



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN CBS

Determinación del momento de aplicación de pulsos con 26%
de oxígeno para el mejoramiento de la calidad de los conidios
de *Isaria fumosorosea*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

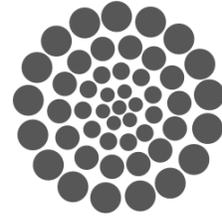
Q.A. JOSÉ MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Asesoras: Dra. Divanery Rodríguez Gómez

Dra. Ainhoa Arana Cuenca

MÉXICO, D.F. JULIO, 2015.



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001465”

Iztapalapa, D. F. a 29 de Julio de 2015

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

Determinación del momento de aplicación de pulsos con 26% de oxígeno para el
mejoramiento de la calidad de los conidios de *Isaria fumosorosea*

Que presentó:

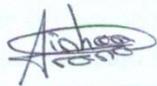
Q. A. José Miguel Angel Castillo Minjarez

Comité tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral	Universidad Autónoma Metropolitana
Asesor: Dra. Divanery Rodríguez Gómez	Universidad Autónoma Metropolitana
Asesor: Dra. Ainhoa Arana Cuenca	Universidad Politécnica de Pachuca

Jurado:

Presidente



Dra. Ainhoa Arana Cuenca

Secretario



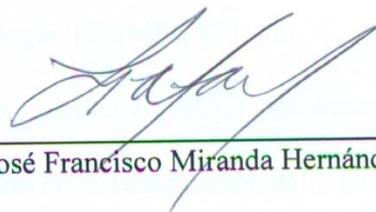
Dr. Paul Misael Garza López

Vocal



M. en C. María Cristina Acosta García

Vocal



Dr. José Francisco Miranda Hernández

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por darme luz, discernimiento y la oportunidad de culminar este reto, que me ha permitido crecer.
- A mi familia, por su comprensión y paciencia ante los momentos de desatención, los amo.
- A mi compañera en este viaje. Gracias Maye por tu amor, apoyo constante y alentarme en los momentos críticos, este logro también es tuyo.
- A la Universidad Autónoma Metropolitana por hacerme sentir en casa.
- A mi director de tesis: Dr. Octavio Loera Corral. Muchas gracias Octavio por brindarme un voto de confianza, darme la oportunidad de asumir este gran compromiso y por todo tu incomparable apoyo para llevarlo a buen término.
- A mis asesoras: Muchas gracias Dra. Divanery Rodríguez Gómez, sabe que fue una pieza clave para que se diera este momento, gracias por llevarme con Octavio, siempre se lo agradeceré. Gracias por su tiempo, sugerencias y apoyo. Dra. Ainhoa Arana Cuenca, le agradezco que haya aceptado ser parte de esta investigación, su tiempo, sus observaciones y comentarios para mejorar este trabajo.
- M. en C. María Cristina Acosta García, muchas gracias por su amable ayuda, sus observaciones y su trabajo tan profesional. Dr. Paul Misael Garza López, agradezco enormemente la amable disponibilidad y solidaridad que siempre me brindó, en especial sus correcciones y comentarios. Dr. José Francisco Miranda Hernández, me faltan palabras para agradecer su apoyo, la atención que me regaló para mantenerme siempre motivado, por ayudarme con la revisión de este escrito, sus observaciones y correcciones. Especialmente le agradezco por compartirme su tiempo y experiencia.
- Al coordinador del posgrado en Biotecnología: Dr. Héctor Escalona Buendía, por estar siempre al pendiente.
- Al Dr. Gustavo Viniegra, por su guía.
- A mis compañeros del laboratorio W-104: Francisco, Berenice, Jorge, Alejandro, Misael, Nohemí, Facundo, Anselmo, Josué, Jazmín y Javier, interminables agradecimientos por compartir sus conocimientos y experiencia, su solidaridad y hacerme pasar momentos tan gratos ante el trabajo arduo.
- A la Dra. Martha Graciela Rocha Munive y la M. en C. Alma Berenice Zúñiga Bustos, un agradecimiento inmensamente especial por brindarme la oportunidad de obtener este crecimiento personal, y otro igual de grande por otorgarme su confianza.
- A mis compañeros y amigos del INECC por sus buenos deseos y motivación, todos han sido importantes para mí.
- Al laboratorio de Microscopía electrónica: Cristina y Jorge, siempre estaré agradecido por su apoyo. Estimado Dr. José David Sepúlveda Sánchez, gracias por su profesionalismo, por compartirme su tiempo y las experiencias de vida.
- Gracias al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo otorgado para llevar a cabo este trabajo.
- Gracias al Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) por todas las facilidades otorgadas.
- Gracias a todos los que de un modo u otro, han sido parte de la conspiración del Universo para obtener este triunfo en mi vida.

RESUMEN

La actividad agrícola es esencial para la economía y la generación de alimento a nivel mundial. Mantener un ritmo creciente en la productividad agrícola será crucial en las próximas décadas; la FAO señala que la producción de alimentos de primera necesidad, deberá aumentar un 60% para satisfacer el crecimiento de la demanda esperada. El aumento de la producción agrícola es restringido por las pérdidas causadas por los insectos considerados plagas. Para su control, se ha hecho el uso de insecticidas químicos, pero su aplicación indiscriminada, ha tenido efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana; además, las plagas han desarrollado resistencia, implicando una menor efectividad de los productos químicos. El Control Biológico como parte del Manejo Integral de Plagas, es una alternativa al uso de los agroquímicos. Los hongos entomopatógenos han sido aprovechados como agentes de control biológico, ya que de forma natural pueden causar enfermedad en los insectos llevando a la generación de epizootias. La mayoría de los bioplaguicidas disponibles comercialmente están formulados a base de los conidios de este tipo de hongos, ya que son las estructuras con las que se dispersan en la naturaleza y al entrar en contacto con los insectos, inician el ciclo infeccioso. La selección de hongos que puedan ser eficaces para la aplicación en campo, se ha basado en características deseables como son la producción eficiente, la infectividad y la seguridad. Sin embargo, no se deben perder de vista otras características de calidad en los conidios como la persistencia, la resistencia a factores de estrés y la estabilidad genética, ya que pueden potenciar su efectividad. Con el reto que representa aumentar la eficacia de los hongos entomopatógenos como agentes de control, se han hecho esfuerzos para encontrar factores de estrés que permitan generar características deseables en los conidios. Es así que es relevante, la identificación de tales factores de estrés y la forma en que se deban aplicar, para lograr el efecto positivo óptimo en las características deseables.

Isaria fumosorosea es un hongo entomopatógeno que está presente en aproximadamente el 6% de los bioplaguicidas comerciales que existen. Ha sido importante, ya que ha presentado virulencia contra varias especies de insectos que son plagas a nivel mundial como el pulgón ruso del trigo (*Diuraphis noxia*), la polilla de la col (*Plutella xylostella*) y la mosca blanca del camote (*Bemisia argentifolii*). Ante el hallazgo encontrado en la investigación de Miranda-Hernández *et al.*, (2014), en donde se determinó que la aplicación de pulsos con 26% de oxígeno, incrementó la calidad de los conidios

generados por dos cepas de *Isaria fumosorosea* (CNRCB1 y ARSEF 3302), y que se tuvo un efecto contrario en la producción de conidios; en el presente trabajo, se tuvo el objetivo de encontrar el momento en el cual debe iniciarse la aplicación de los pulsos oxidantes para generar el efecto positivo óptimo en las características de calidad, empleando las mismas cepas de estudio. Los resultados obtenidos mostraron que en los conidios de CNRCB1 se incrementó la viabilidad un 48 y 41%, en comparación con el control, cuando el tratamiento oxidante se inició a las 48 y 60 h de cultivo, respectivamente. La termotolerancia se incrementó 14.5 veces cuando el tratamiento oxidante se inició a las 60 h de cultivo. En el caso de los conidios de ARSEF 3302, cuando los pulsos se iniciaron a las 48 h de cultivo, se obtuvo el valor más alto de viabilidad (95.9%) y se incrementó la termotolerancia 5 veces, en comparación al control. Hubo un efecto positivo en la infectividad de ambas cepas, cuando los pulsos oxidantes se aplicaron a las 60 h de cultivo.

Por otro lado, se propuso la aplicación de herramientas de comparación del proceso de conidiación de ambas cepas; a partir de los perfiles de producción en condiciones atmosféricas normales (21% de oxígeno), se obtuvieron los parámetros cinéticos de conidiación y se implementó un parámetro novedoso, llamado Índice de coniciación (***I_c***) que indica el estado de conidiación en un momento determinado, con respecto al inóculo inicial. Ambas herramientas permitieron evaluar la estabilidad de las cepas y encontrar diferencias en el proceso de conidiación. Los resultados fueron corroborados con estudios morfológicos realizados con microscopía electrónica de barrido. En general, se observó que ARSEF 3302, en comparación con CNRCB1, no es estable en cuanto al proceso de producción de conidios. Además, la evaluación del efecto de los pulsos con 26% de oxígeno sobre la producción de conidios, realizada con el ***I_c*** y la microscopía electrónica de barrido, indicaron que en ambas cepas, se generó un retardo de la conidiación.

Finalmente, se propone que la información generada en este trabajo, puede aplicarse para evaluar cualquier otro factor de estrés que se encuentre asociado a la conidiación, y que con su aplicación se mejoren una o varias características deseables en los conidios, incrementando sus probabilidades de éxito como agentes de control biológico.

Índice

1. Introducción	10
1.1. La agricultura y las plagas	10
1.2. Manejo Integrado de Plagas (MIP)	11
1.3. Control Biológico	11
1.4. Los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico	13
1.5. <i>Isaria fumosorosea</i>	14
1.6. Ciclo infectivo de los hongos entomopatógenos	15
1.6.1. Adhesión y germinación del conidio en la cutícula del insecto	16
1.6.2. Penetración en el hemocele	16
1.6.3 Replicación en el hemocele	17
1.7. Factores que afectan la eficacia de los hongos entomopatógenos	18
1.8. Generación de propágulos con características deseables para la aplicación en campo	21
2. Antecedentes	23
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivos	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos específicos	25
6. Esquema general de la investigación	26
7. Materiales y Métodos	27
7.1. Microorganismos	27
7.2. Propagación de las cepas	27
7.3. Conservación de las cepas	28
7.3.2. Crioconservación	28
7.4. Extracción y cuantificación de conidios	28
7.5. Perfiles de producción de conidios	29
7.5.1. Inóculos	29
7.5.2. Producción de conidios en condiciones normales (21% de oxígeno)	30
7.5.2.1. Experimento 1	30
7.6. Estudio de los perfiles de producción de conidios	30
7.6.1. Modelo Logístico	30

7.6.2. Índice de conidiación (<i>I_c</i>)	31
7.7. Generación de atmósfera oxidante (Pulsos con 26% oxígeno).....	32
7.8. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes	33
7.8.1. Efecto en la producción de conidios.....	33
7.8.1.1. Experimento 2	33
7.8.2 Efecto en la forma y la calidad de los conidios.....	34
7.8.2.1. Experimento 3	34
7.8.2.2. Experimento 4	36
7.9. Estudio de la morfología.....	36
7.10. Pruebas de calidad.....	39
7.10.1. Viabilidad	39
7.10.2. Termotolerancia	40
7.10.3. Hidrofobicidad	40
7.10.4. Infectividad.....	41
7.11. Análisis estadístico	42
8. Resultados.....	44
8.1. Perfiles de producción de conidios	44
8.1.1. Producción de conidios en condiciones normales (21% de oxígeno). Experimento 1.	44
8.2. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes	47
8.2.1. Efecto en la producción de conidios. Experimento 2.	47
8.2.2. Efecto en la producción de conidios. Experimento 3.	53
8.2.3. Efecto de la atmósfera rica en oxígeno en la morfología de la conidiación.....	58
8.2.4. Efecto en la calidad de los conidios. Experimento 3.....	71
8.2.4.1. Viabilidad.....	71
8.2.4.2. Termotolerancia	74
8.2.4.3 Hidrofobicidad	75
8.2.5. Efecto en la calidad de los conidios. Experimento 4.....	77
8.2.5.1. Infectividad	77
9. Discusión.....	80
9.1. Perfiles de producción (atmósfera normal)	80
9.2. Efecto de los pulsos oxidantes	84
10. Conclusiones	89

11. Perspectivas	90
12. Bibliografía.....	91

1. Introducción

1.1. La agricultura y las plagas

La agricultura es una parte esencial de la economía y la generación de alimento a nivel mundial. Mantener un ritmo creciente en la productividad agrícola será crucial en las próximas décadas; la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), señala que la producción de alimentos básicos (de primera necesidad) deberá aumentar un 60% para satisfacer el crecimiento de la demanda esperada (Lord *et al.*, 2007; FAO, 2013). Algunas situaciones que restringen de manera importante el aumento de la producción agrícola, son las pérdidas causadas por insectos, las malezas y las enfermedades de las plantas; que representan pérdidas del 40% de la producción potencial (Vega *et al.*, 2009).

La actividad agrícola enfrenta el problema de que los insectos son competidores natos de la especie humana por los recursos agrícolas, varios de estos organismos, desde el punto de vista fitosanitario, son considerados plagas por la afectación económica que generan (Selfa y Anento, 1997). En general, las plagas son organismos vivos que se considera que causan daño a nuestra salud o a nuestro bienestar; dentro del área fitosanitaria, la FAO las define como cualquier especie, raza, biotipo vegetal o animal, o agente patógeno dañino para las plantas o productos vegetales (Yu, 1983; FAO, 1995). Para el control de las plagas se ha hecho el uso de insecticidas químicos, pero su aplicación indiscriminada ha tenido efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana; además, las plagas han desarrollado resistencia, implicando una menor efectividad de los agroquímicos (FAO, 1996; Butt *et al.*, 2001; Inglis *et al.*, 2001; Monzón, 2001; Vega *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2011).

1.2. Manejo Integrado de Plagas (MIP)

Para mitigar los problemas agrícolas planteados anteriormente, se ha desarrollado el Manejo Integral de Plagas (MIP), el cual fue definido como “un sistema base de decisión para la selección y uso de tácticas de control de plagas, único o armoniosamente coordinado dentro de una administración estratégica basada en el análisis del costo/beneficio, tomando en cuenta el impacto sobre los productores, la sociedad y el medio ambiente” (Kogan, 1998; Eilenberg *et al.*, 2001). En 2006, Ehler estableció que para ponerlo en práctica, se requiere la gestión simultánea de las estrategias; el seguimiento regular de las plagas, de sus enemigos y antagonistas naturales; el uso de umbrales económicos o de aplicación de plaguicidas; y el uso integrado de múltiples tácticas represivas. Actualmente, la FAO lo define como “la consideración cuidadosa de todas las técnicas de control de plagas disponibles, la posterior integración de medidas adecuadas que desalientan el desarrollo de las poblaciones de plagas, que mantienen a los pesticidas y otras intervenciones a niveles que son económicamente justificados, y reducir o minimizar los riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Ehler, 2006; FAO, 2015).

1.3. Control Biológico

El Control Biológico (CB) surge como una alternativa al uso de productos químicos. Fue en el año 1919 que el estadounidense Harry Smith, introdujo este término por primera vez y lo definió como “la supresión de poblaciones de insectos por las acciones de sus enemigos naturales nativos o introducidos” (Rechcigl y Rechcigl, 2000). Posteriormente, se propuso que el CB formara parte del MIP (Kogan, 1998; Eilenberg *et al.*, 2001). Actualmente, el CB es una estrategia de control de plagas en la que se utilizan enemigos naturales, antagonistas o competidores vivos u otras entidades bióticas inocuas capaces

de mantener la densidad de población de un organismo plaga a un nivel que no cause daños relevantes y mantenga la sustentabilidad de los agroecosistemas (García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013). El control biológico se puede subdividir en cuatro estrategias (Eilenberg *et al.*, 2001): 1. *Control biológico clásico*. Introducción intencional de un agente de control biológico exótico para el establecimiento permanente y el control a largo plazo de la plaga; 2. *Control biológico por inoculación*: Liberación intencional de un organismo vivo como un agente de control biológico con la expectativa de que se multiplique y controle la plaga por un período extenso pero no permanente, su éxito dependerá de la capacidad que tengan para multiplicarse y reducir la población blanco; 3. *Control biológico por inundación*: Uso de organismos vivos para el control de plagas, que es logrado exclusivamente por los mismos organismos liberados, aquí no se espera que el agente de control se reproduzca. 4. *Control biológico por conservación*: modificación del ambiente o la existencia de prácticas para proteger y aumentar enemigos específicos naturales para reducir el efecto de plagas. Puede incluir la combinación con el uso de plaguicidas. Los agentes de control biológico que pueden ser empleados son predadores como escarabajos y crisopas; parasitoides como avispas y algunas moscas; y patógenos como bacterias, hongos y virus. En la figura 1.1 se presentan imágenes de algunos de estos agentes de control.

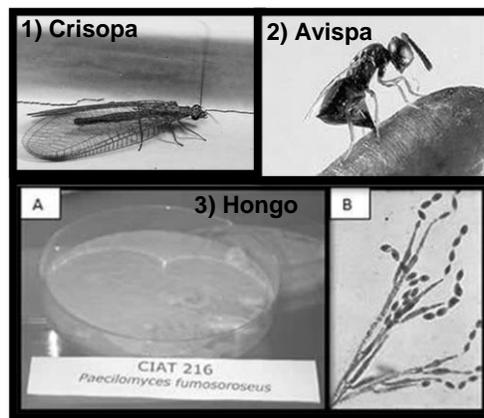


Figura 1.1 Agentes de control biológico: 1) Predador; 2) Parasitoide; y 3) Patógeno: *Isaria fumosorosea*; (A) crecimiento en placa y (B) observación microscópica.

1.4. Los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico

Existen alrededor de 2000 especies de microorganismos entomopatógenos, de los cuales 750 son especies de hongos reunidos en 100 géneros. Los hongos entomopatógenos se encuentran en las divisiones Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota, Chytridiomycota, Oomycota y Basidiomycota (Kalia *et al.*, 2011). Se ha determinado que los hongos han atacado a los insectos causándoles enfermedades desde hace miles de años (Glare, 2004). Los hongos microscópicos son microorganismos eucariontes y heterótrofos; pueden ser unicelulares (como las levaduras) o multicelulares (especies filamentosas), estos últimos constan de células alargadas provistas de una pared que contiene celulosa y quitina, además de otros carbohidratos y proteínas. Estas estructuras vegetativas son llamadas hifas. Después de la infección exitosa de un hospedero, producen asexualmente estructuras reproductivas conocidas como conidios que lo ayudan a su diseminación. Los hongos poseen una gran variabilidad genética y un amplio rango de hospederos (Inglis *et al.*, 2001; Wraight *et al.*, 2007; Moreira, 2012). Los hongos, a diferencia de los virus y las bacterias, pueden infectar a los insectos no solo a través del intestino, sino además, de los espiráculos y particularmente a través de la superficie del tegumento. Una vez que el hongo ha infectado al insecto se puede generar una epizootia que finalmente conlleva al control de la plaga (Inglis *et al.*, 2001; Lacey *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2011; Moreira, 2012). Es así que el potencial de los hongos entomopatógenos ha sido aprovechado para emplearlos como agentes de control biológico y han existido diversos casos de éxito por su utilización como bioplaguicidas (Ferron, 1978; Federici *et al.*, 1980; Rosset y Moore, 1997; Butt *et al.*, 2001; Glare, 2004; de Faria y Wraight, 2007; Lacey y Kaya, 2007; Vega *et al.*, 2009; Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011; Sindhu, *et al.*, 2011; García-Gutiérrez y González-Maldonado, 2013). Dentro de los más utilizados a nivel mundial se encuentran *Metarhizum anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria*

fumosorosea (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (de Faria y Wraight, 2007).

1.5. *Isaria fumosorosea*

Isaria fumosorosea es un hongo entomopatógeno que pertenece a la división Ascomycota que forma micelio tabicado. Las hifas vegetativas presentan paredes lisas. La longitud de sus conidios va de 3.5 a 4 µm, tienen forma ovoide alargada. Cuando este hongo se cultiva en medios sólidos, produce conidios con un color marrón típico imputado a las melaninas, pigmentos que pueden contribuir a la protección de los conidios contra la radiación solar, particularmente de la luz ultravioleta. Es un microorganismo mesófilico, ya que su temperatura de crecimiento óptimo está entre 20 y 30°C; sin embargo, la temperatura de crecimiento varía entre 5 a 33°C, dependiendo del aislado que se trate (Carr *et al.*, 2003; Humber, 2005; Zimmermman, 2008; Asaff *et al.*, 2009). Las especies del género *Isaria* se encuentran predominantemente en trópicos, por lo cual pueden emplearse para desarrollar productos que se usen en regiones de clima caliente (Carrillo-Pérez *et al.*, 2013).

Este hongo tiene acción sobre lepidópteros, coleópteros, dípteros, homópteros e isópteros (Carr *et al.*, 2003). Es un microorganismo de control biológico importante, ya que ha presentado virulencia contra varias especies de insectos que son plagas a nivel mundial como el pulgón ruso del trigo (*Diuraphis noxia*), la polilla de la col (*Plutella xylostella*) y la mosca blanca del camote (*Bemisia argentifolii*) (Vandenberg y Cantone, 2004). Se han desarrollado productos comerciales basados en este hongo, por ejemplo el “*Insecticida biológico PFR-97*” para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Inglis *et al.*, 1999; Glare, 2004). En México, el insecticida PAE-SIN[®] es producido por la empresa Agrobiológicos del Noroeste S. A. de C. V., también para el control de la mosca blanca

(www.agrobionsa.com). Esta plaga ha causado problemas graves en el sector agrícola de nuestro país, principalmente en cultivos de tomate en los estados de Sonora, Sinaloa y Nayarit, en este último estado, también ha afectado cultivos de frijol, pepino, melón y sandía; en algunos casos ha llevado a la pérdida total de las cosechas (Ortiz *et al.*, 2010; Amador *et al.*, 2011).

Es muy importante realizar investigaciones que, por una parte, permitan encontrar aislados de *Isaria fumosorosea* con potencial para el control efectivo de plagas. Por otra parte, se deben desarrollar investigaciones que aporten conocimientos útiles para la optimización de las características deseables de sus conidios, de tal forma que éste hongo entomopatógeno se convierta en una alternativa cada vez más eficiente como agente de control biológico.

1.6. Ciclo infeccioso de los hongos entomopatógenos

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). 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 desarrollo de la enfermedad en el insecto está dividido en tres fases: (1) adhesión y germinación del conidio en la cutícula del insecto, (2) penetración en el hemocele y (3) desarrollo del

hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto (figura 1.2) (Téllez-Jurado *et al.*, 2009).

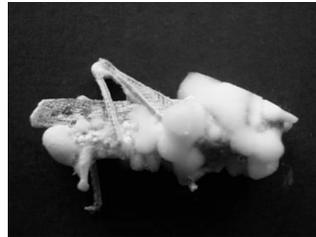


Figura 1.2. Aspecto de un insecto micosado.

1.6.1. Adhesión y germinación del conidio en la cutícula del insecto

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 espора a la superficie mediante el reconocimiento de receptores específicos de naturaleza glicoproteica en el insecto; la adhesión o consolidación de la interfase entre la espора 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).

1.6.2. Penetración en el hemocele

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).

1.6.3 Replicación en el hemocele

Una vez atravesado el exoesqueleto, comienza la invasión del sistema circulatorio del insecto (hemolinfa o hemocele), aquí realizan transición dimórfica de micelio a blastosporas, con las que colonizan los diversos órganos provocando una septicemia. En esta etapa comienzan los mecanismos de defensa del insecto que el hongo debe superar. Uno de los mecanismos con los que cuenta el hongo para superar estos sistemas de defensa, es la síntesis de moléculas tóxicas como las destruxinas (inducen parálisis tetánica) y beauvericinas (la primera producida por *Metarhizium anisopliae* y la segunda por *Beauveria bassiana* e *Isaria 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, 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). En la figura 1.3 se presenta un esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno.

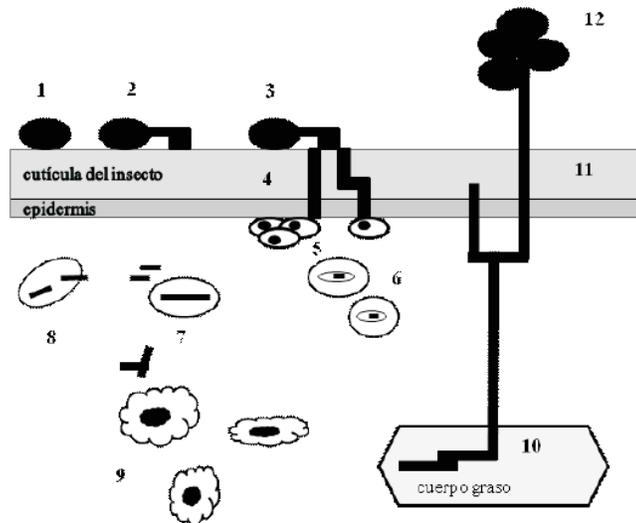


Figura 1.3. Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno (obtenido de Téllez-Jurado *et al.*, 2009). 1. Adhesión de la espora a la cutícula del insecto, 2. Germinación y formación del apresorio, 3. Penetración de la cutícula, 4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis, 5. Agregación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica, 6. Fagocitosis de cuerpo hifales por células fagocitas del insecto, 7. Transformación a cuerpos levaduriformes, 8. Evasión del sistema inmune, 9. Propagación en el homocelo, 10. Transformación a cuerpo hifal, 11. Esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto, 12. Diseminación de las esporas.

1.7. Factores que afectan la eficacia de los hongos entomopatógenos

La capacidad que tienen los hongos para enfermar a los insectos, depende de muchos factores; para su estudio, se pueden agrupar como factores asociados al hongo patógeno, factores asociados al hospedero, y factores asociados al medio ambiente. En el caso de los hongos como grupo, tienen uno de los más amplios intervalos de hospederos, comparados con otros patógenos de insectos; sin embargo, el espectro de hospederos varía ampliamente entre especies de hongos; por esta razón, es importante conocer el intervalo de hospederos en los que cada hongo puede tener acción. Otro aspecto importante, es que pueden existir diferencias en la virulencia entre cepas de la misma especie; al identificar este aspecto se pueden seleccionar las cepas más virulentas. Además, es importante considerar la capacidad de los propágulos para persistir en el medio ambiente; ya que, entre mayor sea su persistencia, se incrementan las

posibilidades de que la infección sea exitosa (Inglis *et al.*, 2001; Li y Feng, 2009; Bouamama *et al.*, 2010). En el caso del hospedero, el factor principal es la susceptibilidad que éste presente ante el ataque del hongo entomopatógeno. La susceptibilidad depende de factores fisiológicos y morfológicos, por ejemplo la densidad de población, el comportamiento, la edad, el estado nutricional, la genética y los daños por agentes químicos, mecánicos o enfermedad (Inglis *et al.*, 2001). La efectividad de los hongos como agentes de control natural depende mucho de las condiciones ambientales (Glare, 2004). La *radiación solar* puede afectar la persistencia de los propágulos o del micelio por la acción de la radiación UV tipo B (longitud de onda de 285 a 315 nm) (Inglis *et al.*, 2001). Por otra parte, se sabe que en *Isaria fumosorosea*, la conidiación es fotoinducida por pulsos de luz azul (longitud de onda de 450 nm) (Sánchez-Murillo *et al.*, 2004). La *temperatura* es uno de los principales factores que afecta la eficacia del hongo, este factor influye en la velocidad de la infección y el tiempo de muerte del insecto, pero por otra parte, el crecimiento vegetativo de la mayoría de hongos entomopatógenos, se inhibe cuando se tienen temperaturas de alrededor de 37°C. También se ha observado que diferentes aislados de la misma especie, pueden tener alta variabilidad en su resistencia a altas temperaturas; además, existen trabajos que han correlacionado este rasgo, con la zona geográfica de la cual provienen los aislados (Ferron, 1978; Inglis *et al.*, 2001; Rangel *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2009; Constanski *et al.*, 2011). La *humedad relativa* puede afectar de forma diferente dependiendo del hongo que se trate, la mayoría de hongos se mantienen estables bajo condiciones secas y frías, pero hay quienes sobreviven mejor a temperaturas moderadas y humedad alta (como *Metarhizium anisopliae*). Por otro lado, el agua es esencial para la germinación de los propágulos y para la conidiogénesis sobre cadáveres (Ferron, 1978; Inglis *et al.*, 2001; Bouamama *et al.*, 2010). La *lluvia*, además de que aumenta la humedad, puede funcionar como medio de dispersión de los propágulos; por otra parte, se ha considerado que con las lluvias fuertes, se podrían lavar los

propágulos adheridos a la cutícula de los insectos. Finalmente el *tipo de suelo*, por su tipo de textura, contenido de materia orgánica, humedad y la presencia de microflora, puede influir en la persistencia y en la eficacia del hongo entomopatógeno (Inglis *et al.*, 2001).

Debido a los factores mencionados, resulta indispensable establecer criterios de selección de hongos entomopatógenos, a partir de los cuales, sea posible seleccionar aquellos que sean óptimos para la aplicación en campo, incrementando así su eficacia. Ravensberg, (2011) propuso que los criterios de selección para el caso de una aplicación por inundación deben ser: *Mortalidad*, englobando en este criterio aspectos como la dosis, el modo de acción, la velocidad de muerte, la sensibilidad a factores abióticos y la persistencia. *Producción eficiente*, en cuanto a rendimiento y a costos. *Seguridad*, abordando aspectos toxicológicos y de afectación a organismos no blanco.

Posada y Vega, (2005) establecieron un sistema de tamizado, para seleccionar candidatos para producción en masa; emitieron parámetros y sus especificaciones correspondientes: porcentaje de mortalidad del insecto (debe ser 100%), tiempo promedio de supervivencia (≤ 3.5 días), distribución de la mortalidad del insecto (≤ 2 días), porcentaje de germinación de esporas ($> 85\%$), duración del ciclo de vida del hongo (≤ 8 días) y producción de esporas sobre el insecto ($\geq 1 \times 10^7$ esporas/insecto). Así, el aislado que cumpla con las 6 especificaciones (6 “x”) es el candidato más apto, 5 “x” es bueno, 4 “x” está dentro del promedio, y por debajo de este criterio (< 4 “x”) es inaceptable.

Es claro que si bien una producción eficiente debe seguir siendo un aspecto importante para la selección de hongos potenciales, también ha cobrado más importancia, el poner más atención en las características de calidad deseables que pueden tener los propágulos. Se ha observado que las condiciones para generar producciones máximas de conidios, no siempre han sido las mejores condiciones para obtener conidios de buena calidad para su aplicación en el campo (Hallsworth y Magan, 1995; Tarocco *et al.*, 2005).

La selección de candidatos para la producción comercial debe considerar múltiples criterios que, además, no solo contemplen la infectividad, sino que también incluyan sobrevivencia en el hábitat, crecimiento y conidiación característicos y estabilidad genética (Vandenberg *et al.*, 2004; Tarocco *et al.*, 2005).

1.8. Generación de propágulos con características deseables para la aplicación en campo

Con el reto que representa aumentar la eficacia de los hongos entomopatógenos como agentes de control, los investigadores se han dado a la tarea de buscar estrategias para generar características deseables en los conidios, de tal manera que se mejore su calidad y se incremente su potencial como candidatos para la generación en masa y su aplicación en campo. Se ha observado que aquellos organismos capaces de encender y apagar vías metabólicas en particular, según sea necesario para la adaptación fisiológica al medio ambiente y sus cambios, están favorecidos de forma natural para prevalecer dentro de una población microbiana; los hongos, por ejemplo, pueden incrementar los ácidos grasos saturados de sus membranas celulares para evitar su fluidez y prevenir la fusión y desintegración por aumentos de la temperatura ambiental (Steels *et al.*, 1994, Rangel, 2011). También pueden sintetizar pigmentos con función fotoprotectora, como la melanina de la pared celular o los carotenoides de las vesículas citoplasmáticas (Armstrong y Hearst, 1996; Butler *et al.*, 1998; Rangel *et al.*, 2006; Rangel, 2011).

Se ha visto que las características de virulencia contra insectos, la termotolerancia, la resistencia a radiación UV-B, etc., de los conidios de hongos entomopatógenos, es afectada en gran medida por ciertas condiciones físicas, químicas y nutrimentales a las que se expone el hongo durante el crecimiento del micelio (Rangel *et al.*, 2015). También se sabe que cuando el hongo se somete a factores de estrés ambientales, genera los productos, como ya se ha mencionado anteriormente, que sirven para proteger a la célula

del mismo estrés o para reparar el daño celular causado. Además, se ha observado que al someter el micelio a un factor estresante, los conidios generados pueden adquirir resistencia, no solo contra este factor, sino contra otros tipos de factores de estrés (protección cruzada) (Rangel, 2011). Es así, que se han realizado investigaciones experimentales, en las que diferentes aislados de hongos entomopatógenos se someten de forma artificial a condiciones de estrés subletales, con la finalidad de identificar aislados que de forma natural hayan adquirido alguna característica deseable, o que por el tratamiento al que son sometidos, hayan tenido la capacidad de desarrollarlas. De este modo, es que existen reportes en los que se ha logrado determinar que se puede afectar la fisiología, el crecimiento y la conidiación de un mismo microorganismo cuando es cultivado en medios distintos o con diferentes sustratos, (Kamp y Bidochka, 2002; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009; Mascarín *et al.*, 2010; Rangel *et al.*, 2015). Si bien, la respuesta de los hongos entomopatógenos ante los factores de estrés está en función de la especie, de la cepa o del aislado que se trate, los parámetros físicos y químicos, así como la fuente de alimentación, pueden inducir una gran variabilidad en la conidiación y en la resistencia de los conidios (Rangel *et al.*, 2015). Es una labor de alta relevancia, la identificación de los factores de estrés y la dosis en que se deban aplicar, para lograr el mejor efecto positivo en las características deseables de los conidios de los hongos entomopatógenos, como son: incremento de la calidad (virulencia, hidrofobicidad, termotolerancia, resistencia a alta presión osmótica y a irradiación UV-B, persistencia, estabilidad, etc.) o incremento de la producción de conidios.

2. Antecedentes

Actualmente, existen algunos trabajos que han permitido demostrar que los pulsos con 26% de oxígeno son un factor de estrés de los hongos entomopatógenos y que, bajo condiciones de laboratorio, han logrado mejorar la calidad o la producción de los conidios. Tlecuil-Beristain *et al.*, (2010) estudiaron el efecto de pulsos oxidantes con 26% de oxígeno en la conidiación del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*. En dicha investigación, los autores encontraron que los pulsos de oxígeno propiciaron un incremento del 100% en la producción de conidios, respecto a lo producido en condiciones normales (21% de oxígeno), logrando una producción máxima de 4.25×10^7 con/cm², sin alterar las características de calidad evaluadas (germinación, hidrofobicidad e infectividad contra *Tenebrio molitor*). Así mismo, en la investigación realizada por García-Ortiz *et al.* (2015) con *Metarhizium anisopliae*, también se encontró este fenómeno, ya que los pulsos con 26% de oxígeno incrementaron 86% la producción de conidios, con respecto a la condición normal de oxígeno; pero además, el tratamiento mejoró la termotolerancia de los conidios sin alterar su viabilidad, hidrofobicidad e infectividad contra *Tenebrio molitor*. Por otra parte, determinaron que existía un tiempo exacto, en el cual el micelio es competente para recibir el tratamiento con la atmósfera enriquecida y propiciar el incremento de la producción de conidios; el cual se encontró que es a las 60 h de cultivo. Garza-López *et al.*, (2012) determinaron que los pulsos con 26% de oxígeno no afectan la producción de conidios de *Beuveria bassiana* con respecto a una atmósfera normal; sin embargo, si se observó un efecto negativo en la calidad (germinación). Además, encontraron evidencia de que el tratamiento con la atmósfera rica en oxígeno, genera un estrés oxidante, el cual provoca daños celulares. Miranda-Hernández *et al.*, 2014, estudiaron en dos cepas de *I. fumosorosea* (ARSEF 3302 y CNRCB1), los efectos de una atmósfera enriquecida en oxígeno (26%) sobre la producción de conidios y la

calidad de éstos. Encontraron que, después de 180 h, la producción de conidios de ARSEF 3302 se incrementó 5 veces respecto a lo encontrado en atmósfera normal; por el contrario, la cepa CNRCB1 disminuyó la producción de conidios en más de un 50%. En cuanto a las características de calidad, en ambas cepas se observó que los conidios producidos bajo el tratamiento oxidante, presentaron mejorías, ya que se incrementó la infectividad contra larvas de *G. mellonella*, también aumentaron su tasa de germinación, así como la resistencia al estrés térmico y al estrés osmótico.

3. Justificación

Ante la necesidad de generar conocimientos que conlleven al desarrollo de productos para el control biológico, basados en el hongo *Isaria fumosorosea* y, considerando los trabajos previos que estudiaron el efecto de los pulsos con 26% de oxígeno, resulta importante determinar el momento preciso en el cual, este tratamiento oxidante, debe iniciarse para generar el mejor efecto positivo en las características deseables de los conidios. Una vez encontrado el momento idóneo de aplicación de los pulsos con oxígeno, la información no solo puede emplearse para el uso de este factor estresante, sino también para el tratamiento con cualquier otro factor de estrés que se encuentre asociado a la conidiación, y que con su aplicación se mejoren una o varias características que son deseables en los conidios; incrementando sus probabilidades de éxito como agentes de control biológico. Por otra parte, debido a la variabilidad que hay en la conidificación de las cepas de una misma especie, ante un mismo factor estresante, como es el caso de las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 de *Isaria fumosorea*; en este trabajo, se ha propuesto la aplicación de parámetros cinéticos de conidiación y la implementación de un parámetro novedoso, llamado Índice de coniciación (**Ic**), como herramientas para comparar el proceso de conidiación de ambas cepas.

4. Hipótesis

Existe un momento idóneo para iniciar la aplicación de pulsos con 26% de oxígeno, que propiciará el mejor incremento de la calidad de los conidios obtenidos en cultivo superficial, de dos cepas de *Isaria fumosorosea*, CNRCB1 y ARSEF 3302.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

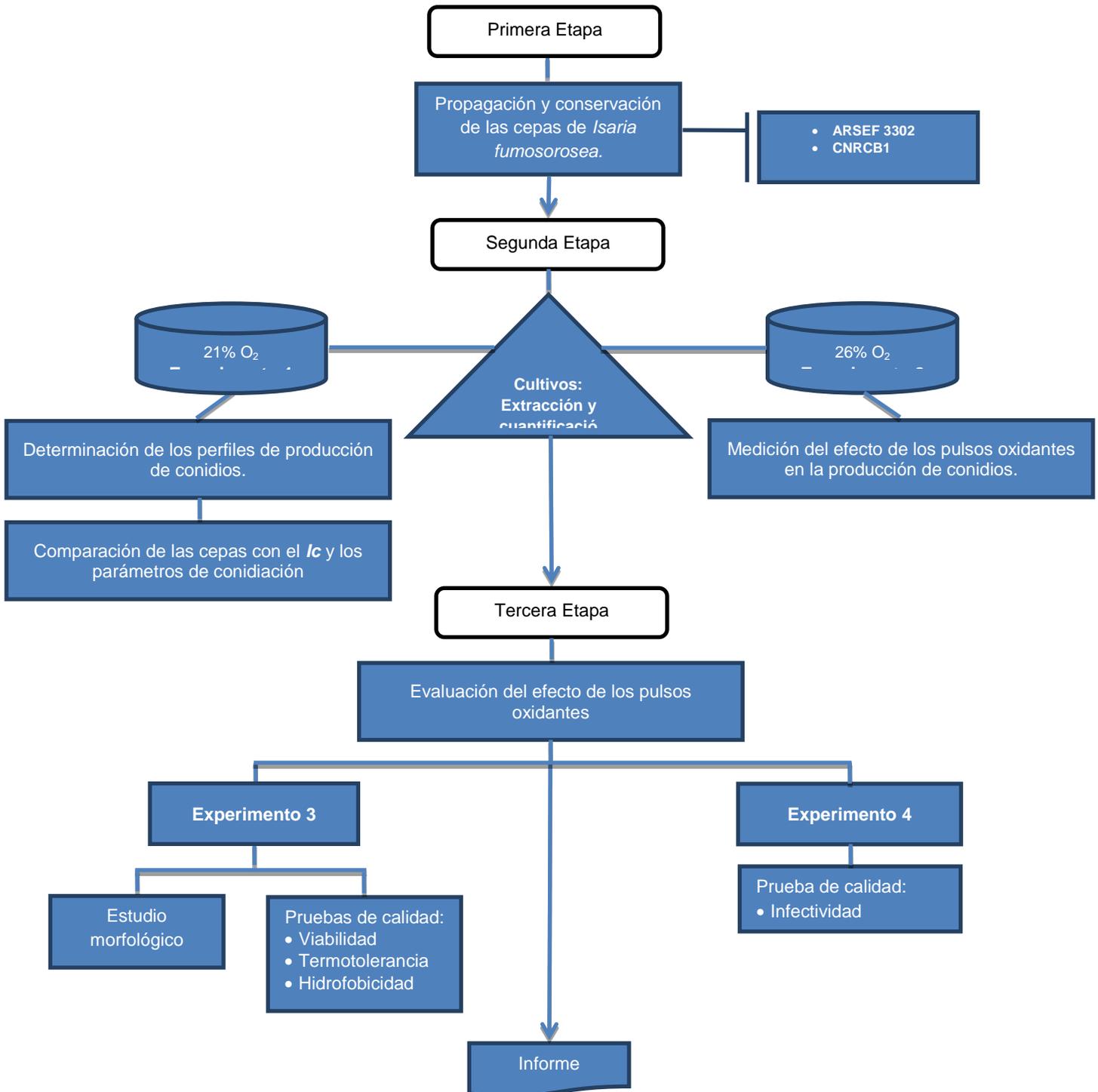
Determinar el momento idóneo para la aplicación de los pulsos con 26% de oxígeno, en el cual, se genere el mejor efecto positivo en la calidad de los conidios obtenidos en cultivo superficial, de dos cepas de *Isaria fumosorosea*, CNRCB1 y ARSEF 3302.

5.2 Objetivos específicos

- Generar parámetros cinéticos de conidiación que permitan comparar los perfiles de producción de conidios de las cepas estudiadas.
- Implementar el índice de conidiación (**Ic**) para el estudio del proceso de conidiación y, a partir de éste, determinar el momento de aplicación de los pulsos oxidantes.
- Determinar el efecto de los pulsos oxidantes en la conidiación de *Isaria fumosorosea* y cuantificar el efecto causado en las características deseables de sus conidios: calidad y producción.

6. Esquema general de la investigación

La investigación se dividió en tres etapas principales, como se muestra en el esquema siguiente:



7. Materiales y Métodos

7.1. Microorganismos

Para los estudios se utilizaron dos cepas de *Isaria fumosorosea*: CNRCB1, obtenida de la colección de hongos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) de Colima, México; y ARSEF 3302, que pertenece a la colección de cepas de hongos entomopatógenos del Agricultural Research Service Collection of Entomopathogenic Fungal (ARSEF) de Ithaca, Nueva York. Los números de acceso en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) son HM209049 y HM209050 respectivamente (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

7.2. Propagación de las cepas

Se emplearon dos tipos de medio de cultivo para la propagación de las cepas. Primero, se realizó la siembra por agotamiento de asa en cajas de Petri de 90 x 15 mm con medio Agar Dextrosa Sabouraud ADS (Bioxon), las cajas se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 días hasta que se presentara un césped abundante de conidios. Posteriormente, con una asa bacteriológica, se tomaron conidios de los cultivos en ADS y se inocularon en matraces Erlenmeyer de 250 ml de capacidad que contenían 50 ml del medio de cultivo (APA) indicado en la tabla 7.1 (Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010). Los matraces se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. La harina de avena se preparó con avena natural comercial (Sol campestre) que fue molida en una licuadora (Osterizer) y tamizada (tamiz No. 60), obteniéndose un tamaño de partícula no mayor de 250 micrómetros.

Tabla 7.1. Formulación del medio de cultivo de harina de avena (APA).

Componente	g/l
Harina de avena	33.3
Peptona de carne (Bioxon)	10
Agar bacteriológico (Bioxon)	15

7.3. Conservación de las cepas

Se aplicaron dos métodos para conservar a las cepas:

7.3.1. Agua desionizada estéril

Se esterilizaron viales de vidrio de 10 ml conteniendo 4 ml de agua desionizada y en estos se colocaron 5 trozos de aproximadamente 5 mm² de medio de cultivo ADS esporulado, los cuales se cortaron con ayuda de un bisturí estéril. Se generaron 8 viales para cada cepa y fueron almacenados a 4°C (López-Lastra *et al.*, 2002).

7.3.2. Crioconservación

Se prepararon 20 criotubos de 1.5 ml estériles para cada cepa, los criotubos se llenaron con una suspensión de conidios en Tween 80 al 0.05% y glicerol al 20% (como concentración final). Posteriormente, se almacenaron a -70°C (López-Lastra *et al.*, 2002; Montesinos-Matías, 2008).

7.4. Extracción y cuantificación de conidios

Se agregaron 20 mL de solución Tween 80 al 0.05% a los matraces Erlenmeyer que contenían el medio de cultivo APA y que presentaban un césped abundante de conidios (cultivos de 10 días de incubación aproximadamente). Los matraces se agitaron durante 10 minutos con parrilla de agitación (Thermo) y agitador magnético a una velocidad constante de 300 rpm. El conteo de los conidios se realizó en cámara de Neubauer

(Marienfeld) y microscopio (BOECO). A partir de los extractos de conidios con Tween 80 se prepararon suspensiones de conidios de 1×10^8 con/ ml, de éstas se tomaron los inóculos para realizar los diferentes experimentos de este trabajo. La producción de conidios (**Con**) se reportó como la cantidad de conidios por centímetro cuadrado de superficie de agar (con/cm²) (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).

7.5. Perfiles de producción de conidios

7.5.1. Inóculos

En condiciones de esterilidad, dentro de la campana de flujo laminar (Veco), se tomaron 100 µl (aproximadamente 1×10^7 conidios (5.76×10^5 con/cm²)) de las suspensiones 1×10^8 con/ ml y se inocularon en botellas serológicas de 125 ml que contenían 10 ml del medio de cultivo APA detallado en la tabla 7.1 (figura 7.1); cada botella se agitó manualmente para distribuir el inóculo en la superficie del medio, posteriormente se cerraron con tapones estériles de algodón y se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante el tiempo requerido en cada experimento (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010; Miranda-Hernández *et al.*, 2014).



Figura 7.1. Unidades experimentales para cinéticas de producción de conidios.

7.5.2. Producción de conidios en condiciones normales (21% de oxígeno)

7.5.2.1. Experimento 1

Este experimento, se realizó con la finalidad de conocer los perfiles de producción de conidios de ambas cepas de estudio, aplicar el modelo logístico para generar los parámetros de conidiación e implementar el uso del índice de conidiación (**Ic**). Estos parámetros, sirvieron como herramientas de comparación de la producción de conidios de ambas cepas, bajo condiciones atmosféricas normales (21% de oxígeno). Para llevar a cabo el experimento, se prepararon unidades experimentales (UE), como se indica en el apartado anterior, con inóculos de las dos cepas de estudio y se hizo el seguimiento de la producción de conidios a lo largo del tiempo (cinética de producción de conidios). Se nombró tiempo cero al momento en el que se realizó la inoculación de cada UE y, a partir de ese momento, se midió el tiempo de incubación. Los tiempos que se definieron para muestrear y realizar la cuantificación de la producción de conidios fueron 21, 36, 45, 60, 108, 180 y 204 h de incubación. El muestreo y la medición de la producción, en cada una de las cepas, se realizaron por triplicado en cada tiempo (excepto los tiempos 180 y 204 que se realizaron por duplicado, debido a la cantidad de UE disponibles). Durante el experimento se introdujo una UE que no fue inoculada y que se empleó como control negativo. Se realizaron gráficas de producción de conidios colocando en el eje de las abscisas el tiempo en horas y en el eje de las ordenadas la producción de conidios (**Con**).

7.6. Estudio de los perfiles de producción de conidios

7.6.1. Modelo Logístico

Las curvas obtenidas en las gráficas de producción de conidios presentaron una forma sigmoidea, por lo que se ajustaron al modelo logístico reportado por Tlecuil-Beristain *et*

al., (2010). Se adaptaron los términos correspondientes y la forma del modelo quedó de la manera siguiente:

$$\frac{d\text{Con}}{dt} = \mu \left[1 - \frac{\text{Con}}{\text{Con}_{\max}} \right] \text{Con} \dots\dots\dots (1)$$

Donde **Con** es la producción de conidios (con/cm²), **μ** es la velocidad específica de producción de conidios máxima (h⁻¹) y **Con_{max}** es la producción de conidios máxima alcanzada (con/cm²).

La solución de la ecuación es:

$$\text{Con} = \frac{\text{Con}_{\max}}{1 + C e^{-\mu t}} \dots\dots\dots (2)$$

Donde,

$$C = \frac{\text{Con}_{\max} - \text{Con}_0}{\text{Con}_0} \dots\dots\dots (3)$$

Con₀ es la concentración de conidios inicial (con/cm²).

Con la ecuación (2) se determinó **μ** para cada ensayo de producción de conidios. Con el valor de éste término se calculó el tiempo de duplicación de conidios máximo (**td**), con la ecuación (4):

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} \dots\dots\dots (4)$$

7.6.2. Índice de conidiación (**Ic**)

Se propuso la introducción de un parámetro nuevo llamado Índice de conidiación (**Ic**). Este parámetro indica cómo ha variado la producción de conidios a lo largo del tiempo con

respecto al inóculo inicial. El I_c se calculó, en todos los puntos en los que se realizó la determinación de la producción de conidios, con la ecuación (5):

$$I_c = C/C_i \dots \dots \dots (5)$$

Donde, C es la producción observada de conidios en un tiempo determinado y C_i es la concentración del inóculo inicial. Las unidades de ambos términos son con/cm².

7.7. Generación de atmósfera oxidante (Pulsos con 26% oxígeno)

Las UE sometidas a este tratamiento se colocaron dentro de la campana de flujo laminar, se les intercambiaron el tapón de algodón por un tapón de plástico estéril y se sellaron con papel Parafilm. Posteriormente se colocó una aguja que funcionó como salida de gas y se colocó una segunda aguja que a su vez estaba conectada a un tanque de gas con 26% de oxígeno (Praxair); una vez que ambas agujas fueron colocadas (figura 7.2), se abrió la llave del tanque para dejar pasar el gas hasta un flujo de 20 cm³/s. El gas se aplicó durante 1 minuto (pulso oxidante); concluido el tiempo, se retiraron las agujas y las UE se regresaron a la incubadora o iniciaron su incubación cuando el pulso oxidante se aplicó desde el tiempo cero. Durante el tiempo que duró cada experimento, el pulso oxidante se aplicó nuevamente cada 24 h para hacer el recambio atmosférico en las UE y renovar la atmósfera oxidante (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).



Figura 7.2. Aplicación de pulso oxidante con gas con 26% de oxígeno.

7.8. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes

7.8.1. Efecto en la producción de conidios

7.8.1.1. Experimento 2

Con la finalidad de observar el efecto a corto y a largo plazo que tuvo la atmósfera oxidante en la producción de conidios (**Con**), se diseñó un experimento en el cual se inició el recambio atmosférico en horas de cultivo diferentes; se determinó **Con** al momento de aplicar el primer pulso oxidante y a las 24 y 96 h después de haber iniciado el tratamiento. Los tiempos que se definieron para iniciar los pulsos con 26% de oxígeno fueron 0, 21, 36, 48 y 60 h de cultivo; por lo tanto, los tiempos de muestreo para evaluar **Con** fueron las triadas siguientes: 0, 24 y 96 h; 21, 45 y 117 h; 36, 60 y 132 h; 48, 72 y 144 h; y 60, 84 y 156 h. Para llevar a cabo el experimento, se realizó la cinética de producción de conidios con 21% de oxígeno (tratamiento control); del mismo lote de la cinética control, se fueron tomando las UE para realizar los recambios atmosféricos, con lo que se pudo medir **Con** para cada triada, en los mismos tiempos y en ambas condiciones de cultivo (atmósfera con 21 y 26% de oxígeno).

De este modo, desde el momento en el que se inoculó cada UE para la cinética (tiempo cero) se tomaron las primeras muestras para iniciar los pulsos oxidantes. Todas la UE se incubaron y transcurridas 24 h de cultivo, se tomaron las UE sometidas al tratamiento oxidante y se tomaron UE de la cinética control (atmósfera con 21% de O₂) para determinar **Con**; también a las 96 h de cultivo se tomaron UE de ambas condiciones de cultivo y se determinó **Con**. Se procedió de igual manera con las otras triadas de tiempo. El experimento se realizó de forma simultánea con ambas cepas; cada punto de muestreo se evaluó por triplicado y se empleó un control negativo (UE sin inóculo) para cada condición de cultivo. En todos los puntos que se midió **Con** y se calculó del **Ic**. Los

resultados de la cinética control de este experimento (parámetros de conidiación e **lc**) se aprovecharon para hacer la comparación de la producción de conidios, ya no solo entre cepas (como en el experimento 1), sino además, entre experimentos.

7.8.2 Efecto en la forma y la calidad de los conidios

7.8.2.1. Experimento 3

De forma general, el objetivo de este experimento, fue la generación de muestras de ambas condiciones atmosféricas de estudio (21 y 26% de oxígeno), para evaluar las diferencias en la morfología y la calidad de los conidios producidos. Pero se aprovecharon los datos, para evaluar una vez más, el efecto del tratamiento oxidante en la producción de conidios. Este experimento fue similar al experimento 2; en este caso se iniciaron los pulsos de oxígeno a las 0, 24, 36, 48 y 60 h de cultivo, pero sólo se determinó **Con** a las 96 h posteriores de haber generado la atmósfera oxidante (efecto a largo plazo). De tal manera que en lugar de tener triadas de tiempos, se tuvieron las duplas: 0-96 h; 24-120 h; 36-132 h; 48-144 h; y 60-156 h. Al igual que en el experimento 2, se realizó la cinética de producción de conidios con 21% de oxígeno (tratamiento control); del mismo lote de la cinética control se fueron tomando las UE para realizar los recambios atmosféricos, con lo que se pudo medir **Con**, ahora para cada dupla, en los mismos tiempos en ambas condiciones de cultivo (atmósfera con 21 y 26 % de oxígeno). Así, desde el momento en el que se inoculó cada UE para la cinética (tiempo cero) se tomaron las primeras muestras para realizar la generación de la atmósfera oxidante; todas la UE se incubaron; transcurridas 96 h de cultivo, se tomaron UE sometidas al tratamiento oxidante y se tomaron UE de la cinética (atmósfera con 21 % de O₂) para determinar **Con**. Se procedió de igual manera con las otras duplas de tiempo. El experimento se realizó de forma simultánea con ambas cepas; cada punto de muestreo se evaluó por triplicado y se empleó un control negativo (UE sin inóculo) para cada condición de cultivo. En todos los

puntos que se midió **Con**, se calculó el **Ic** y nuevamente, los resultados de la cinética control de este experimento (parámetros de conidiación e **Ic**), se aprovecharon para hacer la comparación de la producción de conidios entre cepas y entre experimentos.

Por otro lado, del mismo lote de UE preparadas para las cinéticas control de este experimento, se usaron UE que fueron procesadas para realizar la evaluación de la morfología de la conidiación. Estas muestras fueron tomadas en cada punto en el cual también se midió **Con**; en la tabla 7.2 se indican con una X, las muestras que se obtuvieron para cada cepa. Son 15 muestras para cada cepa, por lo que se generaron 30 muestras en total.

Tabla 7.2. Muestras tomadas para evaluar la morfología de la conidiación.

Tiempo (h)	21% O ₂	26% O ₂
0	X	
24	X	
36	X	
48	X	
60	X	
96	X	X
120	X	X
132	X	X
144	X	X
156	X	X

En este mismo experimento, también se tomaron UE del mismo lote de la cinética, para hacer la evaluación de las características de calidad: viabilidad, termotolerancia e hidrofobicidad. Cada evaluación se realizó por triplicado. En la tabla 7.3 se indica con una X los puntos en los que se muestreó para realizar las pruebas de calidad.

Tabla 7.3. Muestras tomadas para evaluar la calidad de los conidios.

Tiempo (h)	21% O ₂	26% O ₂
0	X	
96	X	X
120	X	X
132	X	X
144	X	X
156	X	X

7.8.2.2. Experimento 4

Se diseñó un cuarto experimento para evaluar la infectividad como cuarta característica de calidad de los conidios generados en ambas condiciones atmosféricas (21 y 26% de O₂). Al igual que en el experimento 3, se aplicaron los pulsos de oxígeno iniciales a las 0, 24, 36, 48 y 60 h de cultivo; pero en este caso, las UE que se sometieron a la atmósfera oxidante se mantuvieron así durante 156 h posteriores de haber aplicado el primer pulso oxidante; de tal manera que las duplas de tiempo fueron: 0-156 h; 24-180 h; 36-192 h; 48-204 h; y 60-216 h. En la tabla 7.4 se indican las muestras que fueron generadas.

Tabla 7.4. Muestras tomadas para evaluar la infectividad de los conidios.

Tiempo (h)	21 % O ₂	26 % O ₂
0	X	
156	X	X
180	X	X
192	X	X
204	X	X
216	X	X

7.9. Estudio de la morfología

Se aplicó la técnica de microscopía electrónica de barrido (MEB) para observar la conidiación de ambas cepas estudiadas. Se obtuvieron micrografías de cada punto de medición de producción de conidios descrito en el experimento 3; tanto en condiciones

normales de oxígeno como con el tratamiento con oxígeno al 26%. La toma de muestra y su procesamiento se realizó siguiendo el procedimiento que se describe a continuación (Ezziyani *et al.*, 2004; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2012):

- a) Cada muestra para MEB se obtuvo de la UE correspondiente con un horador como se muestra en la figura 7.3.



Figura 7.3. Toma de muestra para MEB a partir del medio de cultivo.

- b) Las muestras se colocaron en tubos de 2 ml (Eppendorf) con glutaraldehído al 3.5% (fijador primario) y se mantuvieron al menos 24 h en refrigeración (entre 2 y 8 °C).
- c) Trascurrido el tiempo, las muestras se lavaron con amortiguador de fosfatos (0.1 M, pH 7.4) hasta eliminar el glutaraldehído. Durante todo este proceso el amortiguador estuvo a 4°C.
- d) Posteriormente se hizo una segunda fijación agregando tetraóxido de osmio al 1% hasta cubrir las muestras y se dejó reaccionar por 2 h.
- e) Posteriormente se realizaron lavados con soluciones de etanol de menor a mayor concentración; con lo cual, se eliminó el tetraóxido de osmio y las muestras se deshidrataron. La deshidratación se efectuó en etapas de 15 minutos (2 veces) con disoluciones crecientes de etanol de 30, 40, 50, 70, 80, 90% y absoluto. En esta etapa del proceso, las muestras adquirieron una coloración negra característica (figura 7.4).

NOTA: Los pasos d) y e) también se realizaron a 4°C (hasta el etanol al 70%, después se realizó a temperatura ambiente).



Figura 7.4. Muestras colocadas en tubos de 2 ml (Eppendorf) para los procesos de fijación, lavado y deshidratación.

- f) Terminada la deshidratación, las muestras se encapsularon manteniéndolas siempre sumergidas en etanol absoluto (figura 7.5) y se secaron mediante el método de punto crítico. En el equipo de secado (figura 7.6), el etanol es sustituido por un flujo de CO₂ líquido; una vez retirado todo el etanol, se incrementa la temperatura hasta que la densidad de la fase líquida y de la fase gaseosa del CO₂ se igualan, haciéndose indistinguible la interfase líquido-gas (punto crítico). En estas condiciones, es posible llevar todo el líquido a la fase gaseosa sin que exista tensión en la superficie de la muestra, evitando daños estructurales (Ris, 1985).



Figura 7.5. Encapsulamiento de las muestras sumergidas en etanol absoluto.



Figura 7.6. Equipo de secado a punto crítico (Tousimis).

- g) Terminado el proceso de secado, las muestras se montaron en soportes metálicos con cinta conductiva de carbón de doble cara adhesiva y grafito coloidal. Las muestras se dejaron secar por lo menos 24 h.
- h) Las muestras se cubrieron con oro con el método de pulverización catódica conocido como “sputtering” en el equipo mostrado en la imagen 7.7.



Figura 7.7. Equipo depositador de iones metálicos al vacío para bañar las muestras con oro por el método de “sputtering”.

- i) Se realizó la observación de las muestras preparadas en el microscopio electrónico de barrido (figura 7.8) entre 10 y 15 kV y se adquirieron las micrografías correspondientes.



Figura 7.8. Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5900LV.

7.10. Pruebas de calidad

7.10.1. Viabilidad

Para medir la viabilidad de los conidios, en condiciones de esterilidad se prepararon suspensiones 1×10^4 con/mL, se tomaron 30 μ L (300 conidios aproximadamente) y fueron inoculados en cajas de Petri con agar Dextrosa Sabouraud. Las cajas se incubaron a $27 \pm$

2°C por 60 h y se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes y se determinó el porcentaje de viabilidad teniendo como base que 300 conidios corresponden al 100% de viabilidad (Miranda-Hernández *et al.*, 2014). No se adicionó desoxicolato de sodio al medio de cultivo, ya que el crecimiento de las colonias fue tal, que no se encimaron entre sí, permitiendo realizar el conteo sin problema.

7.10.2. Termotolerancia

Las mismas suspensiones (1×10^4 con/mL) empleadas para la viabilidad se colocaron a 40°C durante 1 h en un termomezclador (Eppendorf) (figura 7.9). Transcurrido el tiempo se procedió a determinar la viabilidad de los conidios como se explicó anteriormente (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).



Figura 7.9. Incubación a 40°C en el termomezclador.

7.10.3. Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la superficie de los conidios se evaluó usando un ensayo de partición acuosa-disolvente con n-hexadecano como fase orgánica (figura 7.10). Los conidios de cada tratamiento se suspendieron en una solución de KNO_3 0.1 M. La suspensión se agitó 30 s en un vórtex; posteriormente se determinó la densidad óptica (DO) de la suspensión de conidios a 660 nm, utilizando el espectrofotómetro (Beckman) mostrado en la figura

7.11; con lo cual se generó el dato de densidad óptica total (OD_{total}). A continuación, 3 ml de la suspensión de conidios, se transfirieron a un tubo que contenía 1 ml de n-hexadecano y se agitó durante 20 s. Después de 30 min, la fase orgánica se eliminó usando una micropipeta, y se midió la densidad óptica de la fase acuosa (OD_{aq}). A continuación, la hidrofobicidad (H) relativa se determinó con la ecuación siguiente:

$$H = 100 (1 - OD_{aq} / OD_{total}) \dots \dots \dots (6)$$

Donde OD_{total} y OD_{aq} representan los valores de la muestra inicial y de la fase acuosa post-tratamiento, respectivamente (Shah *et al.*, 2007).

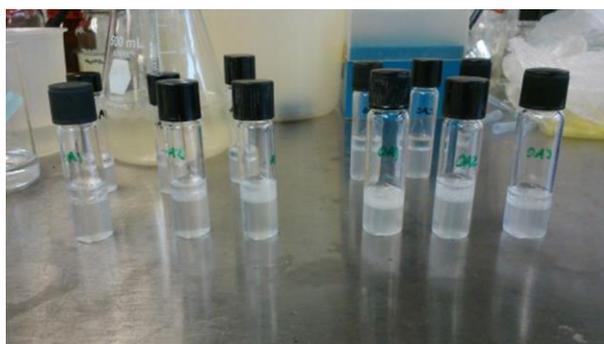


Figura 7.10. Ensayo de partición acuosa-disolvente con n-hexadecano como fase orgánica.



Figura 7.11. Espectrofotómetro Beckman DU-640, EE.UU.

7.10.4. Infectividad

La infectividad de los conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea*, obtenidos en las diferentes condiciones, se evaluó usando larvas de la polilla de la cera, *Galleria mellonella* (Petmmal). 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 fueron placas de Petri (90 x 15 mm) que contenían

diez larvas (figura 7.12); 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 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 y para corroborar que la muerte fue causada por el hongo (Miranda-Hernández *et al.*, 2014).



Figura 7.12. Unidades experimentales para bioensayos.

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

$$Y = (100 - S) e^{-k(t-t_0)} + S \dots\dots\dots (7)$$

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 (7), se determinó el tiempo en el que se logró la muerte del 50% de la población, TL_{50} .

7.11. Análisis estadístico

Se emplearon las herramientas Solver y Análisis de datos de Microsoft Excel (2010). La primera herramienta se aplicó para realizar el ajuste de los datos experimentales al modelo logístico, en el estudio de los perfiles de producción de conidios; y al modelo de decaimiento exponencial, en el bioensayo de infectividad. La segunda herramienta se utilizó para aplicar la prueba de t de Student en la comparación de medias obtenidas en cada experimentación, usando un nivel de significancia estadística de 0.05%. Con el software PASW Statistics, versión 18.0 (2009), se realizaron análisis de varianza utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$, para evaluar el efecto del tiempo en la eficiencia del proceso de conidiación (cinéticas de producción de conidios analizadas con el **lc**).

8. Resultados

8.1. Perfiles de producción de conidios

8.1.1. Producción de conidios en condiciones normales (21% de oxígeno). Experimento 1.

Este experimento se realizó para determinar los perfiles de producción de conidios de las cepas de estudio y compararlos entre sí, aplicando el **lc** y los parámetros de conidiación generados con el modelo logístico. En las figuras 8.1 y 8.2 se presentan las gráficas de producción de conidios a lo largo del tiempo (cinéticas de producción de conidios) que se obtuvieron para las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302. Los puntos corresponden a cada réplica de la medición de la producción de conidios, observada experimentalmente en cada tiempo (Con. Obs.). La línea continua corresponde a la producción de conidios calculada con el modelo logístico (Con. Calc.). En la tabla 8.1 se presentan los parámetros cinéticos calculados con ambas cepas a partir del modelo: Producción de conidios máxima (**Con_{max}**); cantidad de conidios inicial (Inóculo inicial **Con₀**); velocidad específica de producción de conidios máxima (**μ**); tiempo de duplicación máximo (**td**); y coeficiente de correlación (**R²**).

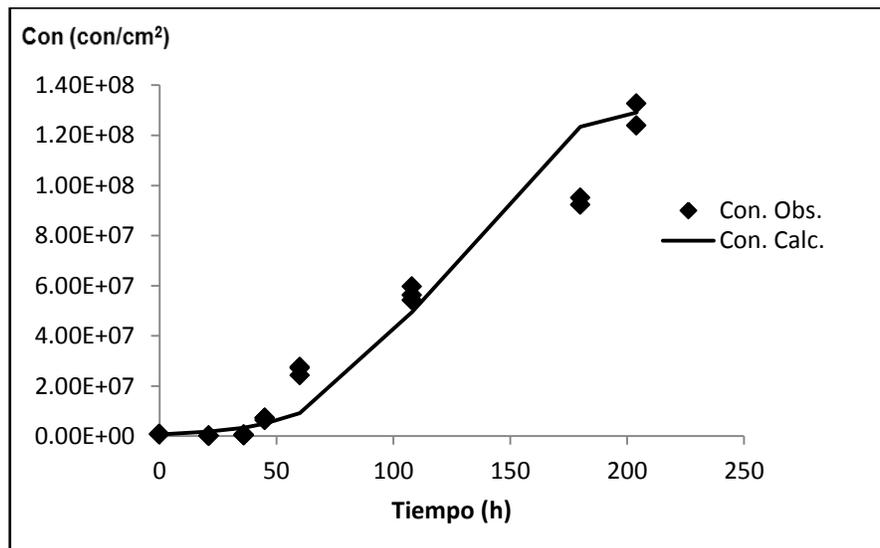


Fig. 8.1. Perfil de producción de conidios de la cepa CNRCB1 (experimento 1).

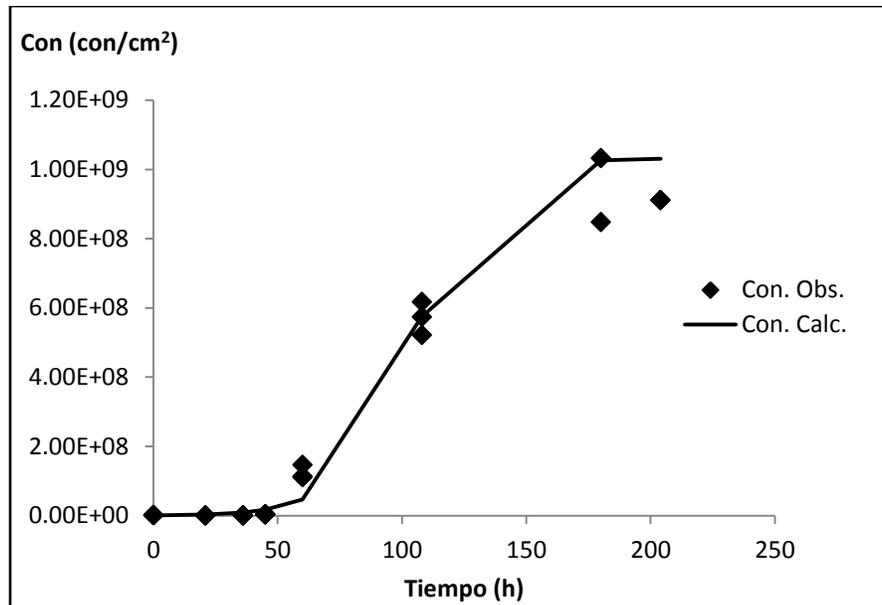


Fig. 8.2. Perfil de producción de conidios de la cepa ARSEF 3302 (experimento 1).

Tabla 8.1. Parámetros cinéticos de las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 (experimento 1)

PARÁMETRO	CEPAS	
	CNRCB1	ARSEF 3302
Con_{max}	1.33 x 10⁸ con/cm²	1.03 x 10⁹ con/cm²
Con₀	7.35 x 10⁵ con/cm²	7.93 x 10⁵ con/cm²
μ	*0.043 ± 0.006 h⁻¹	0.069 ± 0.012 h⁻¹
td	16.02 h	10.12 h
R²	0.945	0.984

* Diferencia estadísticamente significativa entre cepas.

Con estos resultados se determinó que la cepa ARSEF 3302 tuvo mayor velocidad de producción de conidios en comparación con la cepa CNRCB1; lo cual se evidencia por los valores de μ y de td en la tabla 8.1. También se observó que el modelo logístico presentó un buen ajuste a los datos, ya que explica más del 94% de los datos experimentales.

La tabla 8.2 muestra los promedios de la producción observada de conidios (**C**), determinados en tiempos diferentes para ambas cepas estudiadas. Con estos datos se calcularon los Índices de conidiación (**Ic**) correspondientes (tabla 8.3). Los valores del inóculo inicial (**Ci**) considerados para realizar el cálculo del **Ic**, fueron equivalentes a los datos de **Con₀** indicados para cada cepa en la tabla 8.1.

Tabla 8.2. Producción observada promedio obtenida con atmósfera de oxígeno normal (experimento 1).

Tiempo (h)	Producción observada de conidios C (con/cm ²)			
	CNRCB1		ARSEF3302	
	Promedio	DE	Promedio	DE
21	1.34 x 10 ⁵	8.80 x 10 ³	1.29 x 10 ⁵	3.75 x 10 ⁴
36	4.34 x 10 ⁵	1.82 x 10 ⁵	3.38 x 10 ⁵	9.16 x 10 ⁴
45	6.96 x 10 ⁶	4.83 x 10 ⁵	2.81 x 10 ⁶	5.59 x 10 ⁵
60	2.63 x 10 ⁷	1.82 x 10 ⁶	1.23 x 10 ⁸	1.99 x 10 ⁷
108	5.67 x 10 ⁷	2.77 x 10 ⁶	5.71 x 10 ⁸	4.76 x 10 ⁷
180*	9.37 x 10 ⁷	2.04 x 10 ⁶	9.40 x 10 ⁸	1.30 x 10 ⁸
204*	1.28 x 10 ⁸	6.11 x 10 ⁶	9.11 x 10 ⁸	0.00**

* Puntos que se hicieron solo por duplicado, ** Mismo valor en ambas determinaciones. **DE** Desviación estándar.

Tabla 8.3. Índice de conidiación (**Ic**) calculado a partir de la producción observada y obtenida con atmósfera de oxígeno normal (experimento 1).

Tiempo (h)	Índice de conidiación Ic					
	CNRCB1			ARSEF3302		
	Promedio	DE		Promedio	DE	
21	a 0.18	0.01		a 0.16	0.05	
36	b 0.59	0.25		b 0.43	0.12	
45	c 9.46	0.66		c' 3.55	0.71	
60	d 35.82	2.47		d' 155.39	25.17	
108	e 77.12	3.77		e' 720.00	60.08	
180*	f 127.45	2.77		f' 1185.45	164.56	
204*	g 174.51	8.32		f' 1149.09	0.00**	

* Puntos que se hicieron solo por duplicado, ** Mismo valor en ambas determinaciones. **DE** Desviación estándar. Las diferentes letras al inicio de cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa entre tiempos. Las letras con comilla implican diferencia estadísticamente significativa entre cepas.

Al inicio de las cinéticas de producción (tiempo cero), el ***Ic*** tiene un valor de 1, ya que ***C*** y ***Ci*** son iguales. Con los resultados de la tablas 8.3 se observó que hubo un período de tiempo (21 a 36 h) en el cual el ***Ic*** presentó valores menores que 1; posteriormente se observó que entre las 36 y 48 h, el ***Ic*** se incrementó abruptamente en los tiempos siguientes, debido a la producción exponencial de los conidios que se muestra en la tabla 8.2. Estos resultados mostraron que el ***Ic*** es un indicador de la eficiencia de la conidiación, ya que indica cómo aumenta la producción de conidios con respecto al inóculo inicial a un tiempo determinado.

8.2. Estudio del efecto de los pulsos oxidantes

8.2.1. Efecto en la producción de conidios. Experimento 2.

Este experimento fue realizado principalmente para medir el efecto de los pulsos oxidantes en la producción de conidios de ambas cepas estudiadas, pero se aprovecharon los perfiles de producción de conidios generados en el experimento, bajo atmósfera normal (21% de oxígeno), para hacer comparaciones entre cepas y entre experimentos (1 y 2). En las figuras 8.3 y 8.4 se muestran las cinéticas de producción de conidios en condiciones atmosféricas normales obtenidas para las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 en el experimento 2; los parámetros cinéticos correspondientes se presentan en la tabla 8.4.

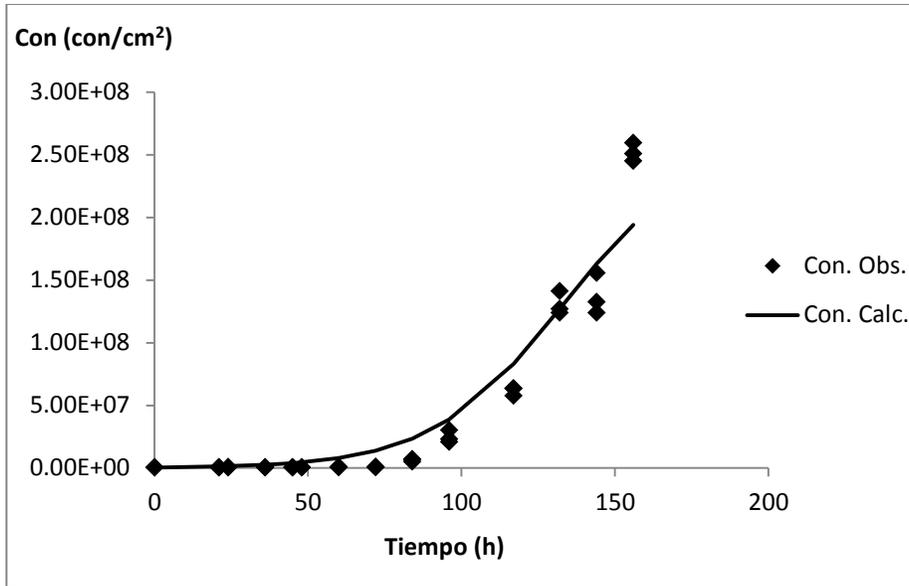


Fig. 8.3. Perfil de producción de conidios de la cepa CNRCB1 (experimento 2).

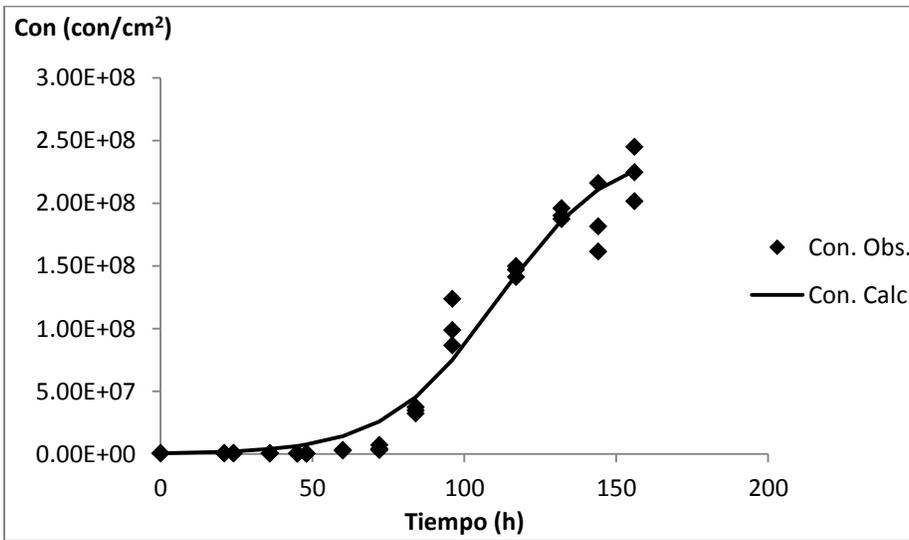


Fig. 8.4. Perfil de producción de conidios de la cepa ARSEF 3302 (experimento 2).

Tabla 8.4. Parámetros cinéticos de las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 (experimento 2)

PARÁMETRO	CEPAS	
	CNRCB1	ARSEF 3302
Con_{max}	2.59 x 10⁸ con/cm²	2.45 x 10⁸ con/cm²
Con₀	6.05 x 10⁵ con/cm²	5.76 x 10⁵ con/cm²
μ	*0.046 ± 0.003 h⁻¹	0.055 ± 0.005 h⁻¹
td	15.21 h	12.71 h
R²	0.938	0.969

* Diferencia estadísticamente significativa entre cepas.

Con estos resultados se observó que, al igual que en el experimento 1, la cepa ARSEF 3302 presentó mayor velocidad para generar conidios que la cepa CNRCB1; sin embargo, la diferencia entre las cepas fue notablemente menor ya que, mientras que en el experimento 1, la diferencia de los valores de **td** fue de 5.9 h; en el experimento 2, fue de 2.5 h.

En la tabla 8.5 se presentan los promedios de la producción observada de conidios (**C**) que se obtuvieron en las cinéticas de producción de ambas cepas, bajo condiciones atmosféricas normales, en el experimento 2. La tabla 8.6 muestra, para ambas cepas, los promedios de **C** obtenidos bajo la atmósfera enriquecida con 26% de oxígeno, a las 24 y 96 horas después de haber iniciado el recambio atmosférico, cuando el primer pulso oxidante se aplicó en diferentes horas de cultivo: 0, 21, 36, 48 y 60 h (**C**₀, **C**₂₁, **C**₃₆, **C**₄₈ y **C**₆₀).

Tabla 8.5. Producción observada promedio obtenida con atmósfera de oxígeno normal (experimento 2).

Tiempo (h)	Producción de conidios C (con/cm ²)			
	CNRCB1		ARSEF3302	
	Promedio	DE	Promedio	DE
21	5.67 x 10 ⁵	4.40 x 10 ⁴	4.90 x 10 ⁵	2.88 x 10 ⁴
24	6.24 x 10 ⁵	1.59 x 10 ⁵	5.48 x 10 ⁵	2.88 x 10 ⁴
36	5.00 x 10 ⁵	4.40 x 10 ⁴	4.32 x 10 ⁵	9.98 x 10 ⁴
45	4.03 x 10 ⁵	2.88 x 10 ⁴	3.84 x 10 ⁵	7.25 x 10 ⁴
48	4.13 x 10 ⁵	3.33 x 10 ⁴	3.55 x 10 ⁵	6.66 x 10 ⁴
60	6.63 x 10 ⁵	2.88 x 10 ⁴	2.98 x 10 ⁶	2.45 x 10 ⁵
72	7.49 x 10 ⁵	5.76 x 10 ⁴	4.77 x 10 ⁶	2.11 x 10 ⁶
84	6.19 x 10 ⁶	1.03 x 10 ⁶	3.49 x 10 ⁷	2.59 x 10 ⁶
96	2.47 x 10 ⁷	4.96 x 10 ⁶	1.03 x 10 ⁸	1.88 x 10 ⁷
117	6.15 x 10 ⁷	3.33 x 10 ⁶	1.46 x 10 ⁸	4.40 x 10 ⁶
132	1.31 x 10 ⁸	9.26 x 10 ⁶	1.91 x 10 ⁸	4.40 x 10 ⁶
144	1.37 x 10 ⁸	1.64 x 10 ⁷	1.86 x 10 ⁸	2.77 x 10 ⁷
156	2.52 x 10 ⁸	7.25 x 10 ⁶	2.24 x 10 ⁸	2.16 x 10 ⁷

DE Desviación estándar.

Tabla 8.6. Producción observada promedio obtenida en atmósfera oxidante (experimento 2).

Producción observada de conidios C (con/cm ²) de CNRCB1										
Tiempo (h)	C ₀		C ₂₁		C ₃₆		C ₄₈		C ₆₀	
	Promedio	DE								
24	5.00 x 10 ⁵	8.32 x 10 ⁴	3.46 x 10 ⁵	8.65 x 10 ⁴	6.92 x 10 ⁵	2.88 x 10 ⁴	7.88 x 10 ⁵	1.66 x 10 ⁴	3.18 x 10 ⁶	5.25 x 10 ⁵
96	7.78 x 10 ⁶	7.63 x 10 ⁵	4.61 x 10 ⁷	2.88 x 10 ⁶	7.59 x 10 ⁷	1.66 x 10 ⁶	6.82 x 10 ⁷	1.66 x 10 ⁶	8.74 x 10 ⁷	1.66 x 10 ⁷
Producción observada de conidios C (con/cm ²) de ARSEF 3302										
Tiempo (h)	C ₀		C ₂₁		C ₃₆		C ₄₈		C ₆₀	
	Promedio	DE								
24	5.38 x 10 ⁵	7.25 x 10 ⁴	3.27 x 10 ⁵	7.25 x 10 ⁴	1.05 x 10 ⁶	6.66 x 10 ⁴	2.24 x 10 ⁶	1.83 x 10 ⁵	1.63 x 10 ⁷	1.20 x 10 ⁶
96	1.19 x 10 ⁷	8.80 x 10 ⁵	5.28 x 10 ⁷	4.40 x 10 ⁶	9.61 x 10 ⁷	8.80 x 10 ⁶	9.32 x 10 ⁷	9.26 x 10 ⁶	1.34 x 10 ⁸	2.60 x 10 ⁷

DE Desviación estándar.

Con los datos de las tablas 8.5 y 8.6 se calcularon los Índices de conidiación (*I_c*) correspondientes y que se presentan en las tablas 8.7 y 8.8. Por una parte, se muestran los *I_c* obtenidos a lo largo de la cinética de producción de conidios en condiciones

atmosféricas normales ($IC_{21\%}$); y por otro lado, se muestran los IC obtenidos en las condiciones oxidantes, 24 y 96 h después de haber aplicado el primer pulso oxidante en tiempos diferentes: 0, 21, 36, 48 y 60 h ($IC_{26\%-0}$; $IC_{26\%-21}$; $IC_{26\%-36}$; $IC_{26\%-48}$; y $IC_{26\%-60}$). Los valores del inóculo inicial (Ci) considerados en el cálculo del IC , fueron equivalentes a los datos de Con_0 indicados para cada cepa en la tabla 8.4.

Tabla 8.7. Índice de conidiación (IC) calculado para CNRCB1 a partir de la producción observada obtenida con atmósfera normal y atmósfera oxidante (experimento 2).

Tiempo (h)	$IC_{21\%}$		$IC_{26\%-0}$		$IC_{26\%-21}$		$IC_{26\%-36}$		$IC_{26\%-48}$		$IC_{26\%-60}$	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
0*	1.00	0.00										
21*	a 0.94	0.07										
24	a 1.03	0.26	a 0.83	0.14								
36*	a 0.83	0.07										
45	a 0.67	0.05			a 0.57	0.14						
48*	a 0.68	0.05										
60*	a 1.10	0.05					a 1.14	0.05				
72	a 1.24	0.10							a 1.30	0.03		
84	b 10.22	1.70									b' 5.25	0.87
96	c 40.79	8.20	c', b 12.86	1.26								
117	d 101.59	5.50			d' 76.19	4.76						
132	e 215.87	15.31					e' 125.40	2.75				
144	e 226.98	27.08							f' 112.70	2.75		
156	f 415.87	11.98									g' 144.44	27.49

*Tiempo de inicio del primer pulso oxidante; DE Desviación estándar. Las diferentes letras al inicio de cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa entre tiempos. Las letras con comilla, indican diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

Tabla 8.8. Índice de conidiación (IC) calculado para ARSEF 3302 a partir de la producción observada obtenida con atmósfera normal y atmósfera oxidante (experimento 2).

Tiempo (h)	$IC_{21\%}$		$IC_{26\%-0}$		$IC_{26\%-21}$		$IC_{26\%-36}$		$IC_{26\%-48}$		$IC_{26\%-60}$	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
0*	1.00	0.00										
21*	a 0.85	0.05										
24	a 0.95	0.05	a 0.93	0.13								
36*	a 0.75	0.17										
45	b 0.67	0.13			b 0.57	0.13						
48*	b 0.62	0.12										
60*	c 5.17	0.43					c' 1.82	0.12				
72	c 8.28	3.66							d' 3.88	0.32		
84	d 60.50	4.50									e' 28.33	2.08
96	e 178.83	32.62	f' 20.67	1.53								
117	f 253.33	7.64			g' 91.67	7.64						
132	g 331.67	7.64					h', e 166.67	15.28				
144	g, h 323.33	48.05							h', e 161.67	16.07		
156	h 388.33	37.53									i', f 231.67	45.09

*Tiempo de inicio del primer pulso oxidante; DE Desviación estándar. Las diferentes letras al inicio de cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa entre tiempos. Las letras con comilla, indican diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos.

Respecto a las condiciones atmosféricas normales, los resultados se muestran en las tablas 8.7 y 8.8. En estas, se observa que, al igual que en el experimento 1, hubo un período de tiempo en el cual el **lc** presentó valores menores que 1, pero en este caso en lugar de ir de 21 a 36 h, el período de tiempo fue más largo, de 21 a 48 h. Posteriormente, entre las 48 y 60 h, se observó un incremento en los valores de **lc**, los cuales superaron la unidad (esto se observó en el experimento 1 pero entre las 36 y 48 h), en los tiempos siguientes, en **lc** se incrementó debido a la producción exponencial de los conidios que se muestra en la tabla 8.5.

En lo que respecta al efecto de las condiciones oxidantes sobre la producción (determinado con el **lc**), al ver la respuesta a corto plazo (24 h) que presentó la cepa CNRCB1 (tabla 8.7), solamente se observó una disminución del valor del **lc** (5.25) y que fue de un 49%, con respecto al valor del **lc** (10.22) de la atmósfera normal, cuando el primer pulso oxidante se aplicó a las 60 h de cultivo; en los demás casos (primer pulso oxidante aplicado a las 0, 21, 36 y 48 h) el valor de **lc** no presentó diferencia con respecto a la atmósfera normal; es decir, en estos casos no hubo afectación en la producción de conidios. Pero cuando se evaluó la respuesta a largo plazo (96 h), en todos los casos se presentó una afectación negativa, con respecto a la atmósfera normal, de 68, 35, 42, 50 y 75% para cada uno de los tiempos diferentes de inicio de la atmósfera oxidante (0, 21, 36, 48 y 60 h, respectivamente); sin embargo, no se observó un perfil de afectación claro conforme se movieron los tiempos de inicio de los pulsos.

En el caso de la cepa ARSEF 3302 (tabla 8.8), se observó que en la respuesta a corto plazo, tuvo mayor sensibilidad al tratamiento con respecto a la cepa CNRCB1, ya que la afectación se presentó antes; hubo un 75% de afectación en la producción cuando se inició el pulso oxidante a las 36 h, y un 53% de afectación cuando se aplicó el primer pulso oxidante a las 48 y 60 h. En la respuesta a largo plazo (96 h), en todos los casos,

también se presentó una afectación negativa con respecto a la atmósfera normal, de 88, 74, 50, 50 y 40% para cada uno de los tiempos diferentes de inicio de la atmósfera oxidante (0, 21, 36, 48 y 60 h, respectivamente). Se pudo observar un perfil de afectación descendente, pues el efecto disminuyó en intensidad conforme se movió el tiempo de inicio de los pulsos. En este experimento, el análisis de datos realizado con el **lc**, mostró que la atmósfera oxidante afectó de forma negativa la eficiencia del proceso de conidiación de ambas cepas; la afectación promedio de la atmósfera oxidante en la producción, fue de 53% en la cepa CNRCB1 y 60% en la cepa ARSEF 3302.

Con este experimento se concluyó que no era necesario seguir midiendo el efecto a corto plazo, ya que en algunos casos no se detecta diferencia entre tratamientos o el efecto general fue similar al obtenido a largo plazo. También se observó que el valor del **lc** no es diferente entre las 21 y 24 h en condiciones atmosféricas normales, así que por practicidad experimental, el pulso oxidante que se inició a las 21 h en el experimento 1, se aplicó a las 24 h en los experimentos siguientes.

8.2.2. Efecto en la producción de conidios. Experimento 3.

Esta sección del experimento 3, se realizó para medir el efecto de los pulsos oxidantes en la producción de conidios y comparar los resultados con los obtenidos en el experimento 2. Además, se aprovechó la información de los perfiles de producción generados (**lc** y parámetros de conidiación), para comparar la producción de conidios entre las cepas y entre los experimentos (1, 2 y 3). En las figuras 8.5 y 8.6 se muestran las cinéticas de producción de conidios en condiciones atmosféricas normales, obtenidas para las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 en el experimento 3; los parámetros cinéticos correspondientes se presentan en la tabla 8.9.

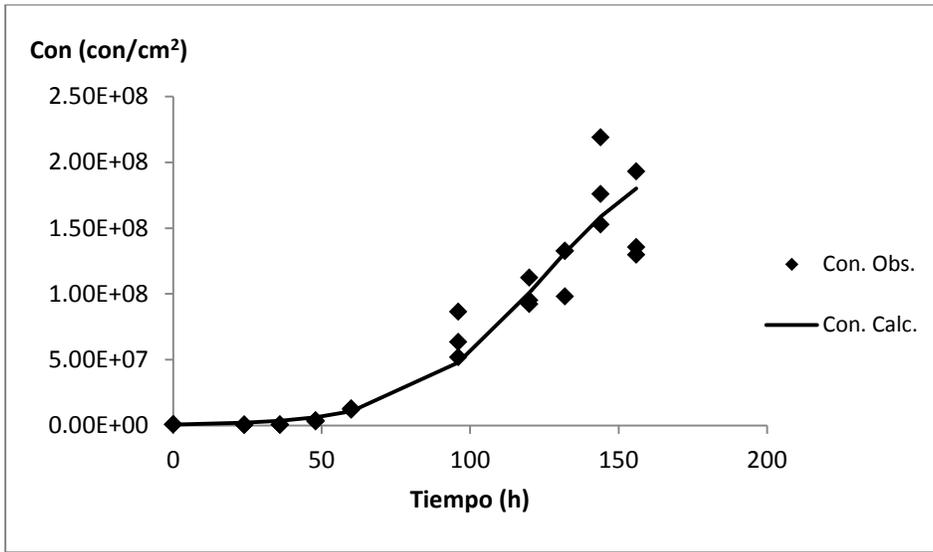


Fig. 8.5. Perfil de producción de conidios de la cepa CNRCB1 (experimento 3).

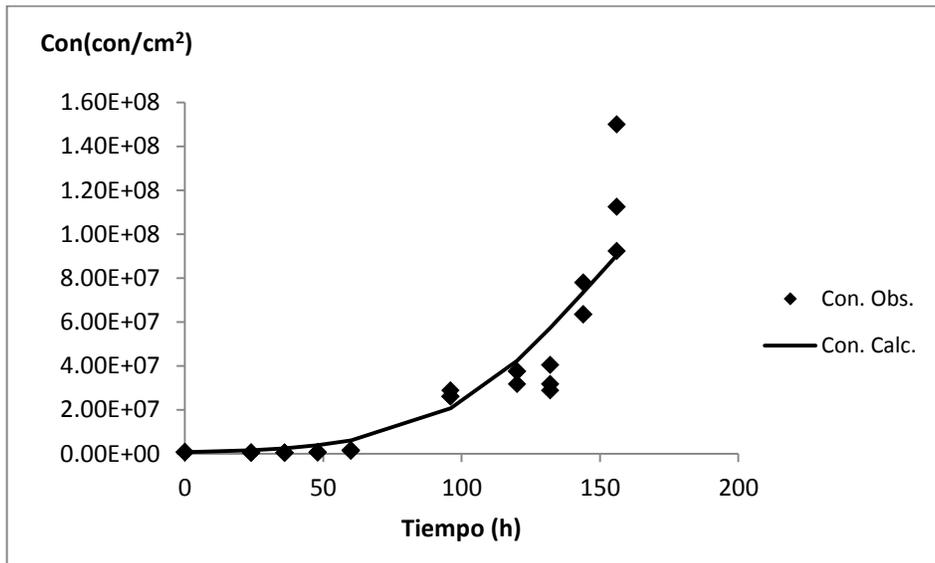


Fig. 8.6. Perfil de producción de conidios de la cepa ARSEF 3302 (experimento 3).

Tabla 8.9. Parámetros cinéticos de las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 (experimento 3)

PARÁMETRO	CEPAS	
	CNRCB1	ARSEF 3302
Con_{max}	2.19 x 10⁸ con/cm²	1.50 x 10⁸ con/cm²
Con₀	6.77 x 10⁵ con/cm²	6.63 x 10⁵ con/cm²
μ	*0.047 ± 0.004 h⁻¹	0.037 ± 0.002 h⁻¹
td	14.79 h	18.54 h
R²	0.917	0.857

* Diferencia estadísticamente significativa entre cepas.

Estos resultados mostraron que nuevamente hubo diferencia entre las cepas de estudio; pero en este experimento, la cepa CNRCB1 fue la que mostró una velocidad mayor para generar conidios, pues su **td** fue de 14.79 h, mientras que el **td** de ARSEF 3302 fue de 18.54 h, implicando una diferencia de 3.7 h entre ambas cepas.

En la tabla 8.10 se muestran, para ambas cepas, los promedios de la producción de conidios (**C**) obtenidos en condiciones atmosféricas normales (experimento 3). En la tabla 8.11 se presentan, para ambas cepas, los promedios de **C** obtenidos bajo la atmósfera enriquecida con 26% de oxígeno, a las 96 h después de haber iniciado el recambio atmosférico, cuando el primer pulso oxidante se aplicó en diferentes horas de cultivo: 0, 24, 36, 48 y 60 h (**C₀**, **C₂₄**, **C₃₆**, **C₄₈** y **C₆₀**).

Tabla 8.10. Producción observada promedio obtenida con atmósfera de oxígeno normal (experimento 3).

Tiempo (h)	Producción observada de conidios C (con/cm ²)			
	CNRCB1		ARSEF3302	
	Promedio	DE	Promedio	DE
24	4.03 x 10 ⁵	4.99 x 10 ⁴	3.84 x 10 ⁵	6.00 x 10 ⁴
36	5.96 x 10 ⁵	6.00 x 10 ⁴	3.55 x 10 ⁵	4.40 x 10 ⁴
48	3.48 x 10 ⁶	4.67 x 10 ⁵	5.76 x 10 ⁵	4.99 x 10 ⁴
60	1.24 x 10 ⁷	4.09 x 10 ⁵	1.38 x 10 ⁶	1.26 x 10 ⁵
96	6.72 x 10 ⁷	1.76 x 10 ⁷	2.69 x 10 ⁷	1.66 x 10 ⁶
120	9.99 x 10 ⁷	1.09 x 10 ⁷	3.55 x 10 ⁷	3.33 x 10 ⁶
132	1.21 x 10 ⁸	2.00 x 10 ⁷	3.36 x 10 ⁷	6.00 x 10 ⁶
144	1.83 x 10 ⁸	3.37 x 10 ⁷	6.82 x 10 ⁷	8.32 x 10 ⁶
156	1.53 x 10 ⁸	3.51 x 10 ⁷	1.18 x 10 ⁸	2.92 x 10 ⁷

DE Desviación estándar.

Tabla 8.11. Producción observada promedio obtenida en atmósfera oxidante (experimento 3).

Producción observada de conidios C (con/cm ²) de CNRCB1										
Tiempo (h)	C ₀		C ₂₄		C ₃₆		C ₄₈		C ₆₀	
	Promedio	DE								
96	2.88 x 10 ⁷	2.88 x 10 ⁶	3.46 x 10 ⁷	9.98 x 10 ⁶	5.96 x 10 ⁷	9.26 x 10 ⁶	4.80 x 10 ⁷	3.33 x 10 ⁶	1.01 x 10 ⁸	1.04 x 10 ⁷
Producción observada de conidios C (con/cm ²) de ARSEF 3302										
Tiempo (h)	C ₀		C ₂₄		C ₃₆		C ₄₈		C ₀	
	Promedio	DE								
96	1.83 x 10 ⁷	6.00 x 10 ⁶	1.92 x 10 ⁷	1.66 x 10 ⁶	2.40 x 10 ⁷	9.26 x 10 ⁶	5.09 x 10 ⁷	9.26 x 10 ⁶	5.38 x 10 ⁷	6.00 x 10 ⁶

DE Desviación estándar.

Con los datos de las tablas 8.10 y 8.11 se calcularon los Índices de conidiación (*Ic*) correspondientes y que se presentan en las tablas 8.12 y 8.13. Por una parte, se muestran los *Ic* obtenidos a lo largo de la cinética de producción de conidios en condiciones atmosféricas normales (*Ic*_{21%}); y por otro lado, se muestran los *Ic* obtenidos en las condiciones oxidantes, 96 h después de haber aplicado el primer pulso oxidante en tiempos diferentes: 0, 24, 36, 48 y 60 h (*Ic*_{26%-0}; *Ic*_{26%-24}; *Ic*_{26%-36}; *Ic*_{26%-48}; y *Ic*_{26%-60}). Los

valores del inóculo inicial (**Ci**) considerados en el cálculo del **Ic**, fueron equivalentes a los datos de **Con₀** indicados para cada cepa en la tabla 8.9.

Tabla 8.12. Índice de conidiación (**Ic**) calculado para CNRCB1 a partir de la producción observada obtenida con atmósfera normal y atmósfera oxidante (experimento 3).

Tiempo (h)	Ic_{21%}		Ic_{26%-0}		Ic_{26%-24}		Ic_{26%-36}		Ic_{26%-48}		Ic_{26%-60}		
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	
0*	1.00	0.00											
24*	a	0.60											
36*	b	0.88											
48*	c	5.13											
60*	d	18.31											
96	e	99.29	26.00	a'	42.55	4.26							
120	f	147.52	16.11			a'	51.06	14.74					
132	f	178.72	29.48					e	87.94	13.68			
144	g	269.50	49.69						e	70.92	4.91		
156	f, g	225.53	51.77								f	148.94	15.34

*Tiempo de inicio del primer pulso oxidante; **DE** Desviación estándar. Las diferentes letras al inicio de cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa entre tiempos. Las letras con comilla, indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos.

Tabla 8.13. Índice de conidiación (**Ic**) calculado para ARSEF 3302 a partir de la producción observada obtenida con atmósfera normal y atmósfera oxidante (experimento 3).

Tiempo (h)	Ic_{21%}		Ic_{26%-0}		Ic_{26%-24}		Ic_{26%-36}		Ic_{26%-48}		Ic_{26%-60}		
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	
0*	1.00	0.00											
24*	a	0.58											
36*	a	0.54											
48*	b	0.87											
60*	c	2.09											
96	d	40.58	2.51	a'	27.54	9.05							
120	e	53.62	5.02			a'	28.99	2.51					
132	e	50.72	9.05					a', d	36.23	13.98			
144	f	102.90	12.55						b'	76.81	13.98		
156	g	178.26	44.13								b'	81.16	9.05

*Tiempo de inicio del primer pulso oxidante; **DE** Desviación estándar. Las diferentes letras al inicio de cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa entre tiempos. Las letras con comilla, indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos.

Al ver los resultados que muestran las tablas 8.12 y 8.13, en lo que respecta a las condiciones atmosféricas normales, se observó que al igual que en los experimentos anteriores, hubo un período de tiempo en el cual el **Ic** presentó valores menores que 1, para CNRCB1 fue de las 24 a 36 h y para ARSEF 3302 fue de las 24 a 48 h; posteriormente, CNRCB1 entre las 36 y 48 h, y ARSEF 3302 entre las 48 y 60 h,

incrementaron el valor de **lc** superando la unidad; en los tiempos siguientes, el **lc** se incrementó debido a la producción exponencial de los conidios (tabla 8.10).

En lo que respecta al efecto de las condiciones oxidantes sobre la producción (determinado con el **lc**), con la cepa CNRCB1 (tabla 8.12) en todos los casos se presentó una afectación negativa con respecto a la atmósfera normal, de 57, 65, 51, 74 y 34% para cada uno de los tiempos diferentes de inicio de la atmósfera oxidante (0, 24, 36, 48 y 60 h, respectivamente). Como ocurrió con el experimento 2, en este experimento tampoco se encontró un perfil de afectación claro conforme se movió el tiempo de inicio de los pulsos. En el caso de la cepa ARSEF 3302 (tabla 8.13), también se presentó una afectación negativa con respecto a la atmósfera normal, de 32, 46, 29, 35 y 54% para cada uno de los tiempos diferentes de inicio de la atmósfera oxidante (0, 24, 36, 48 y 60 h, respectivamente); pero a diferencia del experimento 2, en el cual se había encontrado un perfil de afectación descendente conforme se movió el tiempo de inicio de los pulsos, en este caso no existió un perfil claro en la afectación. En general con este experimento, nuevamente se observó que los pulsos oxidantes afectaron de forma negativa la eficiencia del proceso de conidiación de ambas cepas; la afectación promedio de la atmósfera oxidante en la producción, fue de 56% en CNRCB1 y 39% en ARSEF 3302.

8.2.3. Efecto de la atmósfera rica en oxígeno en la morfología de la conidiación.

Esta sección del experimento 3 corresponde a los resultados obtenidos por el estudio de la morfología de la conidiación en ambas cepas de estudio. Por una parte, se presentan las micrografías correspondientes al seguimiento que se le dio a las cinéticas de producción de conidios (cinéticas control), con el fin de observar el inicio del proceso de conidiación. Por otro lado, se presentan las micrografías que muestran el efecto causado por la atmósfera oxidante sobre el mismo proceso. Las figuras 8.7 y 8.8 muestran las micrografías correspondientes a los seguimientos que se hicieron de las cinéticas control

de las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302, respectivamente, bajo condiciones atmosféricas normales. En general, cada recuadro corresponde a una micrografía; en la parte superior izquierda de cada micrografía, se indica el tiempo de cultivo en color blanco. Leyendo de izquierda a derecha, la primera micrografía de cada tiempo fue una toma panorámica (entre x250 y x1000 aumentos) y la segunda micrografía correspondió a un acercamiento mayor a la muestra (entre x2500 y x5000 aumentos).

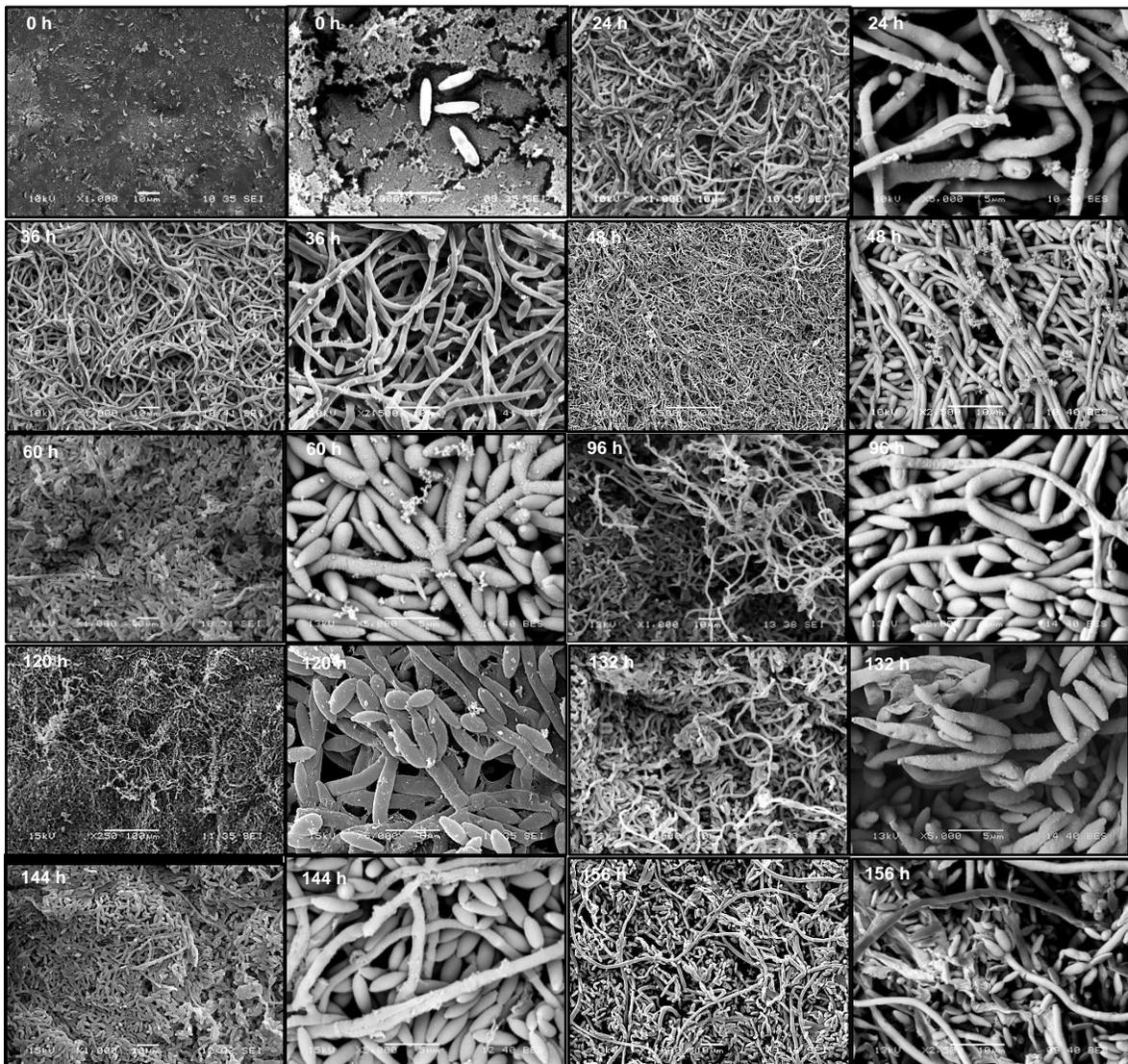


Figura 8.7. Micrografías de la cinética de producción de conidios de la cepa CNRCB1, bajo atmósfera normal. En cada imagen se indica el tiempo de cultivo en horas (h); el cual se va incrementando, leyendo de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Se presentan dos imágenes por cada tiempo de cultivo, la primera corresponde a una toma panorámica (x250-x1000), la segunda es un acercamiento a la muestra (x2500-x5000). Las micrografías se tomaron entre 10 y 15 kV.

En la figura 8.7, las micrografías de las 0 h correspondieron al inóculo inicial de la cepa CNRCB1 y muestran como fue la disposición que tomaron los conidios en el medio de cultivo. A las 24 h de cultivo, se observó la formación del micelio proveniente de la germinación de los conidios agregados inicialmente; en la toma de acercamiento se pudo observar que el micelio formó estructuras en forma de verticilos con algunos brotes iniciales de conidióforos. El mismo patrón se observó a las 36 h de cultivo. A las 48 h de cultivo se hace evidente la presencia abundante de conidios, pero la composición de la muestra, en su mayoría continuó siendo micelio. En las micrografías correspondientes a los tiempos de cultivo siguientes (60, 96, 120, 132, 144 y 156 h), se pudo ver la proliferación que hubo de los conidios; además de la formación de conidióforos maduros con entre 4 a 6 fiálides (60, 96, 120, 132 y 156 h), característicos de la conidiación de esta especie, y que implican que el proceso de conidiación estaba muy activo.

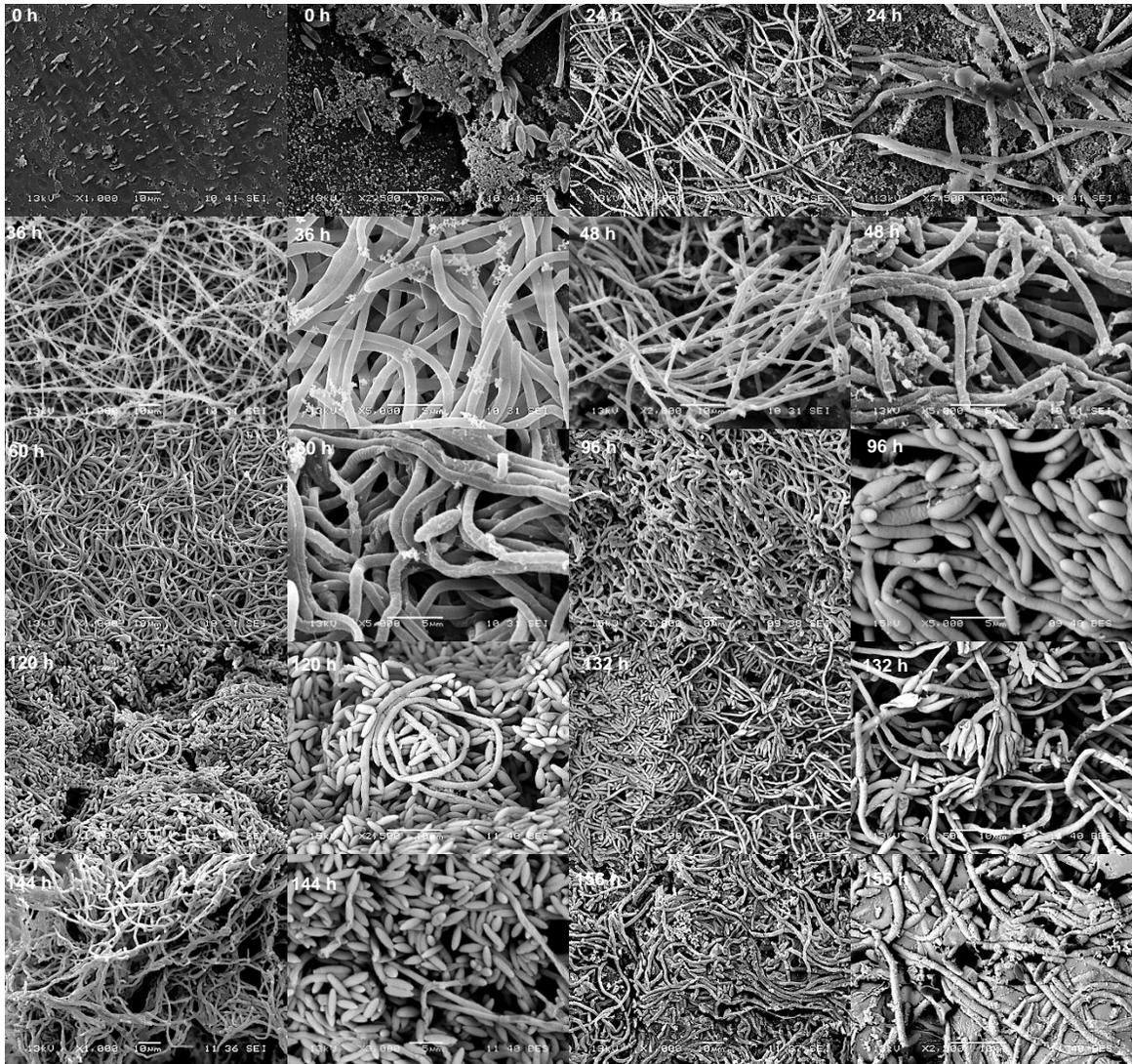


Figura 8.8. Micrografías de la cinética de producción de conidios de la cepa ARSEF 3302, bajo atmósfera normal. En cada imagen se indica el tiempo de cultivo en horas (h); el cual se va incrementando, leyendo de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo. Se presentan dos imágenes por cada tiempo de cultivo, la primera corresponde a una toma panorámica (x1000-x2000), la segunda es un acercamiento a la muestra (x2500-x5000). Las micrografías se tomaron entre 13 y 15 kV.

En la figura 8.8, las micrografías de las 0 h correspondieron al inóculo inicial de la cepa ARSEF 3302 y muestran como fue la disposición que tomaron los conidios en el medio de cultivo (muy similar a la mostrada por la cepa CNRCB1). De igual manera que con CNRCB1, se observó que a las 24 h de cultivo se generó micelio proveniente de la germinación de los conidios agregados inicialmente; sin embargo en este caso, las tomas de acercamiento indicaron que hasta las 48 y 60 h de cultivo, se presentaron ligeros

brotos de conidios, pero la composición de las muestras, en su mayoría, continuó siendo micelio. En las micrografías correspondientes a los siguientes tiempos de cultivo (96, 120, 132, 144 y 156 h) se pudo ver la proliferación que hubo de los conidios. En las tomas de acercamiento de las 96 y 132 h de cultivo, se pueden ver conidióforos maduros, que de manera general, fueron menos abundantes en las muestras de la cepa ARSEF 3302 en comparación con las muestras de la cepa CNRCB1. Estos resultados indicaron que bajo condiciones atmosféricas normales, el proceso de conidiación de la cepa ARSEF 3302 fue más lento que el que presentó la cepa CNRCB1. Lo cual coincide con los resultados de producción de conidios observados en este experimento (tabla 8.10) y con los parámetros de conidiación reportados en la tabla 8.9.

En las figuras 8.9 a 8.13 y 8.14 a 8.18, se muestran las micrografías obtenidas con las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302, respectivamente, a las 96 h posteriores de haber iniciado el recambio atmosférico en tiempos diferentes de cultivo (duplas: 0-96; 24-120; 36-132; 48-144; y 60-156 h). En general las condiciones oxidantes se presentan en las micrografías marcadas con las letras minúsculas **a**, **b** y **c**; mientras que las condiciones atmosféricas normales se muestran en las micrografías rotuladas con las letras mayúsculas **A**, **B** y **C**. Las micrografías se presentan en triadas que corresponden a tres tomas diferentes de la misma muestra, leyendo de izquierda a derecha; en general, la primera micrografía (**a** o **A**) corresponde a una toma panorámica (entre x250 y x1000), la segunda y tercera micrografías (**b** o **B**, y **c** o **C**) son acercamientos a las muestras (entre x1000 y x 5000). Las micrografías se tomaron entre 13 y 15 kV.



Figura 8.9. Micrografías de la producción de conidios de CNRCB1 en condiciones atmosféricas normales (**A, B, C**) y en atmósfera oxidante (**a, b, c**), obtenidas a las 96 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante inmediatamente después de haber agregar el inóculo inicial en el tiempo cero (0 h).

En la figura 8.9 se presentan las micrografías correspondientes al estado de la conidiación o morfología de la conidiación, de muestras que se recolectaron a las 96 h de cultivo, que en el caso de la atmósfera oxidante, correspondió a la muestra en la que se inició el recambio atmosférico desde el tiempo cero (0 h). En las tomas panorámicas se observa que la composición de las muestras en ambas condiciones atmosféricas (**a, A**) fue de micelio y conidios; sin embargo con las tomas de acercamiento **B** y **C**, se observó que bajo las condiciones atmosféricas normales, hubo mayor abundancia de conidios en comparación con la atmósfera oxidante, e incluso se observan conidióforos, implicando un estado de conidiación más activo.

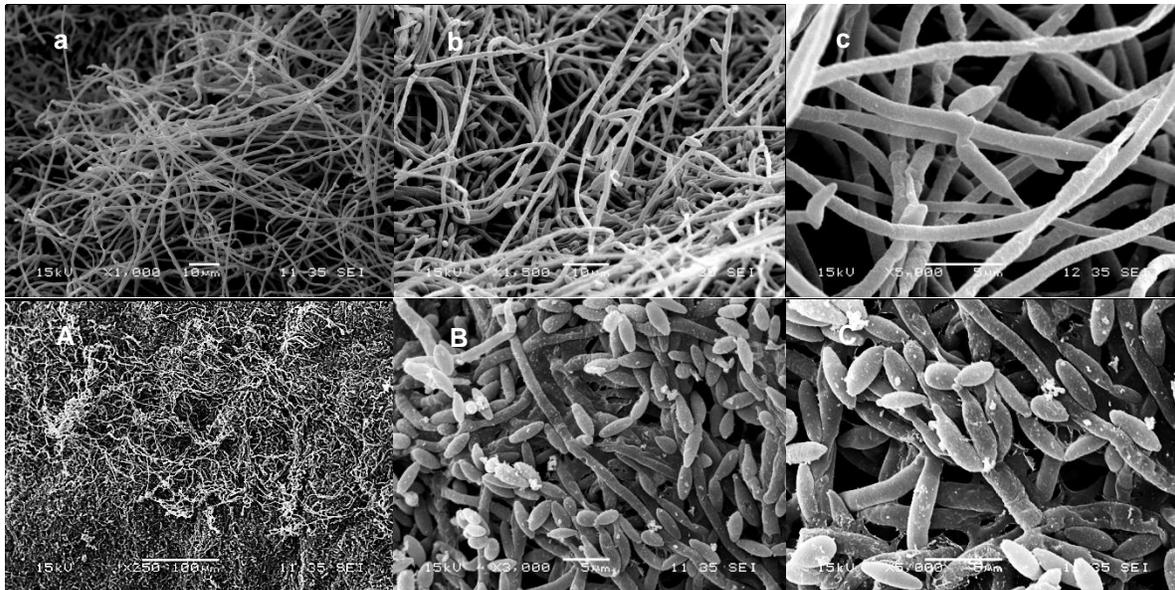


Figura 8.10. Micrografías de la producción de conidios de CNRCB1 en condiciones atmosféricas normales (**A**, **B**, **C**) y en atmósfera oxidante (**a**, **b**, **c**), obtenidas a las 120 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 24 h de cultivo.

En la figura 8.10 se presentan las micrografías correspondientes al estado de la conidiación de muestras que se recolectaron a las 120 h de cultivo, que en el caso de la atmósfera oxidante (**a**, **b**, **c**), correspondió a la muestra en la que se inició el recambio atmosférico a las 24 h de cultivo. En las tomas panorámicas se puede observar que la mayor composición de la muestra **A** fueron conidios, a diferencia de las condiciones oxidantes (**a**), donde hubo mayor presencia de micelio. En el acercamiento presentado en la imagen **c**, se puede ver que comenzaban brotes de conidióforos; a diferencia de **C**, en donde se ejemplifica la presencia de conidióforos maduros. Este resultado indicó que bajo las condiciones oxidantes, el proceso de conidiación estuvo menos avanzado en comparación con la atmósfera normal.

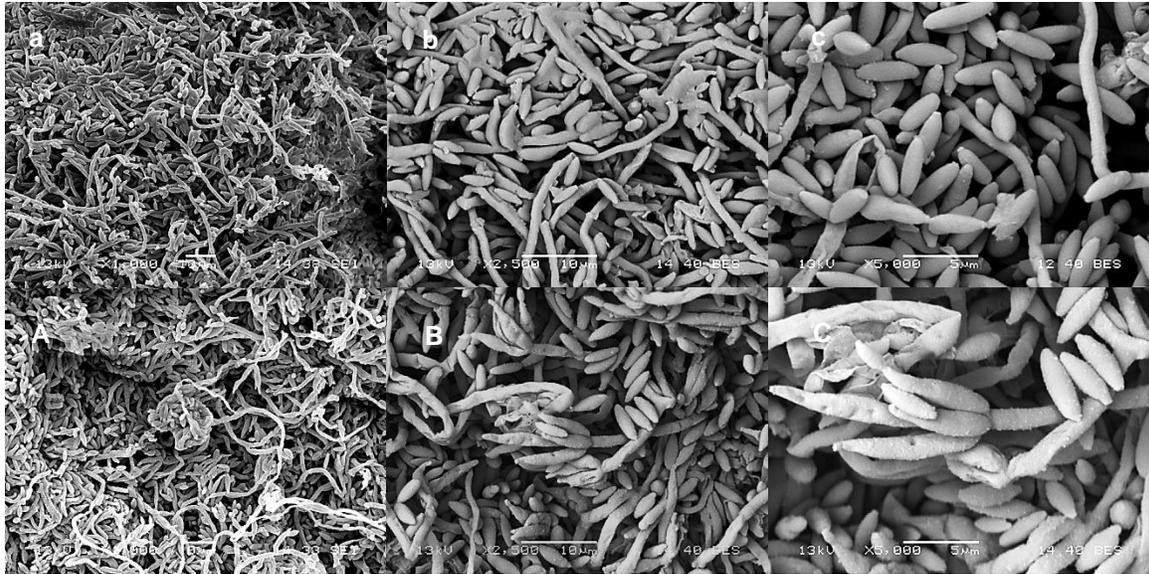


Figura 8.11. Micrografías de la producción de conidios de CNRCB1 en condiciones atmosféricas normales (**A, B, C**) y en atmósfera oxidante (**a, b, c**), obtenidas a las 132 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 36 h de cultivo.



Figura 8.12. Micrografías de la producción de conidios de CNRCB1 en condiciones atmosféricas normales (**A, B, C**) y en atmósfera oxidante (**a, b, c**), obtenidas a las 144 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 48 h de cultivo.



Figura 8.13. Micrografías de la producción de conidios de CNRCB1 en condiciones atmosféricas normales (**A**, **B**, **C**) y en atmósfera oxidante (**a**, **b**, **c**), obtenidas a las 156 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 60 h de cultivo.

Las figuras 8.11, 8.12 y 8.13 muestran las micrografías obtenidas cuando se muestreó a las 132, 144 y 156 h de cultivo, respectivamente, y bajo ambas condiciones atmosféricas; lo que corresponde a que, bajo las condiciones oxidantes, el primer pulso de oxígeno se realizó a las 36, 48 y 60 h de cultivo, respectivamente. De forma general, se observó que la composición de las muestras fue de micelio y conidios; en la figura 8.12 se observa que hubo una mayor abundancia de conidios en las condiciones atmosféricas normales (**A**, **B**, y **C**); pero en el caso de las figuras 8.11 y 8.13 aunque se observó abundancia de micelio bajo ambas condiciones atmosféricas, fue característico que hubo mayor presencia de conidióforos maduros, como se ejemplifica en las imágenes **B** de la figura 8.11, y **C** de la figura 8.13. Implicando un proceso de conidiación más activo. Por lo que se dedujo nuevamente, que con las condiciones oxidantes se produjo un retardo en la conidiación de la cepa CNRCB1.

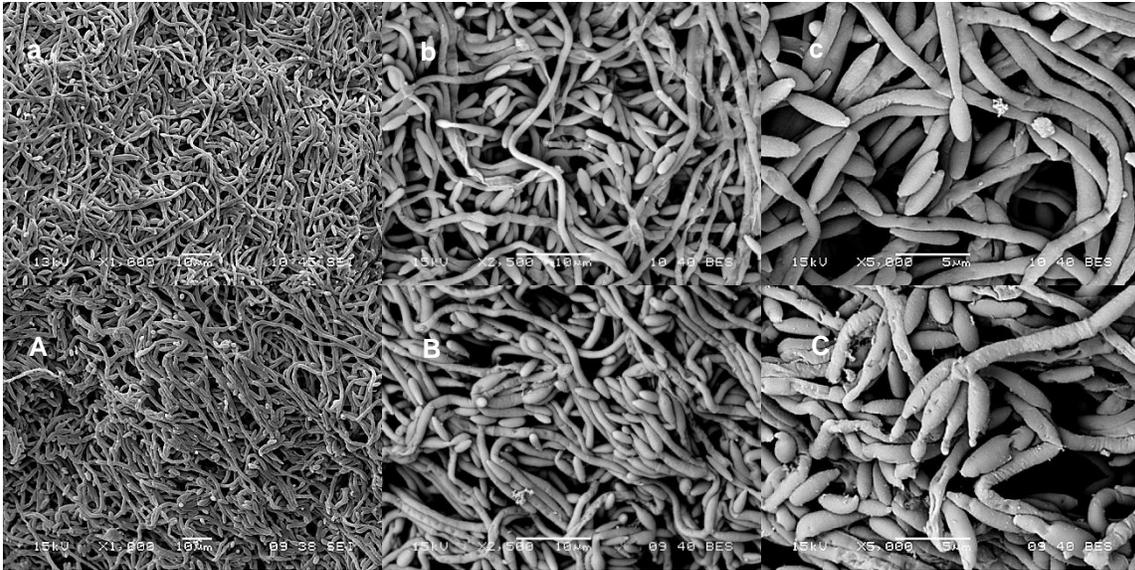


Figura 8.14. Micrografías de la producción de conidios de ARSEF 3302 en condiciones atmosféricas normales (**A**, **B**, **C**) y en atmósfera oxidante (**a**, **b**, **c**), obtenidas a las 96 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante inmediatamente después de haber agregar el inóculo inicial en el tiempo cero (0 h).

En el caso del estudio morfológico realizado en la conidiación para la cepa ARSEF 3302, en la figura 8.14 se presentan las micrografías correspondientes a las muestras que se recolectaron a las 96 h de cultivo, que en el caso de la atmósfera oxidante, correspondió a la muestra en la que se inició el recambio atmosférico desde el tiempo cero (0 h). Las tomas panorámicas de ambas condiciones atmosféricas (**a**, **A**), indican que hubo micelio abundante en la composición de ambas muestras; al hacer los acercamientos a las muestras, las imágenes **b** y **c** (condiciones oxidantes) mostraron la presencia de brotes de conidios en la punta de algunas hifas; en comparación con las imágenes **B** y **C** (atmósfera normal) que mostraron abundancia de conidióforos maduros; lo que implicó que se tenía un proceso de conidiación más activo.

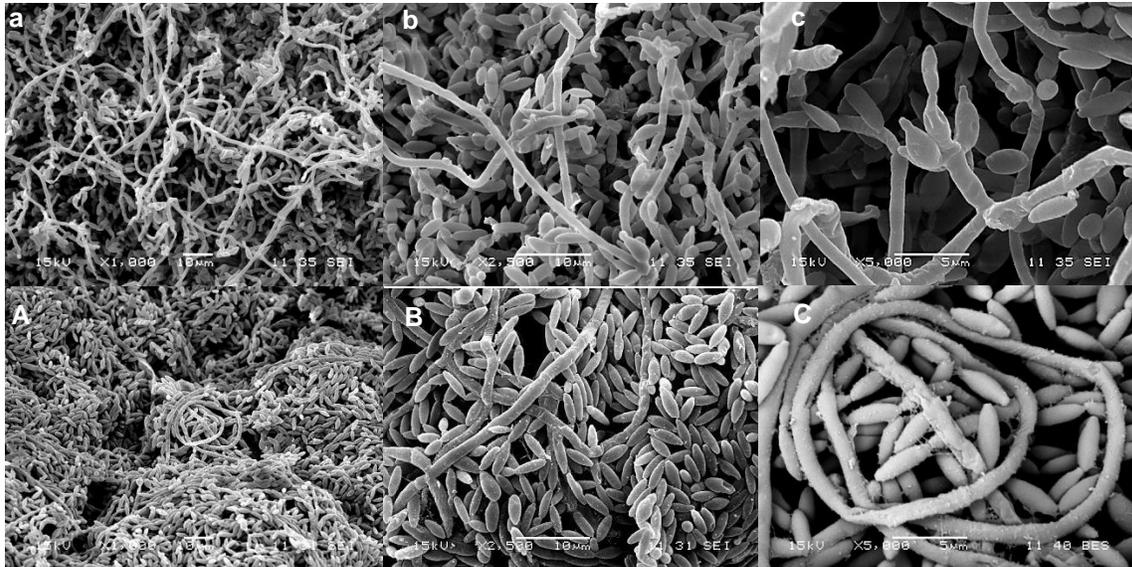


Figura 8.15. Micrografías de la producción de conidios de ARSEF 3302 en condiciones atmosféricas normales (**A**, **B**, **C**) y en atmósfera oxidante (**a**, **b**, **c**), obtenidas a las 120 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 24 h de cultivo.

En la figura 8.15 se presentan las micrografías correspondientes al estado de la conidiación de muestras que se recolectaron a las 120 h de cultivo, que en el caso de la atmósfera oxidante (**a**, **b**, **c**), correspondió a la muestra en la que se inició el recambio atmosférico a las 24 h de cultivo. En las tomas panorámicas se puede observar que la composición de la muestra **A** fueron conidios, de forma mayoritaria; en el caso de la imagen **a**, si bien se observó la presencia de conidios, hubo mayor cantidad de micelio. Lo que indicó que el proceso de conidiación estaba más avanzado en las condiciones atmosféricas normales.



Figura 8.16. Micrografías de la producción de conidios de ARSEF 3302 en condiciones atmosféricas normales (**A, B, C**) y en atmósfera oxidante (**a, b, c**), obtenidas a las 132 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 36 h de cultivo.

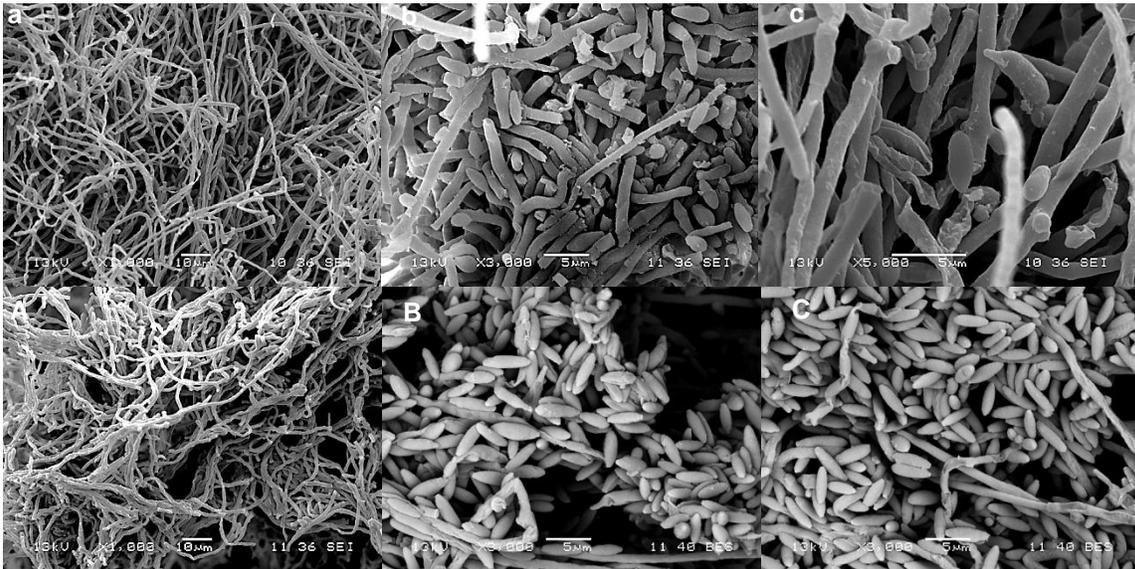


Figura 8.17. Micrografías de la producción de conidios de ARSEF 3302 en condiciones atmosféricas normales (**A, B, C**) y en atmósfera oxidante (**a, b, c**), obtenidas a las 144 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 48 h de cultivo.

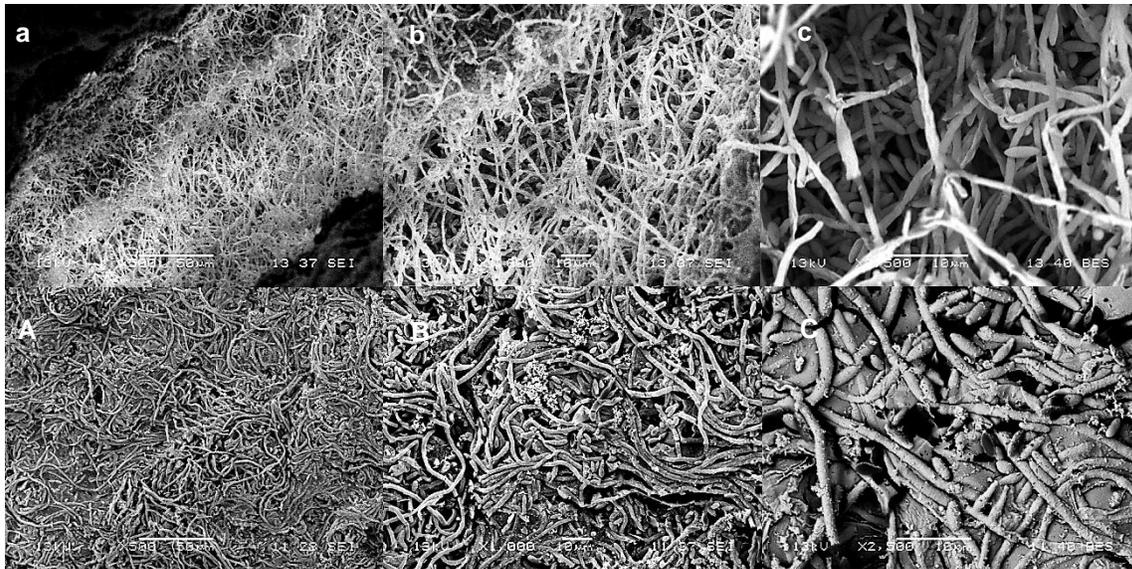


Figura 8.18. Micrografías de la producción de conidios de ARSEF 3302 en condiciones atmosféricas normales (**A, B, C**) y en atmósfera oxidante (**a, b, c**), obtenidas a las 156 h de cultivo. En este caso, la muestra correspondiente a las condiciones oxidantes, fue a la que se le aplicó el primer pulso oxidante a las 60 h de cultivo.

Las figuras 8.16, 8.17 y 8.18 muestran las micrografías obtenidas cuando se muestreó a las 132, 144 y 156 h de cultivo, respectivamente, y bajo ambas condiciones atmosféricas; lo que corresponde a que, bajo las condiciones oxidantes, el primer pulso de oxígeno se realizó a las 36, 48 y 60 h de cultivo, respectivamente. De forma general, las tomas panorámicas (**a, A**) muestran una mayor abundancia de micelio que de conidios en la composición de las muestras, esto difiere de las observaciones realizadas a los mismos tiempos de cultivo con la cepa CNRCB1 (figuras 8.11, 8.12 y 8.13), pues además de haber micelio, hubo conidios en abundancia. Esto indicó que el proceso de conidiación de la cepa ARSEF 3302 fue más lento en comparación con la cepa CNRCB1. La imagen **A** (condiciones atmosféricas normales) de la figura 8.16, muestra mayor abundancia de conidios en comparación con la imagen **a** (condiciones oxidantes); además, el micelio presentó mayor cantidad de conidióforos maduros, indicando que el proceso de conidiación estuvo más avanzado bajo condiciones atmosféricas normales. En el caso de la figura 8.17, las tomas panorámicas (**a, A**) muestran que en ambas condiciones, la

composición mayoritaria de las muestras fue micelio; pero en los acercamientos, se pudo observar que hubo mayor abundancia de conidios bajo condiciones atmosféricas normales (**B** y **C**). En el caso de la figura 8.18, se observó que, aunque la composición de las muestras de ambas condiciones atmosféricas fue micelio mayoritariamente, hubo más zonas de alta densidad de conidios en las condiciones atmosféricas normales (imágenes **A** y **B**) en comparación que en las condiciones oxidantes (**a**, **b**); por lo que se infirió un proceso de conidiación más avanzado, nuevamente en las condiciones atmosféricas normales.

Después de hacer la evaluación de la longitud de los conidios obtenidos bajo ambas condiciones atmosféricas y con ambas cepas de estudio; se encontró que los valores son similares al intervalo de 3.5 a 4.0 μm , reportado en la bibliografía (Humber, 2005) (Tabla 8.14).

Tabla 8.14. Longitud de los conidios generados en condiciones atmosféricas normal y oxidante.

CEPA/tratamiento	Longitud (μm)
ARSEF 3302	
21% oxígeno	4.2 ± 0.3
26% oxígeno	3.7 ± 0.6
CNRCB1	
21% oxígeno	3.8 ± 0.6
26% oxígeno	3.8 ± 0.1

8.2.4. Efecto en la calidad de los conidios. Experimento 3.

8.2.4.1. Viabilidad

En las figuras 8.19 y 8.20 se presentan los porcentajes de viabilidad encontrados en ambas cepas, bajo las diferentes condiciones de estudio planteadas en el experimento 3.

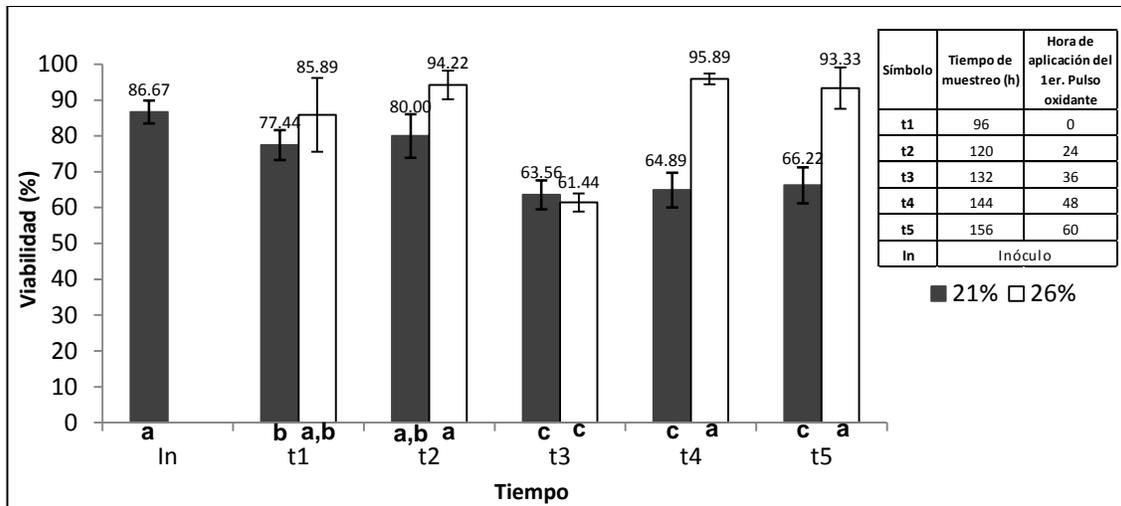


Figura 8.19. Viabilidad de los conidios de la cepa CNRCB1 provenientes de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) a diferentes horas de cultivo. Las diferentes letras en cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa (*t* de Student, $\alpha = 0.05$).

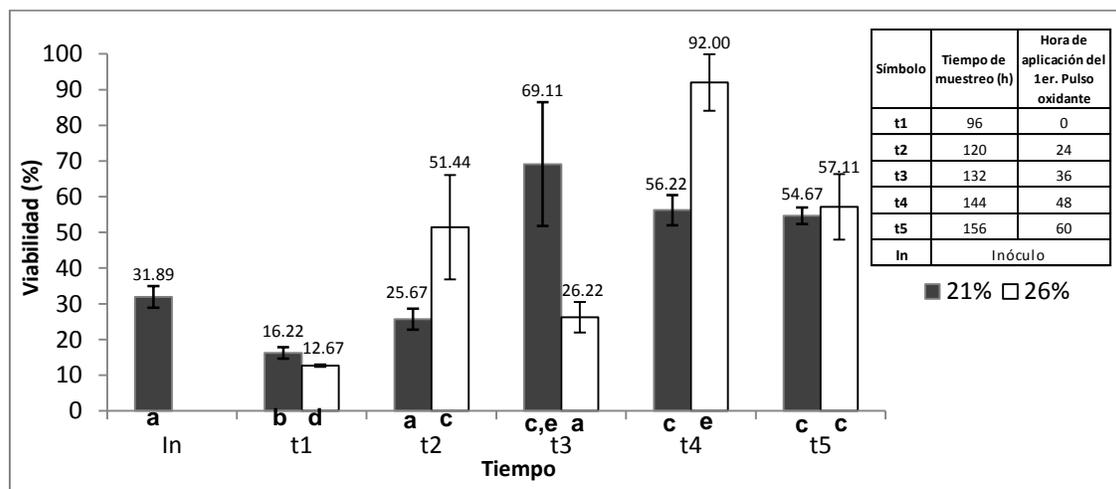


Figura 8.20. Viabilidad de los conidios de la cepa ARSEF 3302 provenientes de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) a diferentes horas de cultivo. Las diferentes letras en cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa (*t* de Student, $\alpha = 0.05$).

En la figura 8.19 se observa que el valor de viabilidad que tuvieron los conidios de la cepa CNRCB1, obtenidos en atmósfera normal a las 96 y 120 h de cultivo, fue más cercano al valor de viabilidad del inóculo, en comparación con el resto de tiempos de cultivo (bajo condiciones atmosféricas normales). A las 96 h de cultivo, la viabilidad fue 11% menor, respecto al inóculo; a las 120 h de cultivo no hay diferencia estadísticamente significativa.

Sin embargo, la viabilidad que presentaron los conidios a las 132 h de cultivo fue 27% menor (respecto al inóculo). De forma similar, se determinó una disminución de la viabilidad en un 25 y 23% en los conidios obtenidos a las 144 y 156 h de cultivo, respectivamente. Por otra parte, se aprecia que cuando se aplicó el pulso oxidante en los primeros tiempos de cultivo (0, 32 y 36 h), no se afectó esta característica de calidad (evaluada 96 h después de haber iniciado el recambio atmosférico); pero, cuando el tratamiento fue aplicado a las 48 y 60 h de cultivo, se observó que los pulsos oxidantes tuvieron un efecto positivo en la viabilidad, ya que la incrementaron en un 48 y 41%, respectivamente, comparando con las condiciones atmosféricas normales.

En el caso de la cepa ARSEF 3302 (figura 8.20) se observa que el inóculo presentó una viabilidad 63% más baja que el inóculo de la cepa CNRCB1; bajo condiciones atmosféricas normales, también se observa que a las 96 h de cultivo, la viabilidad de los conidios disminuyó aún más (49% con respecto al inóculo inicial); a las 120 h de cultivo, la viabilidad se incrementó un 20%; a las 132, 144 y 156 h de cultivo, la viabilidad se incrementó hasta mantener valores similares a los que presentó CNRCB1 en las mismas horas de cultivo. En cuanto al efecto de los pulsos oxidantes sobre la cepa ARSEF 3302, no se encontró una tendencia clara debida al tratamiento; ya que cuando el pulso de oxígeno se aplicó a las 0 h, la viabilidad disminuyó un 22% con respecto a la viabilidad de los conidios obtenidos en atmósfera normal; cuando el pulso se aplicó a las 24 h de cultivo, la viabilidad aumentó 100%; cuando el pulso se aplicó a las 36 h de cultivo, se presentó una nueva disminución de la viabilidad, pero esta vez de un 62%; cuando el pulso se aplicó a las 48 h de cultivo, la viabilidad aumentó nuevamente en un 64%, en este tiempo además, fue en el que se alcanzó el valor más alto de viabilidad (95.9%) bajo ambas condiciones de estudio; cuando se aplicó el pulso a las 60 h de cultivo, no hubo efecto en la viabilidad de los conidios.

8.2.4.2. Termotolerancia

Las figuras 8.21 y 8.22 muestran los porcentajes de viabilidad que presentaron las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302, respectivamente, bajo las diferentes condiciones de estudio (experimento 3), después de haber aplicado el tratamiento térmico.

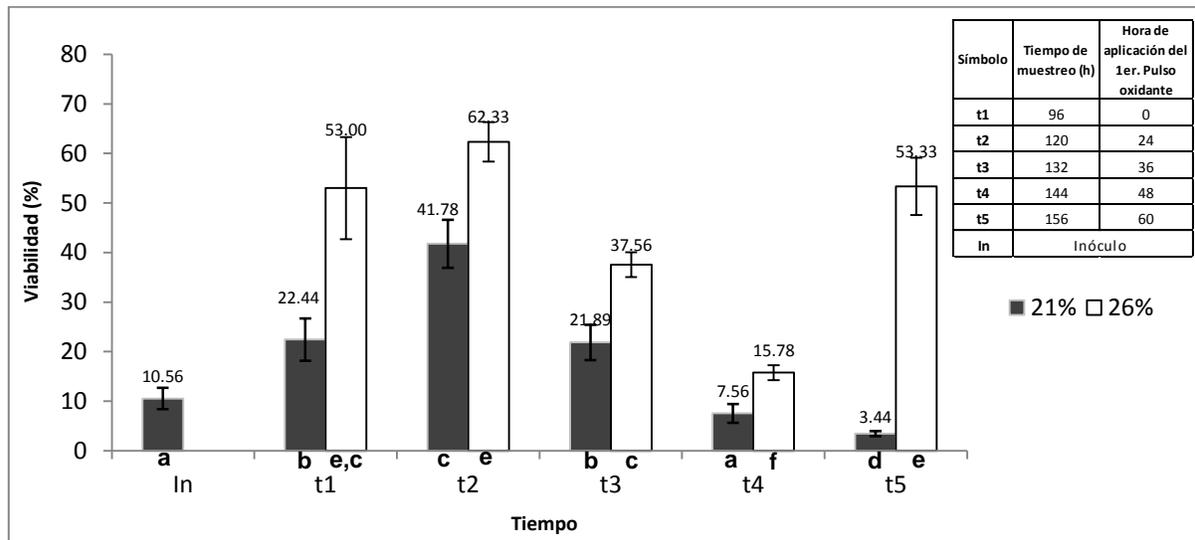


Figura 8.21. Viabilidad de los conidios de la cepa CNRCB1 provenientes de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) a diferentes horas de cultivo; después de haber aplicado el tratamiento térmico (40°C, 1 h). Las diferentes letras en cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa (t de Student, $\alpha = 0.05$).

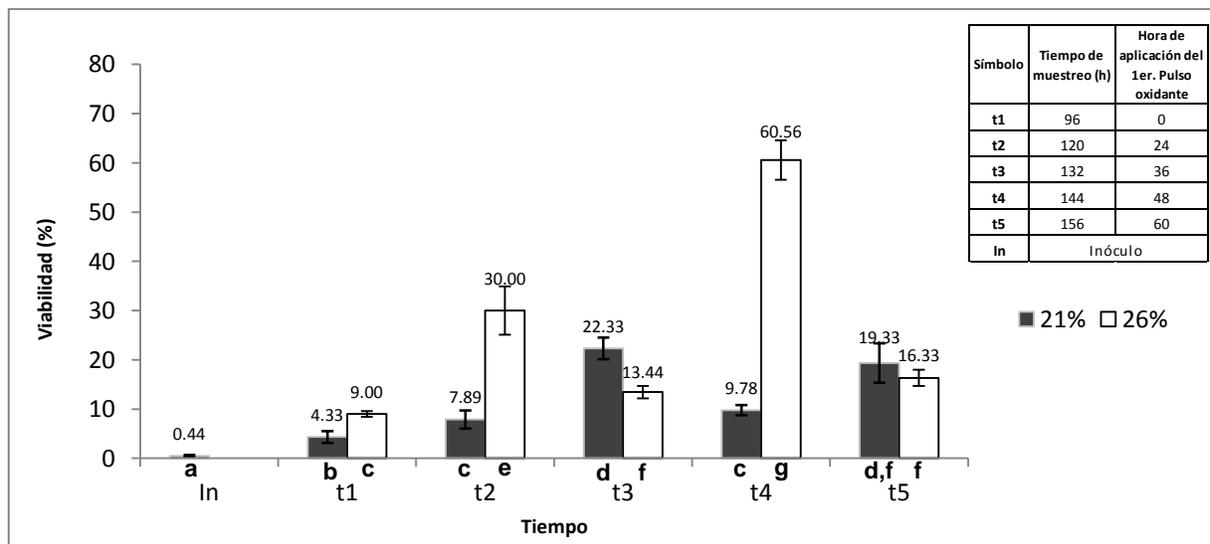


Figura 8.22. Viabilidad de los conidios de la cepa ARSEF 3302 provenientes de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) a diferentes horas de cultivo; después de haber aplicado el tratamiento térmico (40°C, 1 h). Las diferentes letras en cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa (t de Student, $\alpha = 0.05$).

De forma general, la figura 8.21 muestra que los conidios de la cepa CNRCB1, generados bajo condiciones atmosféricas oxidantes, en todos los casos, fueron menos susceptibles al tratamiento térmico aplicado, con respecto a los conidios generados en condiciones atmosféricas normales. El incremento de la viabilidad, debido a los pulsos oxidantes, fue de 136, 47, 72, 109 y 1450% (1.36, 0.47, 0.72, 1.09 y 14.5 veces) para cada uno de los diferentes tiempos de inicio de los pulsos oxidantes (0, 24, 36, 48 y 60 h de cultivo, respectivamente). El mayor incremento en la termotolerancia, se obtuvo al aplicar el pulso oxidante una vez transcurridas 60 h de cultivo.

En cuanto la cepa ARSEF 3303, la figura 8.22 muestra que el efecto de los pulsos oxidantes sobre la termotolerancia fue variable, ya que cuando se aplicó el primer pulso oxidante a las 0 h, se presentó un efecto positivo en la viabilidad de 108% (1.08 veces), con respecto a la viabilidad de los conidios generados en atmósfera normal. En el caso de la aplicación del pulso a las 24 h, también se observó un efecto positivo, en este caso de 280% (casi 3 veces). Sin embargo, cuando el pulso oxidante se aplicó a las 36 h de cultivo, se obtuvo un 40% de decremento en la viabilidad. Cuando el tratamiento oxidante se inició a las 48 h de cultivo, fue cuando se presentó el efecto positivo más grande ya que fue de 519% (5 veces). Por otra parte, no hubo diferencia en la susceptibilidad ante el tratamiento térmico, que presentaron los conidios generados en ambas condiciones atmosféricas, cuando las condiciones oxidantes se iniciaron a las 60 h de cultivo.

8.2.4.3 Hidrofobicidad

En las figuras 8.23 y 8.24 se muestran los porcentajes de hidrofobicidad (H) que se obtuvieron con las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302, respectivamente; bajo las diferentes condiciones de estudio (experimento 3).

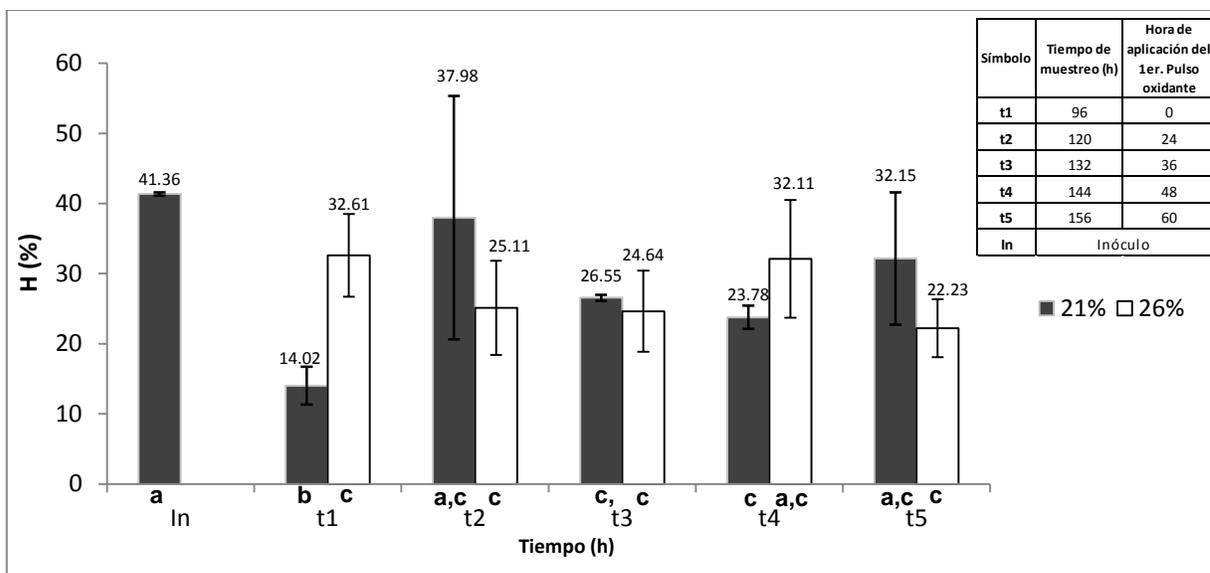


Figura 8.23. Hidrofobicidad (H) de los conidios de la cepa CNRCB1 provenientes de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) a diferentes horas de cultivo. Las diferentes letras en cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa (*t* de Student, $\alpha=0.05$).

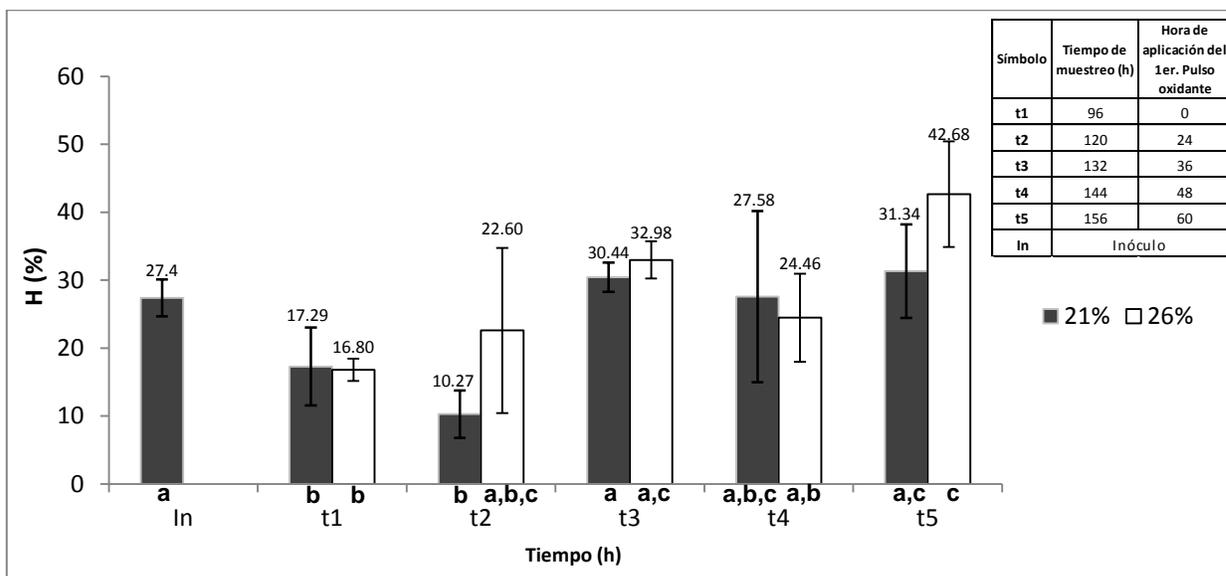


Figura 8.24. Hidrofobicidad (H) de los conidios de la cepa ARSEF 3302 provenientes de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) a diferentes horas de cultivo. Las diferentes letras en cada dato, indican diferencia estadísticamente significativa (*t* de Student, $\alpha=0.05$).

En lo que respecta a esta característica de calidad, solo en el caso de la cepa CNRCB1, cuando el pulso fue aplicado desde el tiempo cero (0 h de cultivo), se encontró un efecto positivo (figura 8.23); sin embargo, en el resto de determinaciones con ambas cepas, no se observó otra afectación en la hidrofobicidad atribuible al tratamiento oxidante. Así que

de forma general, esta característica de calidad, no disminuyó con la aplicación del tratamiento oxidante.

8.2.5. Efecto en la calidad de los conidios. Experimento 4.

8.2.5.1. Infectividad

En la tabla 8.14, se presentan los parámetros de infectividad obtenidos a partir de los bioensayos realizados con la cepa CNRCB1 bajo las diferentes condiciones atmosféricas del experimento.

Tabla 8.15 Parámetros de infectividad de la cepa CNRCB1 obtenidos en condiciones atmosféricas normales y bajo condiciones oxidantes.

PARÁMETROS	Condición A		Condición B		Condición C		Condición D		Condición E	
	21% O ₂	26% O ₂								
S (%)	31.73 ± 13.83	30.00 ± 14.14	33.33 ± 11.55	22.5 ± 9.57	27.5 ± 12.58	23.33 ± 5.77	22.5 ± 5.00	15.00 ± 12.91	40.00 ± 0.00	*7.61 ± 9.08
k (día ⁻¹)	0.27 ± 0.02	*0.12 ± 0.02	0.25 ± 0.14	0.21 ± 0.09	0.13 ± 0.04	0.11 ± 0.05	0.15 ± 0.04	0.19 ± 0.11	0.14 ± 0.06	0.11 ± 0.03
t ₀ (días)	3.99 ± 1.00	4.89 ± 2.61	3.48 ± 1.16	3.67 ± 1.11	4.54 ± 2.44	3.07 ± 1.71	4.16 ± 1.54	4.01 ± 3.84	5.42 ± 2.92	*1.89 ± 0.29
TL ₅₀ (días)	10.21 ± 3.64	17.13 ± 5.50	10.88 ± 1.98	9.17 ± 1.97	15.03 ± 6.39	14.05 ± 2.87	11.55 ± 3.71	10.27 ± 3.88	20.88 ± 6.78	*9.14 ± 0.74
R ²	0.96	0.95	0.94	0.97	0.96	0.92	0.95	0.93	0.92	0.97

*Diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos. Condiciones: **A**= Inicio de pulso oxidante: 0 h, hora de toma de muestra para hacer la prueba: 156 h. **B**= Inicio de pulso oxidante: 24 h, hora de toma de muestra para hacer la prueba: 180 h. **C**= Inicio de pulso oxidante: 36 h, hora de toma de muestra para hacer la prueba: 192 h. **D**= Inicio de pulso oxidante: 48 h, hora de toma de muestra para hacer la prueba: 204 h. **E**= Inicio de pulso oxidante: 60 h, hora de toma de muestra para hacer la prueba: 216 h. Hospedero: *G. mellonella*. Duración del bioensayo: 14 días.

La tabla 8.15 muestra que para la cepa CNRCB1 solo hubo diferencia entre los tratamientos de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) cuando se inició el recambio atmosférico a las 60 h de cultivo (Condición **E**). El valor de la sobrevivencia final (S), logrado con los conidios obtenidos en condiciones oxidantes fue de 7.61% (92.39% de mortalidad), mientras que con los conidios generados bajo condiciones atmosféricas normales, se obtuvo un valor de S de 40% (60% de mortalidad). Además, los conidios generados bajo los pulsos oxidantes, requirieron de menos de la mitad de tiempo para matar al 50% de los insectos, en comparación con los

conidios generados en condiciones atmosféricas normales. Estos resultados indicaron que los pulsos oxidantes aplicados a las 60 h de cultivo, mejoraron la infectividad de la cepa CNRCB1.

La cepa ARSEF 3302 fue menos infectiva en comparación con la cepa CNRCB1, ya que de forma general, bajo las condiciones de experimentación **A**, **B**, **C**, **D** y **E** (en esta última condición sólo en el caso de la atmósfera normal) no se llegó a matar a más del 60% de los insectos. En la figura 8.25 se muestran los porcentajes de supervivencia final (S) obtenidos en cada condición de estudio.

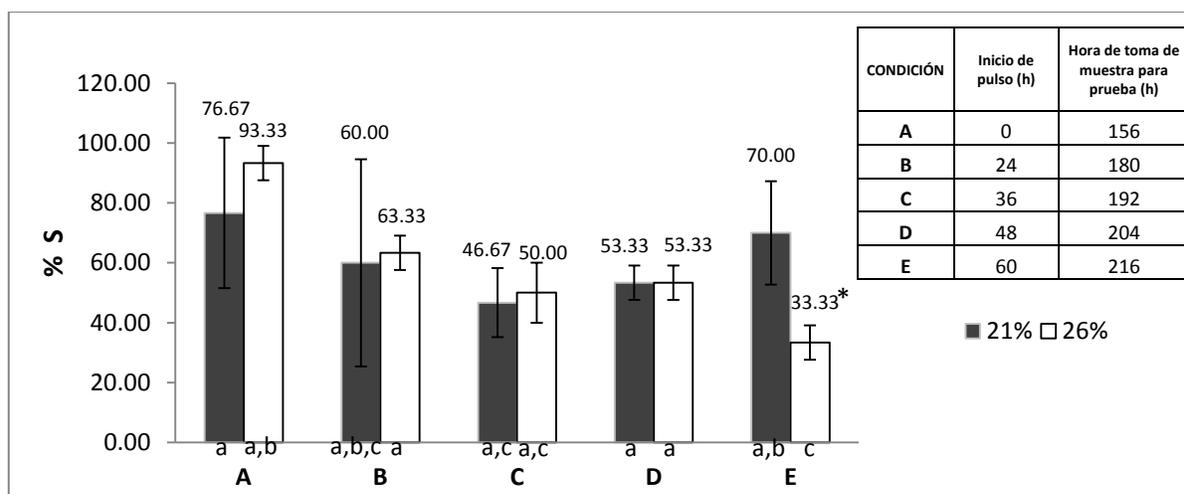


Figura 8.25. Supervivencia final (S) con los conidios de la cepa ARSEF 3302 con atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) a diferentes horas de cultivo. Las diferentes letras (minúsculas) en cada barra, indican diferencia estadísticamente significativa entre condiciones, * Indica diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos atmosféricos (*t* de Student, $\alpha= 0.05$).

Estos resultados mostraron que al igual que con la cepa CNRCB1, solo hubo diferencia entre los tratamientos de atmósfera normal (21% de oxígeno) y atmósfera oxidante (26% de oxígeno) cuando se inició el recambio atmosférico a las 60 h de cultivo (Condición **E**). Por esta razón y debido a que con el tratamiento oxidante se obtuvo una mortalidad mayor al 50%, se calcularon los parámetros de infectividad (solo para las condiciones oxidantes). En la tabla 8.16 se muestran los valores obtenidos.

Tabla 8.16 Parámetros de infectividad de la cepa ARSEF 3302 obtenidos en condiciones oxidantes^a.

PARÁMETROS	26% O ₂
S (%)	33.33 ± 5.77
k (día ⁻¹)	0.20 ± 0.06
to(días)	3.73 ± 3.94
TL ₅₀ (días)	11.50 ± 4.52
R ²	0.97

^aSe iniciaron los pulso oxidantes a las 60 h de cultivo.

Al comparar los parámetros infectivos obtenidos con ambas cepas, bajo las mismas condiciones, se observó que solo hubo diferencia en las sobrevivencia final (S); mientras que los conidios de CNRCB1 bajo la condición oxidante presentaron una mortalidad final del 92.39%, los conidios de la cepa ARSEF 3302 mostraron una mortalidad final de 66.67% (S= 33.33%); este resultado, nuevamente indicó que los conidios generados en la condición **E** con la cepa CNRCB1, fueron más infectivos que los conidios de la cepa ARSEF 3302. De manera general, los resultados de este experimento permitieron inferir que cuando los pulsos oxidantes se iniciaron a las 60 h de cultivo, se mejoró la infectividad de los conidios de ambas cepas.

9. Discusión

9.1. Perfiles de producción (atmósfera normal)

A pesar de que las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 pertenecen a la especie *Isaria fumosorosa*, y que en las gráficas de producción de conidios presentaron un perfil de producción similar (curvas sigmoides), con los parámetros cinéticos de conidiación (μ y td) obtenidos en los experimentos realizados bajo atmósfera normal, se mostró que hay diferencias en los procesos de producción de conidios. Además, al comparar los parámetros obtenidos para la misma cepa en los diferentes experimentos, se observó que con CNRCB1, la μ (0.043, 0.046 y 0.047 h⁻¹) y el td (16.02, 15.21 y 14.79 h) no presentaron diferencias ($P > 0.05$) entre sí. En el caso de ARSEF 3302, los valores de μ de los experimentos 1 y 2 no mostraron diferencia entre sí (0.069 y 0.055 h⁻¹ ($P > 0.05$)), pero hubo diferencia con respecto a la μ del experimento 3 (0.037 h⁻¹); el proceso de generación de conidios fue más lento, como se puede observar con el aumento de los td (10.12, 12.60 y 18.54 h). Estos resultados indicaron que la cepa ARSEF 3302 mostró una tendencia a retardar su capacidad de conidiación. La diferencia del proceso de conidiación de ambas cepas estudiadas, también se pudo observar con el seguimiento que se hizo de las cinéticas de producción de conidios (bajo condiciones atmosféricas normales) con el Ic ; y finalmente, la diferencia también se pudo corroborar con el estudio morfológico realizado en el experimento 3.

Miranda-Hernández *et al.*, (2014), encontraron que a las 180 h de cultivo, mientras que la cepa CNRCB1 produjo 4.72×10^8 con/cm², la cepa ARSEF 3302 solo produjo 3.38×10^7 con/cm² (bajo condiciones atmosféricas normales). En los experimentos 1 y 2 de este trabajo (a las 156 h de cultivo), CNRCB1 ya había generado 2.59×10^8 y 2.19×10^8 con/cm², respectivamente; estos datos son similares al orden de magnitud reportado por

Miranda-Hernández *et al.*, (2014); pero los datos de la cepa ARSEF 3302 son muy diferentes, ya que produjo 2.45×10^8 y 1.5×10^8 con/cm² (experimento 1 y 2, respectivamente). La alta variabilidad que puede presentar una misma cepa para generar conidios, es un fenómeno ya conocido. Cherry *et al.*, (1999), presentaron reportes de una alta variabilidad en la producción de conidios de una cepa de *Metarhizium anisopliae* (IMI 330189) utilizada a escala industrial; en ese trabajo, se logró identificar que las variaciones se debieron a diferencias de temperatura y tiempos de incubación que se presentaban entre cada lote de producción. Es posible pensar que los cambios que presentó la cepa ARSEF 3302, se debieron a los cambios inherentes a las condiciones de cultivo que pudieran haberse presentado entre experimentos; sin embargo, el hecho de que se experimentó de forma simultánea con la cepa CNRCB, y que ésta no presentó variaciones importantes, minimiza esa posibilidad.

La conidiación es una respuesta compleja que en principio está determinada por las condiciones ambientales (disponibilidad de nutrientes, pH, humedad, etc.), pero también por el estado metabólico que presenten las células (Steyaert *et al.*, 2010). Los análisis de la producción bajo condiciones atmosféricas normales, realizados con el *lc* y la microscopía electrónica de barrido, revelaron que los inóculos germinaron de forma similar dentro de las primeras 24 h de cultivo; y que las diferencias se hicieron evidentes por el tiempo que tardaron en generar el micelio secundario que dio origen a los primeros conidióforos; es en este período de tiempo, cuando las condiciones de cultivo podrían haber afectado el proceso de conidiación (inestabilidad). Una probable explicación de los cambios de la cepa ARSEF 3302, sería que estuviera infectada con micovirus, ya que existen investigaciones que han reportado que su presencia, está asociada a un crecimiento lento, así como a fenotipos variables en la morfología y nivel de conidiación;

además de provocar hipervirulencia en *M. anisopliae* e hipovirulencia en *B. bassiana* (Melzer y Bidochka, 1998; Dalzoto *et al.*, 2006; Herrero, 2011).

La reproducibilidad que muestran los datos experimentales con la cepa CNRCB1, permitieron inferir que es una cepa más estable, en comparación con lo reflejado por la cepa ARSEF 3302. Este hallazgo resulta interesante, ya que la estabilidad, si bien es una característica deseable para investigaciones, también lo es para la producción industrial (Vandenberg y Cantone, 2004; Tarocco *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2010; Carrillo-Pérez *et al.*, 2013).

Existen varios trabajos con hongos entomopatógenos que han buscado mejorar la producción de conidios, mediante la aplicación de un factor de estrés. Para la aplicación de ese determinado factor estresante, se ha establecido que durante el cultivo, es necesario dejar pasar una fase pre-estacionaria o que existe un tiempo exacto en el cual el micelio es competente para recibir un tratamiento y presentar una respuesta positiva (García-Ortiz *et al.*, 2015); ambos momentos terminan cuando se desencadena la conidiación; por esta razón, es necesario aplicar el factor de estrés antes de que inicie la conidiación o que el proceso no esté muy avanzado; ya que lo que se pretende, es observar los efectos en los conidios que se generan y no, cómo el factor estresante, afecta a los conidios ya generados.

En función del factor estresante y de la especie de hongo entomopatógeno que se trate, en algunas investigaciones se han definido 60 h de cultivo como el momento de aplicación del factor de estudio (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010; García-Ortiz *et al.*, 2015) y en otras se ha establecido como de 72 h de cultivo (Sánchez-Murillo *et al.*, 2004; Garza-López *et al.*, 2011 y 2012). En la investigación realizada por García-Ortiz *et al.* (2015), se determinó, con *Metarhizium anisopliae*, que 60 h de cultivo es el tiempo en el que el micelio ya es competente para recibir pulsos con 30% de oxígeno y tener un efecto positivo en la

producción de conidios. Sin embargo, si en el presente trabajo se tomara el mismo criterio para la aplicación de algún factor estresante, implicaría una imprecisión del momento de aplicación, con respecto al estado de desarrollo de *Isaria fumosorosea*. Al observar los valores que se tienen de **lc** a las 60 h de cultivo, en los 3 experimentos realizados, se observó que el hongo presentó grados de conidiación diferentes; para CNRCB1 los **lc** fueron de 35.8, 1.1 y 18.3 (experimentos 1, 2 y 3 respectivamente); y para ARSEF 3302 los **lc** fueron 155.39, 5.17 y 2.09. Estos resultados muestran que para hongos como *I. fumosorosea*, que presentan una alta variabilidad en el proceso de conidiación, resulta inexacto basarse en solo horas de cultivo para aplicar los factores de estrés que se deseen estudiar.

El análisis de la conidiación con el **lc** y las micrografías del seguimiento de las cinéticas de producción de ambas cepas, revelaron que existe un período de tiempo entre la germinación y la generación de micelio secundario con brotes de conidióforos; esto conlleva a que es posible establecer un intervalo de **lc**, que implique un estado metabólico adecuado para aplicar algún factor estresante de interés, y afectar la conidiación del hongo. Como ya se ha mencionado anteriormente, cuando los conidios inoculados comienzan a germinar, el valor del **lc** es menor a la unidad; cuando el sistema de cultivo es capaz de igualar la cantidad de conidios del inóculo inicial, el **lc** adquiere nuevamente un valor de 1, y es aquí donde se propone que inicie el intervalo de aplicación de los factores de estudio asociados a la conidiación. El **lc** de los diferentes experimentos, indica que una vez que se ha adquirido el valor de 1, continua la generación exponencial de conidios; por lo que la determinación del otro extremo del intervalo de **lc**, dependerá de cada investigación; lo que no se debe perder de vista es que mientras más aumente el **lc** implica mayor abundancia de conidios que no se verán afectados con el tratamiento que se desee probar. En este trabajo, se sugiere que el **lc** tenga un valor máximo de 10, ya

que una vez que el **lc** se acercó a este valor, por lo general, el siguiente valor creció de manera abrupta. De forma general, estos resultados muestran que el **lc** puede ser un indicador general del estado de desarrollo del hongo, apoyado con los parámetros de conidiación (**μ** y **td**); y presenta la ventaja de que puede aplicarse para cualquier sistema de cultivo, con otros hongos entomopatógenos e incluso se puede aplicar con otro tipo de microorganismos que generen esporas.

9.2. Efecto de los pulsos oxidantes

Este trabajo se une a la lista de investigaciones en las que se ha descrito que al someter a los hongos entomopatógenos a un factor abiótico estresante, es posible afectar, ya sea de forma positiva o negativa, la producción de conidios y/o su calidad, con respecto a los conidios obtenidos bajo condiciones normales. Existen datos que revelan que las atmósferas enriquecidas con oxígeno (> 70% de oxígeno) mejoran la calidad y vida de anaquel de los vegetales empacados “listos para comer”, ya que disminuyen o retardan el crecimiento de hongos (Jacxsens *et al.*, 2001). Las concentraciones elevadas de oxígeno, pueden provocar una acumulación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la célula durante la respiración aeróbica; por lo cual, la cantidad de ERO puede ser tal, que genere un estrés oxidante, tóxico y que conlleve al daño de los componentes celulares (Angelova *et al.*, 2005, Fridovich, 1998).

Por otra parte, en estudios realizados con *Neurospora crassa*, se observó que las ERO pueden funcionar como moléculas que señalizan al micelio la necesidad de citodiferenciarse, en ciertas etapas del desarrollo (Belozerskaya y Gessler, 2006). Es bajo este conocimiento, que Tlecuil-Beristain *et al.*, (2010) describieron por primera vez que una atmósfera enriquecida con 26% de oxígeno, aumentó la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*, en comparación con los conidios obtenidos en una

atmósfera normal, sin afectar su germinación, hidrofobicidad y virulencia. García-Ortiz *et al.*, (2015), obtuvieron resultados similares bajo las mismas condiciones de estudio; pero además, encontraron que con la aplicación de pulsos con 30% de oxígeno, mejoraron la termotolerancia de los conidios generados por *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. Por otra parte, Garza-López *et al.*, (2012), observaron que al exponer a *Beauveria bassiana* a una atmósfera con 26% de oxígeno, no se afectó la producción de conidios, pero se generó un estado oxidante que provocó la disminución de su calidad, debido a la acumulación de lípidos oxidados en la biomasa. En este trabajo, para cada cepa de *Isaria fumosorosea* estudiada, se determinó el porcentaje de afectación general (promedio de los experimentos 2 y 3) en la producción de conidios, provocado por la aplicación de los pulsos oxidantes; se obtuvo en promedio, 54% de afectación en la cepa CNRCB1 y 49% de afectación en la cepa ARSEF 3302, con respecto a la producción bajo condiciones atmosféricas normales. Estos valores son parecidos a lo reportado por Miranda-Hernández *et al.*, (2014), en donde se determinó que la cepa CNRCB1 tuvo un 53% de afectación en la producción de conidios bajo similares condiciones de estudio. En dicha investigación, a diferencia de lo observado en este trabajo, los pulsos oxidantes presentaron un efecto positivo en la producción de conidios de la cepa ARSEF 3302. La diferencia entre ambas investigaciones, como ya se ha indicado anteriormente, puede deberse a la inestabilidad que ha mostrado esta cepa. Por otra parte, en ambos trabajos se han obtenido efectos positivos en las características de calidad. Sin embargo, una contribución de este trabajo, es que se muestra que la calidad se mejora a partir de tiempos críticos para aplicar los pulsos.

Constanski *et al.*, (2011), en un estudio realizado con 15 aislados de *Beauveria bassiana*, lograron determinar que si bien hubo aislados que presentaron mejores características de termotolerancia, a temperaturas mayores de 32°C, en todos los casos se afectó

negativamente la producción de conidios y la virulencia. Fernandes *et al.*, (2008), al estudiar la termotolerancia de los conidios de diferentes aislados de *Beauveria spp.*, pudieron determinar que a 45°C hubo variabilidad en la característica y que los 3 aislados que presentaron la mayor tolerancia, tuvieron valores de germinación de cero, cuando la temperatura se elevó a 46°C. Además, observaron que las características que presentaron los diferentes aislados están correlacionadas con las zonas geográficas de donde se obtuvieron. También existen reportes de una alta variabilidad de la termotolerancia cuando los conidios de varios aislados de *Metarhizium anisopliae*, provenientes de zonas geográficas y hospederos diferentes, fueron sometidos a 45°C (Rangel *et al.*, 2005), o de 38 a 48°C (Li y Feng, 2009). Las cepas de *Isaria fumosorosea* utilizadas en esta investigación provienen de diferentes zonas de la República Mexicana; la cepa CNRCB1 fue obtenida del estado de Colima, que presenta un clima sub húmedo y una temperatura promedio de 25°C; la cepa ARSEF 3302 fue obtenida del estado de Baja California, que presenta un clima seco y un intervalo de temperatura promedio de 18 a 22°C (www.cuentame.inegi.org.mx). Estas diferencias podrían contribuir en la disparidad de las cepas. Cuando los conidios de ambas cepas fueron sometidas a 40°C; el mayor efecto positivo provocado por la atmósfera oxidante se presentó cuando se inició el tratamiento a las 60 h de cultivo, en el caso de CNRB1; y para ARSEF 3302, cuando se inició a las 48 h de cultivo.

Existen estudios que indican que al aumentar la temperatura, se genera un estrés oxidante debido al aumento en la concentración de ERO, las cuales pueden propiciar daños en la célula, como ya se ha mencionado anteriormente (Abrashiev *et al.*, 2008). Es posible que los pulsos con 26% oxígeno generaran un estado oxidante, en el cual se haya propiciado el incremento en la producción de proteínas de choque térmico y de trehalosa en las células del hongo, y que actuaran de manera complementaria, tal cual ocurre

cuando las células son sometidas a un estrés térmico. Las proteínas de choque térmico son chaperonas moleculares constitutivas de las proteínas, involucradas en el plegamiento correcto de las proteínas recién sintetizadas y en corregir proteínas desnaturalizadas (Sanchez *et al.*, 1993; Rangel, 2011). La trehalosa rodea a las macromoléculas formando un escudo cristalino que ayuda a mantener su forma nativa y puede funcionar como un secuestrador de radicales libres que pudieran causar daños celulares (Benaroudj *et al.*, 2001; Rangel, 2011). Estos cambios, también podrían explicar las mejoras que se obtuvieron en la viabilidad de los conidios generados bajo atmósfera oxidante. Existen trabajos que indican que a nivel industrial, es recomendable que los propágulos del hongo tengan una viabilidad mayor al 85% (Jenkins y Grzywacz, 2000; Posada y Vega, 2005); en esta investigación se observó que cuando se inició el recambio en la cepa CNRCB1 a las 48 y 60 h de cultivo, se presentaron las mejoras más importantes en esta característica de calidad (48 y 41% respectivamente), con respecto a la viabilidad de los conidios cultivados bajo condiciones normales; además, los valores de viabilidad estuvieron por encima del recomendado (96 y 93% respectivamente). En lo que respecta a la cepa ARSEF 3302, cuando el tratamiento oxidante se inició a las 48 h de cultivo, fue el único caso donde la viabilidad fue mayor de 85% (92%).

El primer paso para que el hongo comience su ciclo infectivo en el insecto, es que el conidio se adhiera a su cutícula; este proceso de adhesión está mediado por fuerzas hidrofóbicas (Boucias *et al.*, 1988; Shah *et al.*, 2007); y se sabe que la superficie de los conidios es hidrofóbica debido a la presencia de hidrofobinas (Girardin *et al.*, 1999; Shan *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos en esta investigación, revelaron que el tratamiento estudiado no afectó la hidrofobicidad de los conidios, por lo que no se debería afectar la infectividad de forma negativa, al menos en la etapa de adhesión. Los bioensayos mostraron que efectivamente, en ningún caso hubo un efecto negativo en la infectividad,

debido a la atmósfera oxidante; por el contrario, en ambas cepas se observó que al iniciar los pulsos oxidantes a las 60 h de cultivo, los conidios obtenidos bajo este estado, fueron más infectivos que los conidios obtenidos bajo condiciones normales. Al igual que en la investigación de Miranda-Hernández *et al.*, (2014), en el presente trabajo se encontró que la cepa CNRB1 fue más infectiva que la cepa ARSEF 3302, empleando larvas de *Galleria mellonella* como hospedero. Sin embargo, en aquella investigación, los TL_{50} que mostraron las cepas CNRCB1 y ARSEF 3302 bajo condiciones oxidantes, fueron de 3.1 y 3.8 días, respectivamente; bajo las condiciones de este estudio, se obtuvieron valores de TL_{50} de 9.1 días para la cepas CNRCB1 y de 11.5 días para la cepa ARSEF 3302; se necesitó alrededor de 3 veces más tiempo, con ambas cepas, para que se diera la muerte del 50% de la población. Las diferencias podrían deberse a que se emplearon lotes distintos del insecto hospedero; esto podría implicar que estuvieran en estados fisiológicos diferentes. La eficacia de los hongos para matar a un insecto hospedero, depende por una parte, sí, de la capacidad del hongo para generar factores de patogenicidad (enzimas y toxinas), pero también es muy importante las susceptibilidad del insecto, la cual está determinada por factores como la edad, nutrición, salud y densidad de la población (Inglis *et al.*, 2001).

Además de las razones que se han expuesto a lo largo de esta sección, para explicar las diferencias encontradas entre las cepas estudiadas, también cabe mencionar que *Isaria fumosorosea*, según Zimmermman, (2008), es un hongo que es considerado un complejo de especies, lo que le permite tener plasticidad fenotípica; es decir, que su genotipo tiene la capacidad de generar fenotipos con estructuras o fisiología diferentes (fenotipos plásticos), acordes con las condiciones ambientales y sus cambios (Rangel *et al.*, 2015). Los resultados de esta investigación indican que es posible que las células miceliares sometidas a la atmósfera oxidante, percibieran los cambios en el ambiente (gasto de

mantenimiento) y entonces decidieran retardar el proceso de conidiación, para hacer una reingeniería y formar conidios que estuvieran mejor preparados ante el factor estresante (gasto de producción); es así, que se generaron los fenotipos plásticos que fueron capaces de resistir el incremento de temperatura, de mejorar su viabilidad, de mantener la hidrofobicidad y de mejorar la infectividad. Bajo esta suposición, el efecto que tendría la atmósfera oxidante en la producción de los conidios es retardarla, más no detenerla; es decir, que se tendría la capacidad de llegar al máximo de producción de conidios, con respecto a las condiciones normales, solo que se requeriría de más tiempo para lograrlo. Esto concordaría con lo observado en las micrografías obtenidas bajo ambas condiciones de estudio (retardo de la conidiación bajo condiciones oxidantes). Para comprobar esta suposición, habría que realizar las cinéticas de producción de conidios bajo ambas condiciones y medir la producción hasta que se obtuvieran los máximos; a la par se tendrían que medir las características de calidad para verificar si cambian durante el tiempo, además se podrían inferir más costos energéticos debidos a la plasticidad fenotípica.

De manera general, se determinó que el tiempo idóneo para iniciar la aplicación de los pulsos con 26% de oxígeno y generar la mejora óptima de la calidad de los conidios, fue de 60 h para la cepa CNRCB1 y de 48-60 h para la cepa ARSEF 3302. De este modo, se logró comprobar la hipótesis planteada y se alcanzaron los objetivos propuestos en la investigación.

10. Conclusiones

1) Se corroboró que existe un momento idóneo (48-60 h) en el cual, las características de calidad de los conidios del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea*, pueden optimizarse con la aplicación de pulsos con 26% de oxígeno.

2) El **lc** da información acerca del estado de desarrollo del hongo y permite determinar el momento de competencia del micelio, para aplicar cualquier factor de estrés que esté asociado a la conidiación, que tenga el objetivo de incrementar las características deseables de los conidios.

3) El **lc** y los parámetros de conidiación, han funcionado como herramientas para la evaluación de la estabilidad de las cepas de trabajo.

11. Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta investigación, dan pie a aspectos de interés que se abordan a continuación. Para complementar los resultados del efecto positivo que observó en la termotolerancia, podría ser interesante comprobar, si este fenómeno se debe a la generación de trehalosa en la célula o si hay un incremento de las proteínas de choque térmico. Por otra parte, también se podría hacer la medición de enzimas asociadas a la estabilización del estado redox de la célula (catalasa o superóxido dismutasa); y así, comprobar el aumento de ERO debido a los pulsos oxidantes.

Otro punto que resulta de interés, es que hayan sobrevivido conidios después del tratamiento térmico, se podrían evaluar sus características de calidad y determinar si son heredables y por cuántas resiembras. Un experimento que puede ser inmediato y complementario de este trabajo, es la comprobación del posible retardo de la producción de conidios bajo condiciones oxidantes.

Otro aspecto que podría resultar interesante, tiene que ver con la identificación de genes ortólogos en *Isaria fumosorosea*, que estén asociados a la conidiación como *Bbrgs1* o *Cag8*, o asociados a la infectividad como *ch13*; y realizar además, estudios de expresión génica, con la finalidad de conocer los mecanismos moleculares por los cuales podrían

regularse éstos procesos. Por último, también podría resultar interesante, determinar si la variabilidad que presentó la cepa ARSEF 3302 es debida a la presencia de micovirus.

12. Bibliografía

- ▶ Abrashev, R. I., Pashova, S. B., Stefanova, L. N., Vassilev, S. V., Dolashka-Angelova, P. A., & Angelova, M. B. (2008). Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. Canadian journal of microbiology, 54(12): 977-983. DOI: 10.1139/W08-091
- ▶ Amador, R., Mederos, D., & López, M. (2011). Mosquita blanca en tomate, control actual y perspectivas. 2000 Agro Revista Industrial del Campo. 66: 12-17.
- ▶ Angelova, M. B., Pashova, S. B., Spasova, B. K., Vassilev, S. V., & Slokoska, L. S. (2005). Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. Mycological research, 109(02): 150-158. DOI: 10.1017/S0953756204001352
- ▶ Armstrong, G. A., & Hearst, J. E. (1996). Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. The FASEB Journal, 10(2): 228-237.
- ▶ Asaff, A., Escobar, F., & de la Torre, M. (2009). Culture medium improvement for *Isaria fumosorosea* submerged conidia production. Biochemical Engineering Journal, 47(1): 87-92. DOI:10.1016/j.bej.2009.07.007
- ▶ Benaroudj, N., Lee, D. H., & Goldberg, A. L. (2001). Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. Journal of Biological Chemistry, 276(26): 24261-24267. DOI: 10.1074/jbc.M101487200
- ▶ Belozerskaya, T. A., & Gessler, N. N. (2006). Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. Microbiology, 75(4): 427-431. DOI: 10.1134/S0026261706040102
- ▶ Bouamama, N., Vidal, C., & Fargues, J. (2010). Effects of wetting on the persistence of quiescent conidia of *Isaria fumosorosea*. Biological Control, 55(3): 203-210. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2010.07.011
- ▶ Boucias, D. G., Pendland, J. C., & Latge, J. P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Applied and environmental microbiology, 54(7): 1795-1805.

- Butler, M. J., & Day, A. W. (1998). Fungal melanins: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(12): 1115-1136. DOI: 10.1139/w98-119
- Butt, T. M., Jackson, C., & Magan, N. (2001). Fungi as biocontrol agents: progress problems and potential. CABI. Pág. 1-8
- Carr Pérez, A., Elósegui, O., & Bell Padrón, N. (2003). Aislamiento, caracterización morfológica y fisiológica del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Broum Smith. *Fitosanidad*, 7(3):27-32
- Carrillo-Pérez, E., P., Acosta, E., Montesinos-Cisneros, R. M., & de la Torre, M. (2013). Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2): 309-317. DOI: 10.1007/s11274-012-1184-1
- Cherry, A. J., Jenkins, N. E., Heviefo, G., Bateman, R., & Lomer, C. J. (1999). Operational and economic analysis of a West African pilot-scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium spp.* for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 9(1): 35-51. DOI:10.1080/09583159929893
- Constanski, K. C., Neves, P. M. O. J., Nogueira, L. M., Santoro, P. H., Amaro, J. T., & Zorzetti, J. (2011). Selection and evaluation of virulence of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. submitted to different temperature. *Semina: Ciências Agrarias (Londrina)*, 32(3): 875-882. DOI: 10.5433/1679-0359.2011v32n3p875
- Dalzoto, P. R., Glienke-Blanco, C., Kava-Cordeiro, V., Ribeiro, J. Z., Kitajima, E. W., & 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., & 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
- Ehler, L. E. (2006). Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest management science*, 62(9): 787-789.
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4): 387-400. DOI: 10.1023/A:1014193329979

- Ezziyyani, M., Pérez, C., Ahmed, A. S., Requena, M., & Candela, M. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26: 35-45.
- FAO, (1995). <http://www.fao.org/docrep/w3587e/w3587e03.htm> (Consultado 19 de junio de 2015, 12:46 h).
- FAO, (1996). <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm> (Consultado 18 de junio de 2015, 22:14 h).
- FAO, (2013). <http://www.fao.org/docrep/018/i3301s/i3301s.pdf> (Consultado 19 de junio de 2015, 10:37 h).
- FAO, (2015). <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/> (consultado 18 de junio de 2015, 15:30 h).
- Federici, B. A., Fetter-Lasko, J., Soares, G., & Tsao, P. W. (1980). Fungi show promise in biological control. *Cal. Agric*, 34: 25.
- Fernandes, E. K., Rangel, D. E., Moraes, A. M., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2008). Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *Journal of invertebrate pathology*, 98(1), 69-78. DOI: 10.1016/j.jip.2007.10.01
- Ferron, P. (1978). Biological control of insect pests by entomogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23(1): 409-442. DOI: 10.1146/annurev.en.23.010178.002205
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, 201(8): 1203-1209.
- García-Gutiérrez, C., González-Maldonado, M. B. (2013). Síntesis sobre el uso de bioinsecticidas y otros agentes de control biológico de plagas en México. *Vedalia* 12(1): 35-42.
- García-Ortiz, N., Tlecuil-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. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(6): 2783-2791. DOI: 10.1007/s00253-014-6225-2

- Garza-López, P. M., Konigsberg, M., Saucedo-Castañeda, G., & Loera, O. (2011). Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en respuesta al CO₂: producción de conidios y amilasas. *Agrociencia*, 45(7): 761-770.
- Garza-López, P. M., Konigsberg, M., Gómez-Quiroz, L. E., & Loera, O. (2012). Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1): 353-359. DOI: 10.1007/s11274-011-0827-y
- Glare, T. R. (2004). Biotechnological potential of entomopathogenic fungi. *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*. 79-90.
- Girardin, H., Paris, S., Rault, J., Bellon- Fontaine, M. N., & Latgé, J. P. (1999). The role of the rodlet structure on the physicochemical properties of *Aspergillus* conidia. *Letters in applied microbiology*, 29(6): 364-369. DOI: 10.1046/j.1472-765X.1999.00643.x
- Hallsworth J. E., & 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.
- Herrero, N. (2011). Micovirus asociados a los hongos endofíticos y entomopatogénos *Tolypocladium cylindrosporum* y *Beauveria bassiana*. Memoria para obtener el grado de doctora en biología. Universidad de Salamanca, España. Capítulo I.
- <http://www.agrobionsa.com/portfolio-view/pae-sin/> (consultado 18 de julio de 2015, 22:30 h).
- <http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/default.aspx?tema=me> (consultado 18 de junio de 2015, 15:30 h).
- Humber, R. A. (2005). *Entomopathogenic Fungal Identification*. University of Arkasas Ithaca, NY. Pág. 30-31.
- Inglis, P. W., Tigano, M. S., & Valadares-Inglis, M. C. (1999). Transformation of the entomopathogenic fungi, *Paecilomyces fumosoroseus* and *Paecilomyces lilacinus* (deuteromycotina: hyphomycetes) to benomyl resistance. *Genetics and molecular biology*, 22(1): 119-123. DOI: 10.1590/S1415-47571999000100023.
- Inglis, G. D., Goettel, M. S., Butt, T. M., & Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. *Fungi as biocontrol agents*. Pág. 23-69.

- Jackson, M. A., Dunlap, C. A., & Jaronski, S. T. (2010). Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *BioControl*, 55:129–145. DOI: 10.1007/s10526-009-9240-y
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Van der Steen, C., & Debevere, J. (2001). Effect of high oxygen modified atmosphere packaging on microbial growth and sensorial qualities of fresh-cut produce. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2): 197-210. DOI: 10.1016/S0168-1605(01)00616-X
- Jenkins, N. E., & Grzywacz, D. (2000). Quality control of fungal and viral biocontrol agents- assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology*, 10(6): 753-777. DOI: 10.1080/09583150 020011717
- Kalia, A., & Mudhar, R. K. (2011). Biological Control of Pests. *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Springer Berlin Heidelberg. Pág. 223-240.
- Kamp, A. M., & 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
- Kogan, M. (1998). Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annual review of entomology*, 43(1): 243-270. DOI: 10.1146/annurev. ento. 43.1.243
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., & Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future?. *Biological control*, 21(3): 230-248.
- Lacey, L. A., & Kaya, H. K. (2007). *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Springer Netherlands. Pág. 3-7.
- Li, J., & Feng, M. G. (2009). Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. *Mycological research*, 113(1): 93-99. DOI: 10.1016/j.mycres.2008.08.006
- López-Lastra, C. C., Hajek, A. E., & Humber, R. A. (2002). Comparación de Métodos de preservación de cultivos de hongo entomopatógenos. *Canadian Journal of Botany*. 80:1126-1130

- Lord, J. C., Campbell, J. F., Sedlacek, J. D., & Vail, P. V. (2007). Application and evaluation of entomopathogens for managing insects in stored products. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Springer Netherlands. Pág. 677-693.
- Mascarin, G. M., Alves, S. B., & 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., & 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.
- 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 management science*. 70:661-666. DOI: 10.1002/ps.3605.
- Montesinos-Matías, R. (2008). Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. 33-35.
- Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo integrado de plagas*, 63: 95-103.
- Moreira, F. (2012). Manual de biología de suelos tropicales. Instituto Nacional de Ecología. Pág. 287-289.
- Motta-Delgado, P. A., & 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.

- Ortiz, M., Medina, R., Valdivia, R., Ortiz, A., Alvarado, S., y Rodríguez, R. (2010). Mosquitas blancas plaga primaria de hortalizas en Nayarit. Fuente.5, 31–39.
- Posada, F. J., & 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., Braga, G. U., Anderson, A. J., & Roberts, D. W. (2005). Variability in conidial thermotolerance of *Metarhizium anisopliae* isolates from different geographic origins. *Journal of invertebrate pathology*, 88(2): 116-125. DOI: 10.1016/j.jip.2004.11.007
- Rangel, D. E., Butler, M. J., Torabinejad, J., Anderson, A. J., Braga, G. U., Day, A. W., & Roberts, D. W. (2006). Mutants and isolates of *Metarhizium anisopliae* are diverse in their relationships between conidial pigmentation and stress tolerance. *Journal of invertebrate pathology*, 93(3): 170-182. DOI: 10.1016/j.jip.2006.06.008
- 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., 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. *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., & Rechcigl, N. A. (2000). *Biological and biotechnological control of insect pests*. CRC Press.

- Ris, H. (1985). The cytoplasmic filament system in critical point-dried whole mounts and plastic-embedded sections. *The Journal of cell biology*, 100(5): 1474-1487. DOI: 10.1083/jcb.100.5.1474
- Rodríguez-Gómez, D., García-Ortiz, N., Sepúlveda-Sánchez, J.D., & Loera, O. Morfología de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* producidos en diferentes condiciones oxidantes. XXXV Congreso Nacional de Control Biológico. Puebla, Pue. México. Noviembre 2012.
- Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3): 513-518. DOI: 10.1007/s11274-008-9917-x
- Rosset, P., & Moore, M. (1997). Food security and local production of biopesticides in Cuba. *LEISA-LEUSDEN-*, 13: 18-19.
- Sánchez-Murillo, R. I., de la Torre-Martínez, M., Aguirre-Linares, J., & Herrera-Estrella, A. (2004). Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiology*, 150 (2): 311-319. DOI: 10.1099/mic.0.26717-0
- Sanchez, Y., Parsell, D. A., Taulien, J., Vogel, J. L., Craig, E. A., & Lindquist, S. (1993). Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *Journal of bacteriology*, 175(20): 6484-6491.
- Selfa, J., & Anento, J. L. (1997). Plagas agrícolas y forestales. *Bol. SEA*, 20: 75-91.
- Shah, F. A., Allen, N., Wright, C. J., & Butt, T. M. (2007). Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS microbiology letters*, 276(1): 60-66. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00927.x

- Shan, L. T., Wang, Z. L., Ying, S. H., & 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
- Sindhu, S. S., Rakshiya, Y. S., & Verma, M. K. (2011). Biological control of termites by antagonistic soil microorganisms. In *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Springer Berlin Heidelberg. Pág. 261-309.
- Singh, A., Parmar, N., Kuhad, R. C., & Ward, O. P. (2011). Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol in soil Biology. *Bioaugmentation, Biostimulation and Biocontrol*. Springer Berlin Heidelberg. Pág. 1-23.
- Steels, E. L., Learmonth, R. P., & Watson, K. (1994). Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology*, 140(3): 569-576. DOI: 10.1099/00221287-140-3-569
- Steyaert, J. M., Weld, R. J., Mendoza-Mendoza, A., & Stewart, A. (2010). Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology*, 156(10): 2887-2900. DOI: 10.1099/mic.0.041715-0
- Tarocco, F., Lecuona, R. E., Couto, A. S., & 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
- Téllez-Jurado, A., Cruz Ramírez, M. G., Mercado Flores, Y., Asaff Torres, A., & Arana-Cuenca, A. (2009). Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. *Revista mexicana de micología*, 30: 73-80.
- Tlecuítl-Beristain, S., Viniegra-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(5): 387-394. DOI: 10.1007/s11046-009-9268-7.

- ▶ Vandenberg, J. D., & 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. & Roy, H. E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal ecology, 2: 149-159. DOI: 10.1016/j.funeco.2009.05.001
- ▶ Wraight, S. P., Inglis G. D., & Goettel, M. S. (2007). Fungi. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Springer Netherlands. Pág. 223-248.
- ▶ Yu, M. W. (1983). Fungi as pest controls. Tesis doctoral. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad Simon Fraser. Pág. 1.
- ▶ Zimmermann, G. (2008). The entomopathogenic fungi *Isaria farinosa* (formerly *Paecilomyces farinosus*) and the *Isaria fumosorosea* species complex (formerly *Paecilomyces fumosoroseus*): biology, ecology and use in biological control. Biocontrol Science and Technology, 18(9): 865-901. DOI: 10.1080/09583150802471812