actividad de agua AQUALAB CX-2 (Decagon Devices, Pullman, WA). Los resultados de la medición de a_w se presentan en el número 13.3 de la sección de anexos.

7.5.1.5.3 Termotolerancia (V_T)

Las mismas suspensiones (1×10^4 con/mL) empleadas para la viabilidad se colocaron a 40°C durante 1 h en un termomezclador (Eppendorf, Alemania). Transcurrido el tiempo, se determinó la viabilidad de los conidios como se explicó anteriormente (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

7.5.2 Experimento 2. Evaluación del efecto de los pulsos sobre los conidios libres.

Este experimento se realizó con la finalidad de observar el efecto en la calidad al aplicar los pulsos oxidantes directamente a los conidios de cada cepa, previamente separados del medio de cultivo (conidios libres).

7.5.2.1 Obtención de conidios libres

Los hongos se cultivaron a 27 ± 2 °C en placas de Petri como se describe por Tlecuil-Beristain *et al.*, (2010) en medio APA. Para cada cepa se utilizaron placas de Petri suficientes para generar los lotes de conidios necesarios para tener tres réplicas experimentales independientes. Después de 8-9 días, los conidios se cosecharon, sin secar, de cada placa de Petri raspando suavemente la superficie del medio con una espátula de metal estéril. Para estandarizar la cantidad, se midió un volumen de 0.5 mL con los conidios recién cosechados en un tubo Eppendorf y se transfirieron a botellas serológicas. Las UE correspondientes fueron tapadas con tapones de algodón, mientras que las UE que se sometieron a pulsos oxidantes se taparon con tapones de goma y se sellaron con papel Parafilm.

7.5.2.2 Pulsos con 26 y 30% O₂ en conidios libres

Una vez que se colocaron los conidios en las botellas serológicas y se taparon con tapones de goma, se aplicaron los pulsos con las atmósferas enriquecidas de oxígeno, como se describió anteriormente (pág. 3), en este caso, teniendo el cuidado de dirigir la aguja de entrada del gas hacia las paredes de la botella, para evitar que los conidios se levanten y se salgan por la aguja de salida. Las UE se mantuvieron a temperatura ambiente durante el tiempo de experimentación.

7.5.2.3 Efecto de los pulsos oxidantes sobre los conidios libres

Se hicieron las pruebas de calidad en los conidios (descritas en el experimento 1) 24 h después de haber iniciado el pulso oxidante, para evaluar el efecto a corto plazo y después de aplicar un pulso por día, durante cuatro días (96 h después de haber aplicado el primer pulso), para evaluar el efecto a largo plazo. Así, las pruebas de calidad, se realizaron de forma simultánea en ambas condiciones atmosféricas de estudio. Se realizaron gráficas de tiempo vs viabilidad para comparar la calidad obtenida en las diferentes condiciones de estudio (Castillo-Minjarez, 2015).

7.5.3 Experimento 3. Evaluación simultánea del efecto de los pulsos oxidantes en la calidad de los conidios libres y los conidios en medio de cultivo.

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar si el efecto de los pulsos oxidantes era mayor cuando los conidios se encuentran en medio de cultivo o cuando están libres. Para ello, se hizo un lote de botellas serológicas que contenía 10 mL de medio APA, las cuales se inocularon con 100 μ l de una suspensión 1×10^8 con/mL y se incubaron aproximadamente a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Una vez que se tuvieron 7 días de incubación, se tomaron UE para intercambiar el tapón de algodón por el tapón de plástico e iniciar el pulso. Simultáneamente, se tomaron UE (cajas de Petri, ver experimento 2) para raspar los conidios y colocarlos en botellas serológicas sin medio de cultivo, algunas se mantuvieron con tapón de algodón y otras con tapón de plástico para aplicar pulsos con 26% de O_2 en todos los hongos. En otro experimento no reportado aquí, se pudo observar que no hubo diferencia entre aplicar pulsos con 26 o 30% de O_2 sobre los conidios de *M. robertsii*, así que por practicidad, se homogenizó el tratamiento oxidante con pulsos con 26% de O_2 . En todos los casos se hizo la evaluación de las características de calidad ya descritas, a las 24 h posteriores de haber iniciado el pulso oxidante y a las 96 h posteriores (acumulación de cuatro pulsos). Las evaluaciones de *Ic* se hicieron al mismo tiempo que las evaluaciones de calidad.

7.5.4 Experimento 4. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la germinación de los conidios libres.

Se realizó este experimento con la finalidad de complementar las pruebas de viabilidad medidas en términos de UFC, ahora en términos de germinación. Es decir, las variaciones en la calidad de los conidios se determinaron por los cambios en la germinación (G), la resistencia al estrés osmótico (G_o) y la resistencia al estrés térmico (G_T), basándose en métodos publicados anteriormente (García-Ortiz *et al.*, 2015; Miranda-Hernández *et al.*, 2014; Muñoz-Paredes *et al.*, 2016; Tlecuitl-Beristain, *et al.*, 2010). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

7.5.4.1 Germinación (G)

Se prepararon suspensiones 1×10^6 conidios / mL utilizando Tween 80 al 0.05% para diluir y luego se colocaron en tubos Eppendorf de 1,5 mL. A continuación, 30 μ l de estas suspensiones (de cada cepa y de cada tratamiento atmosférico) se inocularon en placas de agar con agua al 1.5% (Bioxon, México). Cada suspensión provino de una botella serológica (muestras experimentales independientes), por lo que la prueba se realizó por triplicado. Las placas se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 14 h. Posteriormente, se cortaron secciones de agar del medio y se contaron 100 conidios en el microscopio. Se consideró que un conidio germinaba cuando la longitud del tubo germinal era al menos del tamaño del diámetro del conidio (Ibrahim y Jenkinson, 2002). Los resultados se expresaron como porcentaje de germinación.

7.5.4.2 Resistencia al estrés osmótico (G_o)

La prueba se realizó como se describió en el párrafo anterior. Pero en este caso, las placas de Petri con 1.5% de agar fueron adicionadas con NaCl 0.5 M (Meyer, México). Los resultados se expresaron como porcentaje de germinación. La concentración de sal dio una actividad de agua (a_w) de 0.96, que se midió utilizando un dispositivo de actividad de agua AQUALAB CX-2 (Decagon Devices, Pullman, WA). Los resultados de la medición de a_w se presentan en el número 13.3 de la sección de anexos.

7.5.4.3 Resistencia al estrés térmico (G_T)

Las suspensiones utilizadas para la determinación de la germinación G (1×10^6 conidios / mL), se sometieron a 40°C durante 1 h en un termomezclador (Eppendorf, Alemania). Posteriormente, la germinación se evaluó como se describió anteriormente. Los resultados también se expresaron como porcentaje de germinación.

7.5.5 Experimento 5. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la infectividad de los conidios libres.

Para cada cepa se realizaron bioensayos 24 h después de haber iniciado el pulso oxidante, para evaluar el efecto a corto plazo y 96 h después de haber aplicado el primer pulso, para evaluar el efecto a largo plazo (acumulación de cuatro pulsos). Además, se realizaron de forma simultánea en ambas condiciones atmosféricas de estudio.

7.5.5.1 Bioensayo de infectividad

La infectividad de los conidios de ambas cepas de *Cordyceps* y de *B. bassiana*, obtenidos en las diferentes condiciones, se evaluó usando como insecto modelo larvas de *Galleria mellonella*; para el caso de *M. robertsii*, se empleó *Tenebrio molitor* como insecto modelo. Después de cosechar los conidios con 0.05% de Tween 80 (Amresco), 20 mL de las suspensiones de las diferentes condiciones de cultivo se estandarizaron a una concentración de 2×10^7 con/mL. Las larvas se sumergieron durante 5 s en estas suspensiones. Como control negativo se utilizó una solución de 0.05% de Tween 80 sin conidios. Las unidades experimentales (UE) fueron placas de Petri (90 × 15 mm) que contenían diez larvas de los insectos modelo (figura 7.2); se hicieron 3 repeticiones por tratamiento y 3 cajas con 10 larvas también para el control negativo.

Después de la inmersión en cada suspensión y en la solución de Tween 80, las UE se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ sin alimento para las larvas. El bioensayo duró 14-15 días, se hizo el registro diario de la mortalidad. Las larvas muertas fueron separadas de las unidades experimentales y se colocaron en cámaras húmedas para estimular la formación de conidios, además para corroborar que la muerte fue causada por el hongo (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).



Figura 7.2 Insectos modelo usados para bioensayos.

Los datos experimentales se ajustaron al modelo reportado por Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009:

$$Y = (100 - S) e^{-k(t-t_0)} + S$$

Donde Y es el porcentaje de supervivencia en el tiempo t (días), k es la tasa de mortalidad específica (día^{-1}), t_0 es el tiempo de la primera muerte (días) y S es la supervivencia final (%).

A partir de la ecuación, se determinó el tiempo en el que se logró la muerte del 50% de la población, TL_{50} .

7.6 Segunda parte: Acercamiento a la explicación del fenómeno.

7.6.1 Experimento 6. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre los niveles de glutatión en los conidios libres.

7.6.1.1 Evaluación de los niveles de glutatión total

Se tomaron muestras de los conidios para analizar a las 24 y 96 h después de que comenzaran los pulsos; las muestras de 24 h se expusieron a un sólo pulso y las de 96 h se sometieron a cuatro pulsos. Se tomaron cuatro botellas por especie de hongos de cada tratamiento experimental. Se agregaron 20 mL de solución salina tamponada con fosfato frío (pH 7.0, 100 mM) (PBS) a cada botella y se agitaron durante 10 minutos usando un agitador magnético. Las suspensiones resultantes de cada tratamiento se utilizaron para determinar los

niveles de glutatión en los conidios utilizando un kit de ensayo de glutatión (Sigma Aldrich®). Previamente, los conidios se sometieron a lisis mecánica como se describe a continuación.

7.6.1.1.1 Lisis de conidios

Se hizo la ruptura de los conidios mediante lisis mecánica como describen Nandakumar y Marten (2002), con algunas modificaciones. Primero, se pipeteó 1 mL de las suspensiones madre de conidios con PBS en tubos Eppendorf de 1.5 mL previamente pesados. Los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes se eliminaron, los tubos más los conidios se pesaron, y se calculó el peso de los conidios en cada tubo. Estos valores se utilizaron para calcular la concentración final de glutatión en las muestras ($\mu\text{M/g}$). A continuación, se añadieron a cada tubo 100 μL de solución de ácido 5-sulfosalicílico al 5% y los sedimentos se resuspendieron mediante agitación con vórtex. Las suspensiones resultantes se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL que contenían 50 mg de perlas de vidrio. Las mezclas se agitaron en un Mini-BeadBeater (BioSpec, EE. UU.) a velocidad máxima, durante 20 minutos (ciclos repetidos de 30 s, seguidos de 30 s de enfriamiento en hielo). Una vez que se completaron los ciclos de ruptura, se completaron las determinaciones correspondientes de acuerdo con las instrucciones del fabricante, provistas con el kit, como se menciona a continuación.

7.6.1.1.2 Kit de ensayo del glutatión

El kit permite medir el nivel de glutatión total en las muestras. La medición se basa en un ensayo cinético en el que el glutatión reducido (GSH) cataliza una reducción continua de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) a ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). El glutatión disulfuro (GSSG) formado se recicla mediante la enzima glutatión reductasa en presencia de NADPH. El GSSG basal presente también reaccionará para dar un valor positivo en esta reacción. El producto amarillo, ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) se cuantificó espectrofotométricamente a 412 nm.

7.6.1.2 Evaluación del nivel de glutatión oxidado y reducido

Los conidios provenientes de cada condición y de cada cepa de estudio fueron sometidos a una lisis mecánica como se describe a continuación, previo a las determinaciones de glutatión.

7.6.1.2.1 Lisis de los conidios

Se probaron dos métodos diferentes para la ruptura de los conidios:

- a) Se realizó mediante lisis mecánica con el método descrito anteriormente (Nandakumar y Marten, 2002) con algunas modificaciones. En lugar de adicionar la solución de ácido 5-sulfosalicílico al 5%, se añadieron 200 μ l de ácido metafosfórico al 5% (J.T. Baker) y 800 μ l de Buffer PBS frío en los tubos con los paquetes celulares y se homogeneizaron en vórtex. Los homogeneizados se transfirieron a tubos Eppendorf de 2 mL que contenían 100 mg de perlas de vidrio. Las mezclas se agitaron en el disruptor celular (Mini-BeadBeater) a velocidad máxima, durante 20 minutos (ciclos repetidos de 30 segundos, seguidos por 30 segundos de enfriamiento en hielo). Después de completar los ciclos de ruptura, las determinaciones correspondientes se completaron como se indica a continuación.
- b) 0.5 mL de conidios de cada cepa y condición de estudio se congelan con N₂ líquido y se trituran en un mortero hasta obtener un polvo fino; el cual se mezcló con 1 mL de PBS y se continuó el procedimiento como se describe a continuación

7.6.1.3 Medición de glutatión reducido y oxidado

Las muestras fueron centrifugadas a 12,500 rpm por 10 min a 4°C, y 500 μ l del sobrenadante se mezclaron con 500 μ l de cloroformo, mezclando por inversión. La mezcla se centrifugó 5 min a 12,500 rpm a 4°C, se filtró el sobrenadante en membrana (0.22 μ m) y 100 μ l de éste se tomaron para analizar en HPLC. El análisis de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) se realizó empleando una columna Synergi 4 mm Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm) de Phenomenex Inc, empleando una fase móvil con una relación 1:99 de acetonitrilo: KH₂PO₄, este

último a una concentración de 20 mM y pH 2.7. Tanto GSH y GSSG se analizaron a 210 nm con un detector de Arreglo de Diodos (Waters 996) (Water Corporation, Milford, MA, USA). Los estándares GSH (C₁₀H₁₇N₃O₆S) y GSSG (C₂₀H₃₂N₆O₁₂S₂) se obtuvieron de Sigma Aldrich®.

7.7 Análisis estadístico

Se utilizó una prueba t de Student ($\alpha = 0.05$) para comparar los datos de las medias en las pruebas de calidad de los conidios y las medidas de la evaluación de los niveles de glutatión. El programa estadístico utilizado fue la herramienta de análisis de datos de Excel (2010). Para nuestro objetivo, la prueba t fue considerada aplicable (Zivin y Bartko, 1976), ya que para ver el efecto de los pulsos, sólo se compararon las medias de las dos condiciones atmosféricas estudiadas, en cada tiempo de muestreo y para cada cepa (21 vs 26% o 30% de O₂).

8. RESULTADOS

8.1 Primera parte: Corroboración del efecto positivo en la calidad al aplicar pulsos oxidantes directamente sobre los conidios.

8.1.1 Experimento 1. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes sobre los conidios en medio de cultivo (cultivos con alta abundancia de conidios o con estado de conidiación avanzada).

En esta sección de resultados, por una parte se presentan aquellos correspondientes a la determinación de los máximos estados de conidiación o producción de conidios máxima (Con_{max}), representados a través del Índice de conidiación (*I_c*) en los sistemas de cultivo bajo condiciones atmosféricas normales (21% de O₂); se muestra que los pulsos oxidantes se iniciaron en ese punto (Con_{max}) o al menos 24 h antes y que el valor de *I_c* fue mayor a 100 (como fue establecido en la sección de materiales y métodos). Por otra parte, se muestran tanto los efectos que tuvieron los pulsos sobre el estado de conidiación de los cultivos, así como los efectos sobre la calidad de los conidios mediante la determinación de características de calidad: viabilidad (V), resistencia al estrés osmótico (V_O) y termotolerancia (V_T).

NOTA 1. Se midió la producción de conidios (con/cm²) en los tiempos determinados de cada ensayo y los datos se transformaron a *Ic* mediante la ecuación correspondiente. En la sección de anexos (tablas 13.2 a 13.6), se presentan los valores de producción de conidios y su conversión a *Ic*.

A. Determinación de la producción máxima de conidios y estudio del efecto de los pulsos oxidantes sobre la producción de conidios.

En el caso de *M. robertsii* Xoch8.1 (figura 8.1), bajo las condiciones atmosféricas normales (21% de O₂), la Con_{max} se presentó entre las 144 y las 216 h de cultivo. El pulso que se aplicó a las 120 h de cultivo, correspondió con las 24 h anteriores a la Con_{max} y a un *Ic* de 131.7 (*Ic* > 100). En cuanto al efecto de los pulsos oxidantes (30% de O₂) sobre la producción de conidios o conidiación, se observó que cuando el pulso se inició a las 120 h, en la evaluación a corto plazo (24 h horas después de aplicar un sólo pulso (144 h)) se tuvo un efecto negativo, pues el control tuvo un *Ic* de 276.2 y con el pulso decreció a 93.7. En la evaluación de la respuesta de los conidios a largo plazo, es decir, en donde se acumularon cuatro pulsos (un pulso por día durante cuatro días = 96 h), al momento de la evaluación (120 + 96= 216 h de cultivo) no se encontró diferencia estadística significativa (*P* > 0.05) en el estado de conidiación. De manera diferente, cuando el pulso se inició a las 144 h, los resultados de la respuesta a corto plazo (168 h) no muestran diferencia estadística significativa (*P* > 0.05) en la conidiación con respecto al control, mientras que en la evaluación de la respuesta a largo plazo (240 h), se encontró que el tratamiento favoreció la conidiación, ya que con los pulsos el *Ic* fue de 165.1 y el *Ic* del control fue de 79.4.

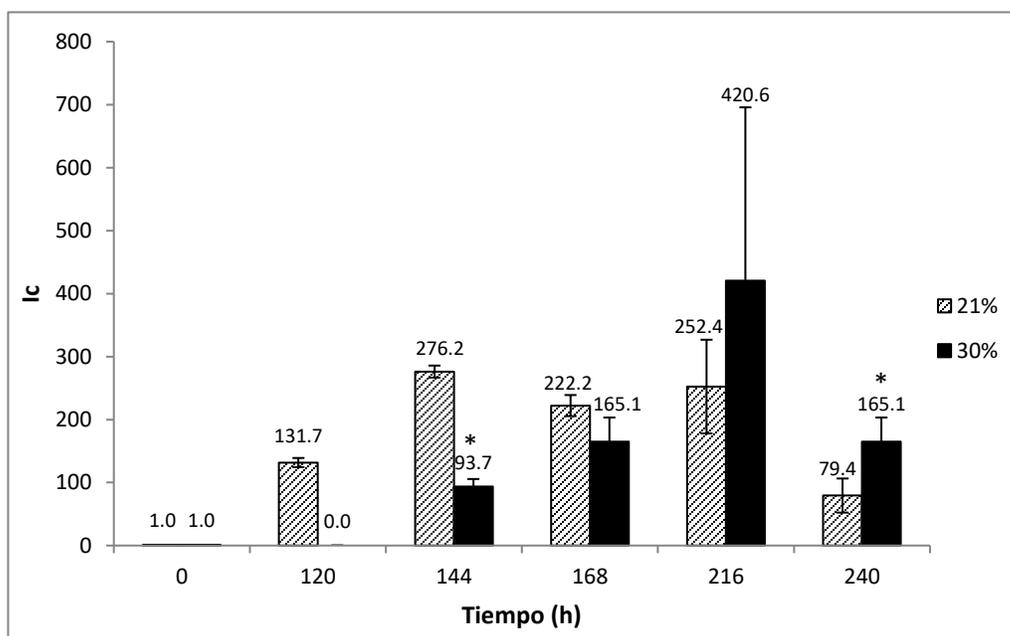


Figura 8.1 Estado de conidiación (I_c) del cultivo de *Metarhizium robertsii* Xoch8.1 bajo condiciones atmosféricas normales (21% de O₂) y bajo las condiciones oxidantes (pulsos con 30% de O₂). *Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

En cuanto a *B. bassiana* Tac1.1, en un primer ensayo se monitoreó la conidiación y se aplicaron los pulsos iniciales a las 120 y 144 h, como se realizó con *M. robertsii*. En la figura 8.2A se muestra que en este tiempo de monitoreo de la producción de conidios o conidiación, no se pudo encontrar la Con_{max} , por lo que se hizo un nuevo ensayo (figura 8.2B) en el que se aumentó el tiempo de monitoreo de la conidiación y se eligieron dos nuevos tiempos para iniciar los pulsos oxidantes (240 y 312 h). En cuanto al efecto de los pulsos oxidantes (26% de O₂), la figura 8.2A muestra que cuando el pulso se inició a las 120 h, en la evaluación a corto plazo (144 h) se afectó la conidiación (el I_c decreció de 552 a 280); por el contrario, en la evaluación de la respuesta largo plazo (216 h), no se encontró diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) en el estado de conidiación. También se observó que cuando los pulsos oxidantes se iniciaron a las 144 h, tanto en la respuesta a corto plazo (168 h) como en la respuesta a largo plazo (240 h), se afectó la conidiación. Además, bajo las condiciones atmosféricas normales (21%) ya fue posible observar la

Con_{max} (se presentó entre las 264 y las 336 h de cultivo), que uno de los pulsos oxidantes se inició justo 24 h antes (240 h) y que el *Ic* fue de 280 (*Ic* > 100) (Figura 8.2 B). Cuando los pulsos iniciaron a las 240 y 312 h de cultivo, tanto en la respuesta a corto plazo (264 y 336 h) como en la de largo plazo (336 y 408 h), no se encontraron diferencias estadísticas significativas (*P* > 0.05) en el estado de conidiación.

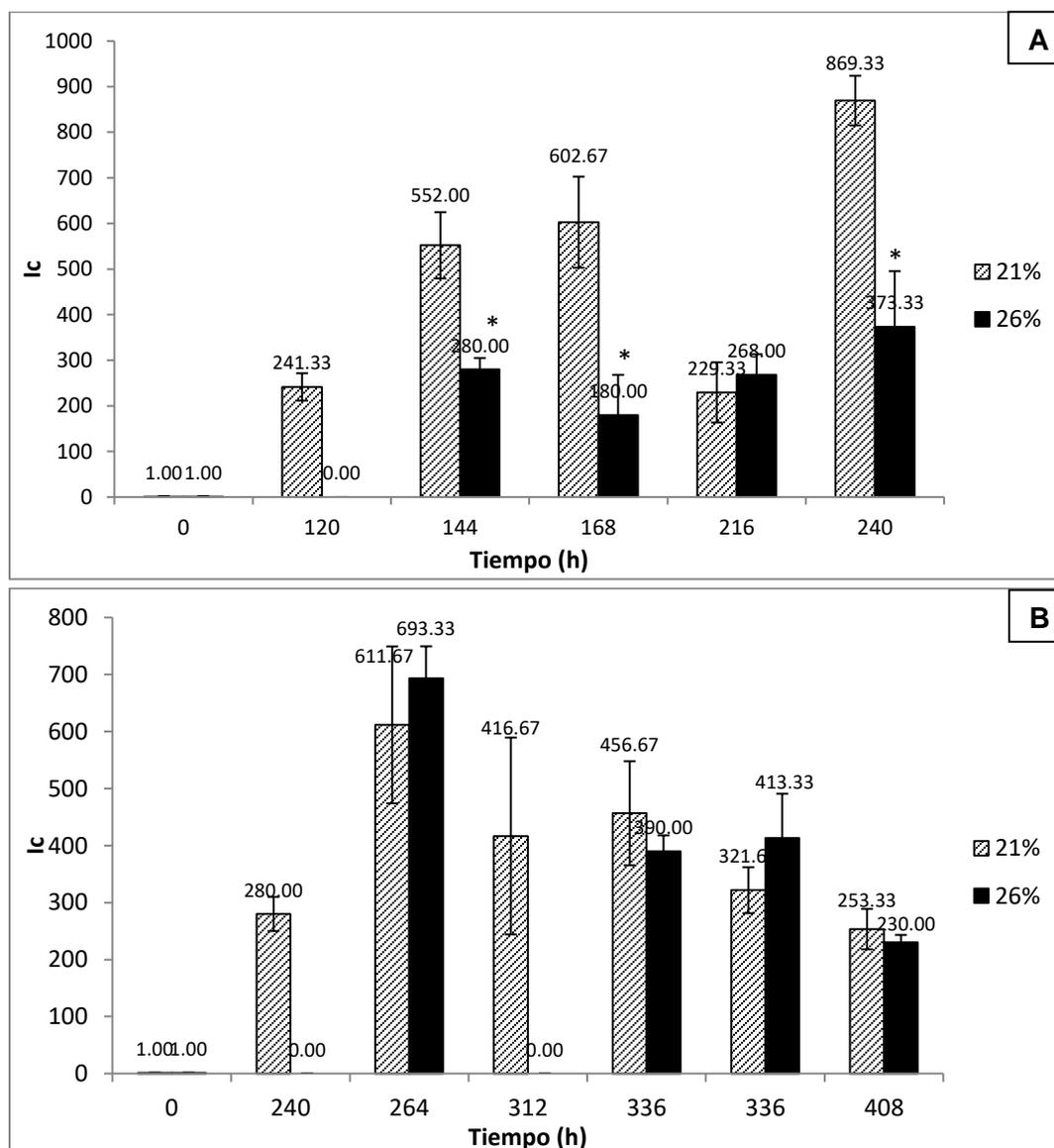


Figura 8.2 Estado de conidiación (*Ic*) del cultivo de *Beauveria bassiana* Tac1.1 bajo condiciones atmosféricas normales (21% de O₂) y bajo las condiciones oxidantes (pulsos con 26% de O₂). A: Primer ensayo. Monitoreo de conidiación de 120 a 240 h. B: Segundo ensayo. Monitoreo de conidiación de 240 a 408 h. *Diferencia estadística significativa (*P* < 0.05).

NOTA 2. Tomando en cuenta que con *B. bassiana* se tuvo que aumentar el tiempo de monitoreo para encontrar Con_{max} , para el caso de ambas cepas de *Cordyceps* se decidió aumentar el tiempo de monitoreo de la conidiación y también modificar los tiempos de aplicación de los pulsos iniciales. Es decir, las 120 y 144 h de cultivo para iniciar los pulsos fueron intercambiadas por 144 y 240 h de cultivo.

En el caso de *C. javanica* CHE-CNRCB303 (figura 8.3) bajo las condiciones atmosféricas normales (21% O_2), la Con_{max} se presentó a las 168 h de cultivo; además, uno de los pulsos oxidantes (26% O_2) se inició justo 24 h antes de este punto (144 h de cultivo), cuando el Ic fue de 319.4 ($Ic > 100$). Por otra parte, se observó que los pulsos oxidantes no afectaron la conidiación, pues cuando se inició el pulso a las 144 h, en la evaluación a corto plazo (168 h), no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en el estado de conidiación de ambas condiciones atmosféricas de estudio (21% vs 26% de O_2), el mismo resultado se observó en la evaluación al largo plazo (240 h). Por otro lado, cuando se inició el pulso a las 240 h, tanto en la evaluación a corto plazo (264 h), como en la evaluación a largo plazo (336 h), tampoco se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$).

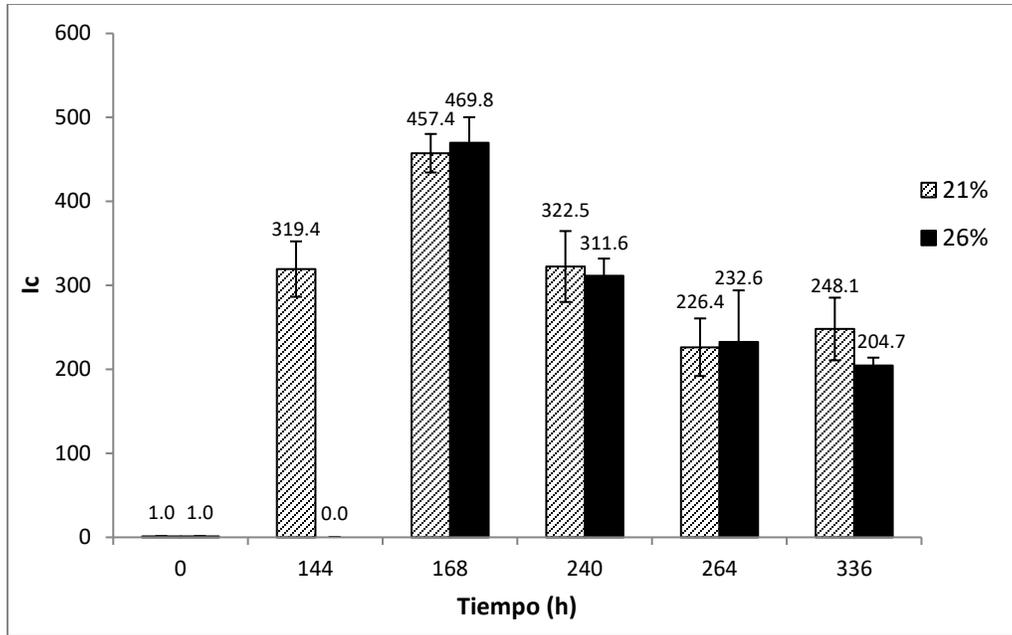


Figura 8.3 Estado de conidiación (I_c) del cultivo de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 bajo condiciones atmosféricas normales (21% de O_2) y bajo las condiciones oxidantes (pulsos con 26% de O_2). *Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

En cuanto a *C. fumosorosea* ARSEF3302 (figura 8.4) se observó que la Con_{max} fue a las 240 h de cultivo, que uno de los pulsos oxidantes se aplicó justo en ese mismo tiempo, cuando el I_c fue de 188.9 ($I_c > 100$). En cuanto al efecto de los pulsos oxidantes (26% O_2), no importando cuando se iniciara el pulso oxidante (144 o 240 h de cultivo), el tratamiento afectó negativamente a la conidiación en las evaluaciones a corto plazo (168 y 264 h), sin diferencias significativas ($P > 0.05$) en el estado de conidiación en las evaluaciones a largo plazo (240 y 336 h).

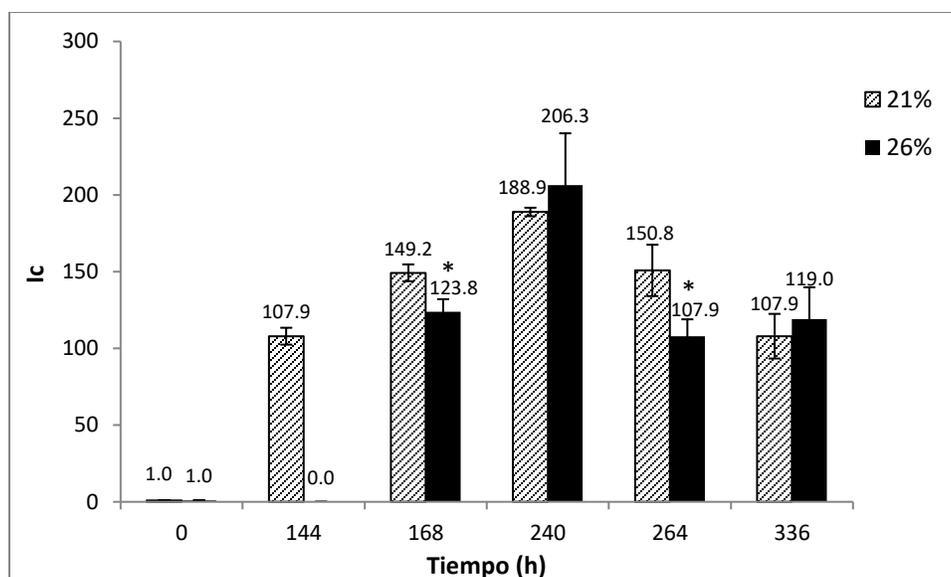


Figura 8.4. Estado de conidiación (I_c) del cultivo de *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302 bajo condiciones atmosféricas normales (21% de O_2) y bajo las condiciones oxidantes (pulsos con 26% de O_2). *Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

B. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes sobre las características de calidad de los conidios.

En todos los casos, los pulsos oxidantes se aplicaron cuando los I_c fueron mayores de 100 y fue sobre estos mismos sistemas de cultivo en donde se realizaron los estudios de calidad, cuyos resultados se presentan a continuación. En las figuras 8.5 a 8.8 se observa el efecto que tuvieron los pulsos oxidantes sobre las características de calidad (V , V_o y V_T), por un lado, en la respuesta a las 24 h posteriores de haber aplicado un sólo pulso (respuesta a corto plazo) y por otro lado, a las 24 h posteriores de haber aplicado cuatro pulsos (un pulso por día), es decir, 96 h posteriores de haber iniciado el primer pulso (respuesta a largo plazo).

En la figura 8.5 se muestra que en el caso de *M. robertsii* Xoch8.1, el pulso oxidante (30% de O_2) en la respuesta a corto plazo (144 h) no tuvo efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la viabilidad (V). Sin embargo, sí se mejoró la resistencia al estrés osmótico (V_o), pues de un 51.3% de viabilidad que tuvo el control en el medio con NaCl 0.5 M, con el tratamiento incrementó a 72.4%. La termotolerancia (V_T) también se mejoró, ya que después de someter los conidios provenientes

de ambas condiciones atmosféricas a 40°C durante 1 h, la viabilidad del control (21% de O₂) fue de 63.0%, mientras que la viabilidad de los conidios sometidos al tratamiento oxidante (30% de O₂) fue de 77.3%. De forma diferente, en la evaluación a largo plazo (216 h), se observó que el tratamiento no afectó significativamente la viabilidad (V) ni la resistencia al estrés osmótico (V_O) (P > 0.05). Sin embargo, en la termotolerancia (V_T) se observó un efecto negativo, pues de una viabilidad de 99.9% que presentó el control, con el tratamiento oxidante fue de sólo 68.3%.

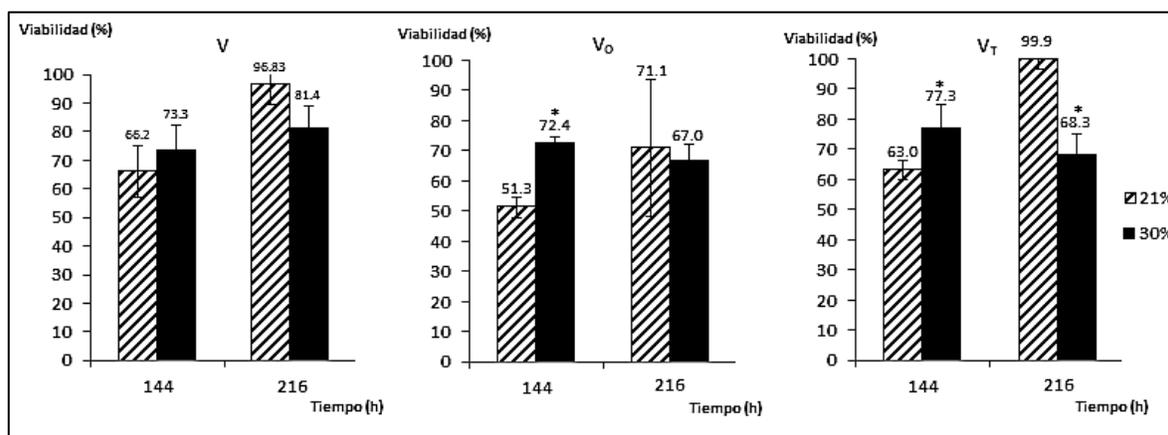


Figura 8.5 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios de *Metarhizium robertsii* Xoch8.1. El inicio de los pulsos fue a las 120 h. La respuesta a corto plazo corresponde a las 144 h y la respuesta a largo plazo corresponde a las 216 h. V= Viabilidad, V_O= Resistencia a estrés osmótico, V_T= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 30%= Pulso oxidante (30% de O₂) *Diferencia estadística significativa (P < 0.05).

En la figura 8.6, a diferencia de lo que se pudo observar con *M. robertsii* Xoch8.1, con *B. bassiana* Tac1.1 se encontró que cuando se aplicaron los pulsos oxidantes hay una tendencia a mejorar las características de calidad, ya que tanto en las evaluaciones a corto plazo (264 h), como en las de largo plazo (336 h), se mejoraron cada una de las características de calidad medidas (V, V_O y V_T).

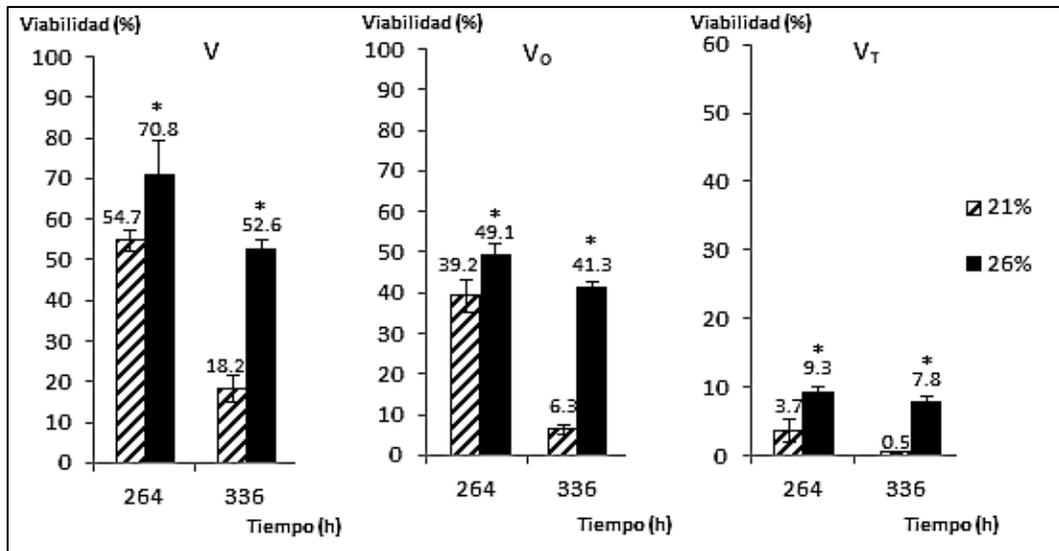


Figura 8.6 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios de *Beauveria bassiana* Tac1.1. El inicio de los pulsos fue a las 240 h. La respuesta a corto plazo corresponde a las 264 h y la respuesta a largo plazo corresponde a las 336 h. V= Viabilidad, Vo= Resistencia a estrés osmótico, Vt= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 26%= Pulso oxidante (26% de O₂) *Diferencia estadística significativa (P <0.05).

En el caso de ambas cepas de *Cordyceps* se logró observar una tendencia al mejoramiento de las características de calidad de los conidios debido a la aplicación de los pulsos oxidantes o por lo menos, el tratamiento no afectó la calidad. Como se observa en la figura 8.7, en el caso de *C. javanica* CHE-CNRCB303, tanto en la evaluación a corto plazo como en la evaluación a largo plazo (168 y 240 h, respectivamente), hubo un incremento en la termotolerancia (V_T). Además, con un sólo pulso se mejoró la viabilidad (V), ya que fue de 62.4% para el control (21% de O₂) y de 86.1% para el caso del tratamiento oxidante (26% de O₂); en contraste, en la evaluación a largo plazo, la viabilidad (V) no se afectó. En el caso de la resistencia al estrés osmótico (Vo), en la respuesta a corto plazo (168 h) no hubo diferencia estadística significativa (P > 0.05) entre ambas condiciones atmosféricas (21% vs 26% de O₂). Sin embargo, en la evaluación a largo plazo se mejoró esta característica de calidad, pues mientras que el control tuvo un 38.7% de viabilidad, con el tratamiento se tuvo 52.8%.

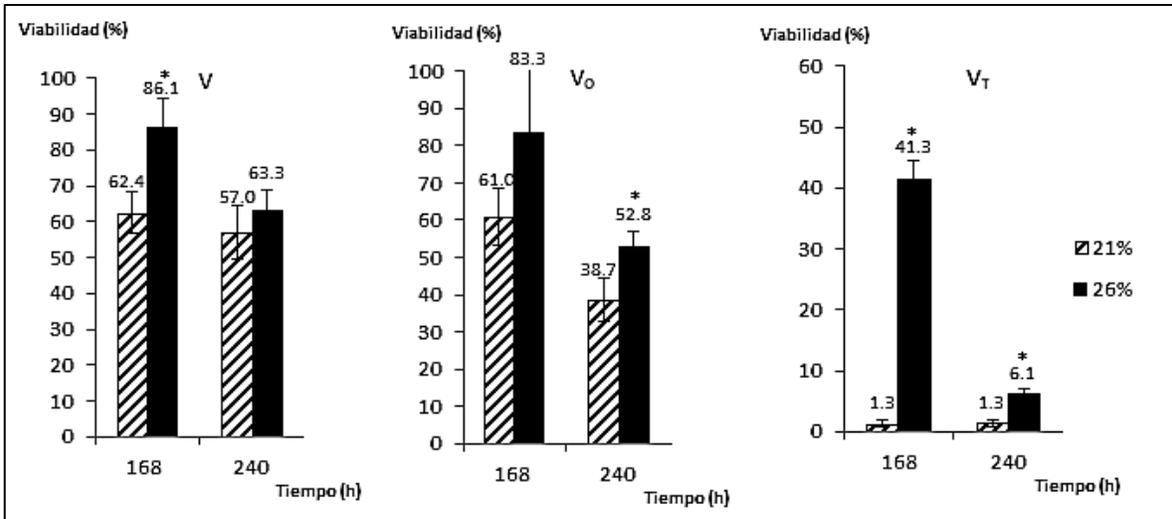


Figura 8.7 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303. El inicio de los pulsos fue a las 144 h. La respuesta a corto plazo corresponde a las 168 h y la respuesta a largo plazo corresponde a las 240 h. V= Viabilidad, V_o= Resistencia a estrés osmótico, V_t= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 26%= Pulso oxidante (26% de O₂) *Diferencia estadística significativa (P <0.05).

En la figura 8.8 se observa que en el caso de *C. fumosorosea* ARSEF3302, con la excepción de que en la evaluación a largo plazo (336 h) de la termotolerancia (V_t) no hubo diferencia estadística significativa (P > 0.05) entre el control y el tratamiento, en el resto de las evaluaciones las características de calidad mostraron una mejoría.

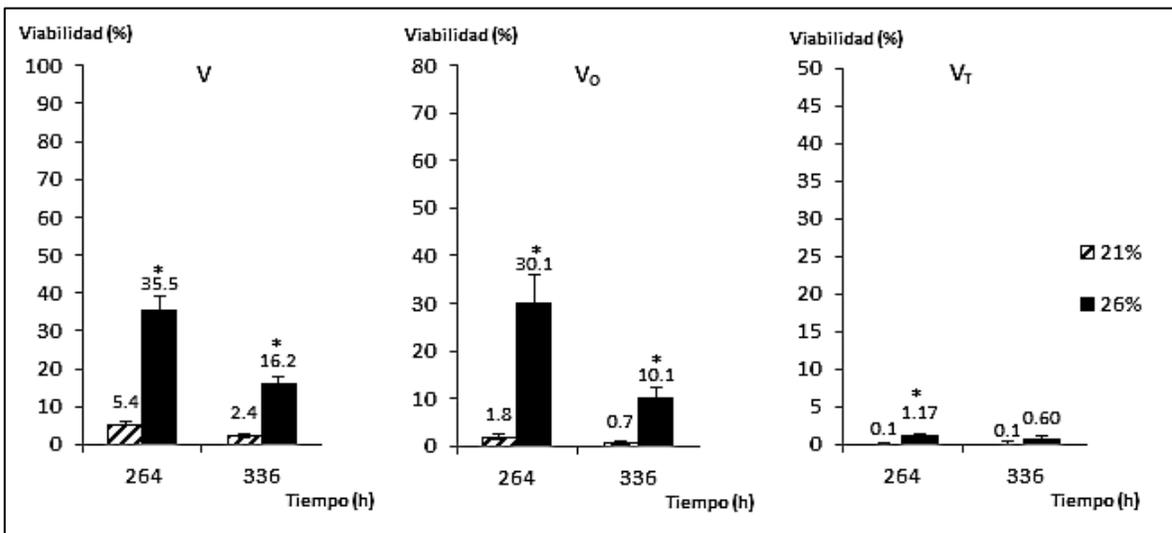


Figura 8.8 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios de *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302. El inicio de los pulsos fue a las 240 h. La respuesta a corto plazo corresponde a las 264 h y la

respuesta a largo plazo corresponde a las 336 h. V= Viabilidad, V_o = Resistencia a estrés osmótico, V_T = Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O_2), 26%= Pulso oxidante (26% de O_2) *Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

8.1.2 Experimento 2. Evaluación del efecto de los pulsos sobre los conidios libres.

Con la finalidad de determinar si los efectos positivos sobre las características de calidad de los conidios observados en el experimento 1 eran reproducibles al aplicar directamente los pulsos sobre conidios cosechados del medio de cultivo (conidios libres), se realizó este nuevo experimento y los resultados se presentan a continuación.

En la figura 8.9, se presentan los resultados de la evaluación de la calidad de los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1 provenientes de la propagación en el medio de harina de avena (APA). Se observó que en la respuesta a corto plazo (24 h), se mejoraron las tres características de calidad evaluadas (V, V_o y V_T) en los conidios sometidos a la atmósfera oxidante (30% de O_2), en comparación con los conidios control (21% de O_2). En la evaluación a largo plazo no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) entre la calidad de los conidios obtenidos en ambas atmósferas (21% vs 30% de O_2).

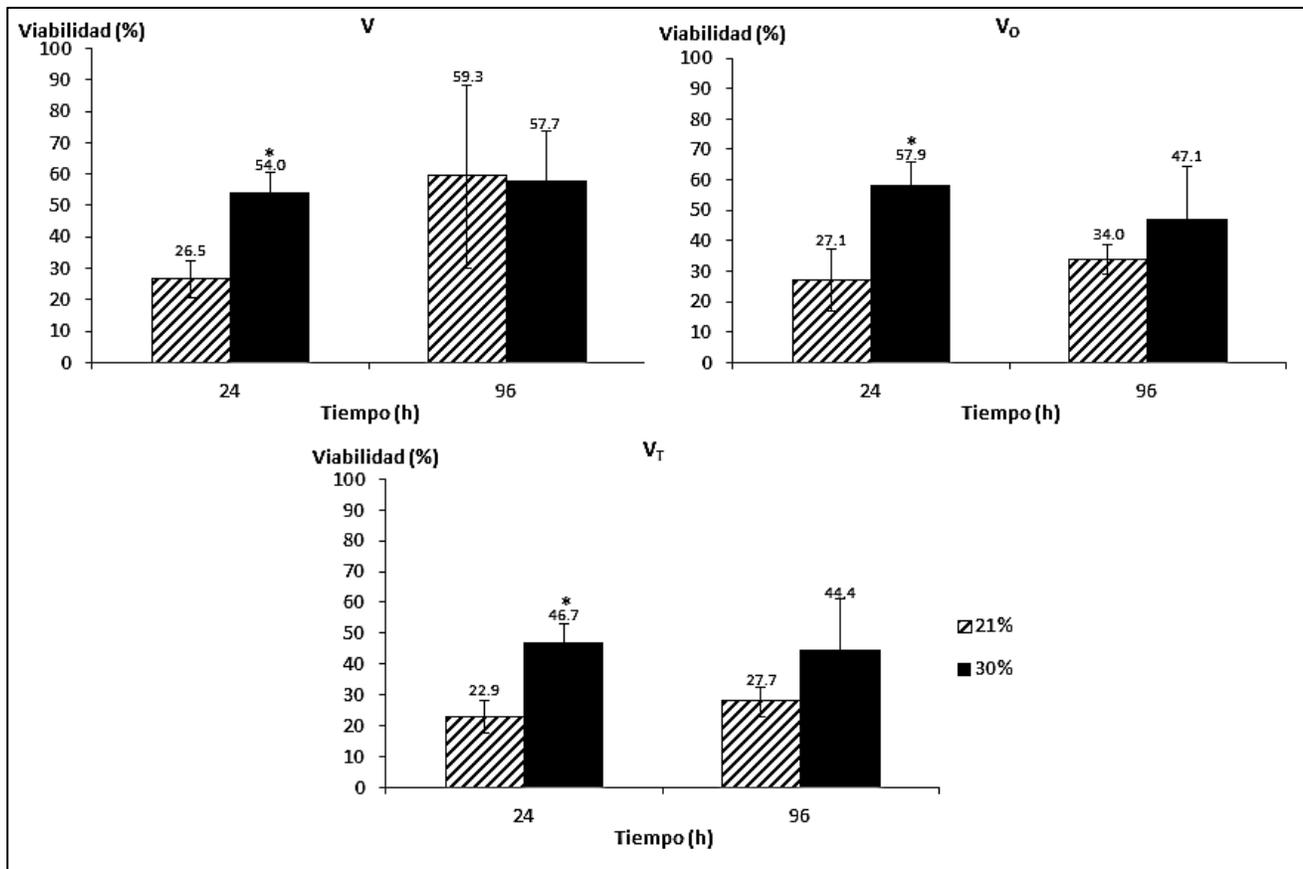


Figura 8.9 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios libres de *Metarhizium robertsii* Xoch8.1 generados en medio APA. La respuesta a corto plazo corresponde a las 24 h y la respuesta a largo plazo corresponde a las 96 h. V= Viabilidad, Vo= Resistencia a estrés osmótico, Vt= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 30%= Pulso oxidante (30% de O₂) *Diferencia estadística significativa (P < 0.05).

En la figura 8.10 se muestra que para *Beauveria bassiana* Tac1.1, el tratamiento (26% de O₂) no afectó ninguna de las características de calidad evaluadas (V, Vo y Vt). Por el contrario, se incrementó la termotolerancia (Vt) al aplicar un sólo pulso oxidante, pues de una viabilidad del 18% que presentó el control, se incrementó a 48.4%.

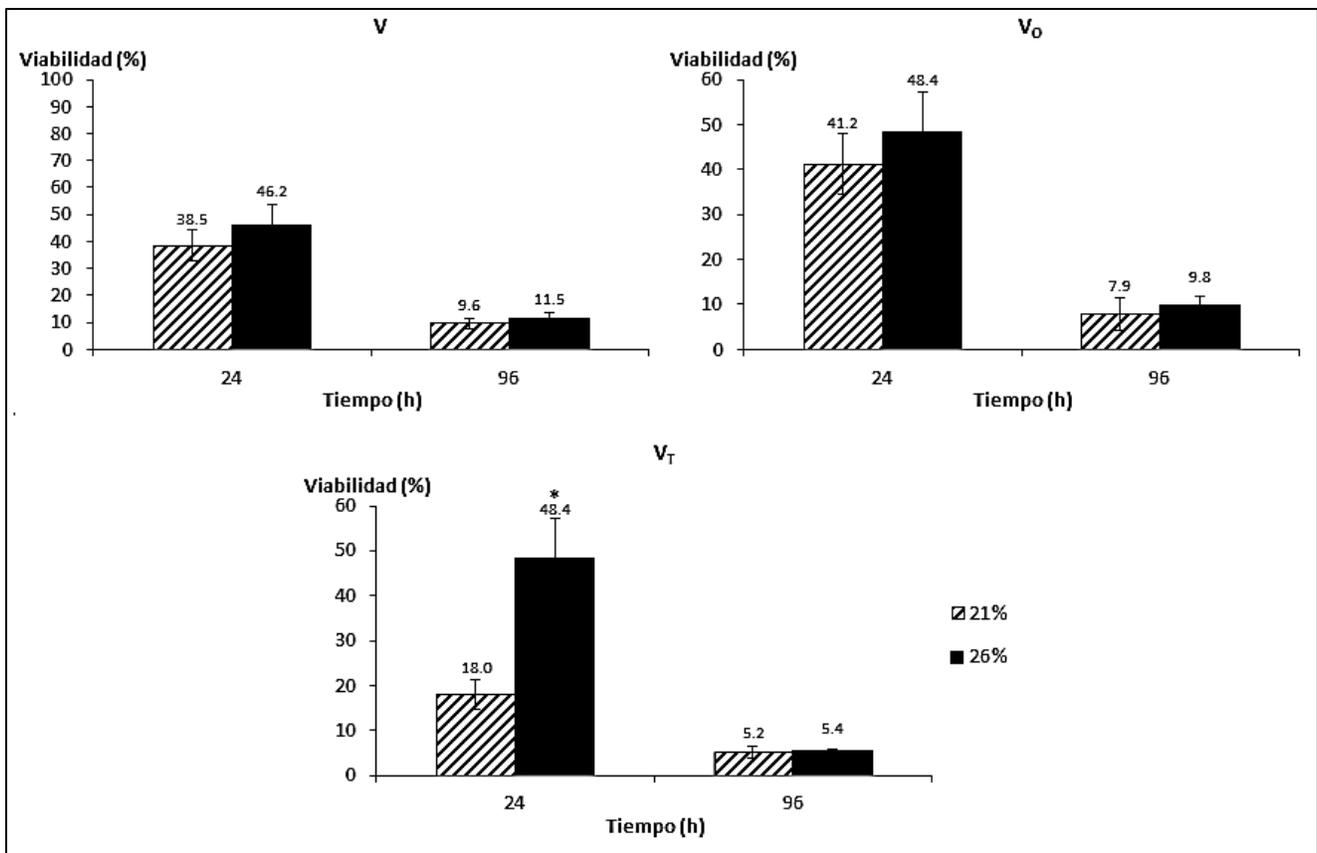


Figura 8.10 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios libres de *Beauveria bassiana* Tac1.1 generados en medio APA. La respuesta a corto plazo corresponde a las 24 h y la respuesta a largo plazo corresponde a las 96 h. V= Viabilidad, Vo= Resistencia a estrés osmótico, VT= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 26%= Pulso oxidante (26% de O₂) *Diferencia estadística significativa (P < 0.05).

En el caso de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 en la figura 8.11, ni en la respuesta a corto plazo (24 h), ni en la respuesta largo plazo (96 h), el tratamiento oxidante (26% de O₂) afectó significativamente la resistencia al estrés osmótico (Vo), entre el control y el tratamiento (21% vs 26% de O₂). En la misma forma, en la evaluación a largo plazo de la viabilidad (V), tampoco hubo afectación por el tratamiento. Sin embargo, la respuesta a corto plazo de esta característica de calidad sí se afectó, pues de aproximadamente el 100% de viabilidad que tuvo el control, la viabilidad (V) decreció a 83.5% con un pulso oxidante. Por otra parte, el tratamiento oxidante

también afectó a la termotolerancia (V_T) de los conidios, pues tanto en la respuesta a corto plazo, como en la respuesta a largo plazo, los valores de viabilidad disminuyeron.

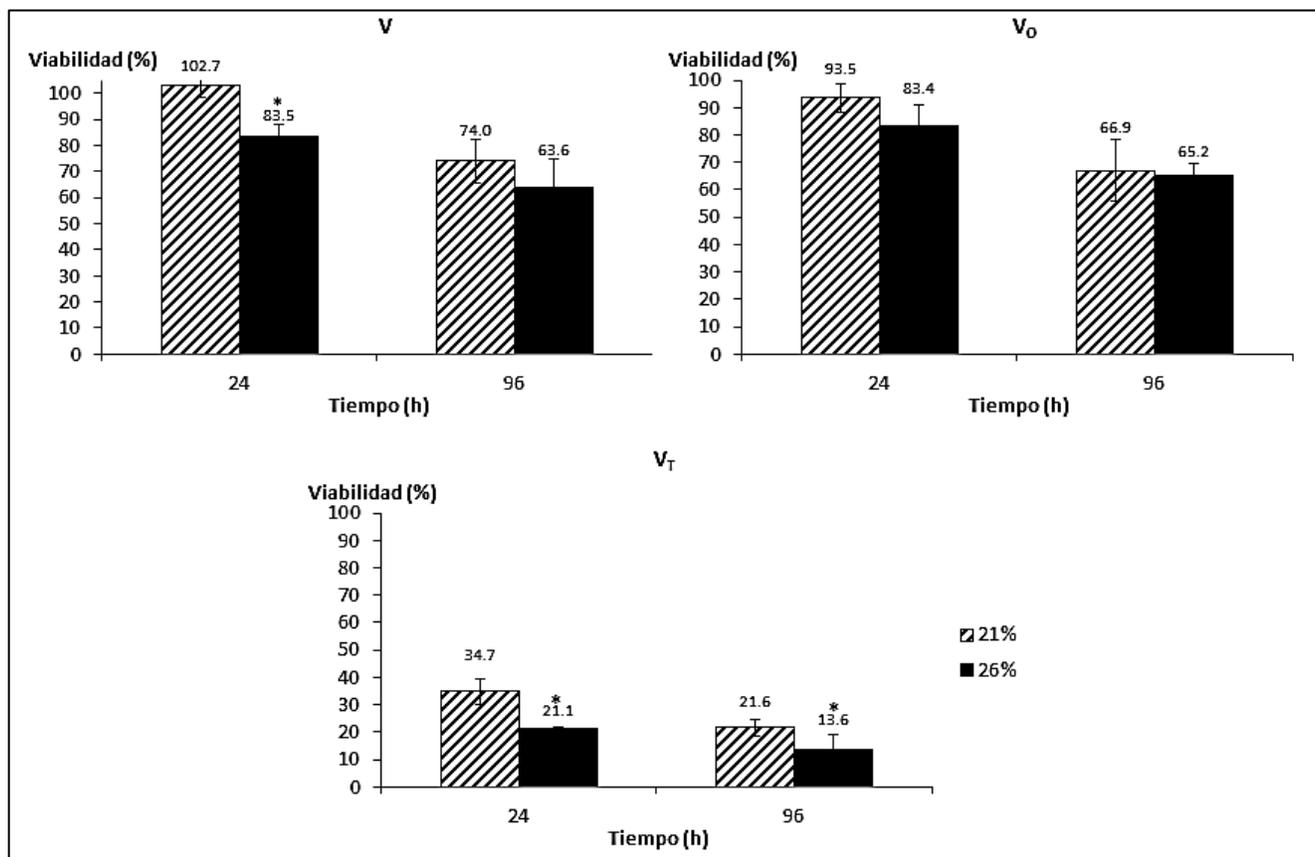


Figura 8.11. Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios libres de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 generados en medio APA. La respuesta a corto plazo corresponde a las 24 h y la respuesta a largo plazo corresponde a las 96 h. V= Viabilidad, V_o= Resistencia a estrés osmótico, V_T= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 26%= Pulso oxidante (26% de O₂) *Diferencia estadística significativa (P <0.05).

En la figura 8.12 se observó que para *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302, el tratamiento oxidante (26% de O₂) en la respuesta a corto plazo (24 h) incrementó la viabilidad (V), pasando de un 11.9% a 21.35%. Este efecto positivo debido al tratamiento oxidante también se observó en la resistencia a estrés osmótico, ya que de un 9.6% de viabilidad que presentó el control, incrementó a 15.1% con un pulso. Aunque la termotolerancia (V_T) no mostró diferencia significativa (P > 0.05) entre ambas condiciones atmosféricas (21% vs 26% de O₂). De similar manera, en la respuesta a

largo plazo (96 h), no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) en ninguna de las pruebas de calidad realizadas. Sin embargo, en este ensayo, la viabilidad (V) del control fue muy baja (11.9%), lo que sugiere que la cepa no se encontraba en condiciones óptimas.

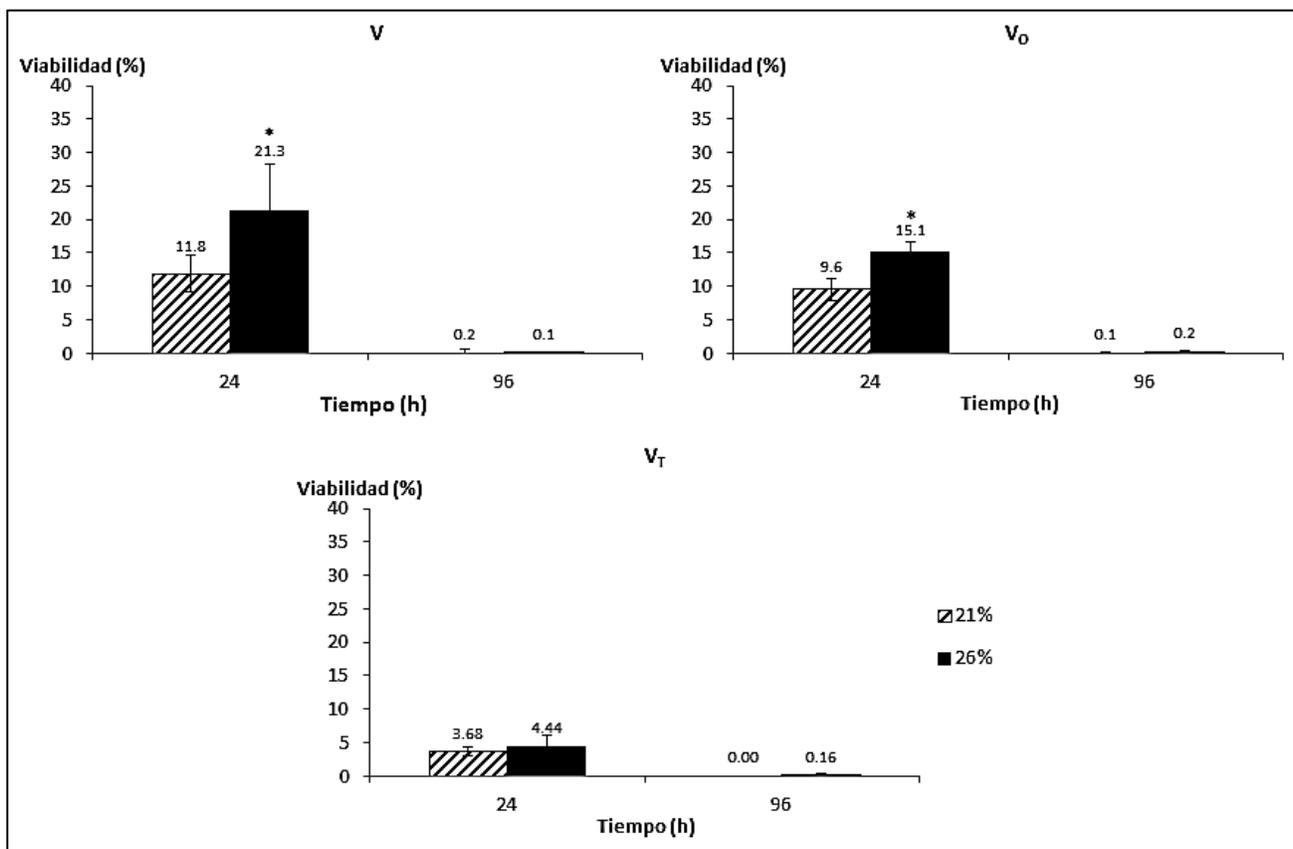


Figura 8.12 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios libres de *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302 generados en medio APA. La respuesta a corto plazo corresponde a las 24 h y la respuesta a largo plazo corresponde a las 96 h. V= Viabilidad, V₀= Resistencia a estrés osmótico, V_T= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 26%= Pulso oxidante (26% de O₂) *Diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

8.1.3 Experimento 3. Evaluación simultánea del efecto de los pulsos oxidantes en la calidad de los conidios libres y en la calidad de los conidios en medio de cultivo.

Este experimento se realizó para medir en cuál de los sistemas estudiados en los experimentos 1 y 2, el incremento de las características de calidad es más notorio en los conidios.

NOTA 3. Este experimento se realizó únicamente con *M. robertsii* Xoch8.1, ya que se realizó de manera simultánea con otro experimento que se basó en aplicar pulsos con 26% de O₂ como tratamiento oxidante, en lugar de los pulsos con 30% de O₂. De tener resultados, al menos similares entre ambos tratamientos oxidantes (26% vs. 30%), se simplificaría la metodología al utilizar sólo pulsos de 26% para todas las cepas, ya que se podría utilizar un mismo tanque de gas para la aplicación del tratamiento.

En la figura 8.13, se presenta el índice de conidiación (*Ic*) que se tuvo en *M. robertsii* Xoch8.1 al momento de hacer las evaluaciones de calidad. En todos los casos se presentó un estado de conidiación alto (*Ic* mayor de 100).

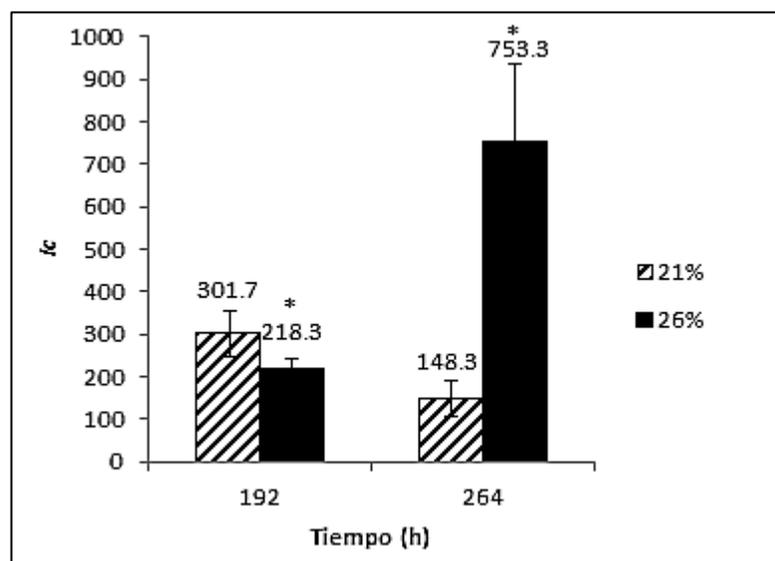


Figura 8.13 Estado de conidiación (*Ic*) del cultivo de *Metarhizium robertsii* Xoch8.1 bajo condiciones atmosféricas normales (21% de O₂) y bajo las condiciones oxidantes (pulsos con 26% de O₂). Inicio de pulso 168 h, evaluación a corto plazo (192 h), evaluación a largo plazo (264 h). *Diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

A continuación se muestran los resultados obtenidos en la medición de las características de calidad (figura 8.14) en ambos sistemas: Conidios en el medio de cultivo APA vs Conidios libres. Se observó que los controles (21% de O₂) presentaron una viabilidad (V) alrededor del 60%. Además, en ambos sistemas hubo incrementos en la calidad debido al tratamiento (26% de O₂). Por una parte, en el caso de los conidios aún adheridos al micelio en el medio de cultivo, el incremento se presentó únicamente en la respuesta a corto plazo (24 h), en las tres características de calidad evaluadas (V, V_O y V_T), en relación a las respuestas obtenidas con sus respectivos controles (21% de O₂). Por el contrario, en las evaluaciones de la respuesta de calidad a largo plazo no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$). Por otra parte, en los conidios libres, el efecto positivo sobre la calidad se observó en la resistencia al estrés osmótico (V_O) y en la termotolerancia (V_T); en este caso, tanto en la respuesta a corto plazo (24 h), como en la respuesta a largo plazo (96 h). Además, en ningún caso se afectó la viabilidad (V) de forma significativa con el tratamiento, al comparar los resultados de los tratamientos contra los controles (21% de O₂).

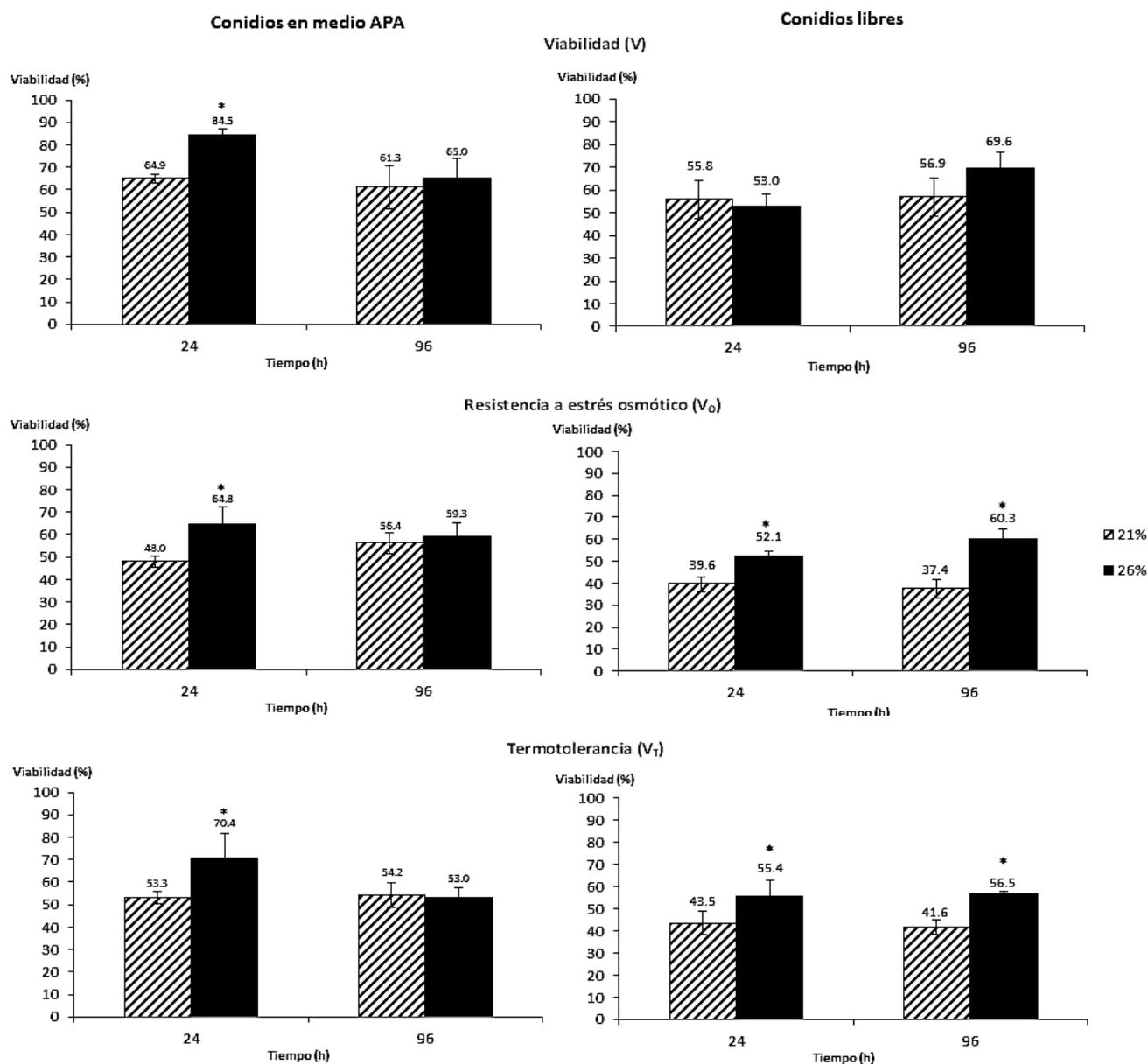


Figura 8.14 Efecto de los pulsos oxidantes sobre la calidad de los conidios de *Metarhizium robertsii* Koch8.1 en medio APA vs conidios libres. La respuesta a corto plazo corresponde a las 24 h (equivalente a 192 h en el medio APA) y la respuesta a largo plazo corresponde a las 96 h (equivalente a 264 h en el medio APA). V= Viabilidad, V₀= Resistencia a estrés osmótico, V_T= Termotolerancia. 21%= Atmósfera control (21% de O₂), 26%= Pulso oxidante (26% de O₂) *Diferencia estadísticamente significativa (P < 0.05).

NOTA 4: A partir de este experimento se continuaron los demás, aplicando como tratamiento oxidante solamente pulsos con 26% de O₂.

8.1.4 Experimento 4. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la germinación de los conidios libres.

Este experimento se realizó con la finalidad de complementar los resultados obtenidos en las mediciones de las características de calidad, cuyas primeras determinaciones se realizaron en términos de porcentaje de viabilidad, mediante el conteo de UFC. Sin embargo, en algunos casos las viabilidades de los controles determinadas con este método, estuvieron por debajo del 50%. Por ello, se determinó la germinación de los conidios (G). Además, se determinaron la resistencia a estrés osmótico (G_O) y la termotolerancia (G_T), pero ahora mediadas en términos de porcentaje de germinación.

En la figura 8.15 se presenta la germinación (G), la resistencia al estrés osmótico (G_O) y la termotolerancia (G_T) que tuvieron los conidios de cada hongo estudiado, sometido a las dos condiciones atmosféricas (21% vs. 26% de O_2). Se indica la respuesta de calidad que se tuvo 24 h después de haber aplicado un pulso (respuesta a corto plazo) y la respuesta de calidad que se tuvo a las 24 h posteriores de acumular cuatro pulsos oxidantes (96 h) (respuesta a largo plazo).

Los resultados de las pruebas de germinación (G) corresponden a las barras blancas, en ellos se observó que la germinación de los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1 (figura 8.15A (Mr)) aumentó 22% en comparación con el control después de un solo pulso oxidante. Además, la germinación fue 24% mayor que el control en la respuesta a largo plazo (96 h). De manera similar, el tratamiento mejoró la germinación de los conidios de *B. bassiana* Tac1.1 (figura 8.15B (Bb)), ya que incrementó 17% con respecto al control, después de un solo pulso oxidante (24 h), e incrementó 28% después de cuatro pulsos oxidantes (96 h). Por otro lado, el tratamiento oxidante no afectó la germinación de los conidios de *Cordyceps* (figuras 8.15C (Cj) y 8.15D (Cf)) después de un solo pulso (24 h). Sin embargo, después de cuatro pulsos (96 h), la germinación de los conidios

de *C. javanica* CHE-CNRCB303 se redujo un 29%, mientras que la de *C. fumosorosea* ARSEF3302 disminuyó un 38% en comparación con el control.

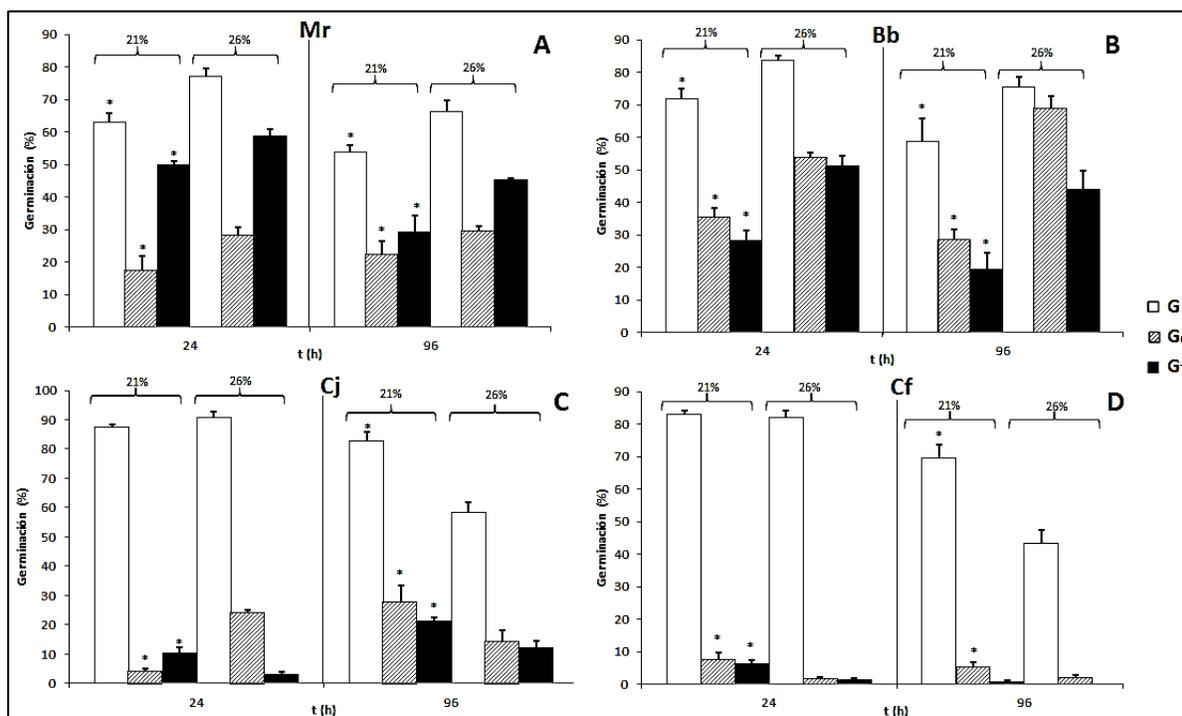


Figura 8.15 Características de calidad (en términos de germinación) de los conidios expuestos a dos atmósferas diferentes: control (21% de oxígeno) y enriquecida con oxígeno (26% de oxígeno). A: resultados correspondientes a Mr: *M. robertsii* Xoch8.1, B: resultados correspondientes a Bb: *B. bassiana* Tac1.1, C: resultados correspondientes a Cj: *C. javanica* CHE-CNRCB303, D: resultados correspondientes a Cf: *C. fumosorosea* ARSEF3302. G: Germinación, G₀: Resistencia a estrés osmótico, G_T: Resistencia a estrés térmico. La línea vertical separa los dos tiempos de muestreo: 24 y 96 h. * Indica una diferencia estadística significativa (P < 0.05) entre tratamientos (21% vs. 26%).

Además, hubo varias diferencias en la germinación de los conidios sometidos a estrés osmótico y estrés térmico. La germinación (G₀) de los conidios de control (21% O₂) de *M. robertsii* Xoch8.1 (figura 8.15A (Mr)) disminuyó bajo el estrés osmótico que en el medio de agar estándar, tanto en la respuesta a corto como a largo plazo (72% y 58% menor, respectivamente). De la misma forma, la germinación (G_T) fue menor después de la exposición al estrés térmico, tanto en la respuesta a corto como a largo plazo (21% y 45% menor, respectivamente). Al comparar los resultados de ambas condiciones atmosféricas (G₀ 21% vs. G₀ 26% y G_T 21% vs. G_T 26%), se observó que los conidios expuestos a un solo pulso oxidante fueron 63% más resistentes al estrés

osmótico y 17% más termotolerantes, en relación al control. De manera similar, después de cuatro pulsos, los conidios adquirieron mayor tolerancia al estrés osmótico y térmico (33% y 55%, respectivamente).

En la figura 8.15B (Bb) se muestra que la germinación (G_0) de los conidios de control de *B. bassiana* Tac1.1 (21% de O_2) fue 50% menor en el medio de estrés osmótico que en el medio de agar estándar, a corto y a largo plazo. Asimismo, la germinación (G_T) disminuyó después de la exposición al estrés térmico, tanto a corto como a largo plazo (60% y 67%, respectivamente). Al comparar los resultados de ambas condiciones atmosféricas (G_0 21% vs. G_0 26% y G_T 21% vs. G_T 26%), se observó que los conidios expuestos a un solo pulso fueron 52% más resistentes al estrés osmótico con respecto al control y 71% más tolerantes al estrés térmico. Aún con mayor respuesta favorable, los conidios fueron más tolerantes al estrés osmótico y al estrés térmico después de cuatro pulsos, ya que la germinación en el medio de estrés osmótico incrementó 140% y en el estrés térmico aumentó 128%.

Como sucedió con los conidios de los otros hongos, la germinación (G_0) de los conidios del control de *C. javanica* CHE-CNRCB303 (21% O_2) (figura 8.15C (Cj)) disminuyó en el medio de estrés osmótico con respecto al medio de agar estándar, a corto y a largo plazo (95% y 67%, respectivamente). Además, en estos conidios la germinación se redujo drásticamente después de la exposición al estrés térmico (G_T) tanto a corto como a largo plazo (88% y 74%, respectivamente). Al comparar los resultados de ambas condiciones atmosféricas (G_0 21% vs. G_0 26% y G_T 21% vs. G_T 26%), se observó que los conidios expuestos a un solo pulso fueron 5 veces más resistentes al estrés osmótico que el control. Por el contrario, los conidios fueron 71% menos termotolerantes (G_T). Notablemente, después de cuatro pulsos, los conidios fueron menos tolerantes al estrés osmótico y térmico (48% y 44% menos, respectivamente).

Por otro lado, la germinación (G_O) de los conidios control de *C. fumosorosea* ARSEF3302 (21% O_2) (Figura 8.15D (Cf)) fue más baja en el medio de estrés osmótico que en el medio de agar estándar en la respuesta a corto y largo plazo (91% y 92%, respectivamente). Al igual que en la exposición al estrés térmico (G_T), pues disminuyó 92% y 99% en la respuesta a corto y largo plazo, respectivamente. En la comparación de los resultados de ambas condiciones atmosféricas (G_O 21% vs. G_O 26% y G_T 21% vs. G_T 26%), los conidios expuestos a un pulso oxidante fueron 78% menos resistentes al estrés osmótico y 79% menos resistentes al estrés térmico. Similarmente, después de cuatro pulsos, los conidios fueron menos tolerantes al estrés osmótico y térmico, ya que la germinación en el medio de estrés osmótico fue 63% menor que el control y después del estrés térmico fue 100% menor.

8.1.5 Experimento 5. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes sobre la infectividad de los conidios libres.

Este experimento se realizó para determinar si el tratamiento oxidante propuesto tiene algún efecto sobre la infectividad de los conidios de los hongos entomopatógenos estudiados. En las figuras 8.16 a 8.19 se muestran las gráficas de Tiempo (días) vs Sobrevivencia (S) de los bioensayos realizados para determinar el efecto del tratamiento a corto y a largo plazo (24 y 96 h, respectivamente). En el caso de *M. robertsii* Xoch8.1 (figura 8.19), se detectó un efecto positivo en la infectividad en la respuesta a corto plazo (24 h), pues de un tiempo letal medio (TL_{50}) de 1.3 d que tuvieron los conidios de la atmósfera normal (21% de O_2) disminuyó a 0.65 d con los conidios sometidos al tratamiento (Tabla 8.1). En la respuesta a largo plazo (96 h) no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) entre los parámetros de infectividad de ambas condiciones atmosféricas (Tabla 8.2).

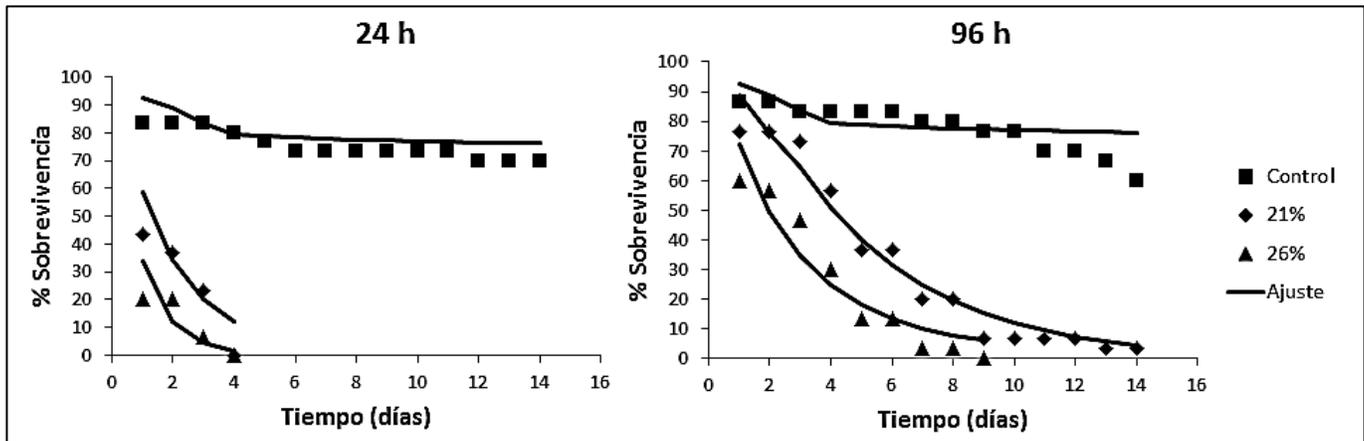


Figura 8.16 Resultados correspondientes al bioensayo de *M. robertsii* Xoch8.1. Respuesta a corto plazo (24 h posteriores a un pulso oxidante), respuesta a largo plazo (24 h posteriores a cuatro pulsos oxidantes (96 h)). Control: sobrevivencia de los insectos sumergidos en Tween 80; 21%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios provenientes de atmósfera normal; 26%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios sometidos a pulsos oxidantes. Los datos punteados corresponden a los datos observados, las líneas continuas corresponden a los ajustes al modelo de decaimiento exponencial.

Tabla 8.1. Medias de los parámetros de infectividad de *M. robertsii* Xoch8.1 (respuesta a corto plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	0.00	0.00	0.00	0.00
k (d ⁻¹)	0.53	0.06	1.10	0.26
to (d)	0.00	0.00	0.00	0.00
TL ₅₀ (d)	1.31	0.14	0.65*	0.14

21%: conidios de atmósfera normal, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar, *Indica una diferencia estadística significativa (P <0.05) entre tratamientos (21% vs. 26% de O₂).

Tabla 8.2 Medias de los parámetros de infectividad de *M. robertsii* Xoch8.1 (respuesta a largo plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	0.00	0.00	1.62	2.81
k (d ⁻¹)	0.25	0.04	0.43	0.20
to (d)	1.17	1.46	0.22	0.21
TL ₅₀ (d)	3.95	1.84	2.07	0.85

21%: conidios de atmósfera normal, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar.

En el caso de *B. bassiana* Tac1.1 (figura 8.17), en las determinaciones realizadas a corto y largo plazo (24 y 96 h), no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre la infectividad de los conidios provenientes de ambas condiciones atmosféricas. En las tablas 8.3 y 8.4 se presentan los parámetros de infectividad correspondientes.

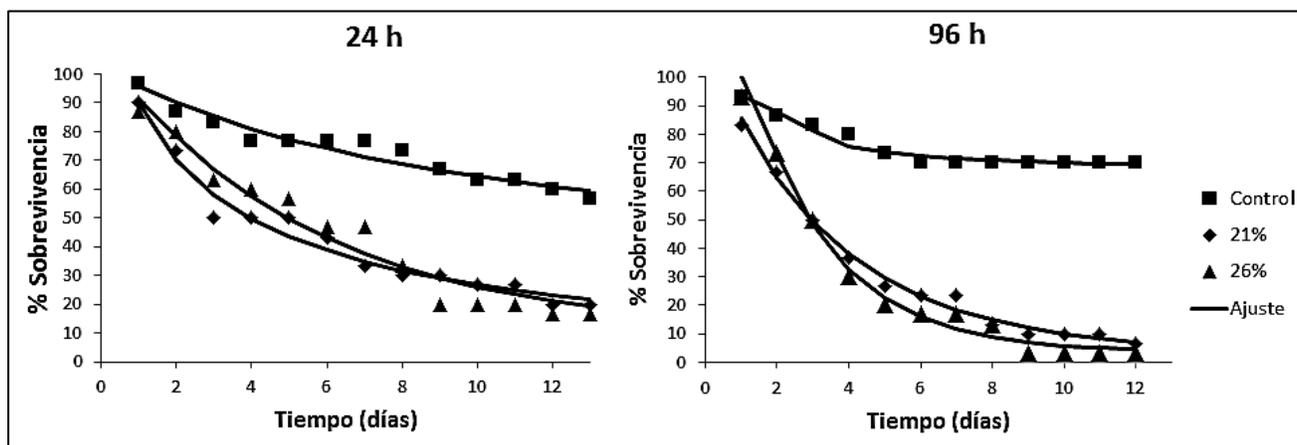


Figura 8.17 Resultados correspondientes al bioensayo de *B. bassiana* Tac1.1. Respuesta a corto plazo (24 h posteriores a un pulso oxidante), respuesta a largo plazo (24 h posteriores a cuatro pulsos oxidantes (96 h)). Control: sobrevivencia de los insectos sumergidos en Tween 80; 21%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios provenientes de atmósfera normal; 26%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios sometidos a pulsos oxidantes. Los datos punteados corresponden a los datos observados, las líneas continuas corresponden a los ajustes al modelo de decaimiento exponencial.

Tabla 8.3 Medias de los parámetros de infectividad de *B. bassiana* Tac1.1 (respuesta a corto plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	15.10	11.12	7.87	13.63
k (d⁻¹)	0.43	0.44	0.18	0.06
to (d)	0.69	0.02	0.45	0.68
TL₅₀ (d)	4.11	1.93	5.08	1.27

21%: conidios de atmósfera normal, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar.

Tabla 8.4 Medias de los parámetros de infectividad de *B. bassiana* Tac1.1 (respuesta a largo plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	15.10	11.12	7.87	13.63
k (d⁻¹)	0.43	0.44	0.18	0.06
to (d)	0.69	0.02	0.45	0.68
TL₅₀ (d)	4.11	1.93	5.08	1.27

21%: conidios de atmósfera normal, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar.

Al igual que con *B. bassiana*, con *C. javanica* CHE-CNRCB303 (figura 8.18) no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre la infectividad de los conidios provenientes de ambas condiciones atmosféricas, en las determinaciones realizadas a corto y largo plazo (24 y 96 h). Las tablas 8.5 y 8.6 presentan los parámetros de infectividad correspondientes.

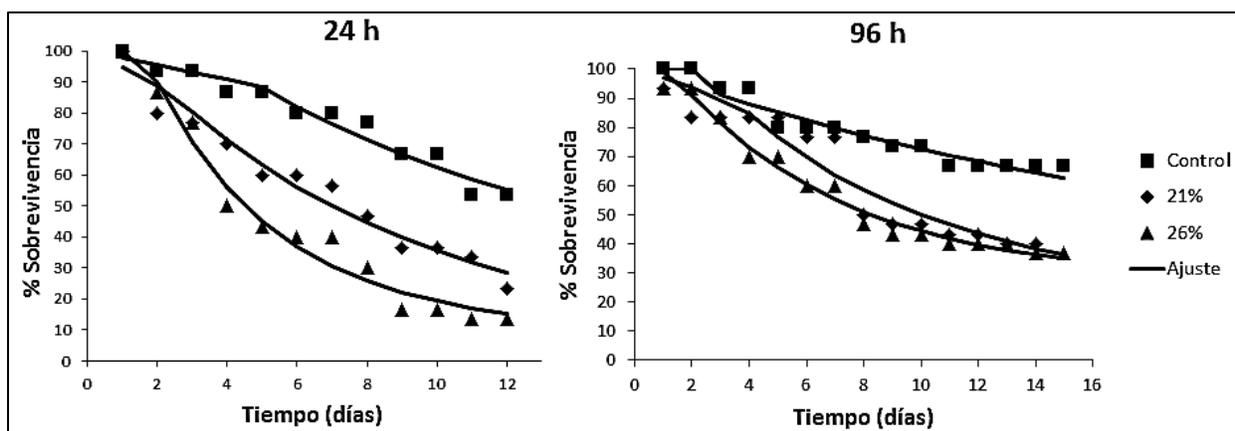


Figura 8.18 Resultados correspondientes al bioensayo de *C. javanica* CHE-CNRCB303. Respuesta a corto plazo (24 h posteriores a un pulso oxidante), respuesta a largo plazo (24 h posteriores a cuatro pulsos oxidantes (96 h)). Control: sobrevivencia de los insectos sumergidos en Tween 80; 21%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios provenientes de atmósfera normal; 26%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios sometidos a pulsos oxidantes. Los datos punteados corresponden a los datos observados, las líneas continuas corresponden a los ajustes al modelo de decaimiento exponencial.

Tabla 8.5 Medias de los parámetros de infectividad de *C. javanica* CHE-CNRCB303 (respuesta a corto plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	3.45	5.94	7.18	6.30
k (d ⁻¹)	0.12	0.03	0.30	0.15
to (d)	0.90	1.28	1.63	0.42
TL ₅₀ (d)	7.05	0.37	4.67*	1.24

21%: conidios de atmósfera normal, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar.

Tabla 8.6 Medias de los parámetros de infectividad de *C. javanica* CHE-CNRCB303 (respuesta a largo plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	11.36	15.55	27.83	11.74
k (d ⁻¹)	0.13	0.09	0.17	0.01
to (d)	1.79	1.97	1.30	0.59
TL ₅₀ (d)	10.19	2.67	9.09	3.80

21%: conidios de atmósfera normal, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar.

El mismo resultado fue observado en el caso de *C. fumosorosea* ARSEF3302 (figura 8.19).

Las tablas 8.7 y 8.8 presentan los parámetros de infectividad correspondientes.

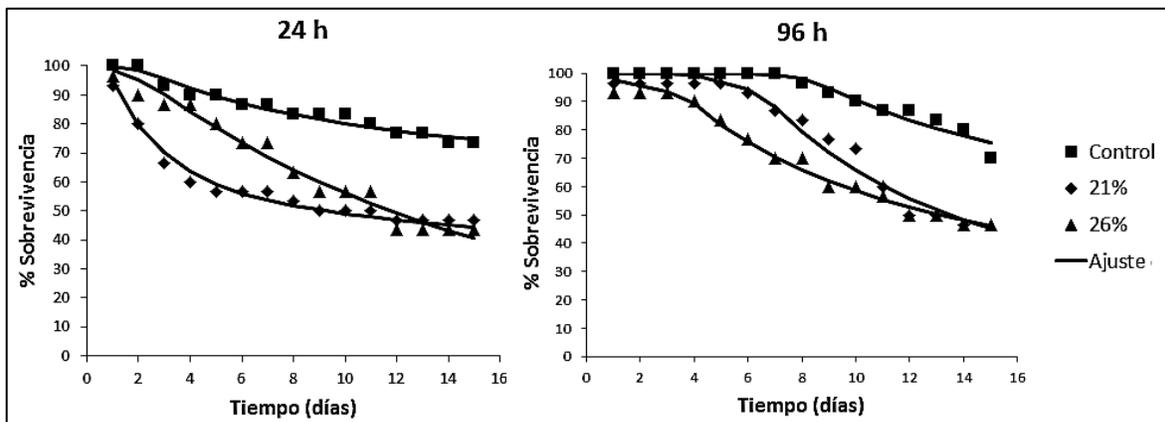


Figura 8.19 Resultados correspondientes al bioensayo de *C. fumosorosea* ARSEF3302. Respuesta a corto plazo (24 h posteriores a un pulso oxidante), respuesta a largo plazo (24 h posteriores a cuatro pulsos oxidantes (96 h)). Control: sobrevivencia de los insectos sumergidos en Tween 80; 21%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios provenientes de atmósfera normal; 26%: sobrevivencia de los insectos infectados con conidios sometidos a pulsos oxidantes. Los datos punteados corresponden a los datos observados, las líneas continuas corresponden a los ajustes al modelo de decaimiento exponencial.

Tabla 8.7 Medias de los parámetros de infectividad de *C. fumosorosea* ARSEF3302 respuesta a corto plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	27.75	23.57	0.05*	0.08
k (d⁻¹)	0.34	0.27	0.07	0.03
to (d)	0.56	0.49	1.22	1.18
TL₅₀ (d)	8.90	6.06	12.26	2.57

21%: controles, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar, *Indica una diferencia estadísticamente significativa (P <0.05) entre tratamientos (21% vs. 26%).

Tabla 8.8 Medias de los parámetros de infectividad de *C. fumosorosea* ARSEF3302 (respuesta a largo plazo).

PARÁMETRO	21%		26%	
	Promedio	DE	Promedio	DE
S (%)	14.29	24.74	22.89	23.95
k (d⁻¹)	0.16	0.13	0.14	0.11
to (d)	5.58	1.60	2.37	2.06
TL₅₀ (d)	13.42	0.87	13.54	2.33

21%: conidios de atmósfera normal, 26%: conidios sometidos a pulsos. DE: Desviación estándar.

8.2 Segunda parte: Acercamiento a la explicación del fenómeno.

8.2.1 Experimento 6. Determinación del efecto de los pulsos oxidantes en la concentración de glutatión de los conidios libres.

8.2.1.1 Medición de la concentración de glutatión total.

En las figuras 8.20 a 8.23 se muestran las concentraciones de glutatión ($\mu\text{M/g}$) en los conidios provenientes de cada cepa, cuando la determinación se realizó 24 h posteriores a la aplicación de un único pulso con 26% de O_2 (respuesta a corto plazo) y cuando la determinación se realizó 24 h posteriores a la aplicación de cuatro pulsos (respuesta a largo plazo (96 h)), así como de los controles respectivos con 21% de O_2 . En *M. robertsii* Xoch8.1 (figura 8.20) el tratamiento oxidante, tanto a corto como a largo plazo, incrementó la concentración de glutatión (76 y 38%, respectivamente) con respecto a los controles. A diferencia del caso de *B. bassiana* Tac1.1 (figura 8.21), en donde no hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre las concentraciones de glutatión en ningún caso.

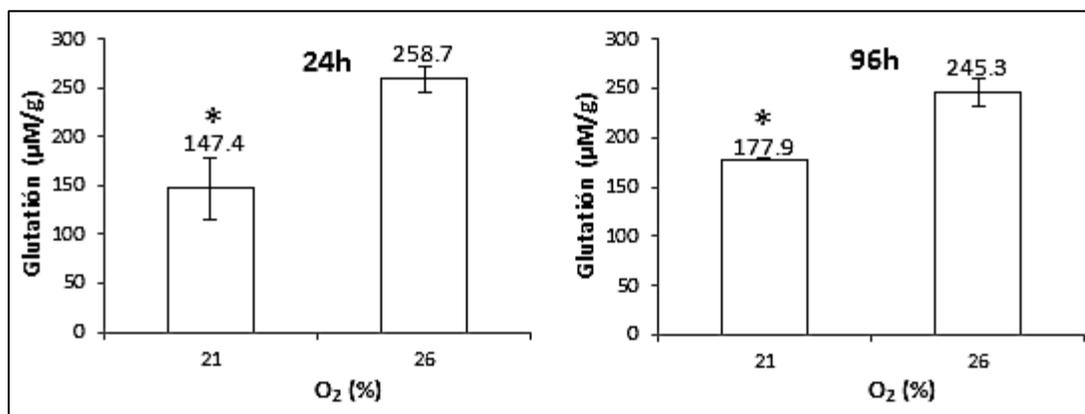


Figura 8.20 Concentración media de glutatión en los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1, en la respuesta a corto plazo (24 h) y en la respuesta a largo plazo (96 h), en ambos tratamientos atmosféricos de estudio (21 vs. 26% de O_2). *Indica una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos.

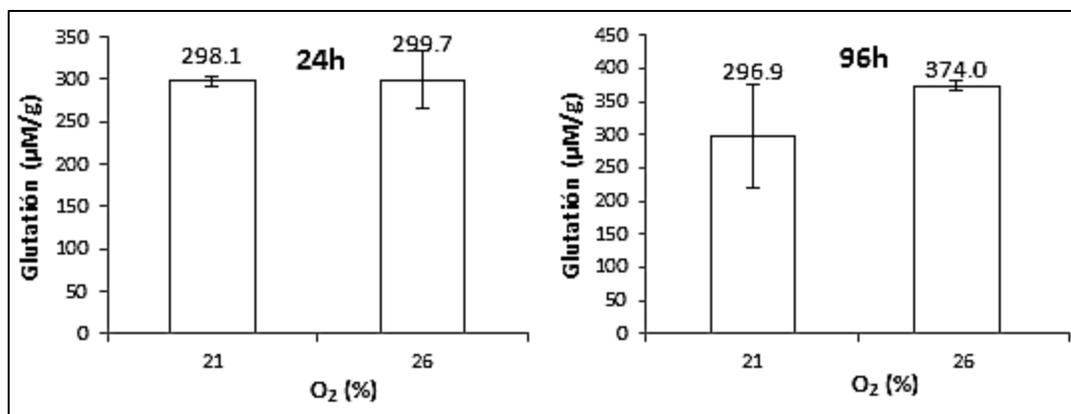


Figura 8.21 Concentración media de glutatión en los conidios de *B. bassiana* Tac1.1, en la respuesta a corto plazo (24 h) y en la respuesta a largo plazo (96 h), en ambos tratamientos atmosféricos de estudio (21 vs. 26% de O₂).

En la figura 8.22, se observó que en el caso de *C. javanica* CHE-CNRCB303, en la determinación a corto plazo (24 h), la concentración de glutatión no tuvo diferencia significativa ($P > 0.05$) con respecto al control. De forma diferente, en la evaluación a largo plazo (96 h), la concentración de glutatión disminuyó 40% con respecto al control. En el caso de *C. fumosorosea* ARSEF3302 (figura 8.23), el tratamiento oxidante afectó la concentración de glutatión, ya que al comparar con los controles respectivos, tanto en la determinación a corto plazo, como en la determinación a largo plazo, la concentración disminuyó 16 y 81% respectivamente.

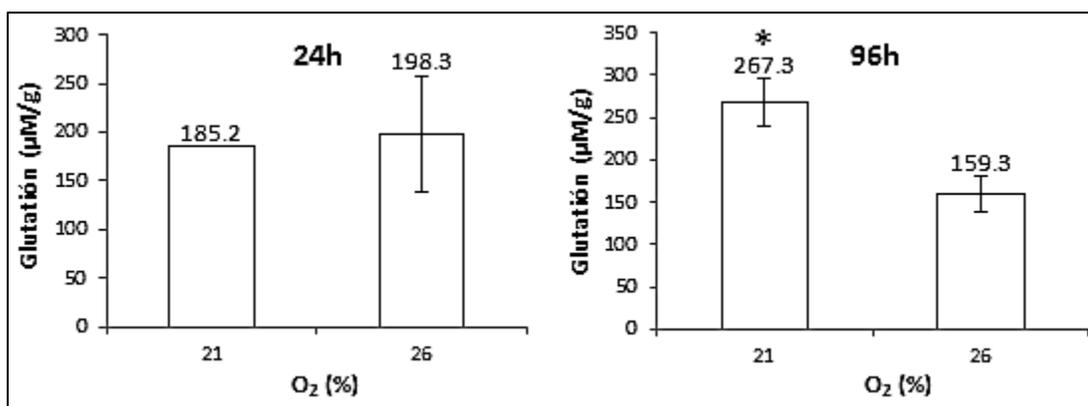


Figura 8.22 Concentración media de glutatión en los conidios de *C. javanica* CHE-CNRCB303, en la respuesta a corto plazo (24 h) y en la respuesta a largo plazo (96 h), en ambos tratamientos atmosféricos de estudio (21 vs. 26% de O₂). *Indica una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos.

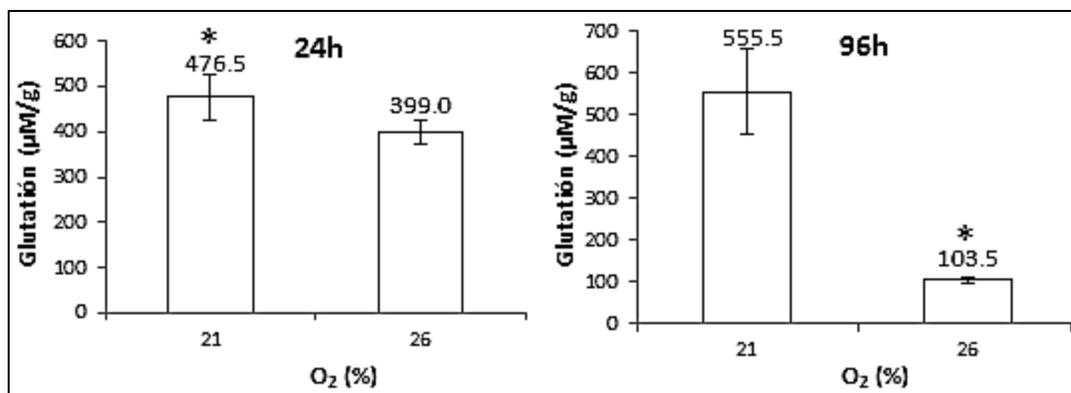


Figura 8.23 Concentración media de glutatión en los conidios de *C. fumosorosea* ARSEF3302, en la respuesta a corto plazo (24 h) y en la respuesta a largo plazo (96 h), en ambos tratamientos atmosféricos de estudio (21 vs. 26% de O₂). *Indica una diferencia estadística significativa (P <0.05) entre tratamientos.

8.2.1.1 Determinación del nivel de glutatión oxidado y reducido

Se corroboró el método de medición por HPLC del glutatión reducido (GSH) y del glutatión oxidado (GSSG), los estándares (Sigma-Aldrich®) presentaron tiempos de retención de 4.2 y 8.5 min, respectivamente (figuras 8.24 y 8.25). Sin embargo, en ninguna de las muestras se logró observar los picos correspondientes a las formas de glutatión (Figuras 13.2 a 13.6 de la sección de anexos). Debido a que lo que se observó fueron varios picos que aparecieron en tiempos de retención diferentes a los de los estándares, quizá el tratamiento de las muestras propició la degradación de las moléculas y al ser el tratamiento de ruptura de los conidios un tratamiento bastante agresivo, se propuso hacer un nuevo método de lisis de conidios con N₂ líquido (ver el inciso b) en la sección de materiales y métodos). Aun así, las muestras no presentaron señal en el HPLC para las moléculas objetivo (figuras 13.7 a 13.11 de la sección de anexos).

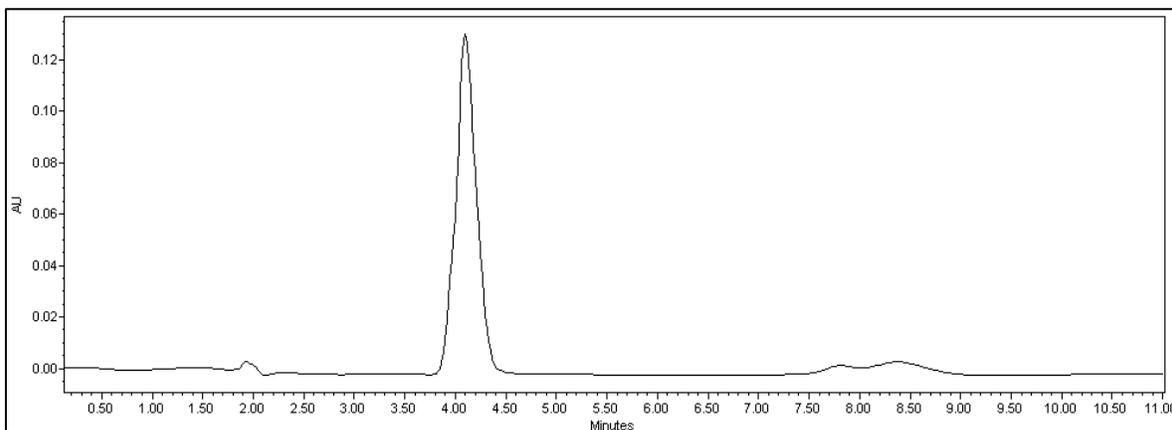


Figura 8.24 Cromatograma obtenido con el estándar de glutatión reducido (GSH). Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH_2PO_4 (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

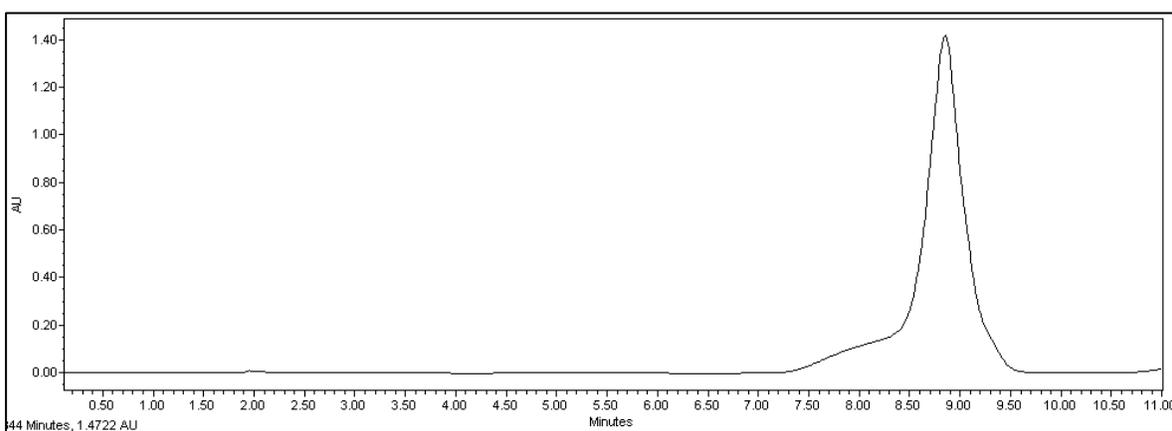


Figura 8.25 Cromatograma obtenido con el estándar de glutatión reducido (GSSG). Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH_2PO_4 (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los trabajos en los que se ha logrado incrementar la producción de conidios (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010), mejorar su calidad (Miranda-Hernández *et al.*, 2014) o incluso tener un efecto combinado (García-Ortiz *et al.*, 2015), han seguido la estrategia de iniciar los pulsos oxidantes en etapas del cultivo en las cuales el hongo se encuentra en fase miceliar. Este es el primer trabajo en el que se ha estudiado una estrategia nueva de aplicación de los pulsos, que consistió en hacer la aplicación del tratamiento directamente sobre los conidios para incrementar su calidad. En este sentido, en el experimento 1, lo más importante era que se aplicaran los pulsos cuando los cultivos estuvieron compuestos principalmente por conidios. Los resultados muestran que el objetivo se cumplió, fue efectiva la estrategia de elegir tiempos cercanos a la conidiación máxima de cada hongo (Con_{max}) para aplicar los pulsos, ya que los valores de índice de conidiación (lc) fueron mayores a 100 (El lc es un parámetro que muestra cuál es el avance de la conidiación en un cultivo al indicar cuantas veces se ha multiplicado un inóculo inicial a lo largo del tiempo). Esto concuerda con un estudio previo (Castillo-Minjarez, 2015) sobre *C. javanica* CHE-CNRCB303 y *C. fumosorosea* ARSEF3302, en donde se observó que los valores de lc aproximados a 100 (alrededor de 120 y 144 h de cultivo) correspondían a cultivos en los que los hongos estuvieron en forma de conidios.

En lo que respecta a los efectos del tratamiento sobre la calidad (experimento 1), el efecto positivo en el género *Cordyceps* coincidió con lo observado por Castillo-Minjarez (2015) para las mismas cepas. Con la diferencia de que, en aquella investigación, usando el mismo sistema de cultivo, el tratamiento se aplicó con valores bajos de lc , entre 2 y 18. Además como hallazgo novedoso, el efecto positivo en la calidad, también se observó en los otros hongos estudiados; todas las características de calidad mejoraron para los conidios de *B. bassiana* Tac1.1 y de *M. robertsii* Xoch8.1, donde bastó un sólo pulso para incrementar la calidad. Aunque el tratamiento a

largo plazo, afectó su termotolerancia, lo que podría deberse a que, en el caso de este hongo se emplearon pulsos con 30% de oxígeno, como en la investigación realizada por García-Ortiz *et al.*, (2015), en donde ese tratamiento mejoró la producción y la termotolerancia de *Metarhizium lepidiotae*. Debido al efecto negativo observado a largo plazo en este hongo, se decidió probar pulsos con 26% de oxígeno (experimento 3) y cuyos resultados se discuten más adelante. La viabilidad (V) tan baja (5.4%) del control de *C. fumosorosea* ARSEF3302 indica que la cepa se dañó, ya que la cepa en evaluaciones previas, había presentado viabilidades entre 60 y 70%. Esto podría deberse a una infección por micovirus, ya que hay reportes de que su presencia afecta el crecimiento, la estabilidad fenotípica y la conidiación (Melzer y Bidochka, 1998). Sin embargo, esta posibilidad debe ser comprobada.

Aunque los medios de cultivo estuvieron principalmente compuestos por conidios, existía la duda de si la respuesta favorable en la calidad, verdaderamente se debió a los conidios ya formados o podría deberse a una mínima cantidad de micelio que aún estuviera presente en el medio y que con el tratamiento generara conidios de mejor calidad. Es por eso que los conidios se separaron del medio de cultivo (conidios libres) y ya cosechados fueron sometidos al tratamiento oxidante (experimento 2). Los resultados de este experimento, de manera novedosa, mostraron que sí es posible modificar la calidad de los conidios libres al aplicar el factor de estrés directamente sobre ellos.

Por una parte, en el caso de *M. robertsii* Xoch8.1 de igual manera que en el experimento 1, con un sólo pulso se observó el efecto positivo en la calidad, pero en este caso, no se afectó la termotolerancia (V_T) con el tratamiento constante. Mostrando una primera evidencia de que para este hongo, el aplicar los pulsos directamente sobre los conidios libres podría ser una mejor estrategia para incrementar su calidad. También, con un único pulso se reprodujo el mejoramiento

de la viabilidad (V) y la resistencia a estrés osmótico (V_o), en el caso de *C. fumorosea* ARSEF3302, y la termotolerancia (V_T) en el caso de *B. bassiana* Tac1.1. Sin embargo, el hecho de que al largo plazo no se observó el mejoramiento de la calidad en estas dos cepas, además del efecto negativo observado en el caso de *C. javanica* CHE-CNRCB303, indican que para estos últimos tres hongos podría ser mejor la aplicación de los pulsos sobre los conidios en el medio de cultivo. Es importante mencionar que las viabilidades de los conidios libres del control de *M. robertsii*, *B. bassiana* y *C. fumosorosea* estuvieron por debajo del 50%, como se mencionó anteriormente, podría indicar un daño de las cepas. Además de la posibilidad de infección por micovirus en estos hongos (Azevedo *et al.*, 2000; Dalzoto *et al.*, 2006; Melzer y Bidochka, 1998), las diferencias en los resultados entre lo observado en los experimentos 1 y 2 también podrían deberse a que los conidios provenían de lotes diferentes, por lo que en el experimento 3 se estudiaron de manera simultánea ambas estrategias de aplicación de los pulsos oxidantes. En el experimento se utilizó *M. robertsii* Xoch8.1 por una parte, para corroborar el mejor incremento de la calidad al aplicar el tratamiento en los conidios libres y por otra, para evaluar el efecto de utilizar pulsos oxidantes con 26% de oxígeno.

Los resultados del experimento 3, por un lado, mostraron que fue mejor la aplicación de pulsos con 26% de oxígeno, ya que con un sólo pulso se lograron mejorar las tres características de calidad evaluadas en comparación con la aplicación del pulso con 30% de oxígeno, en donde no se incrementó la viabilidad (V); es decir, la intensidad del tratamiento determina la respuesta en la calidad de los conidios. Además, tampoco se tuvo el efecto negativo en la termotolerancia (V_T), observado en la evaluación a largo plazo. Por otro lado, en lo que respecta a los conidios libres, al comparar la reproducibilidad de los resultados con el experimento 2, a pesar de que la viabilidad (V) del control apenas fue de 26.5% y que en este experimento fue de más del doble (55.8%), se observó que de igual forma, con un sólo pulso se incrementaron las características de calidad y

que éstas no se afectaron con el tratamiento al largo plazo. Ahora, comparando entre ambos sistemas (conidios en medio de cultivo vs conidios libres), se observó que la viabilidad (V) de los controles fue similar (60%, aproximadamente). De forma muy interesante, se corroboró que la estrategia de aplicar el tratamiento en los conidios libres fue mejor, pues se incrementó la resistencia a estrés osmótico (V_o) y a la termotolerancia (V_T) tanto en las evaluaciones a corto como a largo plazo. En este punto de la investigación se decidió continuar los estudios en el sistema de conidios libres, ya que se acerca más a los productos comerciales, en donde la mayoría de los bioplaguicidas se formulan con conidios cosechados (Muñiz-Paredes *et al.*, 2017). Adicionalmente, con esta estrategia (en comparación con la de aplicar el tratamiento en los conidios en medio de cultivo), no habría manipulación del cultivo, impidiendo posibles contaminaciones y no importa la forma de obtención de los conidios, ya que el tratamiento se aplica directamente en los conidios cosechados. Así que esta estrategia de mejoramiento de la calidad de los conidios podría ser de interés para su posible implementación en la producción comercial de bioplaguicidas.

Aún es resaltable la baja viabilidad (V) observada en los controles del experimento 2 y en ese sentido, debido a la naturaleza del método para medir esta característica, no se descarta la posibilidad de que se subestimen los valores, ya que en la técnica se espera que cada conidio genere una UFC, pero es común que una sola UFC sea generada por más de un conidio (Breed y Dotterer, 1916). Por ese motivo se estudió el fenómeno complementando con la medición de la germinación y se determinó nuevamente la resistencia a estrés osmótico (G_o) y la termotolerancia (G_T), pero ahora ya no medidos en términos de UFC, sino de germinación (experimento 4). Con ello se esperaba corroborar los hallazgos encontrados hasta ahora en los estudios en los conidios libres.

La germinación (G) de los conidios libres de los hongos utilizados como controles, estuvo entre 60 y 80% a las 14 h de cultivo en el medio agar-agua, si se hubiese esperado más tiempo de incubación, los valores de germinación habrían incrementado. Sin embargo, las 14 h fue un tiempo suficiente para observar las diferencias entre las dos condiciones atmosféricas estudiadas (21 vs 26% de oxígeno). Incluso se ha realizado la evaluación a las 12 h de cultivo en otro reporte (Muñiz-Paredes *et al.*, 2016). De manera similar a lo observado en las mediciones en términos de UFC, los resultados en términos de germinación mostraron el efecto positivo en la calidad de los conidios libres de *M. robertsii* Xoch8.1 y *B. bassiana* Tac1.1, ya que la resistencia al estrés osmótico (G_o) y térmico (G_T) mejoraron simultáneamente con el tratamiento. El incremento de varias características deseables al aplicar un factor de estrés es un fenómeno que se conoce como protección cruzada (Miranda-Hernández *et al.*, 2016; Rangel, 2011). De este modo, esta investigación muestra por primera vez, evidencia suficiente de que se induce el fenómeno al aplicar los pulsos oxidantes directamente sobre los conidios.

La inducción de protección cruzada con pulsos oxidantes ya se había observado en *C. fumosorosea* ARSEF3302 y *C. javanica* CHE-CNRCB303 (antes de *I. fumosorosea* ARSEF3302 e *I. fumosorosea* CNRCB1) (Miranda-Hernández *et al.*, 2014) y en *M. lepidiotae* (García-Ortiz *et al.*, 2015). Pero la aplicación del tratamiento se inició en la forma vegetativa durante el cultivo de los hongos. Además de los pulsos oxidantes, se han reportado otras estrategias para inducir la protección cruzada. Por ejemplo, los conidios de *M. anisopliae* producidos con insuficiencia de carbono y nitrógeno son más tolerantes al calor y a los rayos UV-B. Por otro lado, el choque térmico puede inducir resistencia a la radiación UV-B y el estrés osmótico promueve la resistencia al calor y a la radiación UV-B (Rangel, 2011; Rangel *et al.*, 2008). La exposición del micelio de los hongos a pulsos oxidantes genera estrés oxidante por la generación de ERO (Pérez-Guzmán *et al.*, 2016), lo que lleva a que se activen los mecanismos de respuesta al estrés, implicando la

adquisición de resistencia a diferentes factores de estrés, es decir el incremento de la calidad (Miranda-Hernández *et al.*, 2016). Sin embargo, se desconoce si en el conidio podrían existir mecanismos de respuesta similares.

Por otro lado, la respuesta de los conidios de ambas cepas de *Cordyceps* fue muy diferente, ya que fueron más sensibles al tratamiento oxidante en comparación con los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1 y *B. bassiana* Tac1.1. Después de un único pulso (evaluación a corto plazo) de manera novedosa, se encontró un efecto positivo sobre la resistencia de *C. javanica* CHE-CNRCB303 al estrés osmótico (G_0), aunque fue acompañado de un efecto negativo sobre la resistencia al estrés térmico (G_T), por lo que en este caso no se indujo la protección cruzada. Además, la exposición constante a los pulsos (evaluación a largo plazo) tuvo un efecto negativo en la calidad de los conidios. Además, la calidad de los conidios de *C. fumosorosea* ARSEF3302 se afectó por la exposición al tratamiento. Así, los resultados de los experimentos 1 a 4 han mostrado que el efecto del tratamiento sobre la calidad de los HE depende en principio de su estado celular (micelio o conidio) y que la respuesta es variable según la cepa. Esta respuesta contrastante de los conidios de cada hongo podría no sólo deberse a la especie, también puede generarse debido a que los conidios tienen varias etapas de maduración después de la diferenciación celular de fiálida a conidio (Sewall *et al.*, 1990), esto conduce a diferencias en la composición química y en la sincronía del estado de latencia (Van Leeuwen *et al.*, 2010; Wyatt *et al.*, 2013). Adicionalmente, los conidios tienen varios tipos de latencia que pueden diferir dentro de un mismo género (Mysyakina *et al.*, 2016).

De manera interesante, el tratamiento no afectó la infectividad de ninguno de los hongos estudiados (experimento 5). Por el contrario, en el caso de *M. robertsii* Xoch8.1, hubo un efecto positivo en la infectividad en la respuesta a corto plazo, pues los resultados de tiempo letal medio (TL_{50}) revelaron que los conidios sometidos al pulso requirieron de sólo la mitad de tiempo para

matar a la mitad de la población de insectos en el bioensayo. De manera similar, en la respuesta a corto plazo de los conidios de *C. javanica* CHE-CNRCB303, también se observó una mejoría de 34% del mismo parámetro de infectividad. También en ese mismo tiempo de respuesta, el ajuste de los datos indicó que hay una tendencia de mejoría en el parámetro de supervivencia final (S) de *C. fumosorosea* ARSEF3302, pues se proyectó un porcentaje de sobrevivencia final de insectos menor en el bioensayo realizado con los conidios sometidos a los pulsos oxidantes, en comparación con el control de 21% de oxígeno. Es interesante que a pesar de que el tratamiento disminuyó la germinación (G) de ambas cepas de *Cordyceps*, la infectividad no se afectó. El tratamiento oxidante no fue lo suficientemente fuerte como para afectar los mecanismos mediante los cuales se infecta a los insectos, dándole otro atributo atractivo para su posible incorporación en la producción comercial de *B. bassiana* y *M. robertsii*.

La capacidad de respuesta a los pulsos oxidantes mostrada por los conidios libres, indica la existencia de mecanismos internos que responden ante el estímulo externo, como en este caso, para hacer frente a las condiciones adversas en su entorno. Según algunos autores, los conidios son estructuras latentes sin actividad metabólica (Hagiwara *et al.*, 2016; Lamarre *et al.*, 2008; Taubitz *et al.*, 2007). Sin embargo, el proteoma y el transcriptoma de los conidios latentes de algunas especies de *Aspergillus* muestran una actividad mínima. De hecho, el proteoma de los conidios de *A. fumigatus* sugiere que contienen moléculas necesarias para la tolerancia al estrés, y para responder de inmediato a un estímulo ambiental (Teutschbein *et al.*, 2010). Algunas proteínas de choque térmico y chaperonas involucradas en la maduración de los complejos de proteínas son reguladas al alza en los conidios inactivos de *A. fumigatus* (Suh *et al.*, 2012). Además, *Aspergillus* contiene niveles altos de transcripción de genes de catalasa, lo que podría contribuir a la protección contra el estrés oxidante (Hagiwara *et al.*, 2016). García-Ortiz *et al.*, (2018) estudiaron el proteoma de los conidios de *M. lepidiotum* generados bajo el sometimiento

del micelio a pulsos con 30% de oxígeno y encontraron que a diferencia de los controles, bajo las condiciones oxidantes apareció un grupo de proteínas asociadas con la respuesta al estrés oxidante y a la termotolerancia, entre otras. Esta información concuerda con los resultados encontrados en esta investigación, ya que los conidios respondieron a la atmósfera enriquecida con oxígeno y, como consecuencia modificaron algunas características de calidad. Sin embargo, los mecanismos para llevar a cabo este fenómeno son desconocidos hasta ahora. Con la finalidad de tratar de encontrar alguna explicación posible se realizó la segunda parte de la investigación.

Aunque en este trabajo no se tuvo como objetivo observar el efecto de los pulsos sobre la producción de conidios, existen algunos puntos a comentar. El tratamiento no tuvo efecto sobre la producción de conidios de *C. javanica* CHE-CNRCB303, por el contrario, en *C. fumosorosea* ARSEF3302, el hecho de que la producción de conidios sea menor en la medición de la respuesta a corto plazo, indica que el tratamiento podría retardar el proceso de conidiación, comportamiento que ya se había observado por Castillo-Minjarez (2015). Sin embargo, al parecer la cepa puede reponerse al tratamiento, como ya ha sido observado por Muñiz-Paredes *et al.*, (2016) ya que al final se igualan los niveles de producción con el control (lo cual se pudo observar en las evaluaciones a largo plazo). Comparando con la estrategia de aplicar el tratamiento en la fase miceliar, existen resultados muy diferentes, por ejemplo, Miranda-Hernández *et al.*, (2014) observaron una afectación del 53% de la producción al aplicar pulsos con 26% de oxígeno sobre *C. javanica* CHE-CNRCB303 (antes *Isaria fumosorosea* CNRCB1) y un incremento de aproximadamente 5 veces de la producción en el caso de la cepa de *C. fumosorosea* ARSEF3302 (antes *I. fumosorosea* ARSEF3302); aunque Muñiz-Paredes *et al.*, (2016) también encontró efecto negativo del tratamiento sobre la producción de esta cepa. En el caso de *B. bassiana* Tac1.1, a pesar de que durante las primeras horas de los pulsos (primer ensayo) se observó un efecto negativo, después de las 240 h (segundo ensayo) se observó que el tratamiento ya no tuvo ningún

efecto en la producción. De manera diferente, en el estudio de Garza-López *et al.*, (2012), aplicando pulsos con 26% de oxígeno desde la fase miceliar de la cepa *B. bassiana* Bb 882.5, hubo incrementos en la producción en las primeras horas (24 y 48 h). Sin embargo, a los 8 días del tratamiento, se observó que ya no hubo diferencias con respecto al control. De manera particular, en este hongo, llamó la atención la diferencia de valores de *I_c* que hubieron entre el primer y segundo ensayos del experimento 1. En el caso de *M. robertsii* Xoch8.1 el tratamiento reiterativo a largo plazo, provocó un efecto positivo en la producción, lo cual coincidió con otro hongo del mismo género, *Metarhizium lepidiotum* (antes *Metarhizium anisopliae*) estudiado por García-Ortiz *et al.*, (2015). Toda esta variabilidad en esta característica, de igual forma que en el caso de la calidad, podría explicarse por la posible infección con micovirus (Azevedo *et al.*, 2000; Dalzoto *et al.*, 2006; Melzer y Bidochka, 1998) o por la existencia de varias etapas de maduración de los conidios (Sewall *et al.*, 1990) que conllevan a diferencias en la composición química y en la sincronía del estado de latencia (Van Leeuwen *et al.*, 2010; Wyatt *et al.*, 2013), provocando una capacidad de respuesta diferente ante el tratamiento.

Los conidios en latencia pueden detectar la concentración de oxígeno en su ambiente y contienen las estructuras necesarias para respirar (Stade y Brambl 1981, Taubitz *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha determinado que los conidios de *A. niger* tienen un metabolismo respiratorio mínimo que ocurre para el mantenimiento (Novodvorska *et al.*, 2016). Podría ocurrir que al aplicar los pulsos con la atmósfera enriquecida de oxígeno sobre los conidios libres se genere un estrés oxidante debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) pues como se sabe, las mitocondrias contribuyen al envejecimiento celular al generar estas moléculas (Lamarre *et al.*, 2008, Wang *et al.*, 2005). El glutatión es una molécula antioxidante que está presente en los conidios, de hecho, en *Neurospora crassa* regula las propiedades físicas asociadas con la latencia (Fahey *et al.*, 1975), y en las células en general, debido al control que hace sobre las ERO, está

asociado con la resistencia al estrés, el mantenimiento de la estructura mitocondrial, la integridad de la membrana y con la diferenciación y desarrollo celular. Por lo que, la disminución de esta molécula en las células indica la presencia de estrés oxidante (Pócsi *et al.*, 2004).

En este contexto, los resultados de las mediciones de la concentración total de glutatión indicaron la existencia de una relación directa entre los niveles de glutatión y la respuesta de germinación de los conidios después de la exposición a las condiciones oxidantes. En particular, para los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1, algunas características de calidad mejoraron a medida que aumentó el nivel de glutatión, indicando que podría desempeñar un papel en los mecanismos de defensa celular contra el posible estrés oxidante generado por el tratamiento. Los aumentos en la concentración de glutatión debido a los pulsos oxidantes sugieren una posible actividad biosintética como parte del mecanismo de defensa de este hongo. La síntesis de glutatión en los conidios requeriría las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa y glutatión sintetasa (Schafer y Buettner, 2001), cuya actividad podría analizarse en futuros trabajos para detallar este mecanismo. Otra alternativa podría ser medir la actividad del factor de transcripción Nrf2 que regula la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la vía de biosíntesis del glutatión (Wakabayashi *et al.*, 2004).

En el caso de los conidios de *B. bassiana* Tac1.1, la mejora en las características de calidad no estuvo acompañada por un aumento del glutatión total. Esto revela que, aparte del glutatión, existen otros mecanismos en los conidios para resistir el estrés oxidante. Esto podría relacionarse con el hecho de que en los conidios hay factores de transcripción como VosA o AtfA en abundancia y juegan un papel importante en la resistencia a las condiciones de estrés (Krijgheld *et al.*, 2013; Van Leeuwen *et al.*, 2010). En este sentido, una forma de evaluar si el glutatión funciona como mecanismo de defensa en esta cepa, sería medir la actividad de la enzima glutatión reductasa, la cual está activa en los conidios generados bajo pulsos con 30% de O₂ (García-Ortiz *et al.*, 2018).

Como se mencionó en la introducción, en las células el glutatión existe en dos formas, la reducida (GSH) y la oxidada (GSSG). Ante la presencia de radicales de oxígeno, dos moléculas de GSH transfieren electrones a la molécula oxidante, resultando que las moléculas de GSH establecen un enlace disulfuro para la formación de una molécula de GSSG. Finalmente, el GSH es regenerado a partir de GSSG por la acción de la glutatión reductasa (Marschall y Tudzynski, 2016). De esta forma, la célula recicla el glutatión, sin necesidad de sintetizarlo. Esto podría explicar por qué la concentración de glutatión se mantuvo sin cambios en los conidios de este hongo. Es por esta razón que se intentó hacer la medición en HPLC de las formas reducida y oxidada del glutatión, sin embargo las moléculas no se pudieron medir en las muestras, lo cual se cree que se debió a la degradación de las moléculas durante el proceso de obtención de las muestras (figuras 12.2 a 12.11 de la sección de anexos).

Los resultados de las concentraciones de glutatión total obtenidos con las cepas de *Cordyceps* indicaron que el tratamiento genera condiciones de estrés oxidante. El caso de *C. javanica* CHE-CNRCB303 es muy interesante, ya que un sólo pulso aumentó la resistencia de los conidios al estrés osmótico (G_o), aunque las concentraciones de glutatión no cambiaron. Por lo tanto, si el glutatión estuviera involucrado en los mecanismos de defensa de esta cepa, las respuestas de los conidios habrían sido similares a las observadas con *B. bassiana* Tac1.1 (incremento simultáneo de G_o y G_T debido al tratamiento). Por el contrario, en *C. javanica* CHE-CNRCB303 la resistencia al estrés térmico (G_T) y se afectó, contrastando con lo observado con *B. bassiana* Tac1.1. Esto refuerza la idea de que en los conidios debe haber más de un sistema de respuesta al estrés. Además, después de la exposición de los conidios a múltiples pulsos (evaluación de la respuesta a largo plazo), la pérdida de calidad fue acompañada por una reducción en las concentraciones de glutatión, lo que indicó que el glutatión pudo haber dejado de funcionar como una vía de defensa. Consistentemente, la disminución de la calidad observada

en los conidios de *C. fumosorosea* coincidió con la disminución de la concentración de glutatión. Esto sugirió que el glutatión, en este caso, fue insuficiente como mecanismo de defensa.

Estos resultados muestran coincidencia con las investigaciones que presentan evidencia de que los cambios atmosféricos pueden causar estrés oxidante en *B. bassiana* al aumentar la generación de ERO (Garza-López *et al.*, 2012; Pérez-Guzmán *et al.*, 2016). Algunos estudios moleculares, como la medición de la actividad de los factores de transcripción AtfA o VosA, podrían ayudar a comprender los mecanismos de respuesta al estrés de los conidios libres, ya que desempeñan un papel en la resistencia a las condiciones de estrés (Bayram *et al.*, 2010; Hagiwara *et al.*, 2016; Krijghsheld *et al.*, 2013; Ni y Yu, 2007; Van Leeuwen *et al.*, 2013).

Por otro lado, la metodología experimental propuesta en este trabajo para medir las características de calidad de los conidios libres fue efectiva, especialmente como un medio para identificar y comparar los efectos de los diferentes tratamientos con oxígeno. En el caso de la resistencia al estrés osmótico, se tuvo un a_w de 0.96 en el medio agar-agua y de 0.98 en el medio ADS (ambos suplementados con NaCl), por lo que se esperaba que se afectara la germinación (G) o la viabilidad (V) en todas las cepas, ya que se conoce que valores de a_w por debajo de 0.98 afectan el crecimiento de *B. bassiana* (Nuñez-Gaona *et al.*, 2010). Además, en las pruebas de resistencia al estrés térmico (G_T y V_T), el método (40°C, durante 1 h) fue efectivo, pues se logró disminuir la germinación y la viabilidad de los conidios al ser sometidos al tratamiento térmico, permitiendo ver las diferencias entre los conidios control y los sometidos a los pulsos oxidantes (21 vs 26% de oxígeno). Estos métodos podrían considerarse como pruebas de rutina para evaluar la calidad de los conidios en los ensayos de laboratorio, incluso a escala comercial. Adicionalmente, la estrategia propuesta en este trabajo para mejorar la calidad de los conidios libres de hongos entomopatógenos, podría aplicarse a los conidios recolectados para productos comerciales, incluso en conidios almacenados durante mucho tiempo para determinar si se

observan los mismos fenómenos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los efectos dependen de la especie y de la dosis.

Finalmente, este trabajo es un primer esfuerzo para determinar si los conidios de los hongos entomopatógenos podrían responder al ser tratados directamente con pulsos oxidantes.

En resumen los resultados indicaron que:

- ✓ Los pulsos con 26% de oxígeno generan condiciones de estrés oxidante en los conidios.
- ✓ El glutatión presente en los conidios funciona como un mecanismo de defensa ante el estrés oxidante.
- ✓ Los conidios responden al estrés oxidante y modifican sus características de calidad.
- ✓ La estrategia propuesta en esta investigación es efectiva para mejorar la calidad de los conidios de *M. robertsii* Xoch8.1 y *B. bassiana* Tac1.1.

10. CONCLUSIONES

- ❖ Se puede inducir protección cruzada en los conidios con el método propuesto.
- ❖ Los cambios en las concentraciones de glutatión inducidos con los pulsos, indican que la calidad de los conidios libres se modifica al someterlos directamente a condiciones de estrés oxidante.
- ❖ Sin embargo, la respuesta dependerá de la especie de hongo que se trate y de la dosis del tratamiento.

11. PERSPECTIVAS

11.1 Estudios de biología molecular

- Medir los cambios en la actividad de factores de transcripción que están asociados con procesos de maduración y resistencia al estrés en conidios (por ejemplo, VosA o AtfA).
- Análisis transcriptómicos de conidios sometidos al tratamiento.

11.2 Estudios bioquímicos

- Medición en los conidios de la actividad de enzimas asociadas a las síntesis de glutatión como la γ -glutamylcisteína sintetasa o la glutatión sintetasa.
- Medición en los conidios de la actividad de la glutatión reductasa, enzima asociada con la regeneración de glutatión reducido.
- Medición en los conidios de la actividad de enzimas asociadas con la resistencia al estrés como la superóxido dismutasa o la catalasa.
- Implementación de algún método para medir el estado óxido-reducción de los conidios.

11.3 Aplicación

- Evaluar el método con conidios obtenidos de sustratos usados en la producción a escala comercial como arroz.
- Determinar el efecto del tratamiento en productos comerciales.
- Analizar si el tratamiento prolonga la vida de anaquel de los conidios.
- Determinar si el tratamiento puede ser efectivo en conidios almacenados por largo tiempo.

12. BIBLIOGRAFÍA

- ▶ Allen, M.T., y Levy, L.S. (2013). Parkinson's disease and pesticide exposure—a new assessment. *Critical reviews in toxicology*, 43(6): 515-534.
<https://doi.org/10.3109/10408444.2013.798719>.
- ▶ Azevedo, A.C.S., Sosa-Gómez, D.R., Faria, M.R., y Fungaro, M.H.P. (2000). Effects of double-stranded RNA on virulence of *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) against the silverleaf whitefly, *Bemisia tabaci* strain B (Homoptera: Aleyrodidae). *Genetics and Molecular Biology*, 23(1): 61-63. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572000000100010>.
- ▶ Bayram, Ö.S., Bayram, Ö., Valerius, O., Park, H.S., Irniger, S., Gerke, J., y Braus, G.H. (2010). LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS genetics*, 6(12): e1001226.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001226>.
- ▶ Boucias, D. G., Pendland, J. C., y Latge, J. P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and environmental microbiology*, 54(7): 1795-1805.
- ▶ Boveris, A., Repetto, M.G., Boveris, A.D., y Valdez, L.B. (2008). Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. *El Manual Moderno*. Pág. 319-328.
- ▶ Breed, R.S., y Dotterrer, W.D. (1916). The number of colonies allowable on satisfactory agar plates. *Journal of bacteriology*, 1(3): 321. PMID: PMC378655, PMID: 16558698.
- ▶ Cárdenas-Rodríguez, N., Medina-Campos, O.N., y Pedraza-Chaverri, J. (2008). Glutación peroxidasa: una familia de enzimas. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. *El Manual Moderno*. Pág. 201-217.
- ▶ Castillo-Minjarez J. M. A. (2015). Determinación del momento de aplicación de pulsos con 26% de oxígeno para el mejoramiento de la calidad de los conidios de *Isaria fumosorosea*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- ▶ Dalzoto, P. R., Glienke-Blanco, C., Kava-Cordeiro, V., Ribeiro, J. Z., Kitajima, E. W., y Azevedo, J. L. (2006). Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. *Mycological research*, 110(12): 1475-148. DOI: 10.1016/j.mycres.2006.08.009.
- ▶ de Faria, M. R., y Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237-256. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2007.08.001.

- Duc, G., Agrama, H., Bao, S., Berger, J., Bourion, V., De Ron, A.M., y Tullu, A. (2015). Breeding annual grain legumes for sustainable agriculture: new methods to approach complex traits and target new cultivar ideotypes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34: 381-411. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898469>.
- Estefes-Chávez, A. (2015). Evaluación de la producción y calidad de hongos entomopatógenos aislados de 5 delegaciones agrícolas del Distrito Federal. Tesis de especialización. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Fahey, R.C., Brody, S., y Mikolajczyk, S.D. (1975). Changes in the glutathione thiol-disulphide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *Journal of Bacteriology*, 121: 144–151. PMID: 123243PMCID:pmc285624.
- Fernández-Checa, J.C., y García-Ruiz, C. (2008). Glutación. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. *El manual moderno*, Pág. 253-267.
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual review of entomology*, 23(1): 409-442. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.23.010178.002205>.
- García-Ortiz, N. (2012). Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *Lepidiotum* en atmósferas oxidantes. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- García-Ortiz, N., Tlecuitl-Beristain, S., Favela-Torres, E., y Loera, O. (2015). Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6): 2783-2791. DOI: 10.1007/s00253-014-6225-2.
- García-Ortiz, N., Figueroa-Martínez, F.J., Carrasco-Navarro, U., Favela-Torres, E., y Loera, O. (2018). The oxygen concentration in cultures modulates protein expression and enzymatic antioxidant responses in *Metarhizium lepidiotae* conidia. *Fungal biology*, 122(6): 487-496. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.013>.
- Garza-López, P.M., Konigsberg, M., Gómez-Quiroz, L.E., y Loera, O. (2012). Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 353-359. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0827-y>.
- Glare, T. R. (2004). Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. Pág. 79-90.

- Hallsworth, J.E., y Magan, N. (1995). Manipulation of intracellular glicerol and erythritol enhances germination of conidia at low water availability. *Microbiology*, 141:1109–1115. DOI: 10.1099/13500872-141-5-1109.
- Hagiwara, D., Takahashi, H., Kusuya, Y., Kawamoto, S., Kamei, K., y Gonoï, T. (2016). Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics*, 17: 358. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2689-z>.
- Ibrahim, L., y Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 106: 705–715. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006044>.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., y Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing. Pág. 23–69. DOI: 10.1079/9780851993560.0023.
- Jenkins, N. E., y D. Grzywacz. (2003). Towards the standardization of quality control of fungal and viral biological control agents. *Quality control and production of biological control agents: theory and testing procedures*. CABI Publishing. Pág. 247-263.
- Jennings, A.A., y Li, Z. (2014). Scope of the worldwide effort to regulate pesticide contamination in surface soils. *Journal of Environmental Management*, 146: 420–443. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.020>.
- Kalia, A., y Mudhar, R. K. (2011). *Biological Control of Pests. Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Springer Berlin Heidelberg. Pág. 223-240.
- Kamel, F. (2013). Paths from pesticides to Parkinson's. *Science*, 341: 722–723. <https://doi.org/10.1126/science.1243619>.
- Kamp, A. M., y Bidochka, M. J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*, 35(1): 74-77. DOI: 10.1046/j.1472-765X.2002.01128.x.
- Krijgheld, P., Bleichrodt, R.V., Van Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J., y Wösten, H.A.B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74: 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., y Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological control*, 21(3): 230-248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>.

- Lacey, L. A., y Kaya, H. K. (2007). Field manual of techniques in invertebrate pathology. Springer Netherlands. Pág. 3-7.
- Lai, T., y Su, J. (2011). Assessment of resistance risk in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole. *Pest Management Science*, 67: 1468–1472. <https://doi.org/10.1002/ps.2201>.
- Lamarre, C., Sokol, S., Debeaupuis, J.P., Henry, C., Lacroix, C., Glaser, P., y Latgé, J.P. (2008). Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics*, 9: 417. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-417>.
- Leppla, N.C. (1984). Systems management of insect population suppression programs based on mass production of biological control organisms. *Advances and Challenges in Insect Rearing*. Agricultural Research Service, USDA. Pág. 292–294 <https://doi.org/10.5962/bhl.title.149349>.
- López-Lastra, C. C., Hajek, A. E., y Humber, R. A. (2002). Comparación de Métodos de preservación de cultivos de hongo entomopatógenos. *Canadian Journal of Botany*. 80:1126-1130.
- Marschall, R., y Tudzynski, P. (2016). Reactive oxygen species in development and infection processes. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 57: 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2016.03.020>.
- Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T.S., Moreno-Medina, V.R., Hernández-Delgado, S., y Mayek-Pérez, N. (2016). Biochemical basis of tolerance to osmotic stress in phytopathogenic fungus: The case of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Revista Argentina de Microbiología*, 48: 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.004>.
- Mascarin, G. M., Alves, S. B., y Lopes, R. B. (2010). Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(4): 753-761. DOI: 10.1590/S1516-89132010000400002.
- Melzer, M. J., y Bidochka, M. J. (1998). Diversity of double-stranded RNA viruses within populations of entomopathogenic fungi and potential implications for fungal growth and virulence. *Mycologia*, 90(4): 586-594. <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026947>.
- Miranda, R.U., Gómez-Quiroz, L.E., Mejía, A., y Barrios-González, J. (2013). Oxidative state in idiophase links reactive oxygen species (ROS) and lovastatin biosynthesis: differences and similarities in submerged-and solid-state fermentations. *Fungal biology*, 117(2): 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2012.12.001>.

- Miranda-Hernández, F., Garza-López, P.M., y Loera, O. (2016). Cellular signalling in cross protection: An alternative to improve mycopesticides. *Biological Control*, 103: 196-203. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.007>.
- Miranda-Hernández, F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., y Loera, O. (2014). Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest management science*, 70: 661-666. DOI: 10.1002/ps.3605.
- Moreira, F. (2012). Manual de biología de suelos tropicales. Instituto Nacional de Ecología. Pág. 287-289.
- Motta-Delgado, P. A., y Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua-An Interdisciplinary Journal of Applied Science*, 6(2): 77-90. DOI:10.4136/1980-993X.
- Muñiz-Paredes, F., Garza-López, P. M., Viniegra-González, G., y Loera, O. (2016). Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(7): 1-11. DOI 10.1007/s11274-016-2072-x.
- Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., y Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3): 57. DOI 10.1007/s11274-017-2229-2.
- Mysyakina, I.S., Kochkina, G.A., Ivanushkina, N.E., Bokareva, D.A., y Feofilova, E.P. (2016). Germination of spores of mycelial fungi in relation to exogenous dormancy. *Microbiology*, 85: 290–294. <https://doi.org/10.1134/S0026261716030085>.
- Nandakumar, M. P., y Marten, M. R. (2002). Comparison of lysis methods and preparation protocols for one-and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis*, 23(14): 2216. DOI: 10.1002/15222683(200207)23:14<2216::AIDELPS2216>3.0.CO;2-Y.
- Ni, M., y Yu, J.H., 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One*, 2: e970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000970>.
- Novodvorska, M., Stratford, M., Blythe, M.J., Wilson, R., Beniston, R.G., y Archer, D.B. (2016). Metabolic activity in dormant conidia of *Aspergillus niger* and developmental changes during conidial outgrowth. *Fungal Genetics and Biology*, 94, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.002>.

- Nuñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., y Loera, O. (2010). Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 771–777. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400004>.
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., y Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(3): 1057-1068. DOI: 10.1007/s00253-014-6270-x.
- Pérez-Guzmán, D., Montesinos-Matías, R., Arce-Cervantes, O., Gómez-Quiroz, L.E., y Loera, O., y Garza-López, P.M. (2016). Reactive oxygen species production, induced by atmospheric modification alter conidial quality of *Beauveria bassiana*. *Journal of Applied Microbiology* 121: 453-460. <https://doi.org/10.1111/jam.13156>.
- Pócsi, I., Prade, R.A., y Penninckx, M.J. (2004). Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in microbial physiology*, 49(1.76).
- Posada, F. J., y Vega, F. E. (2005). A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *Journal of insect science*, 5(1): 37. DOI: 10.1093/jis/5.1.37.
- Rangel, D. E. (2011). Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(6): 1281-1296. DOI: 10.1007/s11274-010-0584-3.
- Rangel, D. E., Anderson, A. J., y Roberts, D. W. (2008). Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycological research*, 112(11): 1362-1372. DOI: 10.1016/j.mycres.2008.04.013.
- Rangel, D. E., Braga, G. U., Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Hallsworth, J. E., y Roberts, D. W. (2015). Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Current genetics*, 1-22. DOI: 10.1007/s00294-015-0477-y.
- Ravensberg, W. J. (2011). Selection of a microbial pest control agent. In *A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods*. Springer Netherlands. Pág. 23-57.
- Rechcigl, J. E., y Rechcigl, N. A. (2000). *Biological and biotechnological control of insect pests*. CRC Press.

- Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., y Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3): 513-518. DOI: 10.1007/s11274-008-9917-x.
- Salas-Silva, E.S., Simoni-Nieves, A., Miranda-Labra, R.U. y Gómez-Quiroz, L.E. (2017). Fundamentos de la señalización redox: Lecciones de los sistemas generadores de especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico*, 41 (2017): 108 – 115.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulphide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, 30: 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4).
- Sewall, T.C., Mims, C.W., Timberlake, W.E. (1990). Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (wetA) mutant strains. *Developmental Biology*, 138: 499–508. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90215-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90215-5).
- Shan, L. T., Wang, Z. L., Ying, S. H., y Feng, M. G. (2010). Hydrophobicity-related protein contents and surface areas of aerial conidia are useful traits for formulation design of fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*, 169(6): 483-494. DOI: 10.1007/s11046-010-9283-8.
- Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R. C., y Ward, O. P. (2011). Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol in soil Biology. *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Springer Berlin. Pág. 1-23. DOI: 10.1007/978-3-642-19769-7_1.
- Smalling, K.L., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Siegler, K., Hunt, J.W., y Hamilton, M. (2013). Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. *Marine Pollution Bulletin*, 73: 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.028>.
- Stade, S., y Brambl, R. (1981). Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. *Journal of Bacteriology*, 147: 757–767. PMID: 6268605 PMCID:pmc216111.
- Suh, M.J., Fedorova, N.D., Cagas, S.E., Hastings, S., Fleischmann, R.D., Peterson, S.N., Perlin, D.S., Nierman, W.C., Pieper, R., y Momany, M. (2012). Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. *Proteome Science*, 10: 30. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-30>.

- Tarocco, F., Lecuona, R. E., Couto, A. S., y Arcas, J. A. (2005). Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(4): 481-488. DOI: 10.1007/s00253-005-1901-x.
- Taubitz, A., Bauer, B., Heesemann, J., y Ebel, F. (2007). Role of respiration in the germination process of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Current Microbiology*, 54: 354–360. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0413-y>.
- Téllez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., y Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30: 73-80.
- Teutschbein, J., Albrecht, D., Pötsch, M., Guthke, R., Amanianda, V., Clavaud, C., Latgé, J.P., Brakhage, A.A., y Kniemeyer, O. (2010). Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Proteome Research*, 9: 3427–3442. <https://doi.org/10.1021/pr9010684>.
- Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., y Loera, O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*, 169(5): 387-394. DOI: 10.1007/s11046-009-9268-7.
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C.J., Kuča, K. y Musilek, K. (2016). Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology*, 90(1): 1-37.
- Van Leeuwen, M.R., Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., Wösten, H.A.B., y Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74: 59–70. <https://doi.org/10.3114/sim0009>.
- Van Leeuwen, M.R., Van Doorn, T.M., Golovina, E.A., Stark, J., y Dijksterhuis, J. (2010). Water- and air-distributed conidia differ in sterol content and cytoplasmic microviscosity. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 366–369. <https://doi.org/10.1128/AEM.01632-09>.
- Vandenberg, J. D., y Cantone, F. A. (2004). Effect of serial transfer of three strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on growth in vitro, virulence, and host specificity. *Journal of invertebrate pathology*, 85(1): 40-45. DOI: 10.1016/j.jip.2003.12.004.
- Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N., Monzon, A., Ownley B. H., Pell J. K., Rangeli, D., y Roy, H. E. (2009). Fungal

entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal ecology*, 2: 149-159. DOI: 10.1016/j.funeco.2009.05.001.

- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.-I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W., y Talalay, P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 2040-2045. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307301101>.
- Wang, C., Butt, T.M., y St Leger, R.J. (2005). Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. *Microbiology* 151: 3223-3236. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28148-0>.
- Wraight, S. P., Inglis G. D., y Goettel, M. S. (2007). *Fungi. Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Springer Netherlands. Pág. 223-248.
- Wyatt, T.T., Wösten, H.A., y Dijksterhuis, J. (2013). Fungal spores for dispersion in space and time. *Advances in Applied Microbiology*. 85: 43–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00002-2>.
- Zivin, J.A., y Bartko, J.J. (1976). Statistics for disinterested scientists. *Life Sciences*. 18: 15–26. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(76\)90268-x](https://doi.org/10.1016/0024-3205(76)90268-x).

13. ANEXOS

13.1 Determinación del Índice de conidiación (*Ic*).

El primer paso para realizar la determinación del índice de conidiación (*Ic*) es que una vez conocida la concentración de las suspensiones de conidios para los inóculos, en unidades de conidios por volumen de Tween 80 (con/mL), ésta concentración debe transformarse a unidades de área (con/cm²). Para ello se hicieron las determinaciones siguientes:

- I. Se determinó el área superficial en las botellas serológicas utilizadas como unidades experimentales (UE), cuya base es circular. Por lo tanto, se utilizó la ecuación para determinar el área de un círculo: $A = \pi r^2$, en donde A es el área circular a determinar; $\pi = 3.14159...$ (Constante matemática); y r = radio.

Las UE tienen un radio de 2.35 cm, por lo tanto el área superficial del medio sobre el cual se colocan los inóculos corresponde a:

$$A = \pi (2.53)^2 = 17.349 \text{ cm}^2$$

- II. Por otra parte, las suspensiones iniciales de conidios tienen una concentración teórica de 1×10^8 con/mL, de éstas se toman como inóculo solamente 100 μL de la suspensión. Esto equivale a:

$$100 \mu\text{L} (1 \times 10^8 \text{ con}/1000 \mu\text{L}) = 1 \times 10^7 \text{ conidios.}$$

- III. Por lo tanto 1×10^7 conidios son inoculados en 17.349 cm^2 . Así,

$$1 \times 10^7 \text{ conidios} / 17.349 \text{ cm}^2 = 5.76 \times 10^5 \text{ con}/\text{cm}^2$$

Este valor corresponde a la concentración inicial (*Ci*) en la ecuación utilizada para el cálculo del *Ic*.

En la tabla 1 se presentan los datos de las suspensiones de conidios realizadas para el experimento 1. Se muestra la concentración de cada una de ellas en con/ml y su transformación a con/cm².

Tabla 13.1 Concentración de las suspensiones de conidios para los inóculos del experimento 1.

Hongo	Concentración de la suspensión (con/mL)	Concentración del inóculo o Ci (con/cm ²)
<i>M. robertsii</i> Xoc8.1	1.05 x 10 ⁸	6.05 x 10 ⁵
<i>B. bassiana</i> Tac1.1 (A)	1.25 x 10 ⁸	7.21 x 10 ⁵
<i>B. bassiana</i> Tac1.1 (B)	1.00 x 10 ⁸	5.76 x 10 ⁵
<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB303	1.08 x 10 ⁸	6.20 x 10 ⁵
<i>C. fumosorosea</i> ARSEF3302	1.05 x 10 ⁸	6.05 x 10 ⁵

A: Corresponde a cuando los pulsos iniciales se realizaron a las 120 y 144 h de cultivo. B: Corresponde a cuando los pulsos iniciales se realizaron a las 240 y 312 h de cultivo.

Con los datos de concentración del inóculo y los valores de concentración de conidios (C) en cada tiempo de conteo (ya en unidades de con/cm²), se procedió a determinar los *Ic* con la ecuación $Ic = C/Ci$. En las tablas 2 a 6 se presentan los resultados obtenidos en ambas condiciones atmosféricas de estudio (21 vs. 26 o 30% de O₂).

Ejemplo de cálculo

Por ejemplo, si se considera la réplica # 2 de las 240 h de cultivo (tabla 2), en las condiciones con 21% de O₂, el valor de producción fue de 6.63 x 10⁷con/cm². Por lo tanto, la ecuación $Ic = C/Ci$ queda:

$$Ic = 6.63 \times 10^7 \text{ con/com}^2 / 6.05 \times 10^5 \text{ con/com}^2 = \mathbf{109.52}$$

Tabla 13.2 Determinación de los I_c de *M. robertsii* Xoch8.1 para el experimento 1.

# de Réplica	Tiempo (h)	Concentración (C) en 21% de O ₂ (con/cm ²)	Concentración (C) en 30% de O ₂ (con/cm ²)	$I_{C_{21\%}}$	$I_{C_{30\%}}$
Ci**	0	6.05E+05	6.05E+05	1.00	1.00
1	120	8.07E+07		133.33	0.00
2	120	8.36E+07		138.10	0.00
3	120	7.49E+07		123.81	0.00
1	144	1.67E+08	6.34E+07	276.19	104.76
2	144	1.73E+08	5.76E+07	285.71	95.24
3	144	1.61E+08	4.90E+07	266.67	80.95
1	168	1.35E+08	9.80E+07	223.81	161.90
2	168	1.24E+08	7.78E+07	204.76	128.57
3	168	1.44E+08	1.24E+08	238.10	204.76
1	216	1.01E+08	4.47E+08	166.67	738.10
2	216	1.76E+08	1.53E+08	290.48	252.38
3	216	1.82E+08	1.64E+08	300.00	271.43
1	240	3.46E+07	9.80E+07	57.14	161.90
2	240	6.63E+07	7.78E+07	109.52	128.57
3	240	4.32E+07	1.24E+08	71.43	204.76

**Para ambas condiciones atmosféricas (21% vs. 30% de O₂) el valor de Ci es el mismo ya que se parte de la misma suspensión de conidios. A las 120 h de cultivo fue cuando se inició el pulso oxidante, por esa razón no hay datos para las condiciones con 30% de O₂.

Tabla 13.3 Determinación de los I_c de *B. bassiana* Tac1.1 para el experimento 1 (cuando los pulsos iniciales se realizaron a las 120 y 144 h de cultivo).

# de Réplica	Tiempo (h)	Producción (C) en 21% de O ₂ (con/cm ²)	Producción (C) en 26% de O ₂ (con/cm ²)	$I_{C21\%}$	$I_{C26\%}$
Ci**	0	7.21E+05	7.21E+05	1.00	1.00
1	120	1.73E+08		240.00	0.00
2	120	1.96E+08		272.00	0.00
3	120	1.53E+08		212.00	0.00
1	144	4.27E+08	1.96E+08	592.00	272.00
2	144	4.29E+08	1.87E+08	596.00	260.00
3	144	3.37E+08	2.22E+08	468.00	308.00
1	168	5.07E+08	6.63E+07	704.00	92.00
2	168	4.32E+08	1.30E+08	600.00	180.00
3	168	3.63E+08	1.93E+08	504.00	268.00
1	216	1.18E+08	2.08E+08	164.00	288.00
2	216	2.13E+08	1.56E+08	296.00	216.00
3	216	1.64E+08	2.16E+08	228.00	300.00
1	240	6.72E+08	1.82E+08	932.00	252.00
2	240	6.02E+08	2.68E+08	836.00	372.00
3	240	6.05E+08	3.57E+08	840.00	496.00

**Para ambas condiciones atmosféricas (21% vs. 26% de O₂) el valor de Ci es el mismo ya que se parte de la misma suspensión de conidios. A las 120 h de cultivo fue cuando se inició el pulso oxidante, por esa razón no hay datos para las condiciones con 26% de O₂.

Tabla 13.4 Determinación de los I_c de *B. bassiana* Tac1.1 para el experimento 1 (cuando los pulsos iniciales se realizaron a las 240 y 312 h de cultivo).

# de Réplica	Tiempo (h)	Producción (C) en 21% de O ₂ (con/cm ²)	Producción (C) en 26% de O ₂ (con/cm ²)	$I_{C21\%}$	$I_{C26\%}$
Ci**	0	5.76E+05	5.76E+05	1.00	1.00
1	240	1.79E+08		310.00	0.00
2	240	1.61E+08		280.00	0.00
3	240	1.44E+08		250.00	0.00
1	264	4.44E+08	3.72E+08	770.00	645.00
2	264	3.00E+08	3.92E+08	520.00	680.00
3	264	3.14E+08	4.35E+08	545.00	755.00
1	312	1.73E+08		300.00	0.00
2	312	1.93E+08		335.00	0.00
3	312	3.54E+08		615.00	0.00
1	336	3.20E+08	2.28E+08	555.00	395.00
2	336	2.16E+08	2.39E+08	375.00	415.00
3	336	2.54E+08	2.08E+08	440.00	360.00
1	336	2.10E+08	2.71E+08	365.00	470.00
2	336	1.82E+08	1.87E+08	315.00	325.00
3	336	1.64E+08	2.56E+08	285.00	445.00
1	408	1.50E+08	1.30E+08	260.00	225.00
2	408	1.64E+08	1.27E+08	285.00	220.00
3	408	1.24E+08	1.41E+08	215.00	245.00

**Para ambas condiciones atmosféricas (21% vs. 26% de O₂) el valor de C_i es el mismo ya que se parte de la misma suspensión de conidios. A las 240 y 312 h de cultivo fue cuando se inició el pulso oxidante, por esa razón no hay datos para las condiciones con 26% de O₂.

Tabla 13.5 Determinación de los I_c de *C. javanica* CHE-CNRCB303 para el experimento 1 (cuando los pulsos iniciales se realizaron a las 144 y 240 h de cultivo).

# de Réplica	Tiempo (h)	Producción (C) en 21% de O ₂ (con/cm ²)	Producción (C) en 26% de O ₂ (con/cm ²)	$I_{C21\%}$	$I_{C26\%}$
Ci**	0	6.20E+05	6.20E+05	1.00	1.00
1	144	1.76E+08		283.72	0.00
2	144	2.02E+08		325.58	0.00
3	144	2.16E+08		348.84	0.00
1	168	2.74E+08	2.71E+08	441.86	437.21
2	168	2.77E+08	2.94E+08	446.51	474.42
3	168	3.00E+08	3.08E+08	483.72	497.67
1	240	2.19E+08	1.99E+08	353.49	320.93
2	240	2.10E+08	1.79E+08	339.53	288.37
3	240	1.70E+08	2.02E+08	274.42	325.58
1	264	1.33E+08	1.30E+08	213.95	209.30
2	264	1.24E+08	1.15E+08	200.00	186.05
3	264	1.64E+08	1.87E+08	265.12	302.33
1	336	1.30E+08	1.33E+08	209.30	213.95
2	336	1.56E+08	1.21E+08	251.16	195.35
3	336	1.76E+08	1.27E+08	283.72	204.65

**Para ambas condiciones atmosféricas (21% vs. 26% de O₂) el valor de Ci es el mismo ya que se parte de la misma suspensión de conidios. A las 144 h de cultivo fue cuando se inició el pulso oxidante, por esa razón no hay datos para las condiciones con 26% de O₂.

Tabla 13.6 Determinación de los I_c de *C. fumosorosea* ARSEF3302 para el experimento 1 (cuando los pulsos iniciales se realizaron a las 144 y 240 h de cultivo).

# de Réplica	Tiempo (h)	Producción (C) en 21% de O ₂ (con/cm ²)	Producción (C) en 26% de O ₂ (con/cm ²)	$I_{c21\%}$	$I_{c26\%}$
Ci**	0	6.05E+05	6.05E+05	1.00	1.00
1	144	6.34E+07		104.76	0.00
2	144	6.34E+07		104.76	0.00
3	144	6.92E+07		114.29	0.00
1	168	9.22E+07	7.21E+07	152.38	119.05
2	168	9.22E+07	8.07E+07	152.38	133.33
3	168	8.65E+07	7.21E+07	142.86	119.05
1	240	1.15E+08	1.47E+08	190.48	242.86
2	240	1.15E+08	1.21E+08	190.48	200.00
3	240	1.12E+08	1.07E+08	185.71	176.19
1	264	1.01E+08	6.92E+07	166.67	114.29
2	264	9.22E+07	5.76E+07	152.38	95.24
3	264	8.07E+07	6.92E+07	133.33	114.29
1	336	6.34E+07	6.34E+07	104.76	104.76
2	336	7.49E+07	6.63E+07	123.81	109.52
3	336	5.76E+07	8.65E+07	95.24	142.86

**Para ambas condiciones atmosféricas (21% vs. 26% de O₂) el valor de Ci es el mismo ya que se parte de la misma suspensión de conidios. A las 144 h de cultivo fue cuando se inició el pulso oxidante, por esa razón no hay datos para las condiciones con 26% de O₂.

13.2 Cromatogramas obtenidos para la medición de del nivel de glutatión oxidado y reducido en las muestras.

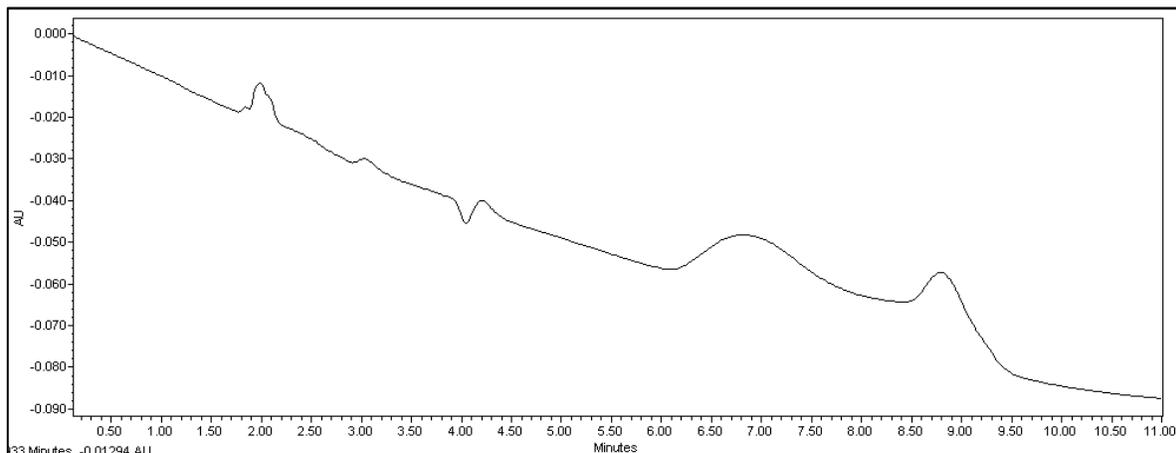


Figura 12.1 Cromatograma obtenido con el PBS. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH_2PO_4 (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

Método de lisis a)

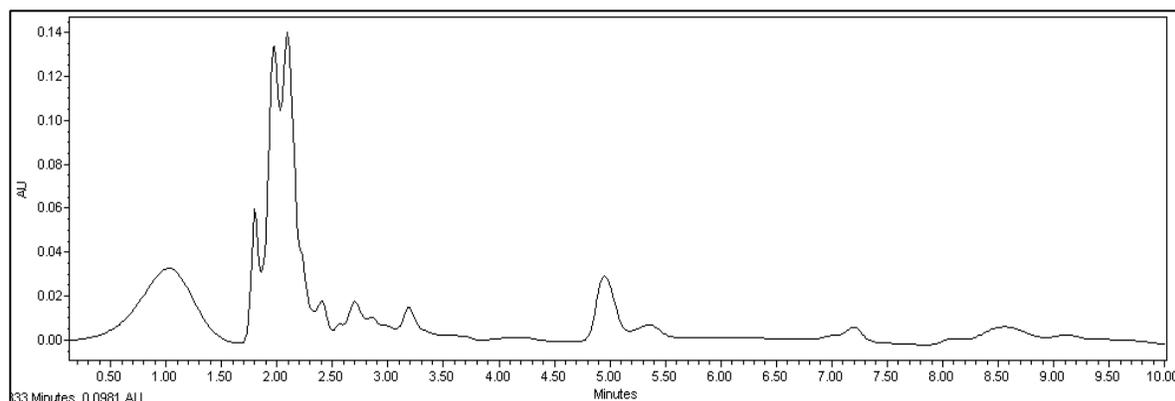


Figura 12.2 Cromatograma obtenido con los conidios control (21% de O_2) de *M. robertsii* Xoch 8.1, en la respuesta a corto plazo, para la determinación de glutatión oxidado y reducido. Método de lisis a). Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH_2PO_4 (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

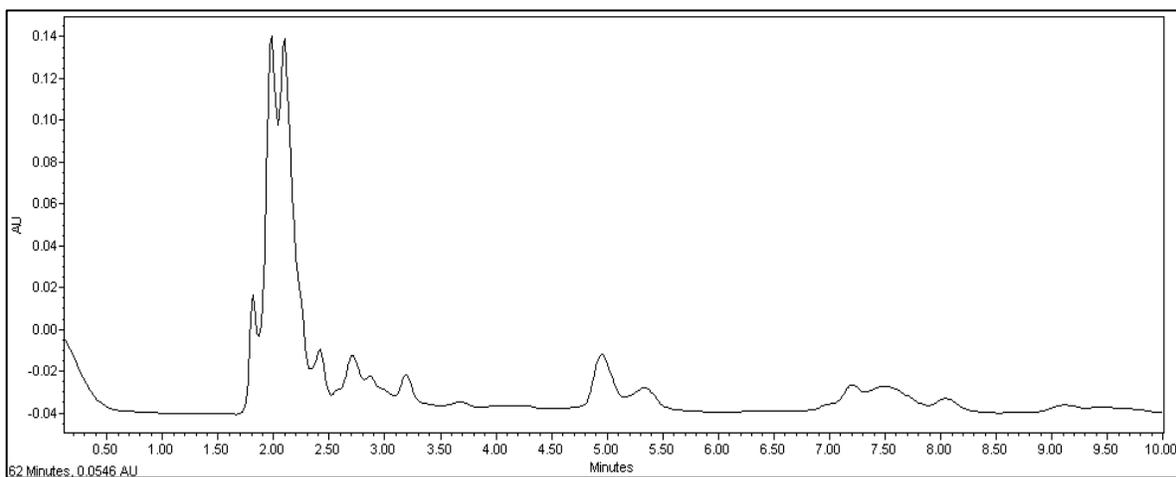


Figura 12.3 Cromatograma obtenido con los conidios sometidos a pulsos oxidantes (26% de O_2) de *M. robertsii* Xoch8.1, en la respuesta a corto plazo, para la determinación de glutatión oxidado y reducido. Método de lisis a). Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH_2PO_4 (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

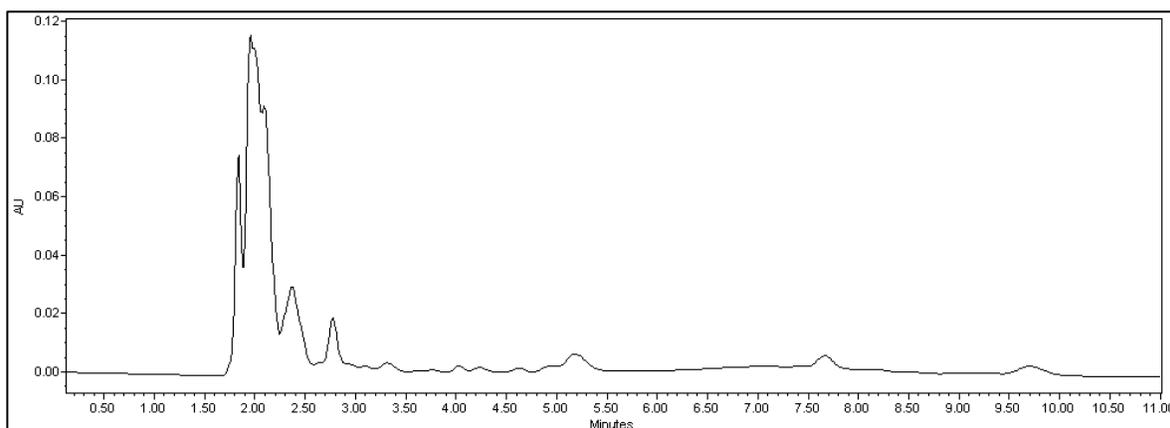


Figura 12.4 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios control (21% de O_2) de *B. bassiana* Tac1.1. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH_2PO_4 (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

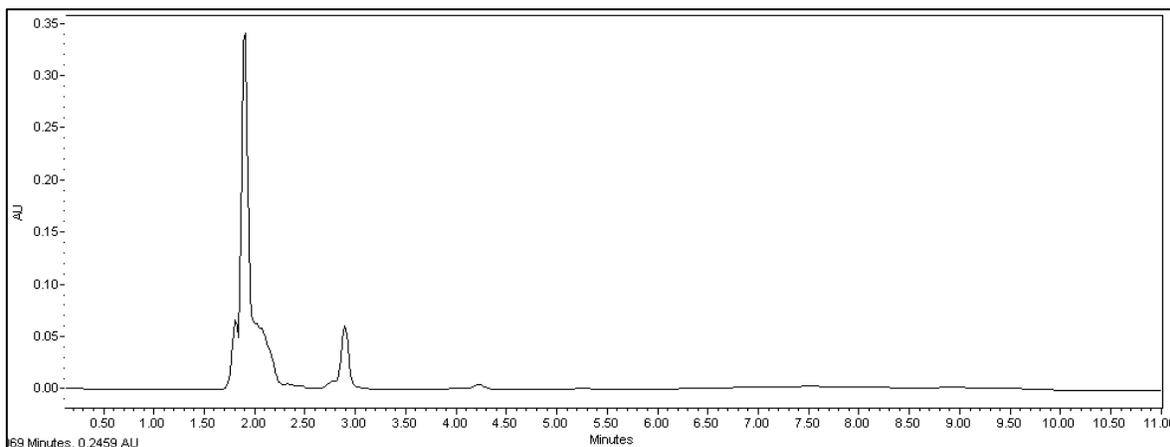


Figura 12.5 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios control (21% de O_2) de *C. javanica* CHE-CNRCB303. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH_2PO_4 (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

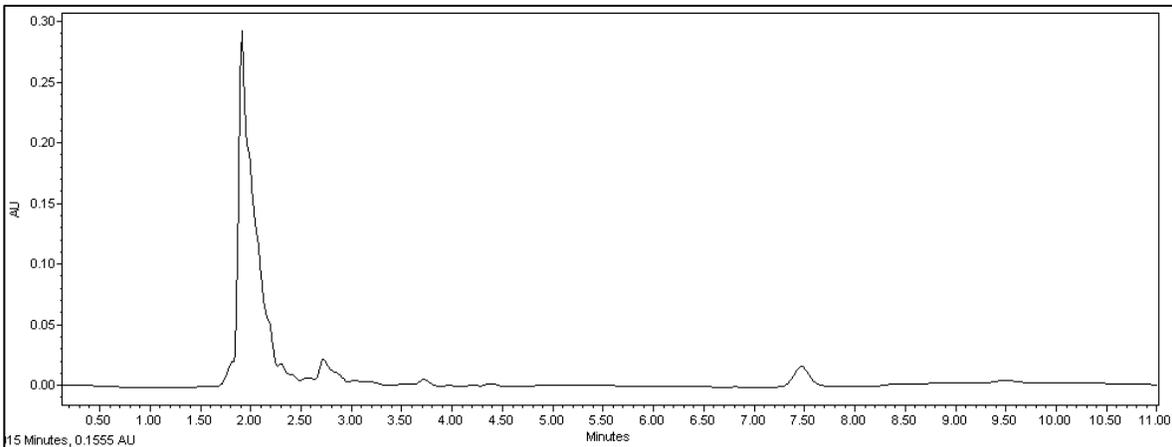


Figura 12.6 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios control (21% de O₂) de *C. fumosorosea* ARSEF3302. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH₂PO₄ (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

Método de lisis b)

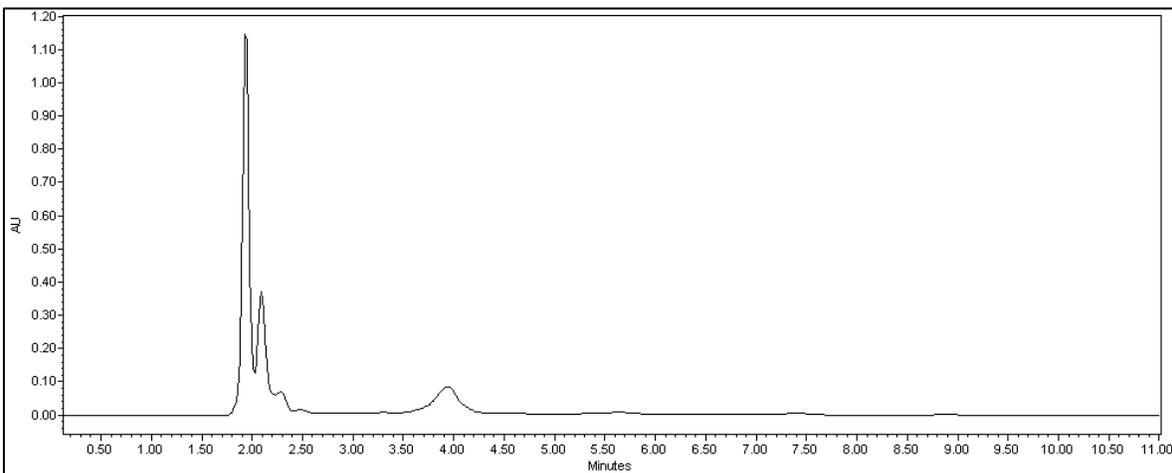


Figura 12.7 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios control (21% de O₂) de *M. robertsii* Xoch8.1. Rompimiento de conidios con N₂ líquido. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH₂PO₄ (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

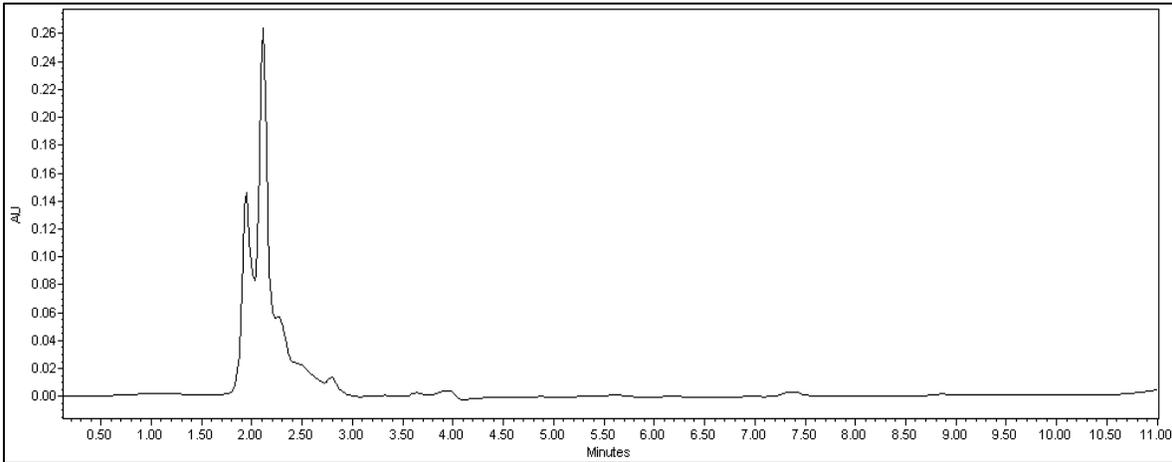


Figura 12.8 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios sometidos a un pulso oxidante (26% de O₂) de *M. robertsii* Xoch8.1. Rompimiento de conidios con N₂ líquido. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH₂PO₄ (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

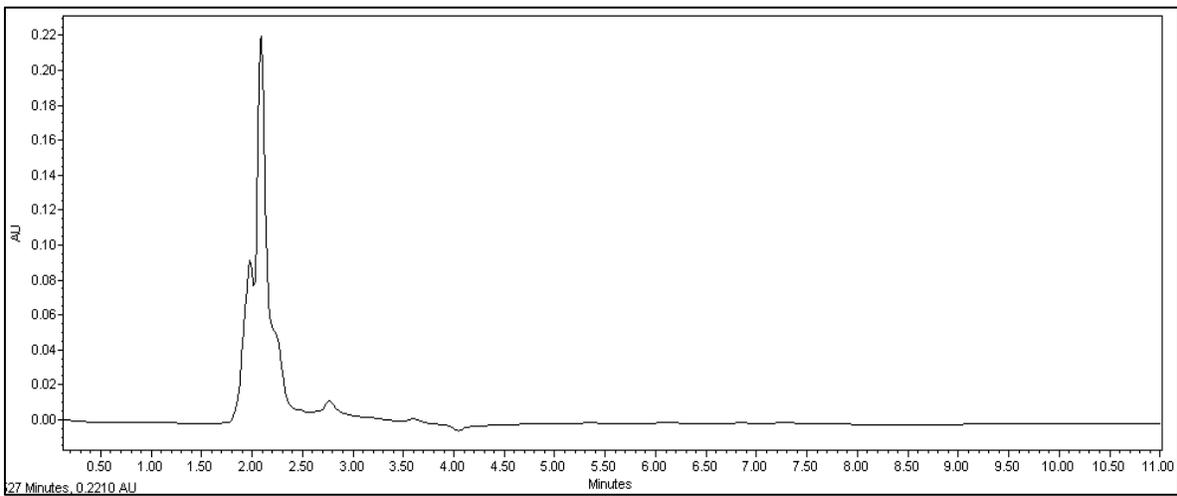


Figura 12.9 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios control (21% de O₂) de *B. bassiana* Tac1.1. Rompimiento de conidios con N₂ líquido. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH₂PO₄ (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

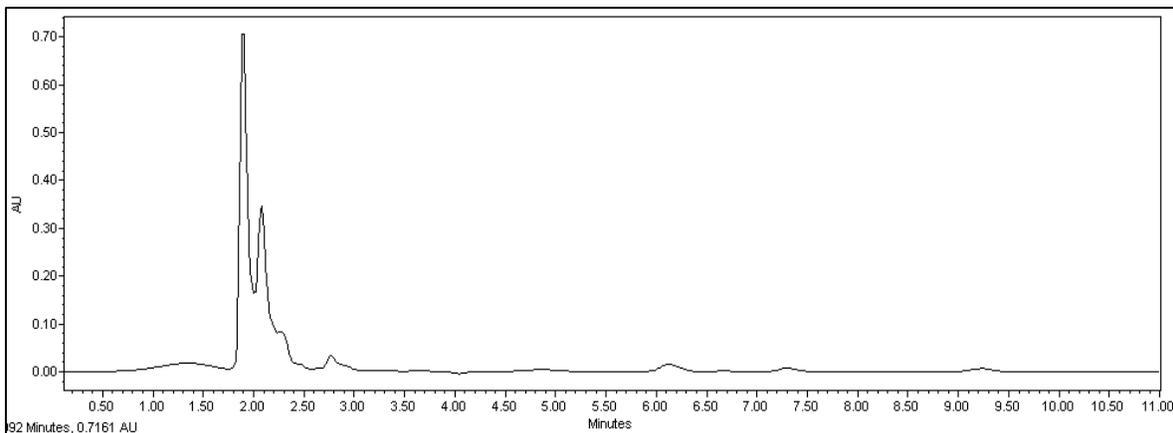


Figura 12.10 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios control (21% de O₂) de *C. javanica* CHE-CNRCB303. Rompimiento de conidios con N₂ líquido. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH₂PO₄ (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

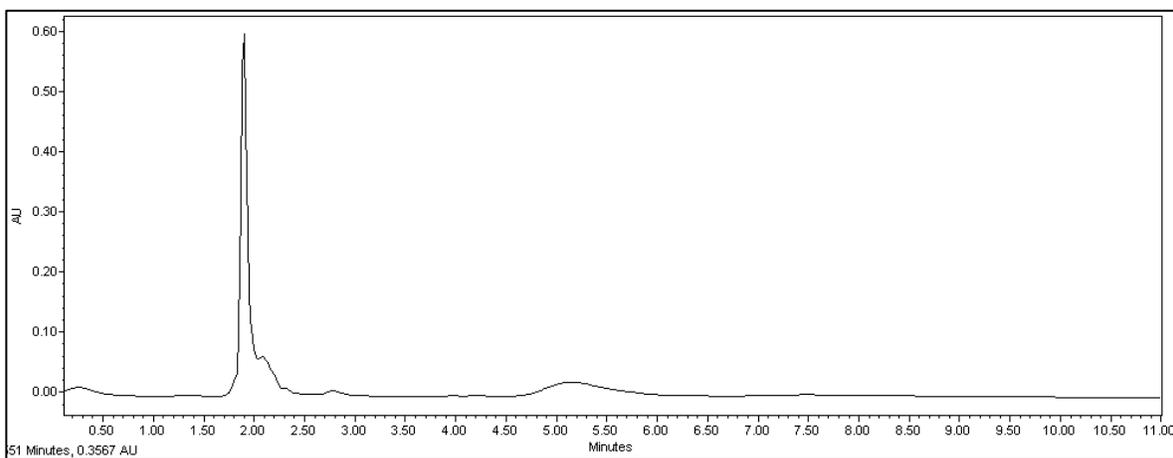


Figura 12.11 Cromatograma obtenido con la muestra de conidios control (21% de O₂) de *C. fumosorosea* ARSEF3302. Rompimiento de conidios con N₂ líquido. Columna Hydro-RP (150 mm x 4.6 mm). Fase móvil acetonitrilo: KH₂PO₄ (1:99). Detector de Arreglo de Diodos, lectura a 210 nm.

13.3 Resultados de la determinación del a_w de los medios utilizados para realizar las pruebas de resistencia a estrés osmótico (V_o y G_o).

La determinación de la resistencia a estrés osmótico se realizó por dos métodos: 1. Por conteo de UFC (V_o) utilizando el medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS). 2. En términos de germinación (G_o) usando el medio Agar-agua 1.5%. Ambos medios fueron adicionados con NaCl hasta tener una concentración final de 0.5 M. En la tabla 7 se pueden ver los resultados que se obtuvieron de la medición de actividad de agua (a_w) de los medios solos y de los medios adicionados con la sal. Se utilizó agua destilada como calibrador del equipo de medición (AQUALAB CX-2).

Tabla 12.7. Determinación del a_w de los medios de cultivo usados para determinar la resistencia a estrés osmótico.

Muestra	Réplica	a_w	Promedio	Desviación estándar
Agua destilada	1	1.0004	1.00	0.001
	2	0.9977		
	3	0.9986		
ADS sólo	1	0.9953	0.99	0.003
	2	0.9967		
	3	0.9904		
ADS/NaCl	1	0.9791	0.98	0.001
	2	0.9768		
	3	0.9788		
Agar-agua sólo	1	1.002	1.00	0.001
	2	1.003		
	3	1.0004		
Agar-agua/NaCl	1	0.9581	0.96	0.001
	2	0.961		
	3	0.9597		

13.4 Artículo



Free conidia of entomopathogenic fungi modify quality traits by changing glutathione levels after an oxidant stimulus

José Miguel Castillo-Minjarez^a, Paul Misael Garza-López^b, Javier Barrios-González^a, Octavio Loera^{a,*}

^a Universidad Autónoma Metropolitana-Istapalapa, Departamento de Biotecnología, San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, C. P. 09340 México D.F., México

^b Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Conidia quality
Dormant conidia
Glutathione
Cross protection
Stress

ABSTRACT

Adverse environmental conditions (e.g. high temperature, high osmotic pressure, atmospheric changes, solar radiation, etc.) reduce the efficacy of conidia from entomopathogenic fungi used for biological control. Strategies to improve the quality traits of conidia include the introduction of sub-lethal stress treatments applied to fungal mycelium, which can improve the resistance of generated conidia to several stress factors. This work presents for the first time evidence that free conidia of *Metarhizium robertsii* Xoch8.1, *Beauveria bassiana* Tac1.1 and *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303, subjected directly to oxidant pulses (26% O₂), had increased osmotic stress resistance compared to control conidia (maintained at 21% O₂). In addition, germination and thermotolerance improved in conidia of *M. robertsii* Xoch8.1 and *B. bassiana* Tac1.1. Only one pulse was enough to observe these positive effects on the stress tolerance of the free conidia. However, the *Cordyceps* genus showed an extreme sensitivity to the treatment, since the quality diminished for *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302, and in the case of *C. javanica* CHE-CNRCB303 the treatment affected those tolerance features. In addition, changes in the level of glutathione in the conidia indicated that the treatment could generate oxidative stress, which affects quality. In conclusion, despite the low metabolic activity in free conidia in a latency state, these responded to 26% O₂ pulses, modifying quality traits and in some cases, inducing cross protection in a species-dependent response. The information of this research could be tested in harvested conidia used in the preparation of formulations for biological control.

1. Introduction

The use of biopesticides has increased in agricultural production, which has helped to mitigate some of the problems that have arisen from over use of chemical pesticides (Duc et al., 2015; Miranda-Hernández et al., 2016). These include damage to human health (Allen and Levy, 2013; Kamel, 2013) and the environment (Jennings and Li, 2014; Smalling et al., 2013), and the development of resistance (Lai and Su, 2011). Conidia of entomopathogenic fungi have been formulated in several commercial biopesticide products, since they naturally infect insects (Motta-Delgado and Murcia-Ordoñez, 2011; Rechcigl and Rechcigl, 1999; Singh et al., 2011). However, there are difficulties in the application of these biopesticides, since adverse environmental conditions affect the efficacy; these include high temperatures, solar radiation (Inglis et al., 2001; Lacey et al., 2001), hypersaline and water deficient environments that cause osmotic stress (Martínez-Villarreal

et al., 2016). In addition, defense mechanisms of insects include behavioral responses that increase body temperature, grooming and production of reactive oxygen species (ROS), all of which can prevent infection (Inglis et al., 2001; Miranda-Hernández et al., 2016; Ortiz-Urquiza et al., 2015; Vega et al., 2009).

The quality of a biological control agent can be defined as the ability to function as intended after release in the field (Leppä, 1984). In the case of entomopathogenic fungi, the factors that affect the quality must be identified, as the quality traits in the conidia to persist in the field. Aspects related to the sensitivity of conidia to adverse biotic and abiotic factors are as important as efficient production and high virulence, since those traits determine persistence in the environment (Posada and Vega, 2005; Ravensberg, 2011). Hence, there is an outstanding interest in finding treatments that improve the quality traits of entomopathogenic fungal conidia, especially those amenable to mass production. In this sense, the physical, chemical and nutritional

Abbreviations: 21%, Normal or control atmosphere; 26%, Oxygen-enriched atmosphere; Bb, *B. bassiana* Tac1.1; Cf, *C. fumosorosea* ARSEF3302; Cj, *C. javanica* CHE-CNRCB303; G, Germination; Mr, *M. robertsii* Xoch8.1; OS, Resistance to osmotic stress; TS, Resistance to thermic stress

* Corresponding author.

E-mail address: loera@xanum.uam.mx (O. Loera).

<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104011>

Received 26 May 2018; Received in revised form 8 June 2019; Accepted 17 June 2019

Available online 18 June 2019

1049-9644/ © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

conditions imposed during growth of fungi affect virulence against insects, thermotolerance and resistance to UV-B radiation, etc. (Muñiz-Paredes et al., 2016; Rangel et al., 2015). Similarly, by subjecting the mycelium to a sub-lethal stress the conidia generated may acquire resistance, not only against this stress factor, but also against other kinds of stress factors, a phenomenon called “cross protection” (Miranda-Hernández et al., 2016; Rangel, 2011). Some investigations have shown improvements in quality traits and/or production of conidia when mycelia were treated with atmospheric pulses enriched in oxygen. Tlecuít-Beristain et al. (2010) observed that gaseous pulses comprising 26% oxygen enhanced the conidiation of *Metarhizium lepidiotae*. García-Ortiz et al. (2015), studying the same entomopathogenic fungus, found that pulses up to 30% oxygen increased production of conidia and their thermotolerance, although there was a critical exposure period during which mycelia were responsive to those stimuli. Miranda-Hernández et al. (2014), working with *Isaria fumosorosea* ARSEF3302 and *Isaria javanica* CHE-CNRCB303 (before *I. fumosorosea* CNRCB1) and now reclassified as *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302 and *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 (Kepler et al., 2017), determined that oxidant pulses increased the quality traits of conidia produced by both strains. However, Garza-López et al. (2012) determined that exposure of *Beauveria bassiana* to modified oxygen atmospheres (16% and 26%) generated cellular damage. These results indicate that the treatment produces oxidative stress and that the response of entomopathogenic fungi to treatment varies by species.

On the other hand, during conidiogenesis in filamentous fungi such as *Aspergillus nidulans* there are different changes during the maturation phases of conidia, involving the activation of genes to synthesize elements of the cell wall of conidia, indicating that there is some activity in these cells (Sewall et al., 1990). In fact, the conidium has a basal metabolic activity; since it contains at least one mitochondrion and all the machinery necessary to carry out respiration (Novodvorska et al., 2016; Stade and Brambl, 1981).

Until now, effects of pulses of an oxygen-enriched atmosphere have not been studied when applied directly on free conidia. The possibility of improving quality traits of conidia using this strategy has advantages over alternative approaches such as exposure of mycelia during mass production, avoiding modifications to commercial mass production systems.

The objective of this work was to determine and compare effects of an oxygen-enriched atmosphere on quality traits of free conidia produced by different entomopathogenic fungi. Conidia responses to oxidative stress conditions are marked by variations in glutathione levels, a molecule used by cells to defend against this type of stress (Fahey et al., 1975; Marschall and Tuzdzynski, 2016). Thus, glutathione levels were determined in the conidia in every treatment.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

The strain *Cordyceps fumosorosea* ARSEF3302 was obtained from the Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF), Ithaca, New York; *Metarhizium robertsii* Xoch8.1, *Beauveria bassiana* Tac1.1 and *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB303 were obtained from National Biological Control Reference Centre, Colima, Mexico. These strains were deposited into the Culture Collection ENCB-IPN WDCM449 with the identification numbers ENCB-MG-79, ENCB-MG-80, ENCB-MG-81 and ENCB-MG-82 (*C. fumosorosea*, *C. javanica*, *M. robertsii* and *B. bassiana*, respectively).

2.2. Recovery of free conidia

The fungi were grown at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ in Petri plates as described by Tlecuít-Beristain et al. (2010) on oat flour medium containing: oat flour (Sol Campestre®, Productos del Campo, Mexico), 33.3 g/L; meat

peptone (Bioxon, Mexico), 10 g/L; and bacteriological agar (Bioxon, Mexico), 15 g/L. Twelve Petri dishes were used for each strain, which generated the batches of conidia necessary to have three independent experimental replicates. After 8–9 days, conidia were harvested without drying from each Petri dish by gently scraping the surface of the medium with a sterile metal spatula. To standardize the quantity, a volume of 0.5 mL with the freshly harvested conidia were measured in an Eppendorf tube and were transferred to serum bottles (120 mL; Distbrand, Mexico City, Mexico).

2.3. Oxygen treatment of conidia

Two treatments were tested 1) normal or control atmosphere (21% O₂) and 2) oxygen rich atmosphere (26% O₂) using a modification of the technique described by Tlecuít-Beristain et al. (2010). Briefly, for each strain studied the control (21% O₂) treatments were made as follows: six bottles containing conidia were covered with cotton caps, allowing free gaseous exchange over the experimental period. Simultaneously, another six bottles were covered with plastic stoppers and sealed with Parafilm (American Can Co., Neenah, WI). The oxidant pulses were then applied via a needle inserted through the plastic stopper and oxygen-enriched gas was injected into the bottle for 1 min (flow rate, 20 cm³/s). A second needle inserted through the stopper allowed a purge of the flowing gas during this period, thus the atmosphere was replaced in each pulse. The gas mixture used contained 26% O₂ and 74% N₂ (Praxair Mexico). This procedure was carried out once a day over four days (four oxygen-enriched pulses). These trials were carried out at room temperature ($25 \pm 6^\circ\text{C}$).

2.4. Evaluation of effects oxygen-enriched pulses in conidia

Conidia were sampled for analysis 24 and 96 h after the pulses began; the 24 h samples only were exposed to a single pulse, and the 96 h samples were subjected to four pulses; three bottles per fungal species were taken from each experimental treatment. Twenty milliliters of cold phosphate-buffered saline (pH 7.0, 100 mM) (PBS) was added to each bottle and agitated for 10 min using a magnetic stirrer. The conidia concentration was determined using a Neubauer chamber (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Germany) and reported as conidia per mL. The resulting suspensions from each treatment were then used to assess different quality traits of the conidia and to determine glutathione levels as described below.

2.4.1. Quality tests

Variations in quality of the conidia were determined by changes in the germination (G), resistance to osmotic stress (OS) and resistance to thermic stress (TS), as previously described (García-Ortiz et al., 2015; Miranda-Hernández et al., 2014; Muñiz-Paredes et al., 2016; Tlecuít-Beristain et al., 2010). All tests were performed in triplicate. From suspensions with PBS, new suspensions (1×10^6 conidia/mL) were prepared using 0.05% Tween 80 to dilute and then placed in 1.5 mL Eppendorf tubes.

2.4.1.1. Germination (G). Germination was determined by inoculating 30 μL of the conidial suspensions (1×10^6 conidia/mL) from each strain, and from each atmospheric treatment onto 1.5% water agar plates (Bioxon, Mexico). Each suspension came from a serological bottle (independent experimental samples), so the test was performed in triplicate. Plates were incubated at $27 \pm 2^\circ\text{C}$ for 14 h. Subsequently, agar sections were cut from the medium and 100 conidia were counted under a microscope (Boeco, Germany). A conidium was considered germinated when the length of the germ tube was at least the size of the diameter of the conidium (Ibrahim and Jenkinson, 2002). The results are expressed as percent germination.

2.4.1.2. Resistance to osmotic stress (OS). This test was performed as

was described in Section 2.4.1.1. But in this case, Petri dishes contained 1.5% agar and 0.5 M NaCl (Meyer, Mexico). The results are expressed as germination percentage. The salt concentration gave a water activity (a_w) of 0.96, which was measured using an AQUALAB CX-2 water activity device (Decagon Devices, Pullman, WA).

2.4.1.3. Resistance to thermic stress (TS). Similar suspensions (1×10^6 conidia/mL) used for germination determination, were held at 40 °C for 1 h in a Thermomixer (Eppendorf, Germany). Then, germination was assessed as described in Section 2.4.1.1. The results are also expressed as germination percentage.

2.4.2. Assessment of glutathione levels

The glutathione levels in the conidia were determined using a Glutathione Assay Kit (Sigma Aldrich®). Previously, conidia were subject to mechanical lysis as described below.

2.4.2.1. Lysis of conidia. Samples were prepared to determine glutathione levels by rupturing the conidia by mechanical lysis, as described by Nandakumar and Marten (2002), with some modifications. First, 1 mL of the conidia stock suspensions in PBS (Section 2.4), were pipetted into previously weighed 1.5 mL Eppendorf tubes. The tubes were centrifuged at 6000 × g for 10 min. The supernatants were removed and the tubes plus the conidia were weighed, and the weight of conidia in each tube calculated. These values were used to calculate the final level of glutathione in the samples (µM/g). Next, 100 µL of 5% 5-Sulfosalicylic Acid Solution were added to each tube and the pellets were re-suspended by vortexing. The resulting suspensions were transferred into 2 mL Eppendorf tubes containing 50 mg of glass beads. The mixtures were agitated in a Mini-BeadBeater (BioSpec, USA) at top speed for 20 min (repeated cycles of 30 s, followed by 30 s cooling on ice). After the rupture cycles were completed, the corresponding determinations were completed according to manufacturer's instructions provided with the kit as mentioned below.

2.4.2.2. Glutathione assay kit. The measurement is based on a kinetic assay in which reduced glutathione (GSH) catalyzes a continuous reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) to TNB; the glutathione disulfide GSSG formed is recycled by glutathione reductase and NADPH. The GSSG present will also react to give a positive value in this reaction. The yellow product, 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) was quantified spectrophotometrically at 412 nm. The kit allows measurement of the level of total glutathione in the samples.

2.5. Statistical analysis

A student *t*-test ($\alpha = 0.05$) was used to compare the means of germination data in the conidia quality tests and the means from assessment of glutathione levels (21 vs. 26% O₂). The statistical program used was Excel Data Analysis tool (2010). For our objective the *t*-test was considerate applicable (Zivin and Bartko, 1976), since to see the effect of the pulses, only the means from the 2 atmospheric conditions studied were compared, at each sampling time and for each strain (21 vs. 26% O₂).

3. Results

Fig. 1 shows the germination (G), resistance to osmotic stress (OS) and resistance to thermic stress (TS) of the conidia of each fungus studied and from the two atmospheric treatments. Results of germination tests (white bars) showed that each of the entomopathogenic fungi revealed a different response to the oxygen treatment. Germination of *M. robertsii* Xoch8.1 conidia (Fig. 1A) increased by 22% compared to the control after a single oxidant pulse (sample taken at 24 h). In addition, germination was 24% higher than the control in the 96 h sample

(total of four oxidizing pulses). Similarly, the treatment enhanced germination of conidia of *B. bassiana* Tac1.1 (Fig. 1B): 17% higher than the control after a single oxidative pulse (24 h), and up to 28% after four oxidative pulses (96 h). On the other hand, the oxidant treatment did not affect germination of conidia of either *Cordyceps* (Fig. 1C and 1D) after a single enhanced pulse. Nevertheless, after four pulses (96 h), germination of *C. javanica* CHE-CNR303 conidia was reduced by 29%, while that of *C. fumosorosea* ARSEF3302 diminished 38% relative to the control.

Several differences were detected in the germination of conidia subject to osmotic (OS) and thermic (TS) stresses. Germination of the control conidia (21% O₂) of *M. robertsii* Xoch8.1 was lower (72% and 58%) on the osmotic stress (OS) medium than on the standard agar medium at both sampling times, 24 h and 96 h, respectively. Likewise, germination was lower after exposure to thermic stress (TS) (21% and 45% lower, respectively). These results show that both osmotic stress and thermic stress damage the conidia. Comparing results from both atmospheric conditions (OS_{21%} vs. OS_{26%} and TS_{21%} vs. TS_{26%}), conidia exposed to oxidant pulses, were more resistant to osmotic stress (63% higher than the control after just one pulse). Conidia were also more tolerant to thermic stress (17% higher than the control). Similarly, after four pulses, conidia acquired higher tolerance to osmotic and thermic stresses, 33% and 55% higher germination, respectively.

Germination of the control conidia (21% O₂) of *B. bassiana* Tac1.1 was 50% lower on the osmotic stress (OS) medium than on the standard agar medium at both sampling times (24 h and 96 h). Likewise, germination diminished after exposure to thermic stress (TS) (60% and 67%, respectively after 24 h or 96 h). Comparing results from both atmospheric conditions (OS_{21%} vs. OS_{26%} and TS_{21%} vs. TS_{26%}), conidia exposed to oxidant pulses, were more resistant to osmotic stress (52% higher than the control after just one pulse). Conidia were also more tolerant to thermic stress (71% higher than the control). Likewise, after four pulses, conidia were more tolerant to osmotic and thermic stresses, the germination on the osmotic stress medium was 140% higher, and 128% higher after thermic stress relative to the control.

Germination of the control conidia (21% O₂) of *C. javanica* CHE-CNR303 was lower on the osmotic stress (OS) medium than on the standard agar medium at both sampling times, 24 h and 96 h (95% and 67% lower, respectively). Similarly, in untreated conidia, germination drastically reduced after exposure to thermic stress (TS) (88% and 74%, respectively). Comparing results from both atmospheric conditions (OS_{21%} vs. OS_{26%} and TS_{21%} vs. TS_{26%}), conidia exposed to oxidant pulses, were more resistant to osmotic stress (5-fold than the control after just one pulse). On the contrary, conidia were less tolerant to thermic stress (71% lower than the control). Notably, after four pulses, conidia were less tolerant to osmotic and thermic stresses, the germination on the osmotic stress medium was 48% lower, and 44% lower after thermic stress in comparison to the control.

Germination of the control conidia (21% O₂) of *C. fumosorosea* ARSEF3302 was lower on the osmotic stress (OS) medium than on the standard agar medium at both sampling times, 24 h and 96 h (91% and 92% lower, respectively). Similarly, germination was lower after exposure to thermic stress (TS) (92% and 99% lower, respectively). Comparing results from both atmospheric conditions (OS_{21%} vs. OS_{26%} and TS_{21%} vs. TS_{26%}), conidia exposed to oxidant pulses, were less resistant to osmotic stress (78% lower than the control after just one pulse). Likewise, conidia were less tolerant (79%) to thermic stress relative to the control. Similarly, after four pulses, conidia were less tolerant to osmotic and thermic stresses, the germination on the osmotic stress medium was 63% lower than the control, and 100% lower after thermic stress.

The glutathione concentration was 76% higher in *M. robertsii* Xoch8.1 conidia exposed to one oxygen pulse (24 h), which corresponds with the observed improvements in the quality traits of these conidia. Glutathione levels consistently reached a concentration 38% higher in conidia exposed to four oxygen-enriched pulses (96 h), with

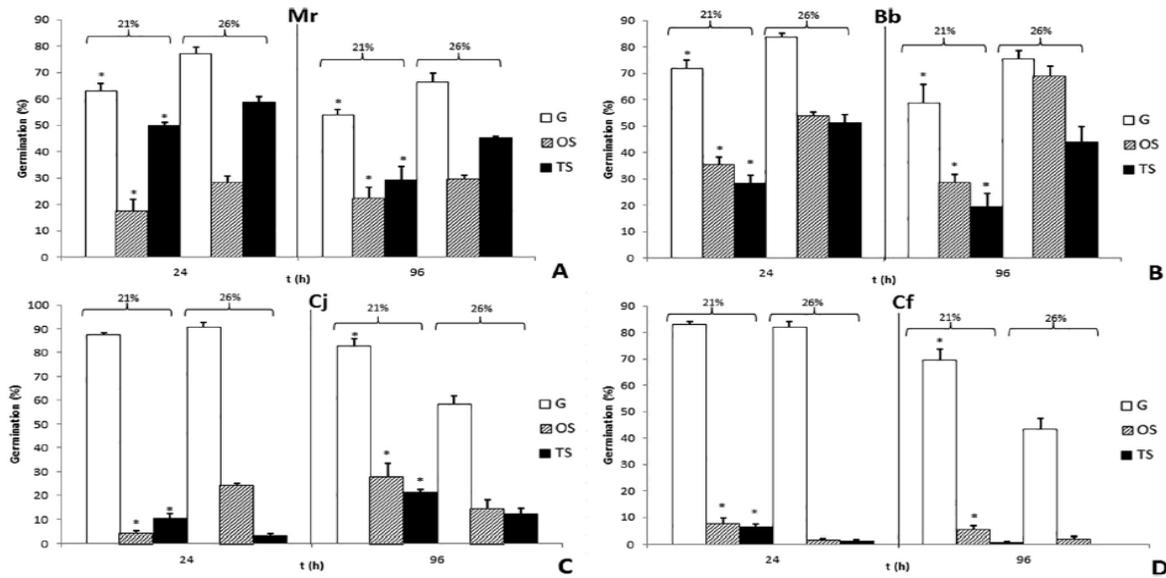


Fig. 1. Quality characteristics of conidia exposed to two oxidative treatments: control (21% oxygen); and oxygen-enriched (26% oxygen). A: results corresponding to Mr: *M. robertsii* Xoch8.1, B: results corresponding to Bb: *B. bassiana* Tac1.1, C: results corresponding to Cj: *C. javanica* CHE-CNRCB303, D: results corresponding to Cf: *C. fumosorosea* ARSEF3302. G: Germination, OS: Resistance to osmotic stress, TS: Resistance to thermic stress. The vertical line separates the two sampling times: 24 h and 96 h. *Indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) between treatments (21% vs. 26%).

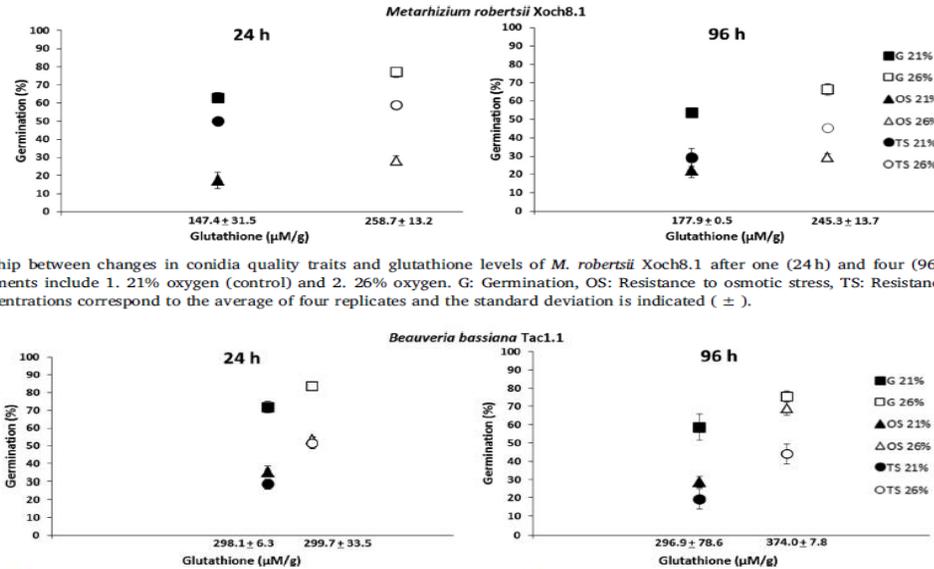


Fig. 2. Relationship between changes in conidia quality traits and glutathione levels of *M. robertsii* Xoch8.1 after one (24 h) and four (96 h) oxygen-enriched treatment. Treatments include 1. 21% oxygen (control) and 2. 26% oxygen. G: Germination, OS: Resistance to osmotic stress, TS: Resistance to thermic stress. Glutathione concentrations correspond to the average of four replicates and the standard deviation is indicated (\pm).

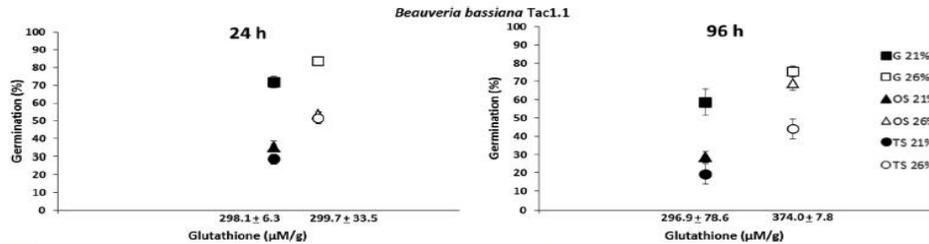


Fig. 3. Relationship between changes in conidia quality traits and glutathione levels of *B. bassiana* Tac1.1 after one (24 h) and four (96 h) oxygen-enriched treatment. Treatments include 1. 21% oxygen (control) and 2. 26% oxygen. G: Germination, OS: Resistance to osmotic stress, TS: Resistance to thermic stress. Glutathione concentrations correspond to the average of four replicates and the standard deviation is indicated (\pm).

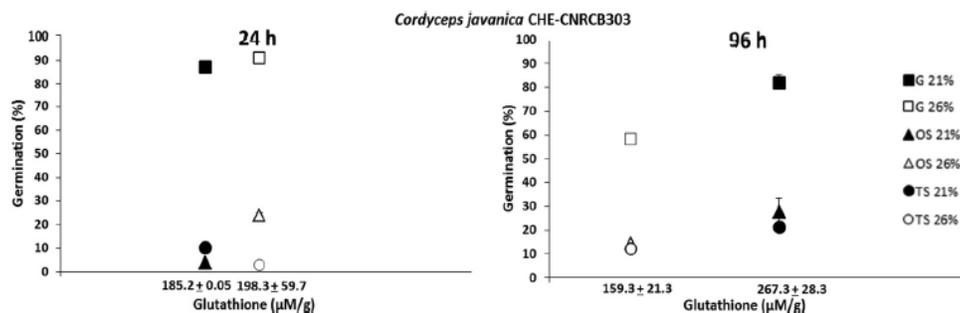


Fig. 4. Relationship between changes in conidia quality traits and glutathione levels of *C. javanica* CHE-CNRCB303 after one (24 h) and four (96 h) oxygen-enriched treatment. Treatments include 1. 21% oxygen (control) and 2. 26% oxygen. G: Germination, OS: Resistance to osmotic stress, TS: Resistance to thermic stress. Glutathione concentrations correspond to the average of four replicates and the standard deviation is indicated (\pm).

corresponding improvements in the quality parameters measured (Fig. 2). In contrast, glutathione levels in *B. bassiana* Tac1.1 conidia (Fig. 3) remained unchanged for both treatments (24 h and 96 h). Nevertheless, in all cases the quality traits of the conidia improved due to the treatment.

Fig. 4 shows that the glutathione levels did not change in conidia of *C. javanica* CHE-CNRCB303, following a single oxidative pulse (24 h). However, after four pulses (96 h) the glutathione concentration in *C. javanica* CHE-CNRCB303 conidia decreased by 40%, corresponding to the observed overall decline on the quality traits of the strain. In the case of *C. fumosorosea* ARSEF3302 (Fig. 5), glutathione levels in conidia dropped 16% after a single pulse and quality traits were impacted for all parameters measured. An 81% drop in glutathione levels occurred after exposure to four pulses (96 h), with a corresponding reduction in conidia quality.

4. Discussion

Fungal conidia responded differently to the oxidative treatment applied in the current study. The results indicate the possibility of inducing cross protection directly in free conidia of *M. robertsii* Xoch8.1 and *B. bassiana* Tac1.1, as resistance to both osmotic and thermal stresses improved by applying pulses with 26% O₂ straight on the conidia after harvesting. The occurrence of cross protection has been observed previously if modified pulses are applied to vegetative stages during fungal culture. For example, cross protection was generated after subjecting the mycelium of *C. fumosorosea* ARSEF3302 and *C. javanica* CHE-CNRCB303 (previously *I. fumosorosea* ARSEF3302 and *I. fumosorosea* CNRCB1) to pulses containing 26% O₂; in both strains the rate of germination, resistance to osmotic stress, thermotolerance and infectivity increased (Miranda-Hernández et al., 2014). Cross protection was also reported in *M. lepidiotae* after the application of pulses containing even higher concentrations of O₂ (30%) on mycelium, which in turn improved thermotolerance and conidial yields (García-Ortiz et al., 2015). The nature of stress may be varied to induce cross pro-

tection. Nitrogen starvation were more tolerant to both heat and UV-B. Even heat shock induced resistance to UV-B radiation, as osmotic stress promoted resistance to heat and UV-B radiation. Conidia produced under oxidative stress generated by menadione had increased or unchanged tolerances to heat or UV-B, respectively (Rangel, 2011; Rangel et al., 2008).

On the other hand, the response by conidia of both *Cordyceps* strains was very different, since those were more sensitive to the oxidant treatment than *M. robertsii* Xoch8.1 and *B. bassiana* Tac1.1. After a single pulse (24 h) there was a positive effect on *C. javanica* CHE-CNRCB303 resistance to osmotic stress, although there was a negative effect on resistance to thermic stress. Thus, the effects on conidial metabolism did not induce cross protection in those conidia. In addition, further exposure to oxygen-enriched pulses (96 h) had a negative effect on conidia quality. Conidia of *C. fumosorosea* ARSEF3302 were strongly affected by exposure to all oxygen treatments. In addition to the fact that conidia were obtained from different species, the contrasting response to our strategy could be explained since fungal conidia have several stages of maturation after cell differentiation of phialide to conidium (Sewall et al., 1990). This leads to differences in the chemical composition and even in the synchronization to enter the dormant state (Van Leeuwen et al., 2010; Wyatt et al., 2013); in fact, conidia exhibit several types of dormancy and even may differ within a single genus (Mysyakina et al., 2016).

It is interesting to note also that exposure of *C. fumosorosea* and *C. javanica* mycelia to oxygenated pulses improved the quality traits (Miranda-Hernández et al., 2014); whereas exposure of free conidia had to the opposite effect. Thus, there is a specific response depending on the stage of fungal development exposed to oxidant conditions. Although to generalize our findings to a particular fungus species, more strains need to be assessed.

Measures of the quality traits showed that the metabolic responses of some conidia were modified to cope with the adverse conditions in their environment. According to some authors, conidia are dormant structures without metabolic activity (Hagiwara et al., 2016; Lamarre et al., 2008; Taubitz et al., 2007). However, the proteome and

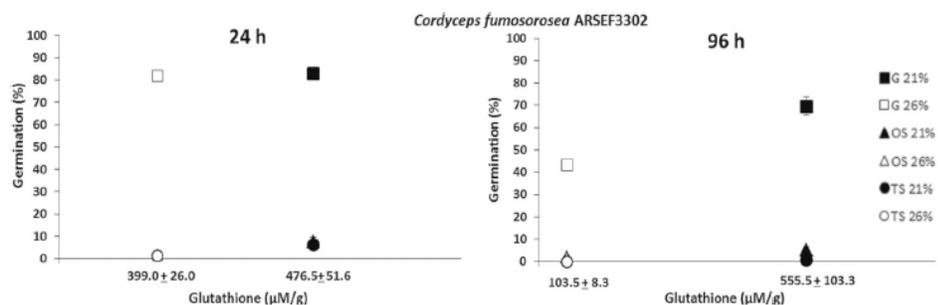


Fig. 5. Relationship between changes in conidia quality traits and glutathione levels of *C. fumosorosea* ARSEF3302 after one (24 h) and four (96 h) oxygen-enriched treatment. Treatments include 1. 21% oxygen (control) and 2. 26% oxygen. G: Germination, OS: Resistance to osmotic stress, TS: Resistance to thermic stress. Glutathione concentrations correspond to the average of four replicates and the standard deviation is indicated (\pm).

transcriptome of dormant conidia of some *Aspergillus* species show minimal activity. For example, the proteome of *A. fumigatus* conidia suggest that they contain molecules required for stress tolerance, in addition to pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase, suggesting that alcoholic fermentation plays a role during dormancy; allowing the potential to immediately respond to an environmental stimulus (Teutschbein et al., 2010). Furthermore, a few heat shock proteins and other chaperons involved in the maturation of protein complexes were also up-regulated in dormant *A. fumigatus* conidia (Suh et al., 2012). Besides the transcriptome results, data suggest that dormancy is associated with fermentation as an alternative to decreasing the metabolic rate due to a reduction in the activity of ATP pumps and anaerobic metabolism (Lamarre et al., 2008), since *A. fumigatus* conidia respond to the concentration of oxygen in the environment (Taubitz et al., 2007). Also, *Aspergillus* contains high transcript levels of catalase genes, which might contribute to protection from oxidative stresses under certain conditions (Hagiwara et al., 2016). The results found in our research agree with this information, since the conidia responded to the oxygen-enriched atmosphere and as a consequence they modified some quality traits. However, the mechanisms to achieve this are unknown until now.

Glutathione regulates physical properties associated with dormancy in *Neurospora crassa* conidia (Fahey et al., 1975). In this context, our results corroborated a direct relationship between glutathione levels and the germination response of conidia following exposure to oxidant conditions. In particular, for *M. robertsii* Xoch8.1 conidia some quality traits were enhanced as the level of glutathione increased. These results indicate that glutathione could play a role in cellular defense mechanisms against the possible oxidative stress generated by the treatment. Glutathione is the most abundant intracellular, non-enzymatic system of ROS detoxification. This soluble tripeptide contains a free thiol group, which allows the transfer of electrons to oxygen radicals (Marschall and Tudzynski, 2016; Schafer and Buettner, 2001). Increases in the concentration of glutathione due to oxidative pulses suggest a biosynthetic activity as part of the defense mechanism of this fungus. In fact, glutathione synthesis in conidia would require the enzymes γ -glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase (Schafer and Buettner, 2001), whose activity could be analyzed in future works to detail this mechanism.

In the case of *B. bassiana* Tac1.1 conidia, improvement in quality traits was not accompanied by an increase in glutathione. This reveals that apart from glutathione, other mechanisms could exist in conidia to resist oxidative stress. This might be congruent with the fact that in conidia there are transcription factors such as VosA or AtfA in abundance and they play an important role in resistance to stress conditions (Krijgsheld et al., 2013; Van Leeuwen et al., 2010). In the strain *B. bassiana* Tac1.1, one way to test if glutathione works as a defense mechanism would be to measure the possible activity of the enzyme glutathione reductase. In the cells glutathione exists in two forms, the reduced form (GSH) and oxidized form (GSSG). Two molecules of GSH transfer electrons onto oxygen radicals, subsequently the GSH molecules establish a disulphide bond for the formation of one GSSG molecule. Then, GSH is regenerated from GSSG by glutathione reductase (Marschall and Tudzynski, 2016). In this way the cell recycles glutathione, without the need to synthesize new molecules. This could explain why the concentration of glutathione remained unchanged in the conidia of this fungus.

The results obtained with the strains of *Cordyceps* provide another suggestion that the treatment could be generating oxidative stress conditions. The case of *C. javanica* is very interesting since like *B. bassiana*, a single oxygen-enriched pulse increased the resistance of conidia to osmotic stress conditions; however, glutathione concentrations did not change. Therefore, if glutathione is involved in defense mechanisms in this strain, the observed responses should have been similar to those seen with *B. bassiana*. The fact that in *C. javanica* the resistance to thermic stress was simultaneously affected contrasts with

that obtained with *B. bassiana*. This reinforces the idea that in conidia there must be more than one stress response system. Conversely, following exposure of conidia to multiple oxygen-enriched pulses (96 h) the loss of quality was accompanied by a reduction in the levels of glutathione, indicating that glutathione may have ceased to function in a defense pathway.

Consistently, the decline in quality traits seen in *C. javanica* coincided with the reduction in glutathione compared to the control. This suggests that if this strain has mechanisms to protect cells against stress, those were insufficient to counteract the imposed challenge. These results are consistent with some works showing evidence that atmospheric changes may cause oxidative stress in *B. bassiana* by increasing generation of ROS (Garza-López et al., 2012; Pérez-Guzmán et al., 2016). In our study, the *Cordyceps* strains were affected by multiple exposures to the oxidative treatment. Molecular studies, for example the measurement of the activity of transcription factors such as AtfA or VosA, could help to understand the stress response mechanisms of free conidia, since they play a role in resistance to stress conditions (Bayram et al., 2010; Hagiwara et al., 2016; Krijgsheld et al., 2013; Ni and Yu, 2007; Van Leeuwen et al., 2013).

The experimental methodology used to measure the quality features of free conidia was effective, especially as a means of identifying and comparing effects of the different oxygen treatments. In the case of resistance to osmotic stress, the culture medium used had an $a_w = 0.96$, which was expected to affect germination in all the strains according to reports showing that $a_w < 0.98$ affected the growth of *B. bassiana* (Nuñez-Gaona et al., 2010). On the other hand, in the test of resistance to thermic stress, the oxygen treatments also affected germination. This method may have utility as a routine test to evaluate conidia quality after production in laboratory cultures or on a commercial scale.

This treatment to improve the stress tolerance of conidia of entomopathogenic fungi could be applied to conidia harvested for commercial products, even on conidia stored for a long time to determine if the same phenomena are observed. However, it is important to consider that the effects are species-dependent and it would be necessary to revise if the treatment affects other commercially-relevant characteristics. Finally, this work is a first approach to determine if the free conidia of entomopathogenic fungi could respond to the oxidative pulses, leading to improvement in their quality characteristics.

CRedit authorship contribution statement

José Miguel Castillo-Minjarez: Conceptualization, Investigation, Methodology, Writing - original draft, Writing - review & editing. Paul Misael Garza-López: Supervision, Writing - review & editing. Javier Barrios-González: Supervision, Writing - review & editing. Octavio Loera: Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Writing - review & editing.

Acknowledgments

The authors thank the National Council for Science and Technology (CONACyT: Project CB-2015-254819 and scholarship for J.M. Castillo-Minjarez); and also the Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104011>.

References

- Allen, M.T., Levy, L.S., 2013. Parkinson's disease and pesticide exposure a new assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 43, 515–534. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.798719>.

- Bayram, Ö.S., Bayram, Ö., Valerius, O., Park, H.S., Irniger, S., Gerke, J., Braus, G.H., 2010. LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. *PLoS Genet.* 6, e1001226. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001226>.
- Duc, G., Agrama, H., Bao, S., Berger, J., Bourin, V., De Ron, A.M., Tullu, A., 2015. Breeding annual grain legumes for sustainable agriculture: new methods to approach complex traits and target new cultivar ideotypes. *Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 381–411. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898469>.
- Fahey, R.C., Brody, S., Mikolajczyk, S.D., 1975. Changes in the glutathione thiol-disulphide status of *Neurospora crassa* conidia during germination and aging. *J. Bacteriol.* 121, 144–151 PMID: 123243PMCID:pmc285624.
- García-Ortiz, N., Tecuít-Beristain, S., Favela-Torres, E., Loera, O., 2015. Production and quality of conidia by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*: critical oxygen level and period of mycelium competence. *Appl. Microbiol. Biot.* 99, 2783–2791. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6225-2>.
- Garza-López, P.M., Konigsberg, M., Gómez-Quiróz, L.E., Loera, O., 2012. Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World J. Microb. Biot.* 28, 353–359. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0827-y>.
- Hagiwara, D., Takahashi, H., Kusuya, Y., Kawamoto, S., Kamei, K., Gonoï, T., 2016. Comparative transcriptome analysis revealing dormant conidia and germination associated genes in *Aspergillus* species: an essential role for AtfA in conidial dormancy. *BMC Genomics* 17, 358. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2689-z>.
- Ibrahim, L., Jenkinson, P., 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycol. Res.* 106, 705–715. <https://doi.org/10.1017/S0953756202006044>.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M., Strasser, H., 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing, Wallingford, pp. 23–69 DOI: 10.1079/9780851993560.0023.
- Jennings, A.A., Li, Z., 2014. Scope of the worldwide effort to regulate pesticide contamination in surface soils. *J. Environ. Manage.* 146, 420–443. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.020>.
- Kamel, F., 2013. Paths from pesticides to Parkinson's. *Science* 341, 722–723. <https://doi.org/10.1126/science.1243619>.
- Kepler, R.M., Luangsa-Ard, J.J., Hywel-Jones, N.L., Quandt, C.A., Sung, G.H., Rehner, S.A., Chen, M., 2017. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus* 8, 335–353. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>.
- Krijgheld, P., Bleichrodt, R.V., Van Veluw, G.J., Wang, F., Müller, W.H., Dijksterhuis, J., Wösten, H.A.B., 2013. Development in aspergillus. *Stud. Mycol.* 74, 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol. Control* 21, 230–248. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.0938>.
- Lai, T., Su, J., 2011. Assessment of resistance risk in Spodoptera exigua (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole. *Pest Manag. Sci.* 67, 1468–1472. <https://doi.org/10.1002/ps.2201>.
- Lamare, C., Sokol, S., Debeaupuis, J.P., Henry, C., Lacroix, C., Glaser, P., Latgé, J.P., 2008. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics* 9, 417. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-417>.
- Leppa, N.C., 1984. Systems management of insect population suppression programs based on mass production of biological control organisms. In: King, E.G., Leppa, N.C. (Eds.), *Advances and Challenges in Insect Rearing*. Agricultural Research Service, USDA, New Orleans, pp. 292–294 <https://doi.org/10.5962/bhl.title.149349>.
- Marschall, R., Tudzynski, P., 2016. Reactive oxygen species in development and infection processes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 57, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2016.03.020>.
- Martínez-Villarreal, R., Garza-Romero, T.S., Moreno-Medina, V.R., Hernández-Delgado, S., Mayek-Pérez, N., 2016. Biochemical basis of tolerance to osmotic stress in phytopathogenic fungus: the case of *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Rev. Argent. Microbiol.* 48, 347–357. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.05.004>.
- Miranda-Hernández, F., Garza-López, P.M., Loera, O., 2016. Cellular signalling in cross protection: an alternative to improve mycopesticides. *Biol. Control* 103, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.09.007>.
- Miranda-Hernández, F., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., Loera, O., 2014. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Manag. Sci.* 70, 661–666. <https://doi.org/10.1002/ps.3605>.
- Motta-Delgado, P.A., Murcia-Ordóñez, B., 2011. Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente Agua-Interdiscip. J. Appl. Sci.* 6, 77–90. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>.
- Muñiz-Paredes, F., Garza-López, P.M., Vinięra-González, G., Loera, O., 2016. Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. *World J. Microb. Biot.* 32, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2072-x>.
- Mysyakina, I.S., Kochkina, G.A., Ivanushkina, N.E., Bokareva, D.A., Feoflova, E.P., 2016. Germination of spores of mycelial fungi in relation to exogenous dormancy. *Microbiology* 85, 290–294. <https://doi.org/10.1134/S0026261716030085>.
- Nandakumar, M.P., Marten, M.R., 2002. Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis* 23, 2216. [https://doi.org/10.1002/1522-2683\(200207\)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1522-2683(200207)23:14<2216::AID-ELPS2216>3.0.CO;2-Y).
- Ni, M., Yu, J.H., 2007. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *PLoS One* 2, e970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000970>.
- Novodvorska, M., Stratford, M., Blythe, M.J., Wilson, R., Beniston, R.G., Archer, D.B., 2016. Metabolic activity in dormant conidia of *Aspergillus niger* and developmental changes during conidial outgrowth. *Fungal Genet. Biol.* 94, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.07.002>.
- Núñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R., Loera, O., 2010. Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 771–777. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000400004>.
- Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., Keyhani, N.O., 2015. Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Appl. Microbiol. Biot.* 99, 1057–1068. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6270-x>.
- Pérez-Guzmán, D., Montesinos-Matías, R., Arce-Cervantes, O., Gómez-Quiróz, L.E., Loera, O., Garza-López, P.M., 2016. Reactive oxygen species production, induced by atmospheric modification alter conidial quality of *Beauveria bassiana*. *J. Appl. Microbiol.* 121, 453–460. <https://doi.org/10.1111/jam.13156>.
- Posada, F.J., Vega, F.E., 2005. A new method to evaluate the biocontrol potential of single spore isolates of fungal entomopathogens. *J. Insect Sci.* 5, 37. <https://doi.org/10.1093/jis/5.1.37>.
- Rangel, D.E., 2011. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World J. Microb. Biot.* 27, 1281–1296. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0584-3>.
- Rangel, D.E., Anderson, A.J., Roberts, D.W., 2008. Evaluating physical and nutritional stress during mycelial growth as inducers of tolerance to heat and UV-B radiation in *Metarhizium anisopliae* conidia. *Mycol. Res.* 112, 1362–1372. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.04.013>.
- Rangel, D.E., Braga, G.U., Fernandes, É.K., Keyser, C.A., Hallsworth, J.E., Roberts, D.W., 2015. Stress tolerance and virulence of insect-pathogenic fungi are determined by environmental conditions during conidial formation. *Curr. Genet.* 61, 383–404. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0477-y>.
- Ravensberg, W.J., 2011. A Roadmap to the Successful Development and Commercialization of Microbial Pest Control Products for Control of Arthropods. Springer Science & Business Media. Springer, Netherlands DOI: 10.1007/978-94-007-0437-4.
- Rechigl, J.E., Rechigl, N.A., 1999. Biological and Biotechnological Control of Insect Pests. CRC Press, Boca Raton.
- Schafer, F.Q., Buettner, G.R., 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulphide/glutathione couple. *Free Radical Bio. Med.* 30, 1191–1212. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00480-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00480-4).
- Sevall, T.C., Mims, C.W., Timberlake, W.E., 1990. Conidium differentiation in *Aspergillus nidulans* wild-type and wet-white (wetA) mutant strains. *Dev. Biol.* 138, 499–508. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90215-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90215-5).
- Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R.C., Ward, O.P., 2011. Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol in soil biology. In: Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R. (Eds.), *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1–23 DOI: 10.1007/978-3-642-19769-7_1.
- Smalling, K.L., Kuivila, K.M., Orlando, J.L., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Siegler, K., Hunt, J.W., Hamilton, M., 2013. Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 73, 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.05.028>.
- Stade, S., Brambl, R., 1981. Mitochondrial biogenesis during fungal spore germination: respiration and cytochrome c oxidase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 147, 757–767 PMID: 6268605 PMCID:pmc216111.
- Stüh, M.J., Fedorova, N.D., Cagas, S.E., Hastings, S., Fleischmann, R.D., Peterson, S.N., Perlin, D.S., Nierman, W.C., Pieper, R., Momany, M., 2012. Development stage-specific proteomic profiling uncovers small, lineage specific proteins most abundant in the *Aspergillus fumigatus* conidial proteome. *Proteome Sci.* 10, 30. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-10-30>.
- Taubitz, A., Bauer, B., Heesemann, J., Ebel, F., 2007. Role of respiration in the germination process of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Microbiol.* 54, 354–360. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0413-y>.
- Teutschbein, J., Albrecht, D., Pötsch, M., Guthke, R., Aimanandi, V., Clavaud, C., Latgé, J.P., Brakhage, A.A., Kniemeyer, O., 2010. Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mould *Aspergillus fumigatus*. *J. Proteome Res.* 9, 3427–3442. <https://doi.org/10.1021/pr910684>.
- Tecuít-Beristain, S., Vinięra-González, G., Díaz-Godínez, G., Loera, O., 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia* 169, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>.
- Van Leeuwen, M.R., Van Doorn, T.M., Golovina, E.A., Stark, J., Dijksterhuis, J., 2010. Water- and air-distributed conidia differ in sterol content and cytoplasmic microviscosity. *Appl. Environ. Microb.* 76, 366–369. <https://doi.org/10.1128/AEM.01632-09>.
- Van Leeuwen, M.R., Krijgheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., Wösten, H.A.B., Dijksterhuis, J., 2013. Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Stud. Mycol.* 74, 59–70. <https://doi.org/10.3114/sim0009>.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Koike, M., Maniania, N., Monzon, A., Ownley, B.H., Pell, J.K., Rangeli, D., Roy, H.E., 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecol.* 2, 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.05.001>.
- Wyatt, T.T., Wösten, H.A., Dijksterhuis, J., 2013. Fungal spores for dispersion in space and time. *Adv. Appl. Microbiol.* 85, 43–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00002-2>.
- Zivin, J.A., Bartko, J.J., 1976. Statistics for disinterested scientists. *Life Sci.* 18, 15–26. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(76\)90268-x](https://doi.org/10.1016/0024-3205(76)90268-x).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00225

Matricula: 2153806192

Inducción de protección cruzada en los canidos libres al someterlos directamente a condiciones de estrés oxidante.

En la Ciudad de Mexico, se presentaron a las 11:00 horas del día 20 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ
DRA. LILIANHA DOMINGUEZ MALFAVON
DRA. NOHEMI GARCIA ORTIZ
DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el ultimo, se reunieron a la presentación de la disertación pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

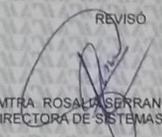
Acto continuo, el presidente del jurado comunico al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

C O S



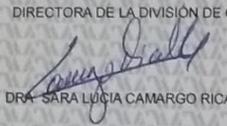
Jose Miguel Angel Castillo Minjarez
JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



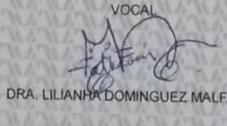
DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE



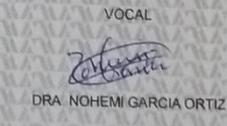
DR. JAVIER BARRIOS GONZALEZ

VOCAL



DRA. LILIANHA DOMINGUEZ MALFAVON

VOCAL



DRA. NOHEMI GARCIA ORTIZ

SECRETARIO



DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ