

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**Comparación en la producción de conidios del genero *Isaria* en cultivos superficiales y sólidos sometidos a pulsos oxidantes.**

TESIS  
para obtener el grado de  
Doctor en Biotecnología

PRESENTA

Facundo Rafael Muñoz Paredes

Director

Dr. Octavio Loera Corral

Noviembre 2016

Ciudad de México a 4 de noviembre del 2016

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

Comparación en la producción de conidios del genero *Isaria* en cultivos superficiales y  
sólidos sometidos a pulsos oxidantes.

que presentó

Facundo Rafael Muñiz Paredes

Comité Tutorial:

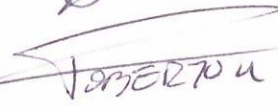
Director: Dr. Octavio Loera Corral  
Asesor: Dr. Paul Misael López Garza  
Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Jurado:

Presidente: Dr. Juan Esteban Barranco Florido



Secretario: Dr. Roberto Montesinos Matías



Vocal: Dr. Paul Misael Garza López



Vocal: Dr. Eric Ortega Sánchez



**“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”**

Ciudad de México a 4 de noviembre del 2016

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

Comparación en la producción de conidios del genero *Isaria* en cultivos superficiales y  
sólidos sometidos a pulsos oxidantes.

que presentó

Facundo Rafael Muñiz Paredes

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral  
Asesor: Dr. Paul Misael López Garza  
Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Jurado:

Presidente: Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Secretario: Dr. Roberto Montesinos Matías

Vocal: Dr. Paul Misael Garza López

Vocal: Dr. Eric Ortega Sánchez

## **Agradecimientos.**

Al Dr. Octavio Loera, por aceptarme dentro de su grupo de trabajo, sabiendo el reto que representaba sacar adelante este trabajo de Doctorado, por siempre hacerse de un tiempo para atender mis dudas y revisar resultados a pesar de su pesado trabajo como Jefe de departamento. Tú compromiso y forma de dirigir son un ejemplo a seguir. Muchas gracias por todas las oportunidades, la confianza y el apoyo que me diste estos 3 años.

Al Dr. Gustavo Viniegra por todas sus críticas y comentarios, los cuales mejoraron de forma notable esta tesis.

Al Dr. Misael Garza, que siempre se mostró atento sobre el avance del trabajo experimental, escritura del artículo y la redacción de la tesis; y que además aportó comentarios y críticas útiles en cada etapa de mi trabajo de doctorado.

A los doctores Esteban Barranco y Eric Ortega quienes siguieron este trabajo desde el examen predoctoral, por su rápida y oportuna revisión de esta tesis. Al Dr. Roberto Montesinos por la revisión y comentarios de la tesis. Y en general a todos mis profesores, que me proporcionaron una excelente formación académica.

A Nohemi Garcia y León Sánchez que me apoyaron en el montaje muchas técnicas que permitieron redondear esta tesis, así como en la interpretación de resultados y uso de software.

A mis papás que siempre están ahí, listos para apoyarme en todo lo que necesito. Y por la excelente educación (en casa y escuela) que siempre se esmeraron en proporcionarme.

A todos mis amigos que fuera y dentro de la UAM siempre me han mostrado un profundo cariño e interés, y que aunque estén lejos siempre me hacen sentir su apoyo y presencia; disculpen no mencionarlos uno por uno, es para evitar olvidar injustamente a alguno(s).

## Resumen.

La producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos en cultivo sólido (CSól) se infieren frecuentemente a partir de resultados obtenidos en cultivo superficial (CSup), sin embargo, no existen reportes que comparen ambos sistemas de cultivo en condiciones similares. En ambos cultivos se usaron las cepas *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 e *Isaria fumosorosea* CNRCB1 (reassignada recientemente como *Isaria javanica*). Ambos sistemas se compararon en términos de producción y calidad de conidios, así como de sensibilidad a pulsos oxidantes, utilizando un medio con la misma composición química (mezcla arroz-avena). La producción de conidios en CSup fue 6 veces mayor respecto al CSól para ambas cepas en términos de conidios por gramos de sustrato inicial (gsi). La germinación y la viabilidad no mostraron diferencias importantes entre ambos sistemas de cultivo, sin embargo, los parámetros de infectividad de los conidios, usando larvas de *Galleria mellonella* sí fueron distintos entre ambos cultivos. Las diferencias de producción de conidios entre ambos sistemas no se explicó en términos del área específica ( $\alpha$ ), sin embargo la disponibilidad de sustrato por área ( $\sigma$ ) afectó los rendimientos de conidiación. La morfología del sustrato (presencia o ausencia de pared de salvado en avena) también se relacionó con estas diferencias, ya que el salvado puede dificultar la disponibilidad de nutrientes del endospermo, a diferencia de la morfología en cultivo superficial donde los nutrientes se encuentran accesibles para la producción de biomasa y conidios, puesto que se adicionan en forma de harina. Además el análisis de Respirimetría, como medición indirecta de la biomasa, mostró que la máxima producción de CO<sub>2</sub> por gsi se obtuvo en CSup.

Los pulsos oxidantes (oxígeno al 26%) disminuyeron la producción de conidios respecto al control con atmósfera normal independientemente de la cepa, el sistema de cultivo o la aplicación de 1 pulso (26%) o 2 pulsos (26% x 2) cada 24 h. Sin embargo, los CSól resultaron en mayor sensibilidad a los pulsos hiperoxidantes en comparación al CSup. La calidad de los conidios obtenidos en CSup de ambas cepas, mostró un incremento en la viabilidad en los tratamientos oxidantes respecto al tratamiento control, a diferencia del CSól con pulsos oxidantes que no mejoraron la viabilidad respecto a la atmósfera normal. La infectividad de los conidios provenientes de los CSup y CSól con pulsos oxidantes no mostró diferencias consistentes, comparadas con sus contrapartes en cultivos con atmósfera normal. Además de una mayor sensibilidad a los tratamientos oxidantes, los CSól con pulsos de oxígeno mostraron una menor invasión del sustrato, probablemente por insuficiencia de oxígeno, como

consecuencia de las diferencias en la cantidad total de sustrato inicial en ambos sistemas, que era 15 veces mayor en CSól respecto al CSup. Se determinaron los residuales de oxígeno en los tratamientos oxidantes, para el CSup se mantuvieron entre 10 y 20% durante el tiempo de cultivo, sin importar si se aplicaban uno o dos pulsos diarios, en cambio en el CSól el residual de oxígeno fue cercano a 0%. La acumulación de CO<sub>2</sub> en los tratamientos oxidantes se comportó de forma inversa con los niveles residuales de oxígeno, ya que los CSup acumularon menos CO<sub>2</sub> que los CSól.

Cuando se igualó la cantidad de sustrato inicial en ambos sistemas (1 gsi por unidad experimental), la conidiación en CSup continuó siendo menor cuando se aplicaban los pulsos oxidantes comparada con la atmósfera normal, sin embargo, en CSól se incrementó la producción de conidios con los pulsos oxidantes para ambas cepas sin importar si se aplicaban 1 o 2 pulsos diarios. Incluso la conidiación se incrementó hasta en un orden de magnitud respecto al control atmosférico, este nivel de incremento no había sido reportado por ningún trabajo previo en cultivos superficiales. Por otra parte en el sistema con 1 gsi, el porcentaje residual de oxígeno en el CSól fue mayor a su contraparte en CSup, y las de CO<sub>2</sub> menores. En un tercer sistema utilizando 2.5 gsi (sólo en CSól) aun fue posible incrementar en la conidiación en la mayoría de los tratamientos oxidantes respecto a la atmósfera normal. La calidad de los conidios obtenidos con 2.5 gsi fue similar en los diferentes tratamientos oxidantes y con atmósfera normal, sin embargo, la termotolerancia de los conidios mejoró en los tratamientos oxidantes respecto a la atmósfera normal. Estos resultados indicaron la importancia de la relación del volumen de reactor y la cantidad de gramos de sustrato inicial, como un criterio a considerar para evaluar los pulsos oxidantes. Finalmente, se evaluó este criterio con las cepas de *Beauveria bassiana* 882.5 y *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, en las cuales se reportó previamente que no incrementaban su conidiación o la disminuían cuando se cultivaron en CSól con 5 gsi con pulsos oxidantes. En ambas cepas fue posible incrementar la producción de conidios por medio de la aplicación de pulsos oxidantes.

## Abstract

Conidia production and quality from entomopathogenic fungi in solid-state culture (SSC) are frequently inferred from results obtained in superficial culture (SC), however, there are no reports comparing both culture systems in similar conditions. In both systems, *Isaria fumosorosea* ARSEF 3002 and *Isaria fumosorosea* CNRCB1 were used (recently reassigned as *Isaria javanica*). Both systems were compared using two *Isaria fumosorosea* strains (ARSEF 3302 and CNRCB1) in terms of conidia production and quality, and also in sensitivity to oxidant pulses using a media with the same chemical composition (rice-oat mixture). Conidia production for both strains in SC was 6-fold higher respective to SSC in terms of conidia per grams of initial dry substrate (gds). Germination and viability did not show important differences between both culture systems, however, infectivity parameters from conidia towards *Galleria mellonella* larvae showed some differences between both systems. The differences in the conidia production between both systems were not explained in terms of specific area ( $\alpha$ ), however substrate availability per area ( $\sigma$ ) affected the conidiation yields. The morphology of the substrate also explained these differences, since the oat bran may difficult the nutrient availability from endosperm, contrary to superficial morphology where substrates are ground making nutrients available for biomass and conidia production. Respirometry analyses, as indirect measurement of biomass, showed that the maximal production of CO<sub>2</sub> per gds was obtained in SC.

Oxygen pulses decreased conidia production respective to a normal atmospheric control independently of the strain, culture system or the application of 1 pulse (26%) or 2 pulses (26% x 2) every 24 hours. However, SSC resulted in a higher sensitivity to hyperoxidant pulses compared to SC. Conidia quality obtained in SC in both strains exhibited an increase in viability after oxidant treatments respective to atmospheric control, contrary to SSC with oxidant pulses, which did not improve viability. The infectivity in SC and SSC with oxidant pulses did not show consistent differences in infectivity parameters compared to atmospheric counterparts. In addition to the higher sensitivity to oxidant treatments, SSC with oxygen pulses presented a lower substrate invasion, probably by an insufficiency of oxygen, as consequence of differences in substrate quantity in both systems which was 15-fold higher in SSC respective to SC. Residual oxygen in oxidant treatments were determined, in SC remained between 10 to 20% during culture time, regardless if one or two daily oxygen pulses were applied, in contrast



in SSC residual oxygen was close to 0%. The accumulation of CO<sub>2</sub> in oxidant treatments behaved inversely to oxygen levels, since SC accumulated less CO<sub>2</sub> than SSC.

When initial substrate amount was equated (1 gds per experimental unit), conidiation in SC remained lower under oxidant pulses compared to normal atmosphere, however, in SSC conidia production increased with oxidant pulses for both strains regardless if 1 or 2 daily pulses were applied. Furthermore conidiation was increased up to 1 order magnitude respective to the normal atmosphere, this increase level has not been reported previously by any work. On the other hand in the system with 1 gds, residual oxygen percentage in SSC was higher than SC, and CO<sub>2</sub> levels lower. In a third system using 2.5 gds (only in SSC) it was still possible to increase conidiation in most of the oxygen treatments respective to normal atmosphere. Conidia quality in 2.5 gds system was similar under different oxidant and atmospheric treatments, however, thermotolerance improved in conidia under oxidant pulses respective to normal atmosphere. These results pointed out the importance of substrate amount-volume reactor, as a criterion to consider to evaluate oxidant pulses. Finally, this criterion was evaluated in *Beauveria bassiana* 882.5 and *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, two strains in which was previously reported that did not increase or decreased conidiation when cultured with 5 gds with oxidant pulses. In both strains it was possible to increase conidia production by oxidant pulses.

## Índice.

|  |    |
|--|----|
| 1. Introducción.....   | 1  |
| 1.1. Insectos plaga.....   | 1  |
| 1.2. Manejo integrado de plagas.....   | 2  |
| 1.3. Control biológico.....  | 3  |
| 1.4. Hongos entomopatógenos.....   | 3  |
| 1.4.1. Hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol.....                              | 6  |
| 1.5. Cultivo sólido y superficial.....   | 6  |
| 1.6. Parámetros de calidad de los conidios.....  | 8  |
| 1.7. Atmósferas modificadas como potenciadores de la producción y calidad de conidios..... | 9  |
| 1.8. <i>Isaria fumosorosea</i> .....   | 10 |
| 2. Justificación.....  | 12 |
| 3. Hipótesis.....  | 12 |
| 4. Objetivos.....  | 13 |
| 4.1. Objetivos particulares.....   | 13 |
| 5. Diagrama de estrategia experimental.....  | 14 |
| 6. Metodología.....  | 15 |
| 6.1. Microorganismos.....  | 15 |
| 6.2. Conteo de conidios.....   | 15 |
| 6.3. Conservación de las cepas.....  | 15 |

|   |    |
|---|----|
| 6.4. Estimación del área específica y disponibilidad de sustratos en los sistemas de cultivo.....                                     | 16 |
| 6.5. Producción de conidios en cultivo superficial y sólido.....  | 16 |
| 6.6. Análisis de respirometría.....   | 17 |
| 6.7. Cuantificación de oxígeno y CO <sub>2</sub> en tratamientos con pulsos oxidantes.....  | 19 |
| 6.8. Parámetros de calidad de los conidios.....   | 19 |
| 6.8.1. Germinación.....   | 19 |
| 6.8.2. Viabilidad.....  | 20 |
| 6.8.3. Infectividad.....  | 20 |
| 6.8.4. Termotolerancia.....   | 21 |
| 6.9. Análisis estadístico.....  | 21 |
| 7. Resultados.....  | 22 |
| 7.1. Determinación del área específica y disponibilidad de sustratos en CSup y CSól.....  | 22 |
| 7.2. Producción de conidios en sistema de CSup y CSól de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 y CNRCB1.....                               | 23 |
| 7.3. Análisis de respirometría de CSup y CSól de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 y CNRCB1.....                                       | 26 |
| 7.4. Efecto de las atmósferas oxidantes en la producción de conidios en CSup y CSól de <i>I. fumosorosea</i> ARSEF 3302 y CNRCB1..... | 28 |
| 7.5. Efecto del tipo de cultivo y los pulsos oxidantes en la calidad de conidios de <i>I. fumosorosea</i> .....                       | 32 |
| 7.5.1. Germinación.....   | 32 |
| 7.5.2. Viabilidad.....  | 33 |

|  |    |
|--|----|
| 7.5.3. Infectividad.....   | 34 |
| 7.6. Determinación de oxígeno residual y CO <sub>2</sub> acumulado en CSup y CSól.....   | 38 |
| 7.7. Efecto de los pulsos oxidantes y diferentes cantidades de gramos de sustrato inicial en sistemas de CSup y CSól.....            | 42 |
| 7.8. Determinación del oxígeno residual y CO <sub>2</sub> acumulado en los sistemas con 1 y 2.5 gsi.....                             | 46 |
| 7.9. Efecto de los pulsos oxidantes en la calidad de conidios en sistemas con 2.5 gsi en CSól.....                                   | 53 |
| 7.9.1. Germinación y viabilidad.....   | 53 |
| 7.9.2. Termotolerancia.....  | 55 |
| 7.9.3. Infectividad en sistemas con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena.....  | 57 |
| 7.10. Efecto de los pulsos oxidantes en sistemas de CSól con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena para otros hongos entomopatógenos..... | 59 |
| 8. Discusión.....  | 60 |
| 9. Resumen de resultados.....  | 76 |
| 10. Conclusiones.....  | 77 |
| 11. Perspectivas.....  | 78 |
| 12. Referencias.....   | 79 |
| Anexo I. Artículo científico.....  | 92 |

## **1. Introducción.**

### **1.1. Insectos plaga.**

Los insectos son considerados el grupo de animales más exitosos no sólo por su habilidad para sobrevivir en todos los hábitats del planeta, sino por ser el grupo con el mayor número total de individuos. La mayoría de ellos resulta beneficiosos para el ser humano, y probablemente menos del 0.5% son considerados como plagas (Sallam, 2000). Las plagas de insectos son aquellas que causan daños de forma directa o indirecta a humanos, animales de granja, cultivos y zonas forestales. La razón principal de la existencia de las plagas es la intervención humana en la creación de agrosistemas, donde suelen seleccionarse cultivos de alto rendimientos para satisfacer las necesidades humanas, esto a su vez provee a los insectos herbívoros de un ambiente propicio para la selección y crecimiento descontrolado de ciertas especies de insectos. El uso de cultivos transgénicos basados en *Bacillus thuringiensis* (Bt) en China se ha correlacionado con la aparición de insectos que anteriormente no eran considerados plagas (Lu y col., 2010), y se cree también que el cambio climático e incendios forestales pueden causar brotes de plagas (Hof y Svahlin, 2016).

Las pérdidas económicas de cultivos por plagas son difíciles de establecer con seguridad, sin embargo se ha estimado que el porcentaje de cosechas perdidas a nivel mundial debido a las plagas es dependiente del tipo de cultivo, y las estimaciones oscilan entre 26-40% para algunos de los cultivos más importantes a nivel mundial, siendo las plagas más destructivas las malezas, seguidas por plagas animales (Oerke y Dehne, 2004). De acuerdo con la FAO (Sallam, 2000) hasta 1/5 de las cosechas mundiales son destruidas por insectos plagas.

El control de plagas ha sido realizado desde hace varios años utilizando sustancias químicas (plaguicidas químicos). En el caso de las plagas de insectos, existen numerosos compuestos con actividad insecticida, los principales grupos son los organoclorados, organofosforados, piretrinas, carbamatos y neonicotinoides. Estos compuestos tienen actividad neurotóxica con diferentes blancos; la acetilcolinesterasa para los organofosforados y carbamatos (Fukuto, 1990), el receptor nicotínico-acetilcolina para los neonicotinoides (Goulson, 2013), los canales de sodio para los organoclorados y piretroides (Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2011; Narahashi, 1971). Estos compuestos poseen diversas ventajas como su amplio espectro contra diferentes variedades de insectos, las dosis bajas en que se requieren y la rapidez con que controlan las plagas (Foster y col., 2003). Sin embargo, existen numerosos problemas asociados al uso de

insecticidas químicos entre ellos los problemas de salud de las poblaciones expuestas, desarrollo de resistencia por parte de los insectos, contaminación de ecosistemas, persistencia en el ambiente y la eliminación de insectos polinizadores. Varios estudios han relacionado la exposición de insecticidas y plaguicidas al desarrollo de distintas enfermedades como cáncer, Parkinson, Alzheimer y diabetes tipo 2 (Allen y Levy, 2013; Karami-Mohajeri y Abdollahi, 2010). La familia química a la que pertenece un plaguicida determinará la toxicidad, por ejemplo los piretroides tienen característica lipofílicas, sin embargo no son acumulados en los tejidos grasos de los mamíferos debido a que son rápidamente metabolizados por hidrolasas y monoxigenasas dependientes del citocromo P450 en el hígado principalmente (Soderlund y col., 2002). Los plaguicidas químicos también causan efectos dañinos en insectos benéficos para la agricultura. Las abejas son uno de los insectos polinizadores más importantes, se ha evaluado que la dosis letal 50 de imidacloprid (neonicotinoide) es de 5 ng por abeja (Suchail y col., 2000), este insecticida es acumulado y transportado a todos los tejidos de las plantas a través del sistema vascular y puede ser ingerido por las abejas a través del néctar.

## **1.2. Manejo integrado de plagas.**

De acuerdo con la definición de la FAO, el manejo integrado de plagas (MIP) es la cuidadosa consideración de todas las técnicas disponibles para combatir las plagas, y la posterior integración de medidas apropiadas que disminuyen el desarrollo de poblaciones de plagas y mantienen el empleo de los pesticidas y otras intervenciones a niveles económicamente justificados, reduciendo al mínimo los riesgos para la salud humana y el ambiente. El MIP enfatiza el crecimiento de cultivos saludables con el menor trastorno de los agrosistemas y alienta los mecanismos naturales de control de plagas (FAO, 2016). El MIP es un programa que busca hacer sustentable la protección de los cultivos. Su objetivo no es erradicar plagas sino mantenerlas en un nivel en cual no causen daños económicos a través de las siguientes metodologías: 1) uso de pesticidas químicos con alta selectividad y bajo riesgo, 2) uso de cultivos resistentes a plagas, 3) rotación, intercalamiento y encubrimiento de cultivos, 4) métodos mecánicos para eliminación de plagas, 5) uso de productos naturales con actividad biocida, 6) control biológico con enemigos naturales y 7) monitoreo de las medidas exitosas en el control de plagas (Chandler y col., 2011).

### **1.3. Control biológico.**

El control biológico es la reducción o mitigación de plagas a través del uso de enemigos naturales denominados agentes de control biológico (ACB). Los ACB incluyen organismos parasitoides, depredadores o patógenos como bacterias, hongos, protozoarios, nematodos, virus, protozoarios, protistas (Rodríguez del Bosque, 2007). La definición de control biológico está en constante evolución por lo que algunos trabajos incluyen o excluyen el uso de compuestos bioactivos como los metabolitos producidos por estos patógenos y extractos vegetales (Glare y col. 2012). Por otra parte las plagas incluyen insectos, patógenos (bacterias y hongos), mamíferos y malezas.

El interés en el uso de ACB ha aumentado debido a los problemas generados por el uso de insecticidas químicos que incluyen problemas de salud en poblaciones expuestas (EPA, 2016), desarrollo de resistencia de las plagas a las que van dirigidos (Lai y Su, 2011) y contaminación del medio ambiente (Smalling y col., 2013).

### **1.4. Hongos entomopatógenos.**

Dentro de los ACB los hongos entomopatógenos (HE) han sido considerados tradicionalmente como factores importantes en la mortalidad de insectos. Los primeros estudios con HE fueron realizados en Italia en 1807 al estudiar las enfermedades de los gusanos de seda, Agostino Bassi demostró que el hongo *Beauveria bassiana* era el agente infeccioso causante de la enfermedad conocida como muscardina de gusanos de seda. A partir de estas observaciones se descubrieron varios hongos capaces de atacar otros insectos. Hasta principios del siglo XXI se reportó la identificación 750 especies de hongos entomopatógenos (Candas y Bulla, 2002), sin embargo la mayoría de las preparaciones comerciales están basadas en 4 géneros: *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria*. A pesar de su capacidad para matar insectos, los HE no necesariamente se encuentran en la naturaleza como parásitos obligados, se ha propuesto que pueden encontrarse como endófitos (Vega y col., 2009). Incluso los análisis genómicos comparativos señalan que los géneros de *Beauveria* y *Metarhizium* se encuentran más relacionados con endófitos y fitopatógenos, que con hongos patógenos de animales (Barelli y col., 2016). Esto incrementa el uso potencial de HE en agricultura, debido a otras ventajas que pueden proporcionar a las plantas, como agentes promotores de crecimiento y protección contra otros microbios patógenos.

Los HE infectan a sus huéspedes por penetración a través de la cutícula o por las aberturas del insecto, posteriormente pueden llevar a cabo interacciones biológicas de biotrofia, necrotrofia o hemibiotrofia. En la primer etapa se realiza la adhesión del conidio a la cutícula del insecto, la adhesión es mediada por interacciones hidrofóbicas específicas o inespecíficas entre la superficie del insecto la cual está compuesta por hidrocarburos, ácidos grasos y ceras (Ivanova y col., 2013; Muratori y col., 2008), y la superficie del conidio que tiene adhesinas (Wang y St. Leger, 2007), hidrofobinas (Zhang y col., 2011) y polisacáridos como los  $\beta$ -glucanos (Ibrahim y col., 2002). Las adhesinas han sido descritas como proteínas superficiales que se unen de forma específica a la cutícula del insecto o ligandos en las superficies de la plantas. En *M. anisopliae*, se han identificado dos adhesinas: MAD1 y MAD2, las cuales son específicas para insectos y plantas respectivamente (Wang y St. Leger, 2007). La expresión heteróloga de MAD1 en *Saccharomyces cerevisiae*, le proporciona la capacidad de adherirse a las alas de langosta y superficies plásticas. Además las adhesinas también han sido identificadas como factores de virulencia, ya que su eliminación provoca una disminución en la infectividad de este hongo a larvas de *Manduca sexta*. Una vez que el conidio se adhiere a la cutícula del insecto, ocurre la germinación y posterior formación del apresorio, la cutícula es penetrada por la combinación de la presión mecánica probablemente ejercida por la acumulación de glicerol en el apresorio como ocurre en el fitopatógeno *Magnaporthe grisea* (Jong y col., 1997) y la liberación de enzimas líticas que degradan la cutícula del insecto como proteasas, quitinasas y lipasas (Schrank y Vainstein, 2010). Después de la rotura de la epicutícula ocurre un desarrollo vegetativo de hifas hasta llegar a la hemolinfa del insecto, donde el hongo puede obtener nutrientes necesarios para su desarrollo y que al mismo tiempo afectan la homeostasis del insecto (Gillespie y col., 2000).

La diferenciación del crecimiento de hifas a cuerpos hifales en la hemolinfa es una estrategia frecuente en varios hongos entomopatógenos para evadir los mecanismos de inmunidad celular del insecto, además de la proliferación del agente patógeno en el sistema circulatorio del hospedero (Pendland y col., 1993). Los cuerpos hifales son frecuentemente llamados blastosporas y aunque son similares, los cuerpos hifales se desarrollan *in vivo* en la hemolinfa del insecto, mientras las blastosporas se producen *in vitro* bajo condiciones nutricionalmente pobres. Además se han reportado diferencias importantes en la composición química de la pared celular entre estas dos formas de crecimiento y en consecuencia su capacidad de ser reconocida por los hemocitos del insecto, ya que en las superficies de los cuerpos hifales las



lectinas no se unen de forma importante en comparación a las blastosporas. Incluso, otras estructuras como conidios aéreos y sumergidos tienen superficies donde las lectinas se unen aún de forma más fuerte que los cuerpos hifales y las blastosporas (Pendland y col., 1993; Wanchoo y col., 2009). A pesar de que el insecto posee respuestas de defensa, el HE puede evadirlas por medio de mecanismos como la producción de inmunomoduladores que suprimen los sistemas de defensa y cambios en la composición química de la superficie celular del hongo (Gillespie y col., 2000). Durante la invasión de los hongos en la hemolinfa ocurre frecuentemente la liberación de toxinas fúngicas como las destruxinas de *M. anisopliae*, que causan parálisis y flacidez en lepidópteros (Kershaw y col., 1999), o el *beauverolide* L de *B. bassiana*, que tienen un papel inmunomodulador al suprimir la fagocitosis de los hemocitos (Vilcinskis y col., 1999). La producción de toxinas no siempre está correlacionada con la infectividad de los hongos entomopatógenos, ya que la muerte del insecto puede ocurrir por otras causas como el rompimiento de la homeostasis y la inanición que son parte del mecanismo de muerte por crecimiento celular (Golo y col., 2014; Kershaw y col., 1999). Una vez agotados los nutrientes en la hemolinfa, nuevas hifas emergen hacia la cutícula del insecto e invaden el cadáver del insecto el cual adquiere la apariencia algodonosa que se observa en los cultivos sólidos y nuevos conidios son producidos (Tian y col., 2015).

La susceptibilidad del insecto hacia determinado hongo entomopatógeno es multifactorial, algunas de las características del insecto que determinan su susceptibilidad son la composición química y estructura de la epicutícula, la cual puede acelerar o frenar la germinación de los conidios, el crecimiento de hifas y la diferenciación a estructuras de infección (Wang y St. Leger, 2005), el grosor de la epicutícula, la presencia y cantidad de vellosidades que proporcionan una entrada fácil a organismos que no forman apresorios, la capacidad del hospedero de producir inhibidores de la maquinaria enzimática del patógeno, la susceptibilidad de los insectos a las toxinas e inmunomoduladores del hongo, la capacidad fagocítica de los hemocitos de los insectos (Bogués y col., 2007). Incluso los comportamientos sociales como el acicalamiento de los insectos pueden afectar la eficacia de los hongos entomopatógenos (Westhus y col., 2014). El estadio del insecto también determina la susceptibilidad a los diferentes hongos patógenos, de hecho el mismo estadio puede incrementar la mortalidad en una especie y disminuirla en otra (James y col., 2013), probablemente esto es debido a diferencias en la capacidad de adhesión de los conidios a las distintas estructuras presentes en los diferentes estadios (Tan y col., 2014).

#### **1.4.1. Hongos entomopatógenos como agentes de biocontrol.**

La primer aplicación de un HE como agente de control de plagas fue realizada en Rusia en 1888 utilizando *M. anisopliae* para controlar al gorgojo de la remolacha (*Cleonus punctiventris*) (Faria y Wraight, 2007). En el uso de HE como agentes de biocontrol, las unidades infectivas generalmente son conidios aéreos, blastosporas, o micelio. Los conidios aéreos son producidos en cultivo sólido (CSól) y son similares a los producidos naturalmente en la superficie de los cadáveres de insectos, también se consideran más eficientes como ACB que las blastosporas y micelio producido en cultivo líquido (CL) (Feng y col., 1994). Los conidios poseen superficies hidrófobas que facilitan la adhesión al huésped (Holder y col., 2007), y son más resistentes a las condiciones ambientales adversas como radiación UV y desecación (Wraight y col., 2001), probablemente debido a que los propágulos obtenidos en CL poseen paredes celulares más delgadas (Jenkins y Prior, 1993).

#### **1.5. Cultivo sólido y superficial.**

El CSól se define como el cultivo de microorganismos en soportes sólidos húmedos, ya sean en soportes que sirvan como substrato o soportes inertes (Bhargav y col., 2008). Este tipo de cultivo ha sido usado para la obtención de enzimas, biomasa y metabolitos. Posee la ventaja de presentar altas productividades, altos rendimientos, y bajos niveles de represión catabólica (Hölker y col., 2004). Se han reportado una gran cantidad de soportes, muchos de ellos residuos agroindustriales, lo cual representa una ventaja pues permiten la obtención de diversos productos a un menor costo. El cultivo superficial (CSup) puede ser visto como un modelo simplificado del CSól que se realiza en placas de agar y han sido utilizados como modelos de laboratorio del crecimiento de hongos filamentosos (Ortega-Sánchez y col., 2012). Una diferencia importante entre ambos sistemas, son los valores de la relación área superficial-volumen del soporte sólido (área específica), los cuales son mayores en el CSól respecto al CSup. Esta relación es muy importante en los sistemas de cultivo sólido ya que puede determinar la cantidad máxima de células que se pueden formar por unidad de área, o la cantidad de sustrato disponible por unidad de área superficial, y que se ha observado que es directamente proporcional al consumo de oxígeno y rendimiento de amilasas en *Aspergillus oryzae* (Rahardjo y col., 2005).

En la producción de conidios aéreos de HE, el arroz es uno de los sustratos más utilizados, este sustrato tiene ventajas como presentar un gran relación superficie/peso, propiedades de

humedad y nutricionales adecuadas (Ye y col., 2006). En este sentido, las hojuelas de avena poseen una mejor capacidad de absorción de agua sin realizar pretratamientos, mantienen la humedad a lo largo del cultivo y mayores rendimientos frente a otros sustratos (Gómez-Preciado, 2014; Jaronski y Jackson, 2012; Weber y col., 1999). En general la producción de conidios en CSól se encuentra en el orden de  $10^9$  conidios por gramo de sustrato, puede variar dependiendo de la cepa utilizada, las condiciones de cultivo y el sustrato utilizado (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Producción de conidios de los principales hongos entomopatógenos en CSól.

| Cepa                                       | Sustrato       | Rendimiento de conidios $\text{gsi}^{-1}$ | Referencia                |
|--|----------------|---|---------------------------|
| <i>B. bassiana</i>                         | Arroz          | $2.5 \times 10^9$                         | Pham y col., 2010         |
| <i>B. bassiana</i>                         | Arroz          | $2.4 \times 10^9$                         | Ye y col., 2006           |
| <i>M. anisopliae</i>                       | Arroz quebrado | $3.72 \times 10^9$                        | Kruger y col., 2014       |
| <i>Metarhizium flavoviride</i>             | Arroz          | $1.5 \times 10^9$                         | Jenkins y col., 1998      |
| <i>I. fumosorosea</i>                      | Maíz molido    | $2.1 \times 10^9$                         | Kim y col., 2010          |
| <i>I. fumosorosea</i><br>ARSEF 3302/CNRCB1 | Arroz          | $1.3 - 6.9 \times 10^9$                   | Angel-Cuapio y col., 2015 |
| <i>M. anisopliae</i>                       | Avena          | $1.2 \times 10^9$                         | Gómez-Preciado, 2014      |

A pesar de que el CSól posee numerosas ventajas respecto a los cultivos superficiales, tiene como desventaja la dificultad de la determinación de biomasa debido a que los microorganismos crecen de forma ligada al sustrato y su separación es complicada (Desgranges y col., 1991b). La estimación de la biomasa es un parámetro importante en los procesos biotecnológicos ya que cuantifica el crecimiento de microorganismos y los diferentes estadios fisiológicos del cultivo. Ambos parámetros son importantes en el sentido que pueden estar relacionados con la producción de cierto metabolito, el desempeño u optimización de la fermentación, la cosecha de células en cierta etapa de crecimiento o edad (evitando lisis celular), el seguimiento del cultivo con el fin de evitar tiempos de cultivo innecesarios o simplemente porque la aplicación de cierto estímulo debe ser llevada a cabo en cierto estado fisiológico (García-Ortiz y col., 2015; Tlecuil-Beristain y col., 2010).

Con el fin de evaluar la producción de biomasa de hongos en CSól se utilizan diversas estrategias para su estimación de forma indirecta, por ejemplo: la cuantificación de algún metabolito como quitina o ergosterol, el consumo de nutrientes, o la actividad biológica por medio de respirometría (Steudler y Bley, 2015). La tasa de consumo de oxígeno y/o la producción de CO<sub>2</sub> son las variables medidas en la respirometría. De acuerdo con Steudler y Bley (2015), la respirometría es una de las mejores estrategias para el seguimiento de la biomasa de *Trametes hirsuta* (junto a la medición de ergosterol, el conteo de núcleos celulares y las actividades lignolíticas), ya que es capaz de describir apropiadamente y de forma reproducible el crecimiento de biomasa, además a diferencia de otras estrategias puede ser automatizada y realizada en continuo. Como única desventaja, se menciona que la respirometría es útil sólo en monocultivos, ya que no es capaz de discernir el efecto de dos o más cepas presentes en la fermentación. Esta técnica se ha utilizado para el seguimiento de biomasa de *B. bassiana*, comparada con la estimación infrarroja de ergosterol, se ha mostrado que la medición de CO<sub>2</sub> es más sensible, ya que el CO<sub>2</sub> se detecta en concentraciones menores que el ergosterol (Desgranges y col., 1991a).

#### **1.6. Parámetros de calidad de los conidios.**

A pesar de que los conidios son las unidades infectivas utilizadas para el control de plagas y numerosos trabajos se enfocan en su sobreproducción, es necesario considerar las características de calidad de los conidios obtenidos ya que una mayor producción no está relacionada con una mejora en la calidad (Rangel y col., 2006; Tlecuitl-Beristain y col., 2010). Es importante que la selección de un hongo, para producir conidios a escala, considere no sólo su capacidad infectiva, sino al conjunto de características como la sobrevivencia en el hábitat, el crecimiento y características de esporulación, la estabilidad genética y la patogenicidad (Tarocco y col., 2005). La evaluación de la calidad de los conidios puede determinar el desempeño de los conidios en campo, lo cual a su vez determinará la confianza del usuario. Dentro de las pruebas de calidad que pueden determinarse se encuentran: germinación, viabilidad, pureza, tolerancia al estrés osmótico, tolerancia a térmica, ensayos de infectividad e hidrofobicidad (Jenkins y Grzywacz, 2000; Miranda-Hernández y col., 2014; Santoro y col., 2015; Tlecuitl-Beristain y col., 2010).

### **1.7. Atmosferas modificadas como potenciadores de la producción y calidad de conidios.**

El oxígeno molecular no se limita a ser un aceptor de electrones, ya que puede influenciar la diferenciación morfológica. En *Neurospora crassa*, la exposición de micelio al aire genera una acumulación de especies reactivas de oxígeno y posteriormente la diferenciación a conidios, estos dos procesos se aceleran e incrementan de forma notable tras la exposición a un flujo de una mezcla de 95% de oxígeno, e inhibidos cuando se exponen a una corriente de nitrógeno (Hansberg y col., 1993).

En *M. anisopliae* en CSup se incrementó la conidiación al aplicar pulsos con 26% de oxígeno respecto a cultivos sometidos a la atmósfera normal (21% de oxígeno), sin afectar la calidad de los conidios (Tlecuitl-Beristain y col., 2010). Este incremento es dependiente del porcentaje de oxígeno que se administra, ya que la aplicación de pulsos con 30% también muestra una mejora en la conidiación, sin embargo un porcentaje mayor de oxígeno (40% de oxígeno) no incrementa la producción de conidios respecto a la atmósfera normal. Otro factor importante es el tiempo de aplicación de los pulsos oxidantes, en *M. anisopliae* las 60 h es el mejor tiempo de aplicación para iniciar los pulsos oxidantes, ya que en este tiempo el micelio se encuentra en un estado competente para responder de forma positiva al estímulo (García-Ortiz y col., 2015). La respuesta a las atmósferas modificadas también es dependiente del tipo de cepa, de hecho dos cepas de *Isaria fumosorosea* responden de forma diferencial a la atmósfera oxidante, mientras la cepa de ARSEF 3302 incrementa su conidiación, la cepa CNRCB1 la disminuye. Sin embargo, la calidad de ambas cepas mejora de forma consistente, incrementándose la tasa de germinación, la osmotolerancia, la termotolerancia e infectividad de los conidios producidos en condiciones hiperoxidantes respecto a los obtenidos en atmósfera normal (Miranda-Hernández y col., 2014).

Estas mejoras en la producción de conidios y/o su calidad han sido principalmente estudiadas en CSup, con un medio que contiene harina de avena y peptona de carne donde se aplica este pulso cada 24 h. El efecto de los pulsos enriquecidos en oxígeno sólo se ha evaluado en CSól para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. En *B. bassiana* no se obtuvo ninguna mejora en producción de conidios respecto a la atmósfera normal, y peor aún, disminuyó la calidad de los conidios, posiblemente por un incremento en el estrés oxidante. Para *B. bassiana* los pulsos oxidantes fueron aplicados 2 veces cada 24 h (Garza-López y col., 2012). En el caso de *M. anisopliae* la

producción de conidios en CSól con pulsos oxidantes disminuyó casi un orden de magnitud respecto al tratamiento con atmósfera normal (Gómez-Preciado y col., 2014). No existe ningún reporte que indique si el tipo de cultivo y la frecuencia de aplicación del pulso afectan las respuestas de la producción de conidios o su calidad.

### **1.8. *Isaria fumosorosea*.**

El HE *I. fumosorosea* (antes conocido como *Paecilomyces fumosoroseus*) está distribuido mundialmente y es capaz de atacar a un amplio número de insectos (Hunter y col., 2011), principalmente se ha utilizado como ACB de varias especies de mosca blanca (*Bemisia tabaci*, *Bemisia argentifolii* y *Trialeurodes vaporariorum*), los cuales pertenecen al orden de los hemípteros, y lepidópteros como *Plutella xylostella*, *Spodoptera exigua* y *Spodoptera frugiperda* (Moura y col., 2013; Zimmermann, 2008). Numerosas cepas de *I. fumosorosea* se han aislado de artrópodos especialmente los pertenecientes al orden Lepidoptera, pero también de aire, agua, plantas, otros hongos y del suelo.

Como se mencionó anteriormente, la temperatura es uno de los principales factores que afectan el desempeño de los HE durante su aplicación en campo. El intervalo de crecimiento de *I. fumosorosea* es de entre 5 hasta 35°C, con un óptimo de crecimiento de 25 a 28°C (Mietkiewski y col., 1994; Vidal y col., 1997). La obtención de conidios termotolerantes es de gran interés ya que después de la cosecha de los conidios, es frecuente realizar secados con el fin de eliminar agua y mantener una vida de anaquel mayor, la cual se recomienda que sea de 12 a 18 meses, sin embargo la mayoría de productos biológicos sólo alcanzan intervalos de 6 a 12 meses (Kim y col., 2014). La radiación solar es uno de los factores abióticos que más afectan la sobrevivencia de *I. fumosorosea*, y de los HE en general, sobre todo la radiación UV-B, seguida por la radiación UV-A (Fargues y col., 1997), siendo incluso más susceptible que otros hongos como *M. anisopliae* y *B. bassiana* (Fargues y col., 1996).

Varios estudios consideran que *I. fumosorosea* es una cepa segura para uso como ACB, no existe evidencia de que sea tóxica para aves, mamíferos (incluyendo humanos), peces y anfibios, sin embargo algunos reportes controversiales han encontrado a cepas de *I. fumosorosea* en reptiles enfermos, sin embargo esto podría deberse a la incorrecta identificación del agente causante de la enfermedad, pues los estudios deducen el patógeno sólo por el color de los conidios, los cuales son frecuentemente confundidos con *Purpureocillium lilacinum* (anteriormente conocido como *Paecilomyces lilacinus*) (Luangsa-Ard

y col., 2011) el cual sí es considerado un patógeno oportunista en humanos (Zimmermann, 2008).

## **2. Justificación.**

El uso de hongos entomopatógenos presenta numerosas ventajas sobre el uso de plaguicidas químicos. El propágulo principal son conidios aéreos que se producen de forma masiva en cultivo sólido.

La selección de un hongo para su aplicación a escala industrial frecuentemente comienza con la evaluación de la producción de conidios y su calidad en cultivos superficiales. Aunque existen reportes que comparan la producción de conidios en hongos fitopatógenos entre sistemas superficiales y sólidos, los medios de cultivo no poseen la misma composición química, lo cual hace difícil una comparación apropiada entre ambos sistemas. Por estas razones es importante determinar si hay diferencias en la producción y calidad de conidios en cultivos superficiales y sólidos de hongos entomopatógenos, en medios con la misma composición química, y si los datos obtenidos en sistema superficial pueden utilizarse para estimar la producción y calidad en cultivo sólido.

Por otra parte, los pulsos de oxígeno de 26% en cultivo superficial son un método para mejorar la calidad de los conidios en *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1, incluso en la cepa ARSEF 3302 se incrementó la conidiación. Sin embargo, se desconoce si estos efectos ocurren en cultivo sólido debido a las diferencias que existen entre ambos sistemas. Esta evaluación resulta aún más relevante cuando se sabe que los pulsos de oxígeno en CSól en otras especies de hongos entomopatógenos no han mejorado la producción de conidios frente a la atmósfera normal, o en el peor de los casos disminuyen de forma importante su conidiación; siendo desconocido el(los) factor(es) detrás de las diferencias en la respuesta entre ambos sistemas.

## **3. Hipótesis.**

El tipo de cultivo (superficial o sólido) tendrá un efecto sobre los rendimientos de conidiación y la calidad de los conidios obtenidos al utilizar un medio con la misma composición química en dos cepa de *Isaria fumosorosea*.

Estas diferencias entre ambos sistemas tendrán un efecto también en la respuesta a la aplicación de pulsos de 26% de oxígeno en la producción de conidios y su calidad.



#### **4. Objetivos.**

Determinar el efecto del sistema de cultivo y la aplicación de pulsos de oxígeno en la producción y calidad de conidios de dos cepas de *I. fumosorosea*.

##### **4.1. Objetivos particulares.**

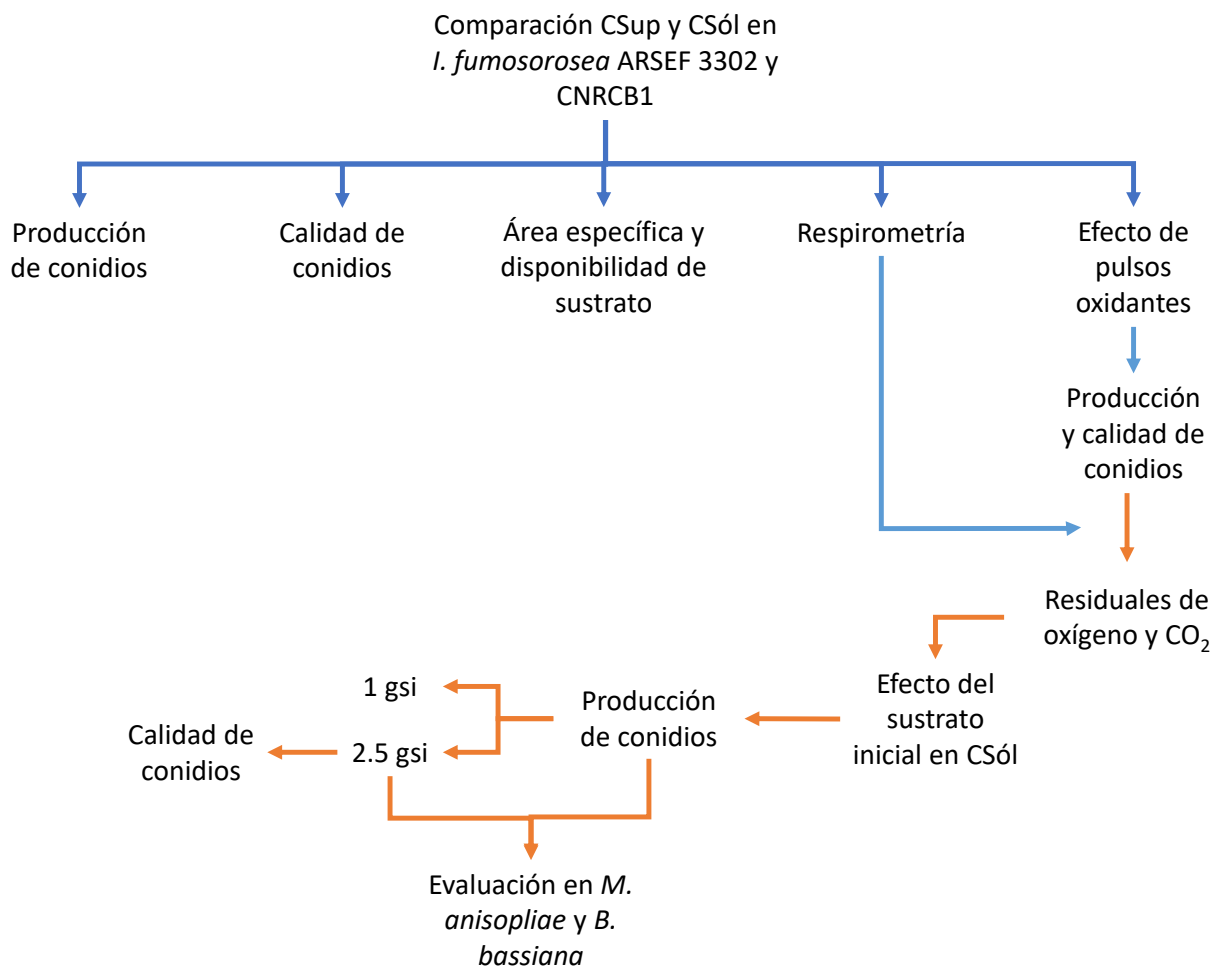
Comparar la producción de conidios en cultivo superficial y sólido de *I. fumosorosea* en atmósfera normal y atmósferas con 26% de oxígeno.

Determinar el efecto en la calidad de los conidios obtenidos en cultivo superficial y sólido en atmósfera normal y atmósferas modificadas con 26% de oxígeno.

Comparar los residuales de oxígeno y el CO<sub>2</sub> acumulado en los sistemas de cultivo donde se aplican pulsos oxidantes.

Determinar el efecto de la relación volumen de reactor-cantidad de sustrato inicial y los pulsos oxidantes en la producción de conidios.

## 5. Diagrama de estrategia experimental.



## **6. Metodología.**

### **6.1. Microorganismos.**

Las cepas empleadas fueron *I. fumosorosea* ARSEF 3302, perteneciente a la colección Agricultural Reserch Service Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures (ARSEF) Ithaca, Nueva York (cepa aislada en Michoacán de Ocampo, Mexicali, Baja California Norte, México), e *I. fumosorosea* CNRCB1 (CHE-CNRCB 305) perteneciente a la Colección de Hongos Entomopatógenos del Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) (Armería, Colima, México). La cepa *I. fumosorosea* CNRCB1 fue recientemente identificada como *Isaria javanica* en un análisis multigénico (Gallou y col., 2016). Sin embargo, con el fin de mantener homogeneidad con reportes previos y con el artículo derivado de esta tesis, el nombre se mantendrá a lo largo del documento como *I. fumosorosea* CNRCB1. Durante la revisión de esta tesis se recomendó que en futuros trabajos se haga referencia de la cepa con la especie correcta. Los inóculos experimentales fueron obtenidos sembrando un conservado de cada cepa e incubando durante 10 d a 28°C con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h, en el medio agar avena, el cual contiene harina de avena (33.3 g L<sup>-1</sup>), agar bacteriológico (15 g L<sup>-1</sup>) y peptona de carne (10 g L<sup>-1</sup>) (Tlecuitl-Beristain y col., 2010). Las suspensiones de conidios fueron obtenidas por raspado con agitador magnético con una solución de Tween 80 al 0.05%.

### **6.2. Conteo de conidios.**

Los conteos de conidios fueron realizados en cámara de Neubauer (Brand, Alemania), cargando 10 µL de la suspensión de conidios (realizando diluciones cuando fuera necesario).

### **6.3. Conservación de las cepas.**

Las cepas se sembraron en agar maltosa Sabouraud durante 10 d a 28°C con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h. Se cortaron fragmentos circulares del cultivo (0.8 cm de diámetro) y se colocaron en tubos Eppendorf con 1 mL de agua destilada estéril, los tubos se mantuvieron a 4°C hasta por 6 meses (modificado de López-Lastra y col., 2002).

#### **6.4. Estimación del área específica y disponibilidad de sustratos en los sistemas de cultivo.**

El área específica ( $\alpha$ ) se define como la superficie disponible para el crecimiento microbiano por unidad de volumen en un sistema de cultivo. Para el CSup, el área específica fue calculada midiendo los diámetros de la superficie de agar con un calibrador Vernier; y el volumen total fue considerado como 10 mL ( $10 \text{ cm}^3$ ), correspondientes a los 10 mL de medio que se agregaron en cada unidad experimental. Para el CSól, los granos de arroz fueron modelados como cilindros alargados, y las hojuelas de avena como cilindros aplanados. La longitud y diámetro de los granos de arroz fueron medidos con el mismo instrumento; de forma similar para las hojuelas de avena, la altura fue medida con calibrador Vernier y el área superficial fue estimada con el analizador Image Pro Plus (Media Cybernetics Inc., EUA). La disponibilidad de sustrato ( $\sigma$ ), de cada sistema de cultivo (CSup o CSól) se calculó dividiendo la concentración total de sustrato de los granos de arroz u hojuelas de avena ( $\text{g cm}^{-3}$ ) entre  $\alpha$  ( $\text{cm}^{-1}$ ), como lo describe Ortega-Sánchez y col., (2012), y se reporta como  $\text{g cm}^{-2}$ .

#### **6.5. Producción de conidios en cultivo superficial y sólido.**

Se realizaron cinéticas de conidiación de las cepas *I. fumosorosea* ARSEF 3302 e *I. fumosorosea* CNRCB1 en botellas serológicas de 120 mL. En el CSup se utilizaron 10 mL de medio arroz-avena el cual consistió en  $16.65 \text{ g L}^{-1}$  de harina de arroz,  $16.65 \text{ g L}^{-1}$  de harina de avena y  $10 \text{ g L}^{-1}$  de agar bacteriológico ( $0.1665$  gramos de sustarto inicial (gsi) de cada una de las dos harinas por botella, es decir  $0.333$  gsi total en cada botella), las botellas con el medio fueron esterilizadas a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min y posteriormente inoculadas con  $100 \mu\text{L}$  de una suspensión ajustada a  $3.33 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , obteniéndose un inóculo final de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ . En el CSól se utilizaron 2.5 g de arroz precocido (VerdeValle®) y 2.5 g de hojuelas de avena (1®) (5 gramos de sustrato inicial (gsi) por botella), las botellas con los granos de arroz y las hojuelas de avena se esterilizaron a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 min. Se determinó la humedad del sustrato en una termobalanza utilizando dos unidades experimentales, posteriormente se realizó la inoculación con  $500 \mu\text{L}$  de una suspensión de conidios estandarizada a  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  obteniéndose un inóculo final de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ . Finalmente se ajustó la humedad del sustrato al 40% con agua destilada estéril. Se realizó el muestreo de cada tiempo por triplicado desde las 60 hasta 348 h. Se obtuvieron los conidios añadiendo 20 mL de solución Tween 80 al 0.05% y agitando durante 10 min con agitador magnético. Con el fin de

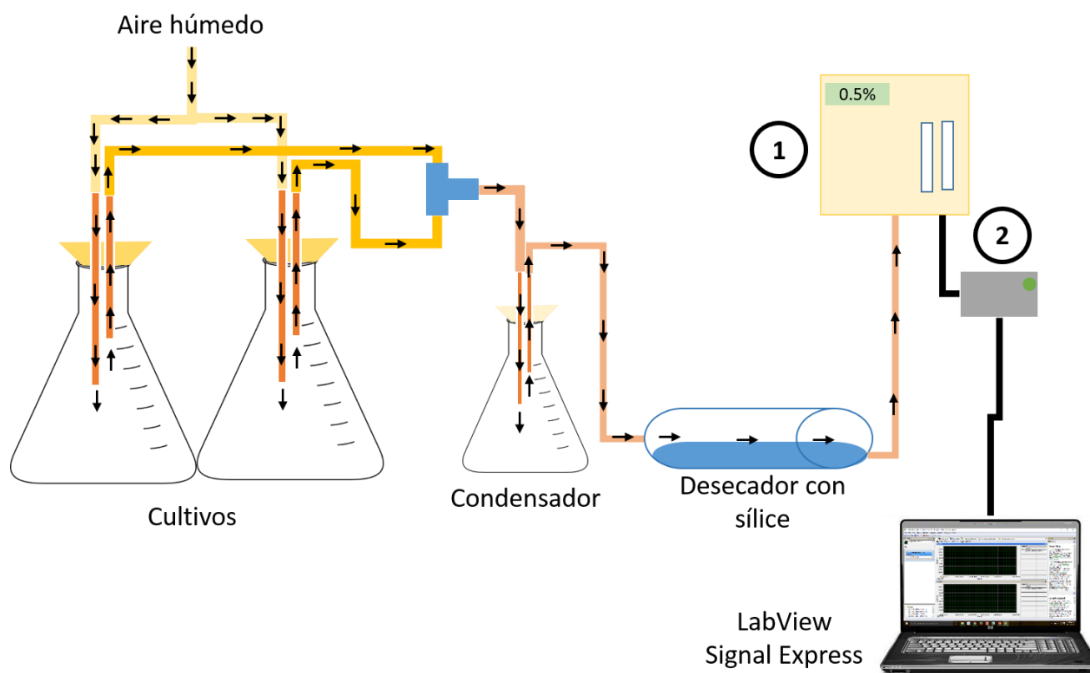
detener los detritos de avena y arroz las suspensiones de conidios fueron filtradas en cuatro capas de gasa. La producción de conidios en ambos cultivos fue expresada como conidios  $\text{gsi}^{-1}$ . Se realizó también la cuantificación de conidios en ambos sistemas de cultivo utilizando los sustratos de forma separada y utilizando la mezcla: arroz, avena y mezcla arroz-avena, respetando los gramos de sustrato inicial en cada sistema de cultivo (0.333 y 5  $\text{gsi}$  para CSup y CSól, respectivamente).

Una vez determinados los tiempo de mayor producción de conidios en ambos sistemas de cultivo se analizó el efecto de la aplicación de los pulsos de oxígeno de 26% en la conidiación de ambas cepas de *I. fumosorosea*. Para ello, se realizaron cultivos con la mezcla arroz-avena en CSup (0.333  $\text{gsi}$ ) y CSól (5  $\text{gsi}$ ). El primer pulso se aplicó a las 60 h (Miranda-Hernández y col., 2014), para ello se cambió el tapón de algodón-gasa de las botellas serológicas por uno de goma y se sellaron utilizando Parafilm. Los pulsos de oxígeno se realizaron utilizando dos agujas, una que funcionó como purga y otra que administraba el oxígeno a un flujo de  $20 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$  durante 1 min. Se realizaron dos tratamientos el primero de ellos aplicando el pulso cada 24 h (26%), y el segundo cada 12 h (26% x 2) (Garza-López y col., 2012). Se realizó el muestreo por triplicado y el conteo de conidios como se describió previamente. Se realizó también una cinética testigo sin pulsos de oxígeno y manteniendo los tapones de algodón-gasa, es decir bajo atmósfera normal (21% de oxígeno). En otros experimentos la cantidad de sustrato fue modificada en CSup a 1  $\text{gsi}$ , así como en CSól a 1 y 2.5  $\text{gsi}$ , dichas modificaciones se indican en la sección de resultados.

## **6.6 Análisis de respirometría.**

Se realizó un seguimiento de la producción de  $\text{CO}_2$  en ambos sistemas de cultivo bajo condiciones atmosféricas normales. Para ello se utilizaron 2 matraces de 500 mL en los cuales se colocó la mezcla de sustrato arroz-avena en sus diferentes formas para CSup (agar arroz-avena) y CSól (granos de arroz- hojuelas de avena). En el CSup se colocaron 40 mL de medio arroz-avena por matraz (1.332  $\text{gsi}$  por matraz) y para el CSól 20  $\text{gsi}$  por matraz de mezcla arroz-avena. De esta forma se mantuvo la relación de gramos de sustrato inicial entre CSól y CSup existente en las botellas serológicas del apartado anterior, la cual es de aproximadamente 15, y las alturas de la película de agar y el lecho sólido fueron muy similares entre ambos sistemas. Los matraces con los cultivos fueron colocados en paralelo en el sistema que se presenta en la Figura 6.1. A los matraces donde se colocó el sustrato se les

hizo pasar aire estéril húmedo a un flujo de  $50 \text{ mL min}^{-1}$ , posteriormente el flujo de aire convergente cargado con  $\text{CO}_2$  pasó a un matraz de 250 mL que funcionó como condensador, después la mezcla de aire pasó a un desecador con sílice para eliminar la humedad y este aire parcialmente seco pasó a un detector infrarrojo de  $\text{CO}_2$  (1) (ADC SB2000, CEA Instruments., Inc, EUA). El detector de  $\text{CO}_2$  estaba conectado a una tarjeta (2) (National Instruments NI USB-9162) que registraba el cambio de corriente cada 10 segundos y que a su vez estaba conectada en línea a una computadora que ejecutaba el software LabVIEW SignalExpress 2009 (National Instruments, EUA).



**Figura 6.1.** Sistema de medición de  $\text{CO}_2$  en paralelo. 1) Detector infrarrojo y 2) tarjeta de registro de corriente.

Los datos obtenidos como unidades de corriente en Amperes fueron transformados a porcentaje de  $\text{CO}_2$ , mediante la calibración del equipo con tres diferentes porcentajes de una mezcla conocida de  $\text{CO}_2$  (0, 2.9 y 5.98%) balanceado con  $\text{N}_2$ . Se expresó el porcentaje de  $\text{CO}_2$  en mg de  $\text{CO}_2$  por h por gsi, utilizando la ecuación de la ley de los gases y asumiendo que la presión es de 0.769 atm. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo logístico:

$$Re(t) = \frac{Re_{max}}{[1 + \frac{Re_{max} - Re_i}{Re_i} e^{-\mu t}]}$$

Donde  $Re$  es la respiración al tiempo  $t$ ,  $Re_{max}$  la respiración máxima ( $\text{mg de CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gsi}^{-1}$ ),  $Re_i$  la respiración inicial ( $\text{mg de CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gsi}^{-1}$ ) y  $\mu$  la tasa máxima de respiración ( $\text{h}^{-1}$ ).

### **6.7. Cuantificación de oxígeno y CO<sub>2</sub> en tratamientos con pulsos oxidantes.**

Se prepararon botellas serológicas como se mencionó anteriormente, a las 60 h se cambió el tapón de algodón por tapón de goma y se administraron los pulsos de oxígeno de 26% y 26% x 2; 24 h después del primer pulso (84 h de incubación), se analizó el contenido de oxígeno y CO<sub>2</sub> de los cultivos, antes de aplicar el siguiente pulso oxidante, para ello se tomaron con una aguja de precisión analítica 0.1 mL de la atmósfera de cada botella y se inyectaron a un cromatógrafo de gases Gow-Mac (Gow-Mac 580, Pensilvania, EUA). Las condiciones de corrida fueron temperatura de columna, detector e inyector: 40, 115 y 50 °C, respectivamente; y el detector de corriente a 125 mV, utilizando helio como gas acarreador.

### **6.8. Parámetros de calidad de los conidios.**

Para las pruebas de calidad se utilizaron conidios obtenidos en CSup y CSól a las 180 y 300 h para la cepa ARSEF 3302, y 156 y 252 h para la cepa CNRCB1.

#### **6.8.1. Germinación.**

Se analizó la germinación de los conidios de ambos sistemas de cultivo, utilizando los tratamientos 21%, 26% y 26% x 2. Los conidios cosechados fueron estandarizados a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y 30  $\mu\text{L}$  fueron colocados en agar agua (1.5%) (Samuels y col., 1989) y distribuidos homogéneamente, después de 10 h se cortó una sección del agar agua y se observó al microscopio, se contaron 100 conidios y se consideró el conidio germinado si la longitud del túbulo germinal era mayor a la longitud del conidio (Ibrahim y col., 2002). Para el sistema de CSól con 2.5  $\text{gsi}$  se evaluó la germinación de los conidios a las 8 h de incubación.

### 6.8.2. Viabilidad.

Se obtuvieron conidios de los tiempos de mayor producción de conidios en ambos sistemas de cultivo y con los tratamientos 21, 26 y 26% x 2. Se ajustó una suspensión a  $1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y 30  $\mu\text{L}$  de la suspensión fueron añadidos a cajas de Petri que contenían medio maltosa-Sabouraud adicionado con 0.5 g  $\text{L}^{-1}$  de desoxicolato de sodio y se incubaron a 28°C (Montesinos-Matías y col., 2011). Después de 72 h, se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) y el porcentaje de viabilidad fue determinado asumiendo 300 UFC como el 100%.

### 6.8.3. Infectividad

Las pruebas de infectividad de conidios fueron realizadas utilizando larvas de *Galleria mellonella*, las larvas fueron infectadas por inmersión durante 5 segundos en una suspensión de conidios (Fang y col., 2009), y después colocadas en cajas de Petri, cada placa de Petri contenía 12 larvas, que fueron alimentadas cada 2 d con aproximadamente 200 mg de alimento comercial para gusano de cera. Se utilizó un control negativo que consistía en larvas que fueron sumergidas en una solución estéril 0.05% de Tween 80. Las placas de Petri fueron colocadas en un contenedor transparente que contenía papel filtro húmedo y fueron incubadas a 28°C con fotoperiodo 12:12 h luz-oscuridad, la humedad relativa dentro del contenedor fue de 85%. Se utilizaron cuatro muestras independientes para cada tratamiento. El porcentaje de sobrevivencia fue registrado diariamente por 12 d colocando las larvas muertas en placas de Petri para corroborar la micosis de los insectos. Los datos experimentales se ajustaron al modelo de decaimiento exponencial propuesto por Rodríguez-Gómez y col. (2009):

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

$$Y = 100 \quad \text{si} \quad 0 \leq t \leq t_0$$

donde  $Y$  es el porcentaje de sobrevivencia en el tiempo  $t$ ;  $k$  es la tasa específica de muerte ( $\text{d}^{-1}$ );  $t_0$  es el tiempo de la primera muerte (d) y  $S$  es la sobrevivencia final (%). El tiempo de sobrevivencia 50 ( $ST_{50}$ ) también fue calculado. Para la infectividad con conidios cosechados del sistema de CSup con 0.333 gsi y el CSól con 5 gsi se utilizó una suspensión de conidios de  $5 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , mientras que para los sistemas de CSól con 2.5 gsi se utilizó una suspensión de  $2.5 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . Esta disminución en la concentración de la suspensión



de conidios fue debido a que con  $5 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ , no se encontraron diferencias consistentes entre los tratamientos.

#### **6.8.4. Termotolerancia.**

Se realizó la cosecha de conidios en CSól utilizando los sistemas con 2.5 gsi evaluando los tratamientos de atmósfera normal y con pulsos de 26% y 26% x 2. Para ello se estandarizó una suspensión de conidios con  $1 \times 10^4$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y se hicieron alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión en tubos Eppendorf, los tubos fueron colocados en un Thermomixer (Eppendorf, EUA). Se analizó la termotolerancia de los conidios a las 0, 1, 2, 4, 6 y 8 h de incubación a  $40^\circ\text{C}$ , para ello se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de la suspensión de conidios y se sembraron en cajas de Petri que contenían medio maltosa-Sabouraud adicionado con  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  de desoxicolato de sodio y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$ . Después de 72 h se realizó el conteo de UFC, expresándose el porcentaje de sobrevivencia. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo de decaimiento exponencial (Miranda-Hernández y col., 2014)

$$S = S_0 e^{-(kt)}$$

Donde  $S$  es la sobrevivencia de los conidios al tiempo  $t$ ,  $S_0$  es el porcentaje de sobrevivencia inicial,  $k$  la tasa específica de decaimiento ( $\text{h}^{-1}$ ) y  $t$  es el tiempo (h). Utilizando el modelo se calculó y reportó como variable de respuesta el  $\text{TS}_{50}$  definido como el tiempo de incubación necesario donde se obtiene el 50% de sobrevivencia de conidios incubados a  $40^\circ\text{C}$ .

#### **6.9. Análisis estadístico.**

Los datos experimentales obtenidos se compararon utilizando pruebas de  $t$  de Student que generalmente se utilizó para comparar diferentes variables entre CSup y CSól; mientras que el análisis de varianza con prueba de Tukey se utilizó la mayoría de las veces para comparar tratamientos oxidantes y el control atmósfera normal dentro de un solo sistema de cultivo. Para ambos tipos de análisis el valor de significancia  $\alpha$  fue de 0.05. Los análisis estadísticos y ajustes al modelo logístico y de decaimiento exponencial fueron realizados utilizando el programa SPSS 18.0. Para la comparación de los parámetros obtenidos en los modelos se utilizó el programa SigmaPlot 12.5, a excepción de los ajustes de respirometría.

## 7. Resultados.

### 7.1. Determinación del área específica y disponibilidad de sustratos de CSup y CSól.

Se observaron diferencias en el área específica ( $\alpha$ ) y disponibilidad de sustrato ( $\sigma$ ) entre los sistemas de CSup y CSól. Para el CSup (0.333 gsi o 33.3 g L<sup>-1</sup> de harinas de arroz-avena), el agar avena-arroz tiene un  $\alpha$  de 1.7 cm<sup>-1</sup>, mientras que los granos de arroz y avena, el valor de  $\alpha$  obtenido es de 22.5 y 22.4 cm<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabla 7.1). La disponibilidad de sustrato ( $\sigma$ ) ha sido propuesta para normalizar comparaciones entre soportes sólidos (Ortega-Sánchez y col., 2012), el valor de  $\sigma$  para el CSup fue menor en comparación al obtenido para los granos de arroz y las hojuelas de avena.

Estos parámetros ponen en evidencia las diferencias intrínsecas entre ambos sistemas de cultivo, por lo que no deben ser considerados similares, y mucho menos tratar de inferir la producción de conidios en CSól a partir de resultados en CSup. Por ejemplo, para que el CSup pudiera ser comparable en términos de  $\alpha$ , la altura del bloque circular de agar tendría que ser de 0.044 cm (manteniendo el área superficial constante), en comparación a los 0.57 cm en que consistieron los experimentos realizados. Esto resulta complicado debido a la posibilidad de manipular y/o mantener el bloque de agar sin perder humedad. Otra forma de igualarlos en función de  $\alpha$ , sería modificando el área superficial (manteniendo el volumen del agar constante), sin embargo sería necesario incrementar el área 13 veces respecto al área obtenida en el agar en las botellas serológicas utilizadas.

Por otra parte, para una comparación correcta basándose en  $\sigma$ , el CSup debería contener de 70 a 99 g L<sup>-1</sup> de harinas, para ser comparable al CSól. Está estandarización sí fue realizada, aunque no de forma intencional, cuando se utilizó el CSup con 1 gsi (0.1 g cm<sup>-3</sup>) (Figura 7.10 y 7.11). Sin embargo, la producción de conidios en CSup fue mayor respecto al CSól, estos resultados serán explicados y discutidos más adelante.

**Tabla 7.1.** Área específica ( $\alpha$ ) y disponibilidad de sustrato ( $\sigma$ ) en CSup y CSól.

| Parámetro                      | Sistema de cultivo                |                 |                   |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------|
|                                | CSup<br>(33.3 g L <sup>-1</sup> ) | CSól            |                   |
|                                |                                   | Granos de arroz | Hojuelas de avena |
| $\alpha$ (cm <sup>-1</sup> )   | 1.70 ± 0.01                       | 22.50 ± 1.99    | 22.40 ± 3.73      |
| $\sigma$ (g cm <sup>-2</sup> ) | 0.019 ± 0.001                     | 0.040 ± 0.003   | 0.057 ± 0.010     |

## 7.2. Producción de conidios en sistema de CSup y CSól de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1.

Con el fin de comparar la producción de conidios en CSup y CSól, se realizaron cinéticas de producción de conidios bajo atmósfera normal para las dos cepas de *I. fumosorosea* (Figura 7.1). Para ambas cepas, el CSup mostró una mayor producción de conidios comparada con el CSól, en términos de la cantidad de sustrato inicial. El tiempo de máxima producción de conidios para la cepa ARSEF 3302 fue a las 180 h ( $1.6 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) y 300 h ( $1.02 \times 10^{10}$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) para el CSól y CSup, respectivamente, esto representa una producción 6.3 veces mayor en el sistema superficial respecto al sólido. La cepa CNRCB1 alcanza la mayor producción de conidios a las 156 h ( $2.57 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) y las 252 h ( $1.68 \times 10^{10}$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) para el CSól y CSup, respectivamente, esto representa una producción 6.5 veces mayor en el CSup respecto al CSól. Debido a la diferencia de tiempos en que se alcanza la mayor producción de conidios, el efecto de los pulsos de oxígeno sobre la producción, germinación y viabilidad de conidios de la cepa ARSEF 3302 fueron determinadas a las 180 y 300 h para ambos sistemas de cultivo, y a las 156 y 252 h para la cepa CNRCB1.

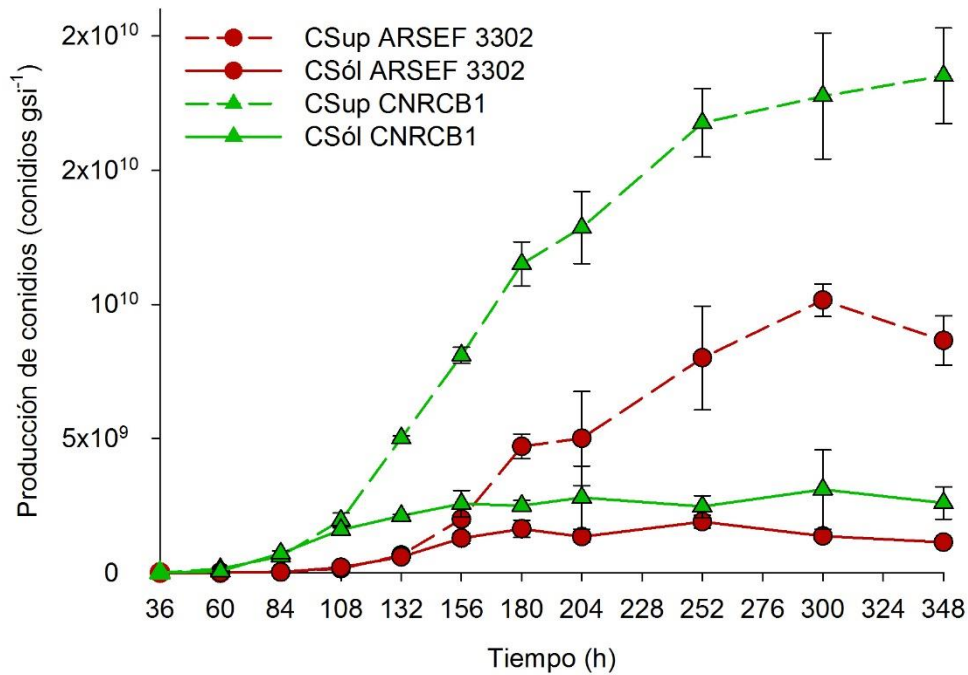
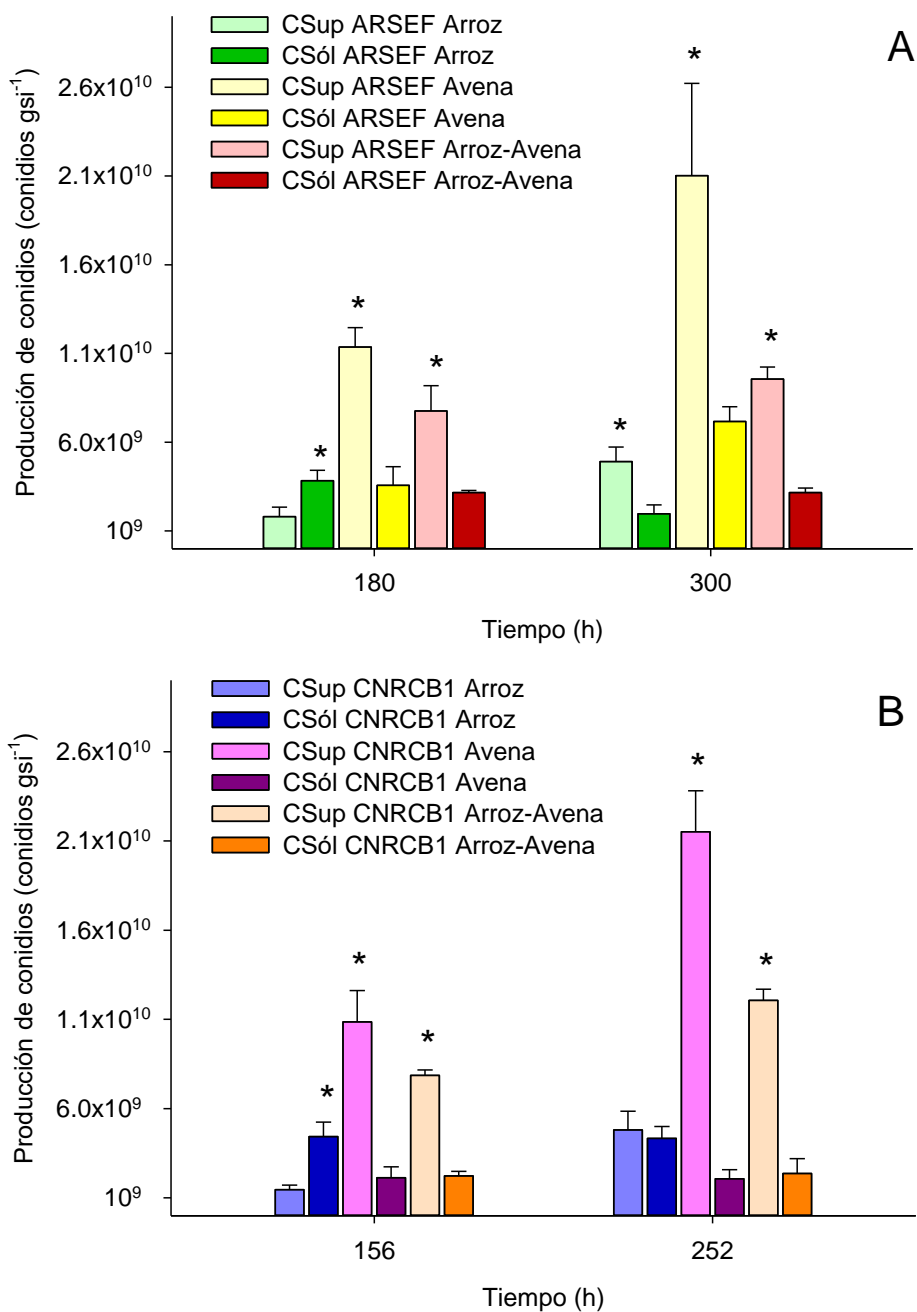


Figura 7.1. Producción de conidios en cultivo superficial (línea punteada) y sólido (línea sólida) de las cepas *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1 utilizando la mezcla arroz-avena.

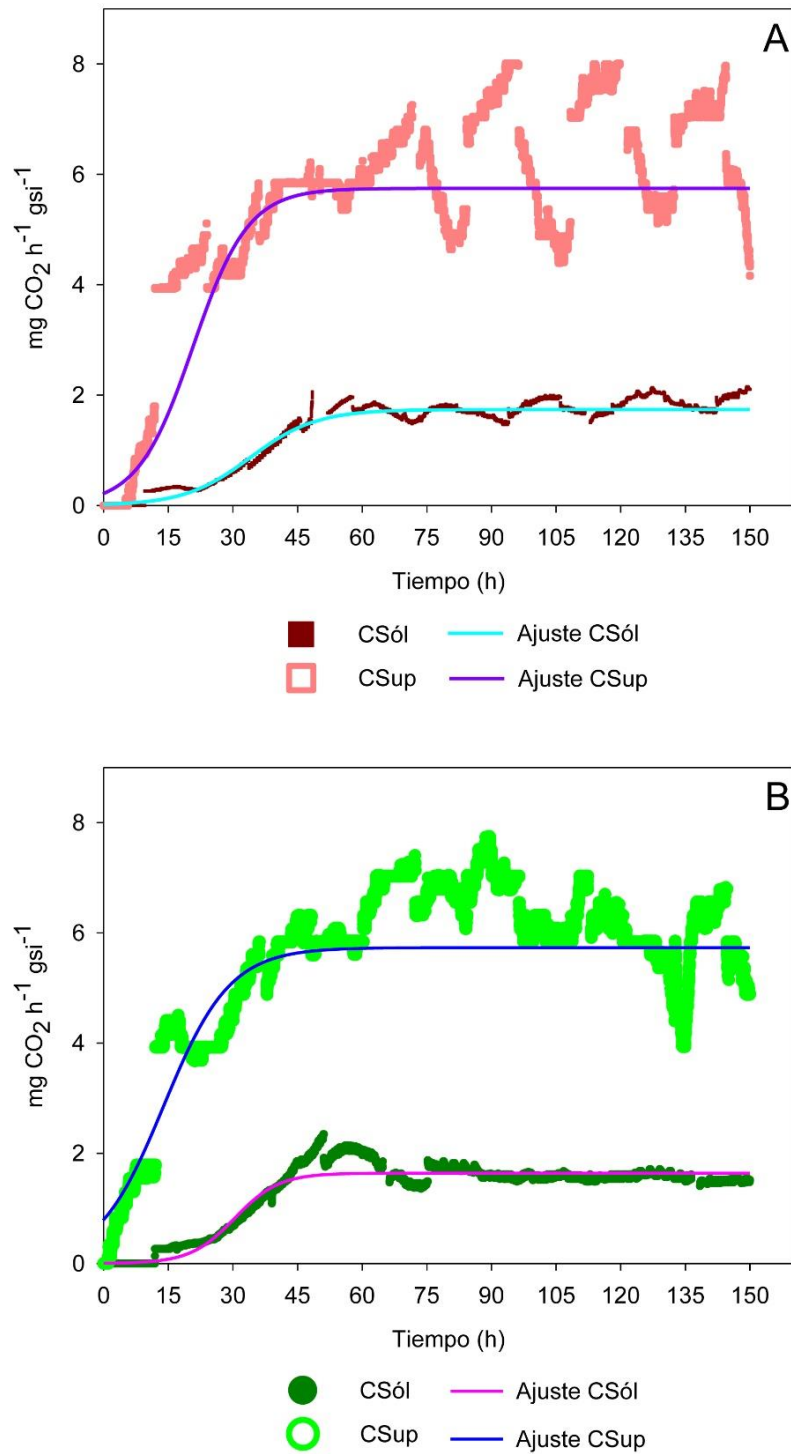
Se analizaron las producciones de conidios en ambos sistemas de cultivo con los sustratos utilizados anteriormente, pero de manera separada para determinar si el tipo de sustrato y su morfología, es decir la presencia o ausencia de pared de salvado en la avena, tenían un efecto sobre la producción de conidios (Figura 7.2). Para la cepa ARSEF 3302 (Figura 7.2A) se obtuvieron mayores producciones en CSup (0.333 gsi), para todos los sustratos respecto al CSól (5 gsi), con excepción del arroz a las 180 h de cultivo. Sin embargo, a las 300 h la producción de conidios fue mayor en el CSup para este sustrato en comparación con el CSól. La cepa CNRCB1 (Figura 7.2B) mostró un comportamiento similar, siendo en general mejor el CSup para la producción de conidios respecto a los sustrato en CSól, a excepción del arroz que a las 156 h fue mejor en CSól y a las 252 h no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ambos sistemas de cultivo. Para ambas cepas el mejor sustrato para la producción de conidios fue la avena en sistema de CSup.



**Figura 7.2.** Producción de conidios de *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1 en CSup y CSól en arroz, avena y mezcla arroz-avena. Los asteriscos representan diferencias significativas en prueba de *t* de Student ( $P < 0.05$ ).

### 7.3. Análisis de respirometría de CSup y CSól de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1.

Debido a las diferencias de producción de conidios entre ambos sistemas utilizando como la mezcla arroz-avena (Figura 7.1), probablemente por la presencia del salvado de los sustratos y su asimilación, se decidió hacer una determinación indirecta de la medición de la biomasa a través de la medición del CO<sub>2</sub> producido en ambos sistemas de cultivo utilizando la mezcla arroz-avena (Figura 7.3). En el caso de la cepa ARSEF 3302 se obtuvieron valores de respiración máxima ( $Re_{max}$ ) de 5.74 y 1.73 mg de CO<sub>2</sub> g<sub>si</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para CSup y CSól, respectivamente (Tabla 7.2). Para la cepa CNRCB1 los resultados fueron similares obteniéndose valores de  $Re_{max}$  de 5.73 y 1.64 mg de CO<sub>2</sub> g<sub>si</sub><sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para CSup y CSól, respectivamente. Para ambas cepas la mayor producción de CO<sub>2</sub> fue en CSup (33.3 g L<sup>-1</sup>), siendo hasta 3.3 veces mayor en comparación al CSól, ambos sistemas utilizando la mezcla arroz-avena. En cuanto a la tasa específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $k$ ) no se obtuvieron diferencias importantes entre sistemas de cultivo. Estos resultados señalan que el rendimiento de biomasa por g<sub>si</sub> es mayor en CSup debido a una mayor  $Re_{max}$ , confirmando la hipótesis de que los sustratos son mejor aprovechados debido a la molienda de los mismos y a la morfología final (ausencia o presencia de pared de salvado), en cada sistema de cultivo, y que finalmente esto explica la mayor producción de conidios en CSup.



**Figura 7.3.** Respirometría de *I. fumosorosea*. A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1 en CSup y CSól utilizando la mezcla arroz-avena. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo de logístico. El valor  $R^2$  mínimo obtenido fue de 0.96.

**Tabla 7.2.** Parámetros cinéticos de producción de CO<sub>2</sub> en CSup y CSól de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1. El sustrato utilizado en ambos sistemas fue la mezcla arroz-avena.

| Cepa       | Sistema de cultivo | Re <sub>max</sub> <sup>§</sup><br>(mg CO <sub>2</sub> gsi <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) | k (h <sup>-1</sup> ) <sup>§§</sup> |
|------------|--------------------|---|------------------------------------|
| ARSEF 3302 | CSup               | 5.74±0.003  | 0.156±0.008                        |
|            | CSól               | 1.73±0.001  | 0.131±0.001                        |
| CNRCB1     | CSup               | 5.73±0.003  | 0.131±0.001                        |
|            | CSól               | 1.64±0.001  | 0.194±0.001                        |

<sup>§</sup>Tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub>

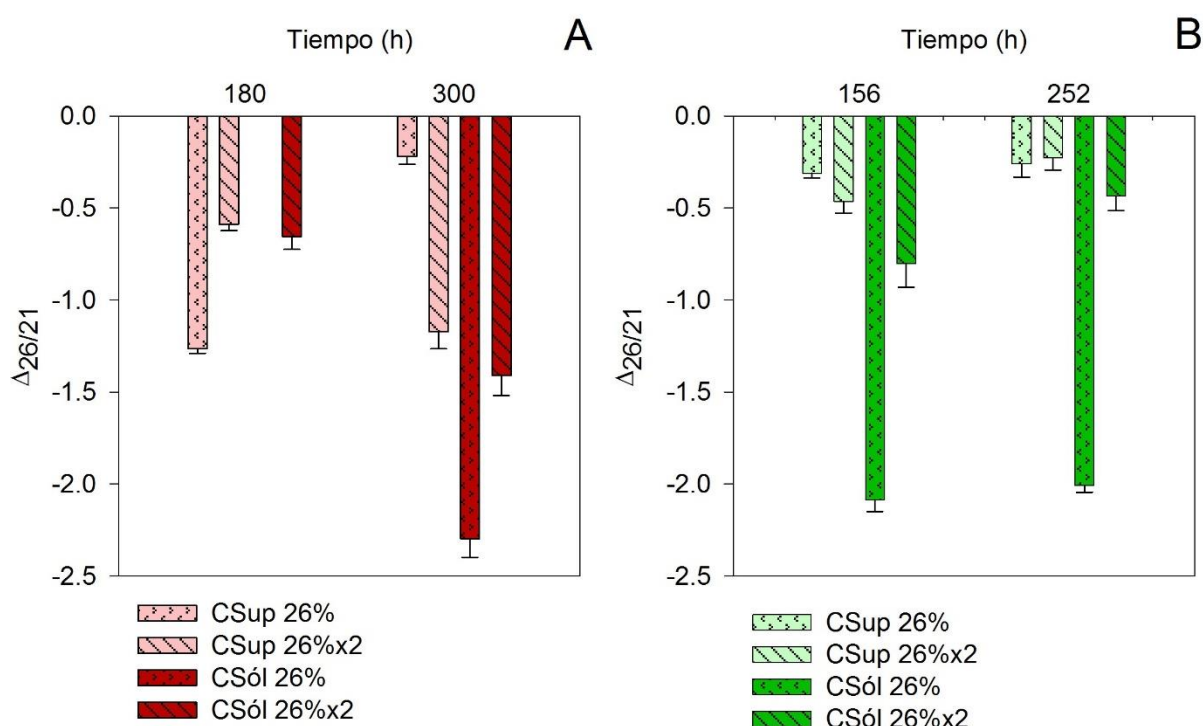
<sup>§§</sup>Tasa específica de producción de CO<sub>2</sub>

#### 7.4. Efecto de las atmósferas oxidantes en la producción de conidios en CSup y CSól de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1.

Se evaluó el efecto de los pulsos de oxígeno sobre la producción de conidios de ambas cepas en CSup y CSól, utilizando sólo la mezcla arroz-avena. En esta primera evaluación, las botellas serológicas contenían 0.333 y 5 gsi para los sistemas de CSup y CSól, respectivamente. Los pulsos de oxígeno fueron aplicados desde las 60 h, y el efecto en la producción de conidios fue reportado como un nueva variable definida como sensibilidad  $\Delta_{26/21}$ , la cual es el logaritmo de la relación de conidios producidos en los tratamientos con atmósfera oxidante (26% o 26% x 2) y el tratamiento con atmósfera normal (21%). La aplicación de pulsos independientemente del sistema de cultivo y cepa provocó una disminución en la producción de conidios (Figura 7.4). La mayor disminución de conidios fue observada en CSól, siendo de hasta 2 órdenes de magnitud menores en comparación a los CSup. Para la cepa ARSEF 3302 (Figura 7.4A) en CSup, la sensibilidad a las 180 h fue de -1.26 y disminuyó a -0.21 a las 300 h, por el contrario la aplicación del pulso 26% x 2 incrementó la sensibilidad conforme pasó el tiempo, obteniéndose valores de -0.58 y -1.17 a las 180 y 300 h, respectivamente. En el CSól de la cepa ARSEF 3302 con el tratamiento 26%, a las 180 h, no se encontraron conidios; mientras

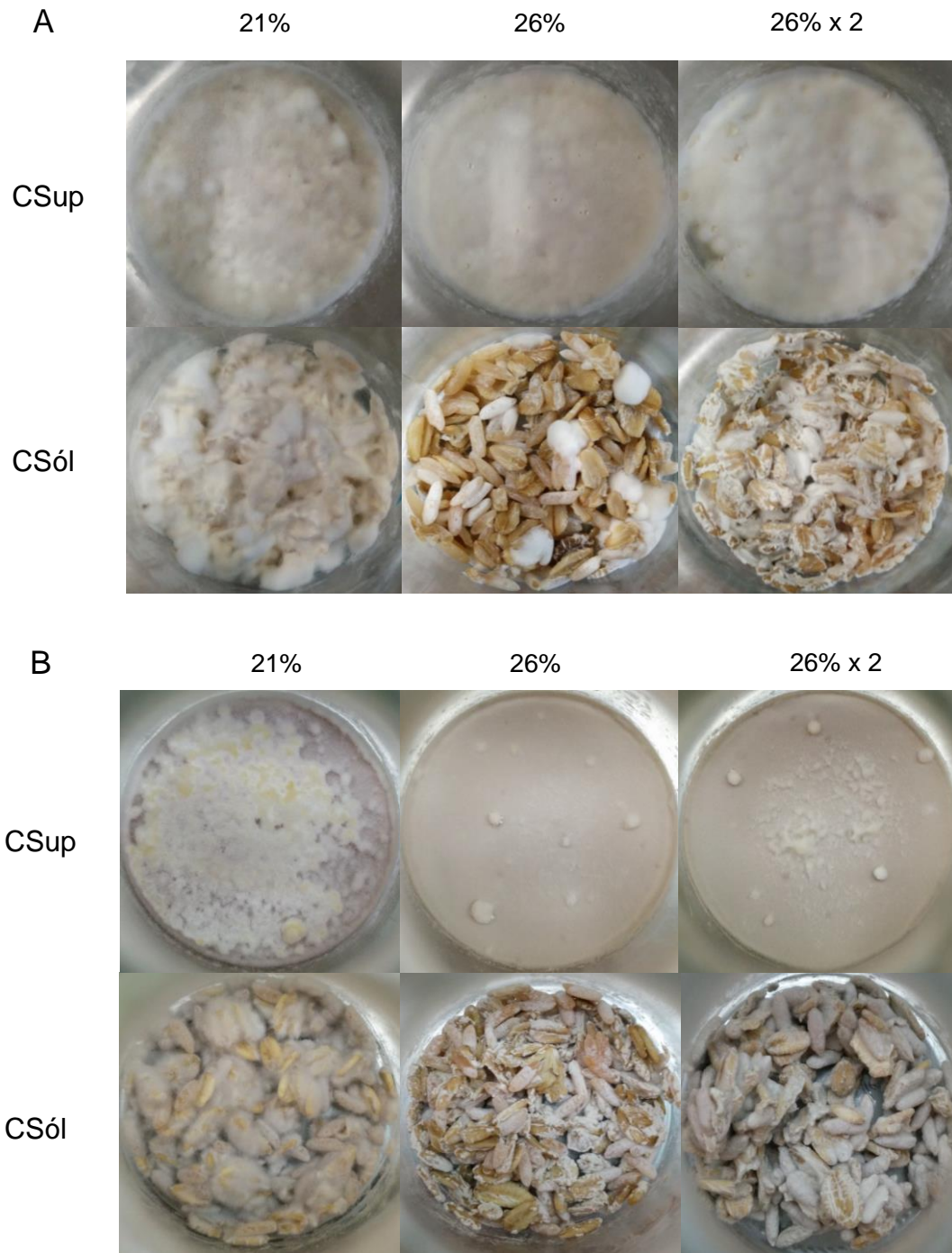


que la sensibilidad a las 300 h fue de -2.29. Cuando se aplicó el pulso 26% x 2, las sensibilidades fueron de -0.65 y -1.41 a las 180 y 300 h, respectivamente. En el caso de la cepa CNRCB1 (Figura 7.4B) en CSup, la aplicación del pulso 26% generó una sensibilidad de -0.31 a las 156 h, y que disminuyó a -0.25 a las 252 h, de forma similar a la cepa ARSEF 3302; mientras que el pulso 26% x 2 pasó de -0.46 a -0.22, en contraste a la cepa ARSEF 3302 la cual incrementa su sensibilidad cuando se aplica el doble pulso. En el caso del CSól, la aplicación del pulso 26% mostró una sensibilidad de -2.08 que disminuyó a -2.00 de las 156 a las 252 h. En el caso del doble pulso las sensibilidades fueron de -0.80 y -0.43 para 156 y 252 h, respectivamente.



**Figura 7.4.** Sensibilidad  $\Delta_{26/21}$  en la producción de conidios a los pulsos oxidantes en cultivo superficial y sólido, de las cepas *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1. No se detectaron conidios en la cepa ARSEF 3302 a las 180 h en CSól para el tratamiento 26%. En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena, el CSup contenía 0.333 gsi por botella y el CSól 5 gsi por botella.

La disminución de la producción en CSól cuando se aplicaron los tratamientos oxidantes estuvo relacionada con una menor invasión del sustrato por parte de las cepas de *I. fumosorosea* durante los pulsos oxidantes en comparación a los tratamientos con atmósfera normal (Figura 7.5). Sin embargo para ambas cepas se observó que para los CSól expuestos al tratamiento con 26% de oxígeno, la invasión del sustrato fue más pobre en comparación al tratamiento 26% x 2. Los CSup no mostraron una diferencia en cuanto a la capacidad de invadir el agar, aunque sí existen diferencias en la morfología de crecimiento entre el tratamiento con atmósfera normal y los tratamientos con pulsos de oxígeno, siendo más notable en la cepa CNRCB1 (Figura 7.5B).



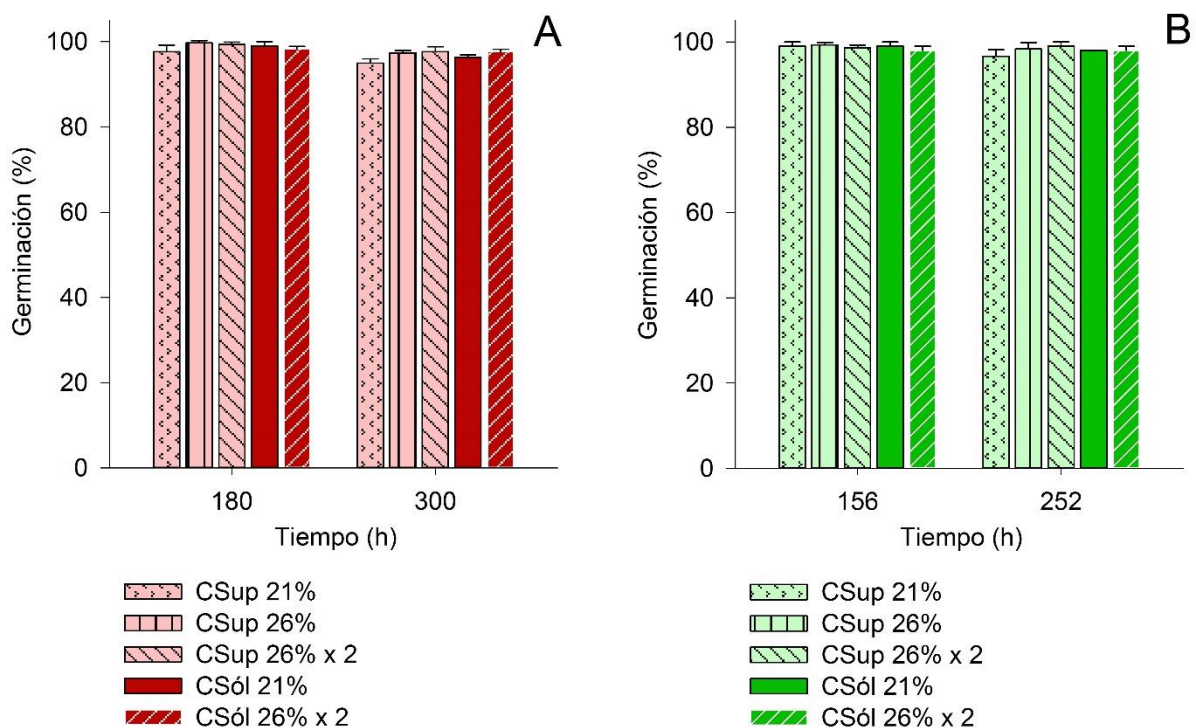
**Figura 7.5.** Morfología de crecimiento de *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 (300 h) y B) CNRCB1 (256 h) en CSup y CSól, con los tratamientos 21%, 26% y 26% x 2. En ambos sistemas de

cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena, el CSup contenía 0.333 gsi por botella y el CSól 5 gsi por botella.

## 7.5. Efecto del tipo de cultivo y los pulsos oxidantes en la calidad de conidios de *I. fumosorosea*.

### 7.5.1. Germinación.

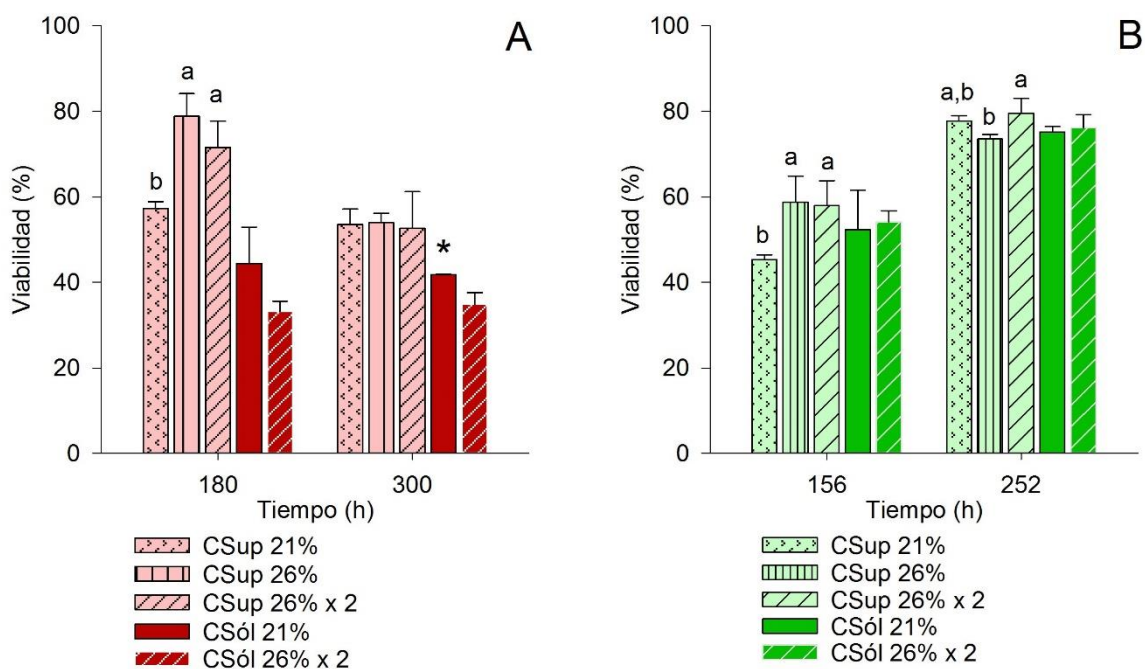
El porcentaje de germinación para la cepa ARSEF 3302 fue evaluado con conidios obtenidos a las 180 y 300 h para ambos sistemas de cultivo y con los pulsos de oxígeno (Figura 7.6). Para todos los tratamientos se observaron germinaciones de 95 a 99% sin encontrarse diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre tipo de cultivo, tratamientos oxidantes y tiempo. El efecto del pulso 26% no pudo ser determinado en CSól debido a los problemas con residuos en las suspensiones de conidios.



**Figura 7.6.** Germinación de los conidios de *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1 obtenidos en CSup y CSól utilizando la mezcla arroz-avena. El CSup contenía 0.333 gsi y el CSól 5 gsi por botella.

### 7.5.2. Viabilidad.

La viabilidad de los conidios de la cepa ARSEF 3302 fue evaluada a las 180 y 300 h para los dos sistemas de cultivo (Figura 7.7A). En el primer tiempo de evaluación no se observaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en la viabilidad de los conidios obtenidos en CSup y CSól. A las 300 h se observó una mayor viabilidad en los conidios cosechados en CSup, respecto a los obtenidos en CSól, sin embargo la viabilidad se mantuvo constante en los dos sistemas entre las 180 y 300 h. Mientras que la cepa CNRCB1 no mostró diferencias en la viabilidad de los conidios obtenidos en CSup y CSól, en ninguno de los tiempos evaluados (Figura 7.7B). Para la cepa ARSEF 3302 en CSup a las 180 h, la viabilidad de los conidios obtenidos en condiciones de atmósfera normal fue de 57.3%, mientras que para los pulsos 26% y 26% x 2 fue de 78.8 y 71.5%, respectivamente; esto representó un incremento en la viabilidad de los conidios de hasta 37% respecto al tratamiento 21%, no existiendo diferencia estadística entre los dos tratamientos oxidantes. A las 300 h no se encontraron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre el tratamiento 21% y los tratamientos con pulsos de oxígeno. El CSól no mostró diferencias en la viabilidad de los conidios de la cepa ARSEF 3302 a las 180 h entre el tratamiento con atmósfera normal y el tratamiento 26% x 2, obteniéndose viabilidades de 44.4 y 32.2%, respectivamente. Sin embargo a las 300 h la viabilidad en el tratamiento con atmósfera normal (41.8%) fue mayor a la del tratamiento 26% x 2 (34.9%). Los porcentajes de viabilidad no difirieron con respecto al tiempo entre las 180 y 300 h para el mismo tratamiento. Para la cepa CNRCB1 se obtuvieron comportamientos similares (Figura 7.7B), en los CSup a las 156 h se obtuvieron viabilidades de 45.3, 58.7 y 57.9% para los tratamientos 21%, 26% y 26% x 2, respectivamente, lo cual representa un incremento de hasta 29% en los tratamientos con pulsos oxidantes respecto al tratamiento con atmósfera normal, lo cual fue consistente con lo observado para la cepa ARSEF 3302. A las 252 h, este efecto positivo por parte de los pulsos oxidantes en la viabilidad no fue observado, obteniéndose valores similares en los 3 tratamientos; sin embargo una diferencia importante entre ambas cepas fue el incremento de la viabilidad a las 252 h con respecto a los valores obtenidos a las 156 h (estos datos fueron consistentes en el CSól), lo cual podría representar una ventaja en la cepa CNRCB1 con respecto a la cepa ARSEF 3302. Los CSól de la cepa CNRCB1 no mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos 21% y 26% x 2 en ninguno de los tiempos evaluados.



**Figura 7.7.** Viabilidad de los conidios de *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1 en CSup y CSól. Letras minúsculas distintas representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos en CSup. El asterisco representa diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos en CSól. En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena, el CSup contenía 0.333 gsi por botella y el CSól 5 gsi por botella.

### 7.5.3. Infectividad.

La infectividad de los conidios fue evaluada en ambos sistemas de cultivo y con modificaciones de su atmósfera. Los datos experimentales fueron ajustados al modelo de decaimiento exponencial propuesto por Rodríguez-Gómez y col. (2009), obteniéndose los parámetros tiempo de inicio de muerte ( $t_0$ ), tasa específica de muerte ( $k$ ), el tiempo de sobrevivencia 50 ( $TS_{50}$ ) y la sobrevivencia final ( $S$ ). Para la cepa ARSEF 3302 (Tabla 7.3) a las 180 h se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en CSup y CSól en el  $t_0$  y en  $k$ , siendo el primer parámetro menor en el CSup y el segundo mayor en CSól; a las 300 h se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos sistemas en los parámetros  $k$  y  $TS_{50}$ , siendo ambos mejores en CSup. En cuanto a los tratamientos con pulsos de oxígeno, en CSup a las 180 h sólo se observaron diferencias en  $k$ , siendo mayor en el tratamiento con atmósfera normal en comparación a los dos tratamientos con pulsos oxidantes, mismos que no difirieron

entre sí; a las 300 h se encontró el mismo comportamiento en  $k$ , siendo mayor en el tratamiento con atmósfera normal, sin embargo, también se encontraron diferencias en el  $TS_{50}$ , siendo mayor en el tratamiento 26% en comparación a 21% y 26% x 2, los cuales no difirieron significativamente entre sí ( $P>0.05$ ). Para los tratamientos 21 y 26% x 2 en CSól, a las 180 h se encontraron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en  $t_0$  siendo menores para el tratamiento oxidante, respecto a la atmósfera normal; a las 300 h  $k$  fue mayor en el tratamiento con atmósfera normal en comparación al tratamiento 26% x 2.

Para la cepa CNRCB1 (Tabla 7.4) en CSup y CSól a las 156 h se encontraron diferencias significativas ( $P<0.05$ ) en  $t_0$ ,  $k$  y  $TS_{50}$ , siendo menores  $k$  y  $TS_{50}$  en el CSól, mientras que  $k$  fue mayor en CSup; a las 252 h ninguno de los parámetros mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos sistemas de cultivo. El efecto de los pulsos oxidantes en CSup a las 156 h fue el siguiente, el menor  $t_0$  fue obtenido con el tratamiento 26% x 2, seguido por la atmósfera normal y el tratamiento con un solo pulso de oxígeno, los tres tratamientos difirieron entre sí; el parámetro  $k$  no mostró diferencias entre la atmósfera normal y 26%, pero estos sí fueron mayores a la  $k$  obtenida para 26% x 2; en el caso de  $TS_{50}$ , se repitió el comportamiento anterior, obteniéndose el menor  $TS_{50}$  para 26% x 2 en comparación con la atmósfera normal y 26%. Este efecto positivo en la mayoría de los parámetros en el tratamiento 26% x 2, desapareció a las 252 h, ya que resultó en valores mayores de  $t_0$  y  $TS_{50}$  y menor de  $k$ , en comparación a la atmósfera normal y 26%. En el caso de la comparación entre tratamientos de atmósfera normal y 26% x 2 en CSól, no se observaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) a las 156 y 252 h en ninguno de los parámetros de infectividad. En los controles negativos para ambas cepas la sobrevivencia siempre fue superior al 90%.

**Tabla 7.3.** Parámetros infectivos de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 en larvas de *G. mellonella*.

| Cepa                                | Tiempo (h) | Tratamiento  | $t_0$ (d) <sup>§</sup>   | $k$ (d <sup>-1</sup> ) <sup>§§</sup> | TS <sub>50</sub> (d) <sup>§§§</sup> |
|-------------------------------------|------------|--------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>I. fumosorosea</i><br>ARSEF 3302 | 180        | CSup 21%     | 1.94 ± 0.01 <sup>+</sup> | 1.68 ± 0.11a                         | 2.12 ± 0.04                         |
|                                     |            | CSup 26%     | 1.96 ± 0.08              | 0.81 ± 0.13b                         | 2.33 ± 0.27                         |
|                                     |            | CSup 26% x 2 | 1.90 ± 0.05              | 0.82 ± 0.08b                         | 2.26 ± 0.09                         |
|                                     |            | CSól 21%     | 1.99 ± 0.00              | 3.55 ± 0.38 <sup>+</sup>             | 2.07 ± 0.03                         |
|                                     |            | CSól 26% x 2 | 1.94 ± 0.00 <sup>*</sup> | 3.02 ± 0.32                          | 2.04 ± 0.00                         |
|                                     | 300        | CSup 21%     | 1.90 ± 0.04              | 0.92 ± 0.07 <sup>+</sup> a           | 2.22 ± 0.06 <sup>b</sup>            |
|                                     |            | CSup 26%     | 2.09 ± 0.08              | 0.47 ± 0.05b                         | 2.84 ± 0.19a                        |
|                                     |            | CSup 26% x 2 | 1.85 ± 0.09              | 0.51 ± 0.05b                         | 2.47 ± 0.04a,b                      |
|                                     |            | CSól 21%     | 1.99 ± 0.05              | 0.61 ± 0.05 <sup>*</sup>             | 2.48 ± 0.09                         |
|                                     |            | CSól 26% x 2 | 1.95 ± 0.06              | 0.46 ± 0.03                          | 2.60 ± 0.07                         |

La sobrevivencia final no fue significativa ( $P > 0.05$ ) para ningún tratamiento. El valor  $R^2$  mínimo obtenido fue de 0.94. El símbolo +, muestra diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre CSup y CSól en atmósfera normal utilizando prueba de  $t$  de Student. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento con atmósfera normal y pulsos oxidantes en CSup, utilizando prueba de comparación de medias de Tukey. Los asteriscos muestran diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamiento atmosférico y pulso oxidante 26% x 2 en CSól. En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena, el CSup contenía 0.333 gsi por botella y el CSól 5 gsi por botella.

<sup>§</sup> Tiempo de muerte de la primera larva

<sup>§§</sup> Tasa específica de muerte

<sup>§§§</sup> Tiempo de sobrevivencia 50



**Tabla 7.4.** Parámetros infectivos de *I. fumosorosea* CNRCB1 en larvas de *G. mellonella*.

| Cepa                            | Tiempo (h) | Tratamiento  | $t_0$ (d) <sup>§</sup>   | $k$ (d <sup>-1</sup> ) <sup>§§</sup> | TS <sub>50</sub> (d) <sup>§§§</sup> |
|---------------------------------|------------|--------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>I. fumosorosea</i><br>CNRCB1 | 156        | CSup 21%     | 1.72 ± 0.03b             | 1.50 ± 0.14 <sup>+a</sup>            | 1.92 ± 0.05a                        |
|                                 |            | CSup 26%     | 1.89 ± 0.02a             | 1.75 ± 0.20a                         | 2.06 ± 0.06a                        |
|                                 |            | CSup 26% x 2 | 1.07 ± 0.05c             | 0.71 ± 0.06b                         | 1.49 ± 0.07b                        |
|                                 |            | CSól 21%     | 1.08 ± 0.05 <sup>+</sup> | 0.73 ± 0.08                          | 1.49 ± 0.18 <sup>+</sup>            |
|                                 |            | CSól 26% x 2 | 1.04 ± 0.04              | 0.75 ± 0.06                          | 1.44 ± 0.06                         |
|                                 | 252        | CSup 21%     | 1.93 ± 0.01b             | 2.15 ± 0.23a                         | 2.07 ± 0.11b                        |
|                                 |            | CSup 26%     | 1.97 ± 0.01b             | 1.70 ± 0.12a                         | 2.14 ± 0.17b                        |
|                                 |            | CSup 26% x 2 | 2.56 ± 0.20a             | 0.34 ± 0.06b                         | 3.42 ± 0.30a                        |
|                                 |            | CSól 21%     | 1.96 ± 0.01              | 3.07 ± 0.56                          | 2.06 ± 0.17                         |
|                                 |            | CSól 26% x 2 | 1.97 ± 0.00              | 3.33 ± 0.32                          | 2.06 ± 0.20                         |

La sobrevivencia final no fue significativa ( $P>0.05$ ) para ningún tratamiento. El valor  $R^2$  mínimo obtenido fue de 0.93. El símbolo +, muestra diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre CSup y CSól en atmósfera normal utilizando prueba de  $t$  de Student. Las letras minúsculas muestran diferencias significativas ( $P<0.05$ ) entre tratamiento atmosférico y pulsos oxidantes en CSup, utilizando prueba de comparación de medias de Tukey. En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena, el CSup contenía 0.333 gsi por botella y el CSól 5 gsi por botella.

§ Tiempo de muerte de la primera larva

§§ Tasa específica de muerte

§§§ Tiempo de sobrevivencia 50

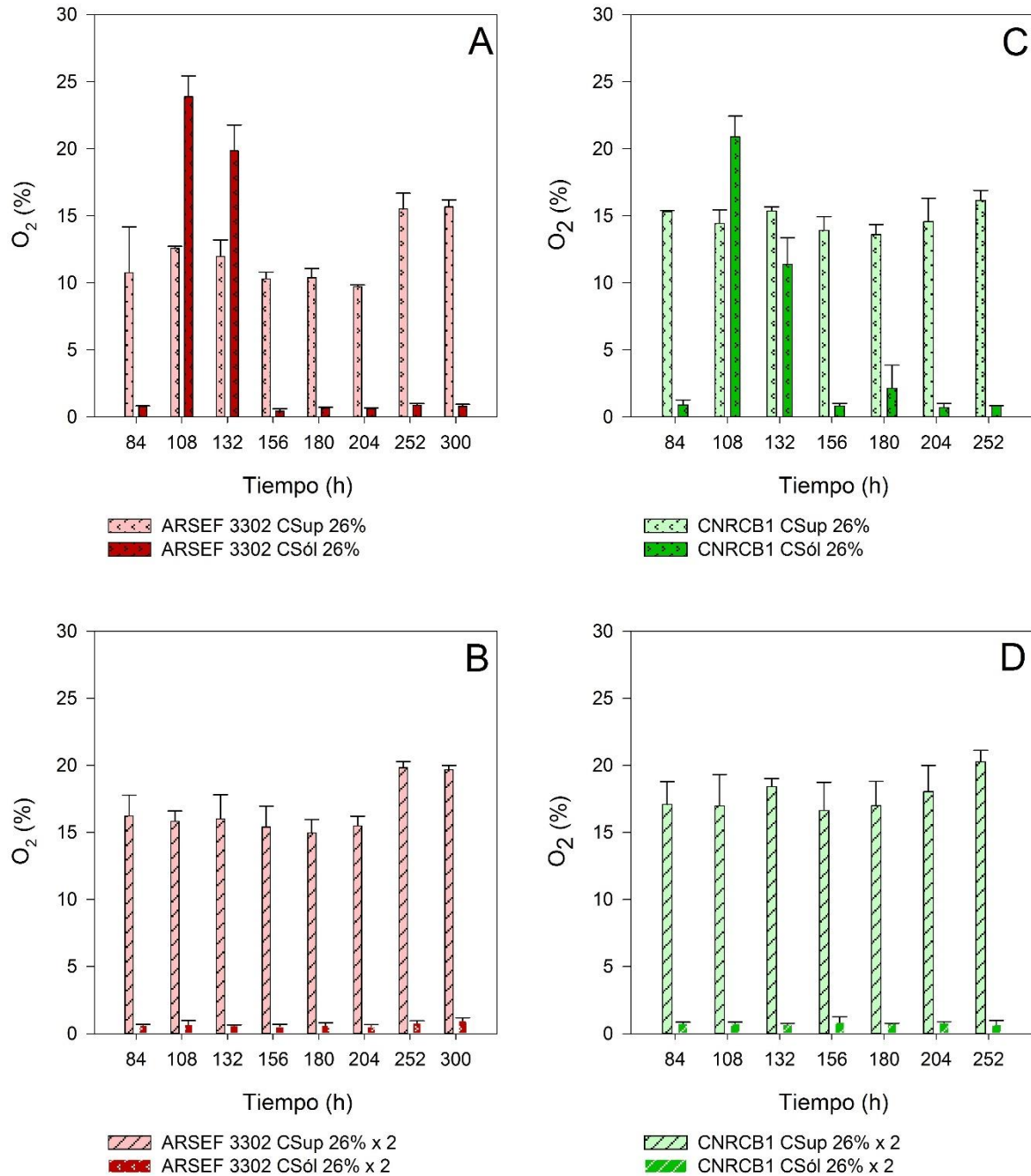
## 7.6. Determinación de oxígeno residual y CO<sub>2</sub> acumulado en CSup y CSól.

Los datos obtenidos en el análisis de respirometría entre CSup y CSól indicaron que existe una diferencia importante en la producción de CO<sub>2</sub>, siendo mayor en CSup cuando se expresa como mg de CO<sub>2</sub> gsi<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>; sin embargo cuando estos datos no se normalizan y se expresan como mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> (datos no mostrados) el comportamiento se invierte, siendo mayor la producción de CO<sub>2</sub> en CSól respecto al CSup. Esto indica que probablemente la biomasa total en CSól es mayor a la del CSup, y esto es relevante en los sistemas con pulsos oxidantes ya que son sistema cerrados, y por lo tanto una mayor demanda de oxígeno en los CSól podría agotar rápidamente la atmósfera oxidante, incluso consumir en su totalidad el oxígeno del sistema, limitando el crecimiento y conidiación, lo cual es apreciable en el sistema de CSól. Por estas razones se determinaron los porcentajes residuales de oxígeno y la acumulación de CO<sub>2</sub> en ambos sistemas de cultivo cuando se aplicaron pulsos oxidantes.

Para la cepa ARSEF 3302 los residuales de oxígeno entre ambos sistemas fueron completamente diferentes a lo largo de la cinética, en el caso del tratamiento 26% (Figura 7.8A), se observaron residuales de 10.7 y 0.7% en sistema superficial y sólido, respectivamente; mientras en CSup los residuales se mantuvieron similares a lo largo del cultivo, sólo incrementando ligeramente hacia el final del cultivo alcanzando niveles de hasta 15.6%; en el caso del CSól a las 108 h se observó un residual de oxígeno de 23.8%, y a las 132 h disminuyó ligeramente a 19.8%, a partir de este momento los residuales de oxígeno se mantuvieron por debajo de 0.9%. Cuando el tratamiento oxidante se aplicó cada 12 h (26% x 2) (Figura 7.8B), se obtuvieron comportamientos similares en el CSup a los obtenidos cuando se aplicó el pulso cada 24 h, por otra parte el CSól consumió prácticamente la totalidad del oxígeno a lo largo del cultivo, ya que no se registraron niveles de oxígeno superiores a 1%.

La cepa CNRCB1 mostró similitudes a los tratamientos de la cepa ARSEF 3302. Cuando se aplicó el tratamiento 26% (Figura 7.8C), los cultivos superficiales tuvieron niveles de oxígeno de 15.3% en el primer tiempo de determinación y de 16.1% al final de las mediciones. El CSól presentó un comportamiento similar al observado en ARSEF 3302, al primer día de medición se agotó prácticamente todo el oxígeno, a las 108 h el oxígeno presente fue de 20.8% y a las 132 h disminuyó hasta 11.3%, a partir de este tiempo los niveles de oxígeno se mantuvieron por debajo del 2.3%. Cuando se aplicó el tratamiento 26% x 2 (Figura 7.8D), el CSup inicio con niveles de oxígeno de 17% siendo al final del cultivo de 20.2%, mientras que el CSól agotó

prácticamente el oxígeno suministrado a lo largo del cultivo, siendo los niveles de oxígeno menores a 0.9% a lo largo del cultivo.

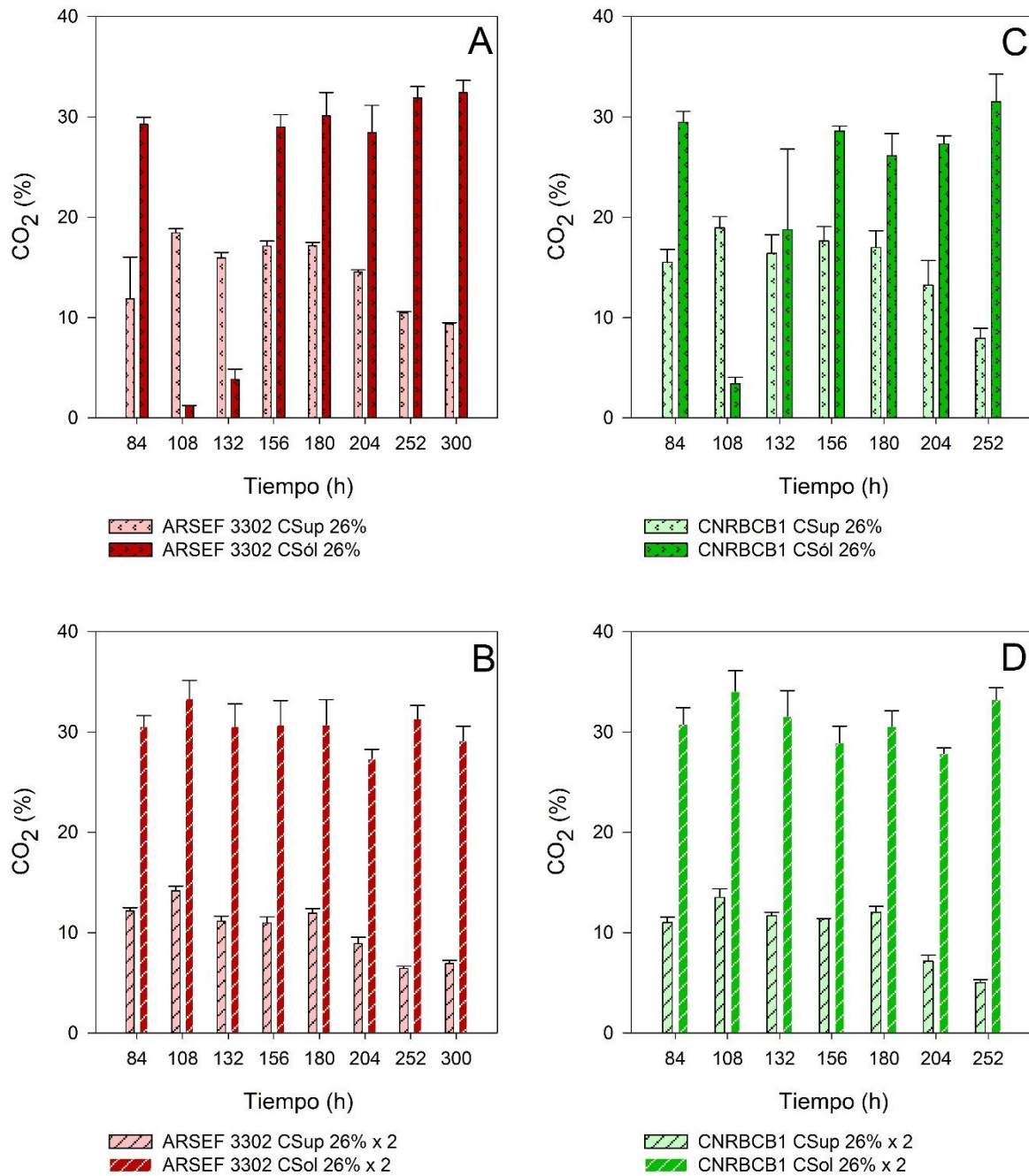


**Figura 7.8.** Residual de oxígeno en CSup y CSól utilizando la mezcla arroz-avena, de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (A y B) e *I. fumosorosea* CNRCB1 (C y D). La determinación de

oxígeno fue realizada desde las 84 h, cada 24 h antes de la aplicación de las atmósferas oxidantes. En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena, el CSup contenía 0.333 gsi por botella y el CSól 5 gsi por botella.

La determinación de CO<sub>2</sub> fue realizada utilizando las mismas botellas serológicas con que se realizó la determinación de oxígeno residual, ya que la columna usada durante la cromatografía de gases permite hacer al mismo tiempo las lecturas de CO<sub>2</sub>, oxígeno y N<sub>2</sub>. Para la cepa ARSEF 3302, a las 108 h en CSup con 26%, se obtuvo una acumulación de CO<sub>2</sub> de 11.8%, 24 h después de esta primer determinación el CSup incrementó ligeramente la acumulación de CO<sub>2</sub> hasta las 180 h de cultivo, a partir de este punto la acumulación de CO<sub>2</sub> comenzó a disminuir, siendo de 9.3% al final de la cinética; por otra parte el CO<sub>2</sub> en CSól inicio con una acumulación de 29.2%, 24 h después la acumulación cayó hasta 1.1%, 48 h después esta acumulación incrementó a 3.8% y a partir de este momento las acumulaciones observadas fueron de hasta 32.4% (Figura 7.9A). La aplicación del pulso 26% x 2 disminuyó ligeramente la acumulación de CO<sub>2</sub> en CSup comparado con el tratamiento 26%, obteniéndose 12.1 y 6.9% de CO<sub>2</sub> al inicio y final de las determinaciones; mientras que en CSól la acumulación de CO<sub>2</sub> se mantuvo arriba de 27.3% a lo largo del cultivo (Figura 7.9B).

En el caso de la cepa CNRCB1 se obtuvieron comportamientos similares a la cepa ARSEF 3302; en el CSup con 26%, se obtuvo una producción de CO<sub>2</sub> de 15.5% a las 84 h de cultivo, este porcentaje se mantuvo similar hasta las 180 h, bajando hasta 7.9% al final del cultivo (Figura 7.9C). El CSól con 26% mostró una acumulación de CO<sub>2</sub> de 29.4% a las 84 h, sin embargo a las 108 y 132 h la acumulación de CO<sub>2</sub> fue de 3.4 y 18.7% respectivamente, a partir de este tiempo las acumulaciones de CO<sub>2</sub> fueron superiores a 26.1% (Figura 7.9C). Los tratamientos 26% x 2 en la cepa CNRCB1 mantuvieron la acumulación de CO<sub>2</sub> debajo de 13.5% en CSup, siendo de 5% al final del cultivo. Para el CSól la acumulación se mantuvo por encima de 27.8% a lo largo del cultivo, de forma similar a la cepa ARSEF 3302 (Figura 7.9D).



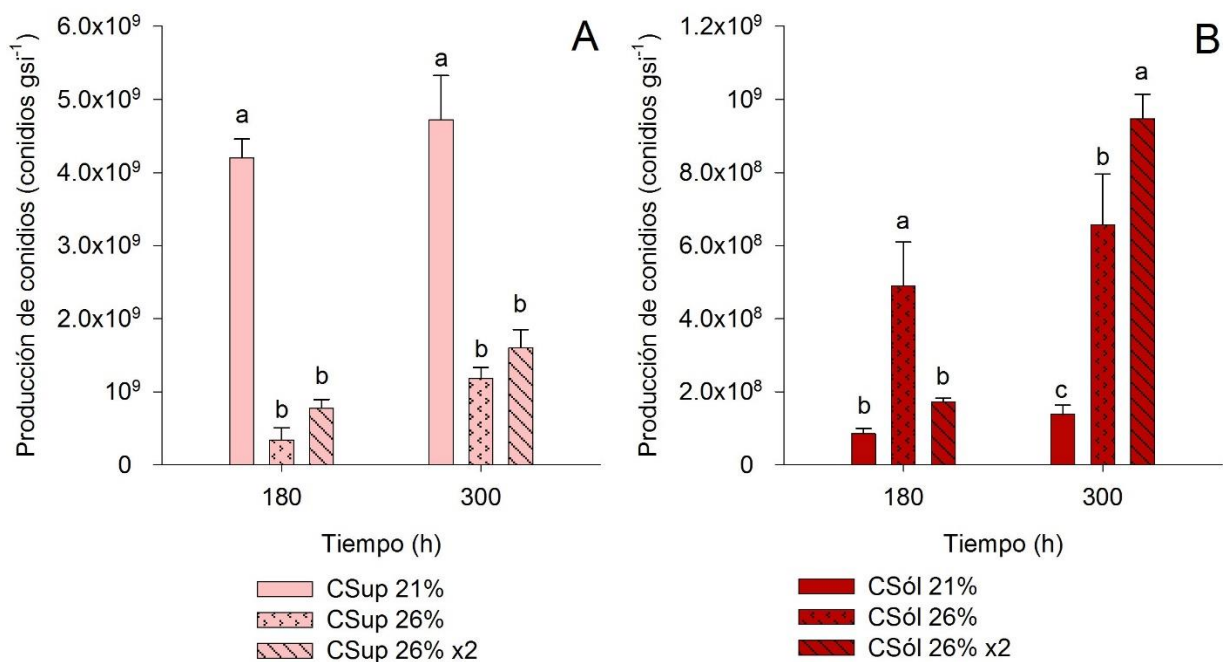
**Figura 7.9.** Acumulación de CO<sub>2</sub> en CSól y CSup utilizando la mezcla arroz-avena, de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (A y B) e *I. fumosorosea* CNRBCB1 (C y D). La determinación de CO<sub>2</sub> fue realizada desde las 84 h, cada 24 h antes de la aplicación de las atmósferas oxidantes. En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena, el CSup contenía 0.333 gsi por botella y el CSól 5 gsi por botella.

La diferencia en la acumulación de CO<sub>2</sub> y oxígeno entre CSup y CSól, indicó que la cantidad de oxígeno suministrado durante el pulso de oxígeno a los CSól no era suficiente para mantener el crecimiento de biomasa, y por lo tanto producir conidios, esto también se relaciona con el bajo crecimiento de micelio e invasión de la mezcla de sustrato en CSól (Figura 7.5A y B). Además puede relacionarse con la falta de mejoras en la viabilidad de los conidios obtenidos en este sistema, en comparación al CSup, ya que el oxígeno administrado en los pulsos de oxígeno podría consumirse rápidamente y el efecto de la atmósfera oxidante sería nulo. Por estas razones se decidió realizar un ajuste de los gramos de sustrato inicial, para ello se estandarizaron ambos sistemas de cultivo para contener 1 gramo de sustrato inicial de la mezcla arroz-avena, y manteniendo la relación de inóculo a  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ . Se determinó la producción de conidios, la acumulación de CO<sub>2</sub> y el residual de oxígeno, para ambas cepas, en los dos sistemas de cultivo y con las 3 condiciones atmosféricas anteriores. En un experimento posterior se utilizó 2.5 gsi exclusivamente en CSól, para evaluar el efecto de los pulsos oxidantes.

#### **7.7. Efecto de los pulsos oxidantes y diferentes cantidades de gramos de sustrato inicial en sistemas de CSup y CSól.**

Se analizó el efecto de los pulsos oxidantes sobre la producción de conidios de las dos cepas de *I. fumosorosea* utilizando 1 y 2.5 gsi, para estos experimentos la variable de producción de conidios fue reportada como conidios por gsi, debido a que la variable sensibilidad tenía mayor utilidad para los casos en los que la producción de conidios bajo tratamientos oxidantes era menor respecto al tratamiento con atmósfera normal; a continuación se describe la primer condición (1gsi). La producción de conidios de la cepa ARSEF 3302 en CSup (Figura 7.10A) mostró nuevamente una disminución cuando se aplicaron los tratamientos oxidantes respecto al tratamiento con atmósfera normal, obteniendo a las 180 h para el tratamiento de atmosfera normal una producción de  $4.2 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ , mientras que para los tratamientos oxidantes fue de  $3.43 \times 10^8$  y  $7.75 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$  para 26% y 26% x 2, respectivamente, lo que representa una caída de más de 1 orden de magnitud en el caso del tratamiento con 1 sólo pulso oxidante, y 5.4 veces en el caso del pulso doble. A las 300 h la diferencia en la producción de conidios entre el tratamiento con atmósfera normal y los tratamientos oxidantes disminuyó ligeramente, obteniéndose de 4 y 2.9 veces menos conidios con respecto al control atmosférico, en los tratamientos 26% y 26% x 2, respectivamente. Estas diferencias en la producción de conidios fueron comparables a las obtenidas cuando la cantidad de sustrato

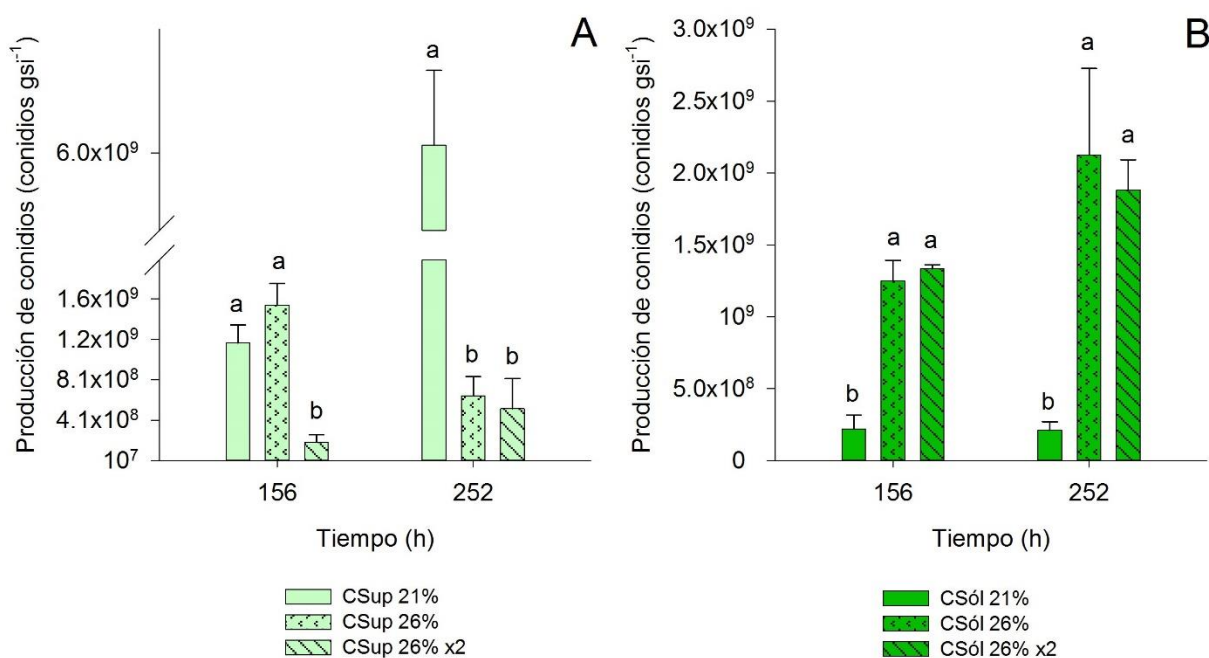
inicial no estaba estandarizada (Figura 7.4A). En el caso de los CSól para la cepa ARSEF 3302 (Figura 7.10B), se observaron comportamientos completamente diferentes al CSup, ya que ambos tratamientos con pulsos de oxígeno, en general incrementaron la producción de conidios, respecto al tratamiento con atmósfera normal. A las 180 h la mayor producción de conidios fue obtenida con el tratamiento 26% ( $4.9 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ), siendo 5.7 veces mayor que el tratamiento atmosférico, mientras que el tratamiento atmosférico ( $8.5 \times 10^7$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) y 26% x 2 ( $1.7 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ). A las 300 h, ambos tratamientos oxidantes muestran una mayor producción de conidios, respecto a la atmósfera normal ( $1.3 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ), siendo 6.8 y 4.7 veces mayor la producción en el tratamiento 26% x 2 ( $9.4 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) y 26% ( $6.5 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ), respectivamente.



**Figura 7.10.** Producción de conidios de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 en CSup y CSól en sistemas con 1 gsi. Letras distintas representan diferencias significativas en prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena.

Para la cepa CNRCB1 en CSup (Figura 7.11A) a las 156 h, las producciones de conidios entre el tratamiento con atmósfera normal ( $1.1 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) y 26% ( $1.5 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) no

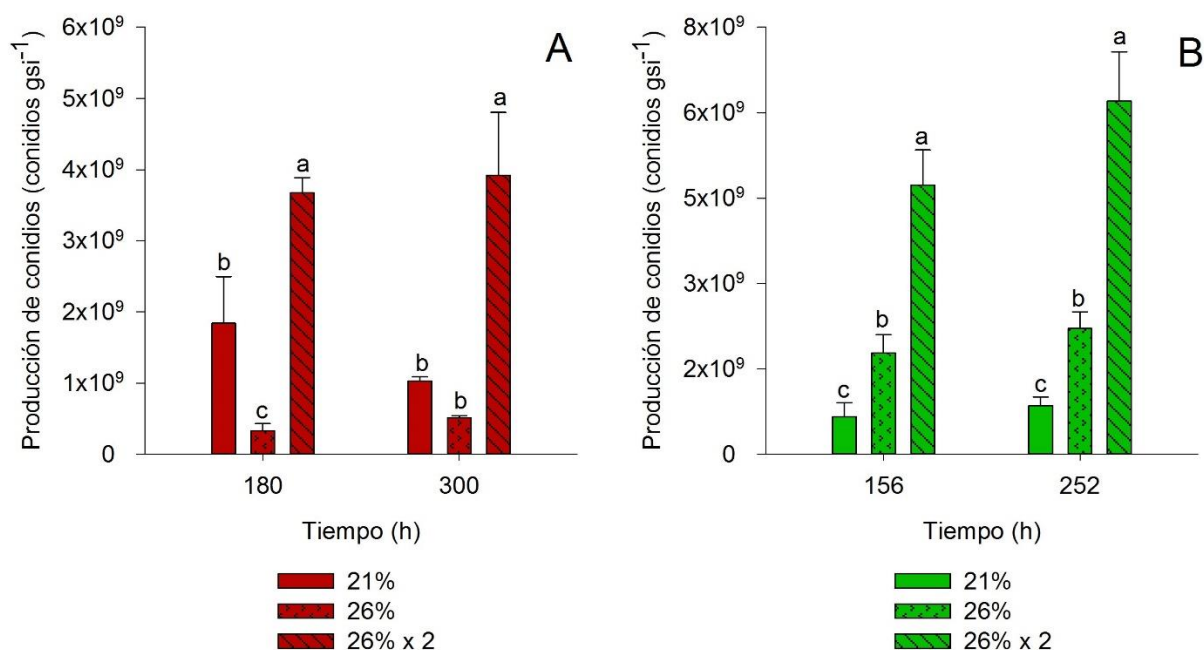
mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), mientras que el tratamiento 26% x 2 ( $1.9 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) mostró menor producción de conidios respecto a los dos anteriores. A las 252 h, la mayor producción de conidios fue obtenida con el tratamiento de atmósfera normal ( $6.1 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) respecto a los tratamientos 26% ( $6.5 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) y 26% x 2 ( $5.25 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ), estos últimos no mostraron diferencias significativas entre sí. Para los CSól (Figura 7.11B), se obtuvieron comportamientos similares a los observados para la cepa ARSEF 3302 (Figura 7.10B), ya que los pulsos oxidantes permitieron un incremento en la producción de conidios en comparación a la atmósfera normal. A las 156 h la producción de conidios en el control atmosférico, 26% y 26% x 2 fueron de  $2.2 \times 10^8$ ,  $1.2 \times 10^9$  y  $1.3 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ , respectivamente, lo cual representa hasta 5.9 veces más conidios cuando se aplican los pulsos oxidantes respecto al control atmosférico. A las 252 h los comportamientos son similares al primer tiempo, sin embargo, las diferencias en la producción de conidios incrementan siendo la producción de conidios de 1 orden de magnitud mayor en el tratamiento 26% y de 8.5 veces mayor en 26% x 2 respecto a la atmósfera normal.



**Figura 7.11.** Producción de conidios de *I. fumosorosea* CNRCB1 en CSup y CSól en sistemas con 1  $\text{gsi}$ . Letras distintas representan diferencias significativas en prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). En ambos sistemas de cultivo se utilizó la mezcla arroz-avena.

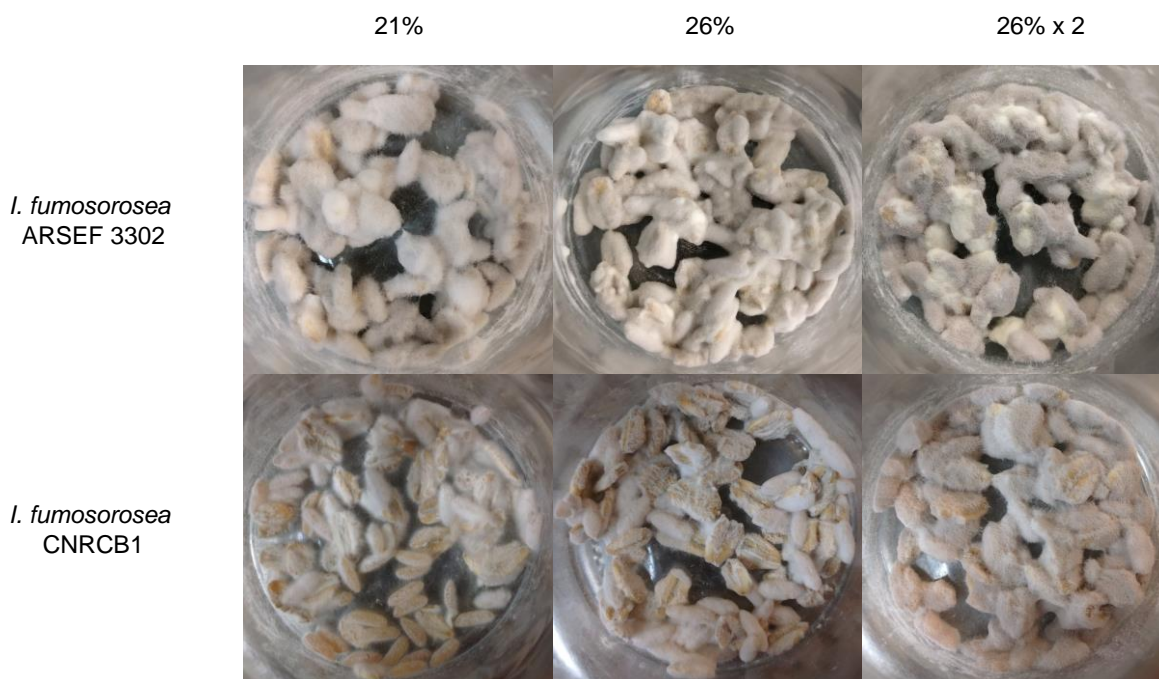


Se analizó el efecto de los pulsos oxidantes en una tercera cantidad de gramos de sustrato inicial (2.5 gsi) para ambas cepas, pero sólo en CSól, debido a que este sistema es el utilizado a nivel industrial, además de que las cantidades de harina de arroz y avena necesaria para tener 2.5 gsi en CSup es difícil de incorporar en agua. Para la cepa ARSEF 3302 a las 180 h se incrementó 2 veces la conidiación en el tratamiento 26% x 2 ( $3.6 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) respecto a la atmósfera normal ( $1.8 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ), el tratamiento 26% ( $3.3 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) mostró una producción de conidios significativamente ( $P < 0.05$ ) menor a los tratamientos con atmósfera normal y 26% x 2 (Figura 7.12 A). A las 300 h, no se encontraron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre la producción de conidios del tratamiento 21% y 26%, sin embargo el tratamiento 26% x 2 continuó siendo significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) a los 2 tratamientos anteriores. La cepa CNRCB1 incrementó la producción de conidios siempre que se aplicaron las atmósferas oxidantes (Figura 7.12B), a las 156 h los tratamientos 26% ( $1.7 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) y 26% x 2 ( $4.7 \times 10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ) mostraron un incremento de 2.7 y 7.1 veces, respectivamente, en la conidiación respecto a la atmósfera normal ( $6.5 \times 10^8$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ ), estos incrementos permanecieron constantes a las 252 h.



**Figura 7.12.** Producción de conidios de *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1 en CSól en sistemas con a 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena. Letras distintas representan diferencias significativas en prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ).

Los incrementos en la producción de conidios pudieron observarse incluso en las botellas serológicas por la apariencia morfológica (Figura 7.13), ya que cuando los tratamientos oxidantes estimulantes incrementaban la conidiación era posible observar zonas de aspecto polvoso color grisáceo característico, correspondiente a la producción de conidios (Hoy y col., 2010).



**Figura 7.13.** Morfología de crecimiento de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1 en CSól con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena en tratamientos atmósfera normal, 26% y 26% x 2.

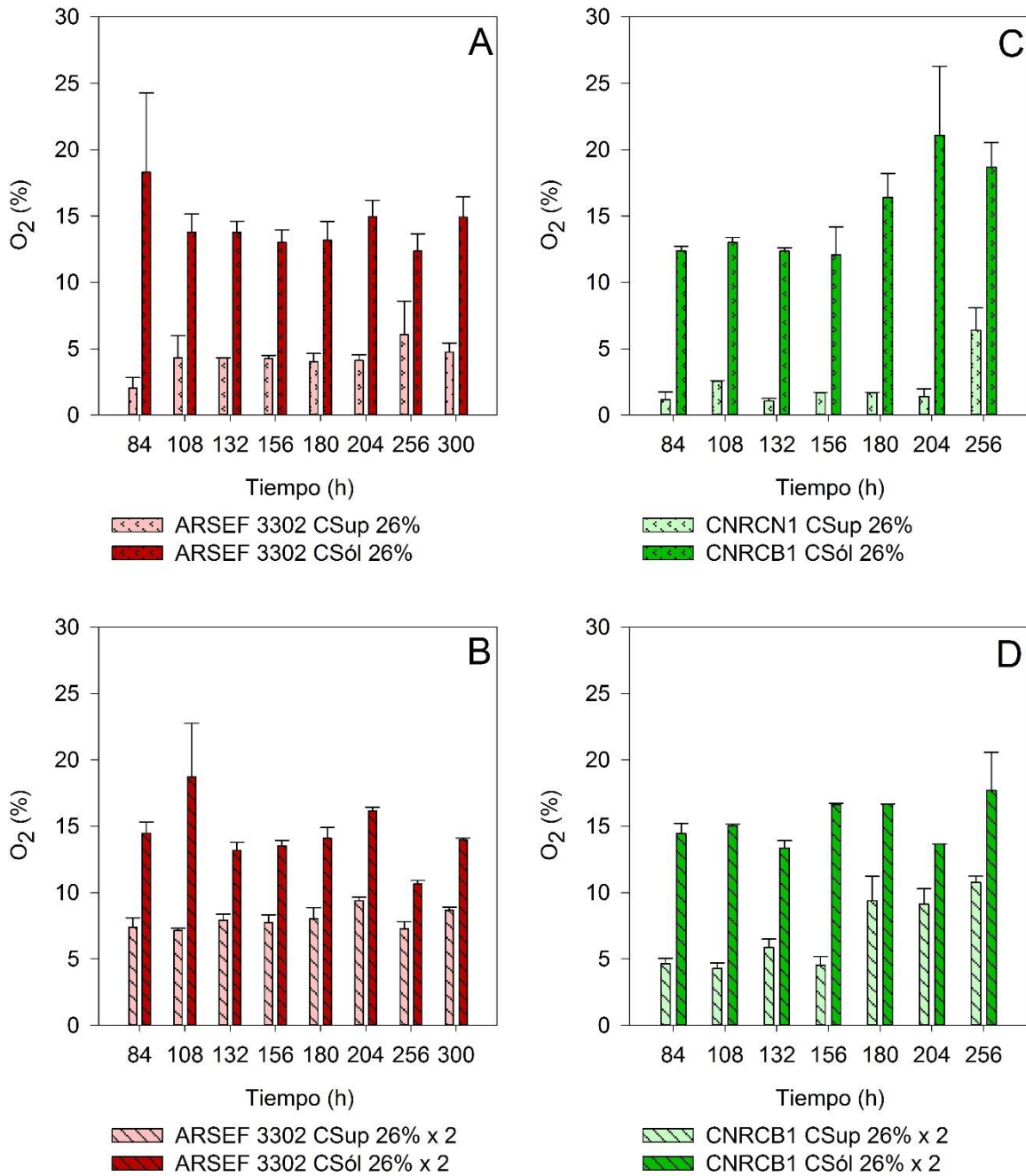
### **7.8. Determinación del oxígeno residual y CO<sub>2</sub> acumulado en los sistemas con 1 y 2.5 gsi.**

Se realizaron las determinaciones de oxígeno y CO<sub>2</sub> para los sistemas de CSup y CSól con 1 gsi, mientras que para el sistema con 2.5 gsi sólo fueron realizados en CSól debido a las razones que se mencionaron anteriormente.

Para el sistema con 1gsi en CSup con pulsos de 26% para la cepa ARSEF 3302 se inició con niveles de oxígeno residuales de 2%, los cuales se mantuvieron similares a lo largo del cultivo

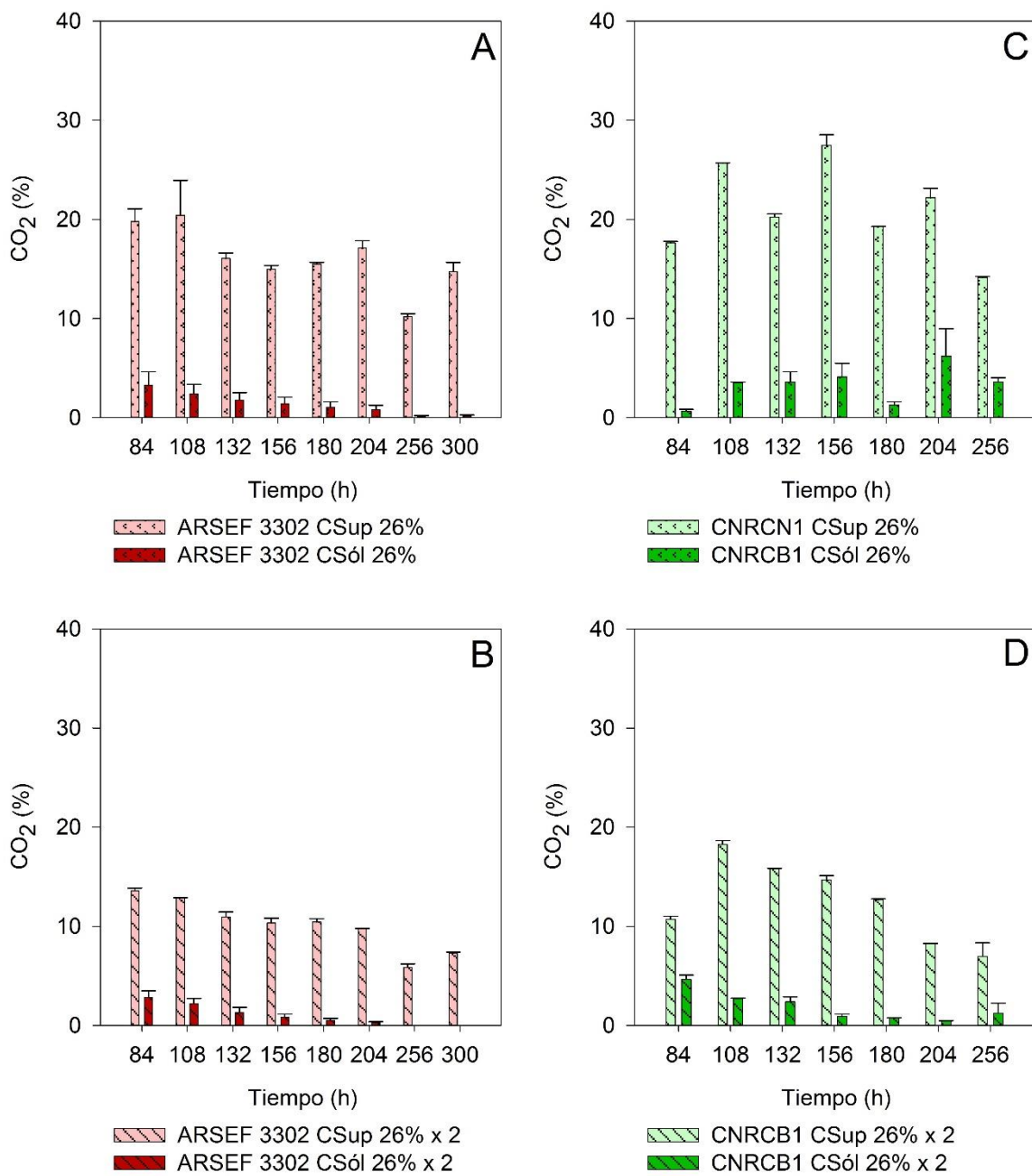
y fueron de 4.7% al final del cultivo. En el caso del CSól la primer medición de oxígeno residual fue de 18.3%, y al igual que en CSup se mantuvo prácticamente constante a lo largo del cultivo, siendo a las 300 h de 14.9% (Figura 7.14 A). Los tratamientos con pulsos de 26% x 2 en CSup, presentaron niveles mayores a 7.2% a lo largo del cultivo, los cuales fueron ligeramente mayores comparados a los obtenidos durante el pulso único; mientras que en CSól con doble pulso oxidante se obtuvieron valores mayores a 10.6% a lo largo del cultivo (Figura 7.14B), siendo similares respecto a los obtenidos con un pulso único en CSól.

En la cepa CNRCB1 con el tratamiento 26% (Figura 7.14C), los comportamientos en general fueron similares a los observados a la cepa ARSEF 3302, en el CSup a las 84 h con los pulsos 26%, los residuales de oxígeno fueron de 1.1% y a las 252 h de 6.38%, mientras que en CSól fueron mayores, siendo de 12.3 y 18.6% para las 156 y 252 h, respectivamente. Los tratamientos con pulsos 26% x 2 en CSup (Figura 7.14D) mostraron niveles de oxígeno ligeramente superiores a los obtenidos con pulso único, y en el caso del CSól fueron muy similares, lo cual fue consistente con lo observado para la cepa ARSEF 3302.



**Figura 7.14.** Residual de oxígeno en CSól y CSup de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (A y B) e *I. fumosorosea* CNRCB1 (C y D) estandarizando la cantidad de sustrato inicial a 1 g con la mezcla arroz-avena. La determinación de oxígeno fue realizada 24 h después de la primera aplicación de los pulsos oxidantes.

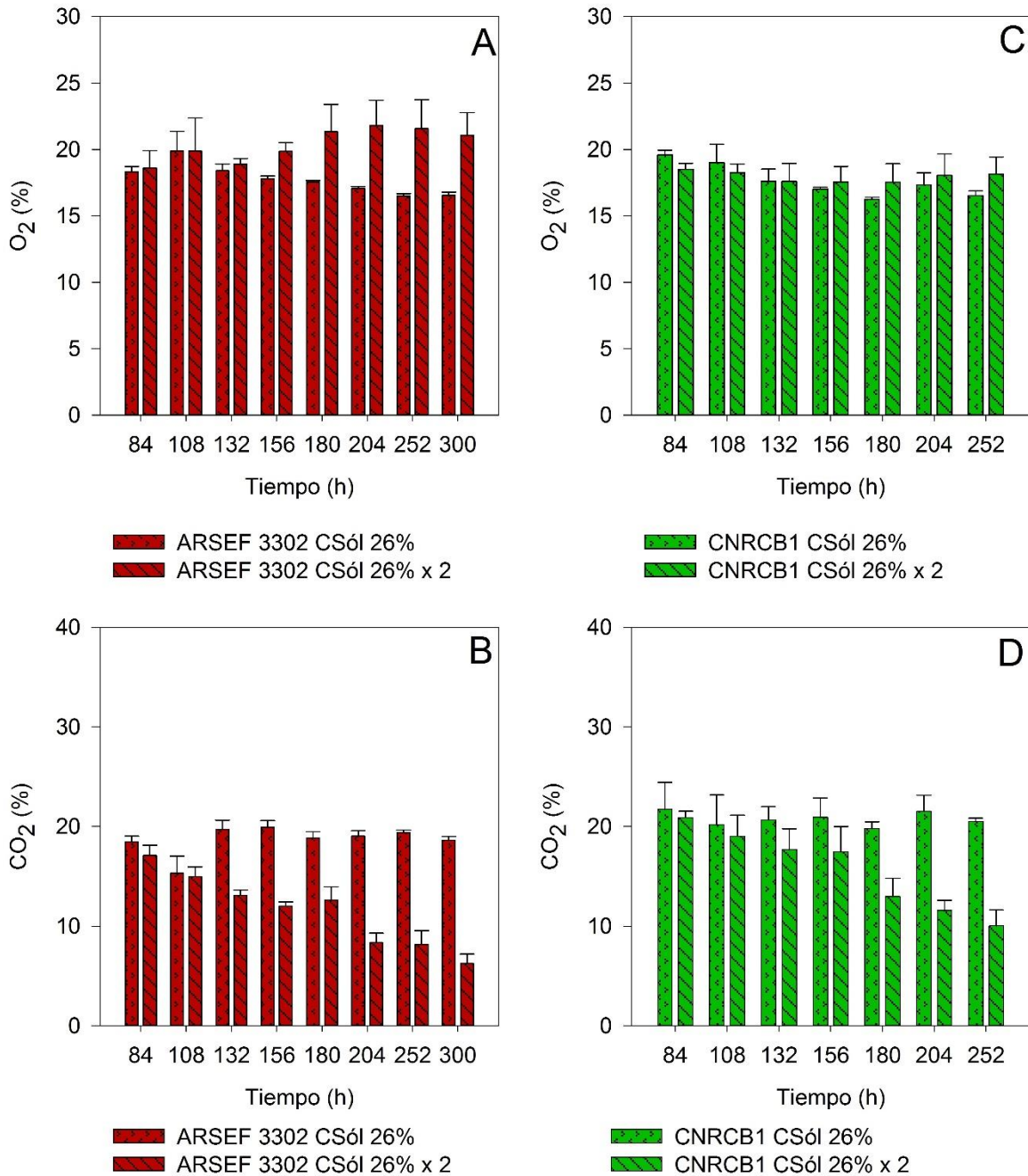
Las mediciones de CO<sub>2</sub> acumulado para los sistemas anteriores con 1gsi se presentan a continuación. La cepa ARSEF 3302 en CSup con pulsos 26%, mostró que el CO<sub>2</sub> producido fue de 10.1 a 20.4% a lo largo del cultivo, mientras los CSól bajo este mismo tratamiento los niveles de acumulación de CO<sub>2</sub> fueron menores al CSup con valores de 0.1 a 3.2% (Figura 7.15A). Al administrar los pulsos 26% x 2, el CO<sub>2</sub> acumulado en CSup disminuyeron respecto a los niveles con 26% obteniéndose valores de 5.8 a 13.8%, mientras que en CSól los valores obtenidos fueron 0.2 a 2.8% (Figura 7.15B). Para la cepa CNRCB1 en CSup con el pulso 26%, la acumulación de CO<sub>2</sub> (14.1 a 27.4%) fue mayor a la obtenida en CSól (0.6 a 6.1%), reproduciéndose este mismo comportamiento cuando se aplicaron los pulsos 26% x 2, con niveles de 6.9 a 18.2% en CSup y 0.4 a 4.6% en CSól. Los resultados obtenidos en las determinaciones de ambos gases en los sistemas con 1 gsi son consistentes con el análisis de respirometría, ya que prueban que la capacidad respiratoria en CSup es superior al CSól, además eliminan el posible error que podría existir en el análisis respirométrico cuando se usan cantidades diferentes de sustrato inicial, lo cual hacía necesario normalizar la tasa de respiración por gsi.



**Figura 7.15.** Acumulación de CO<sub>2</sub> en CSól y CSup de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (A y B) e *I. fumosorosea* CNRCB1 (C y D) estandarizando la cantidad de sustrato inicial a 1 g con la mezcla arroz-avena. La determinación de CO<sub>2</sub> fue realizada 24 h después de la primera aplicación de los pulsos oxidantes.

Como se mencionó previamente se analizó la producción de conidios en un sistema con 2.5 gsi exclusivamente en CSól, a continuación se describen los resultados de oxígeno residual y

CO<sub>2</sub> acumulado. Para la cepa ARSEF 3302 los niveles de oxígeno residual con el tratamiento 26% se mantuvieron entre 16.4 y 19.8% a lo largo de la cinética, mientras que la aplicación de pulsos 26% x 2 mostró niveles similares hasta las 156 h respecto al tratamiento 26%, a partir de este tiempo los residuales de oxígeno fueron mayores en el tratamiento 26% x 2 a los obtenidos con pulsos únicos obteniéndose residuales de oxígeno de 18.6 a 19.8% (Figura 7.16A). En cuanto a la acumulación de CO<sub>2</sub> para el tratamiento 26% se obtuvieron niveles de 15.2 a 19.9%, mientras que el tratamiento 26% x 2 disminuyó de forma notable los niveles de CO<sub>2</sub> a partir de las 132 h respecto al tratamiento 26%; a lo largo de la cinética para el tratamiento 26% x 2 los niveles de CO<sub>2</sub> fueron de 6.2 a 17% (Figura 7.16B). La cepa CNRCB1 mantuvo niveles muy similares de oxígeno residual entre los tratamiento 26% (16.2 a 19.5%) y 26% x 2 (17.5 a 18.5%) (Figura 7.16C). La acumulación de CO<sub>2</sub> se mantuvo prácticamente similar entre los dos tratamientos oxidantes a lo largo del cultivo con niveles de 19.7 a 21.7% para 26% y 10 a 20.8% para 26% x 2 (Figura 7.16D).



**Figura 7.16.** Residuales de oxígeno y acumulación de CO<sub>2</sub> en sistemas con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena en CSól de las cepas *I. fumosorosea* ARSEF 3302 (A y B) y CNRCB1 (C y D). Las determinaciones de los gases fueron realizadas 24 h después de la primera aplicación de los pulsos oxidantes.

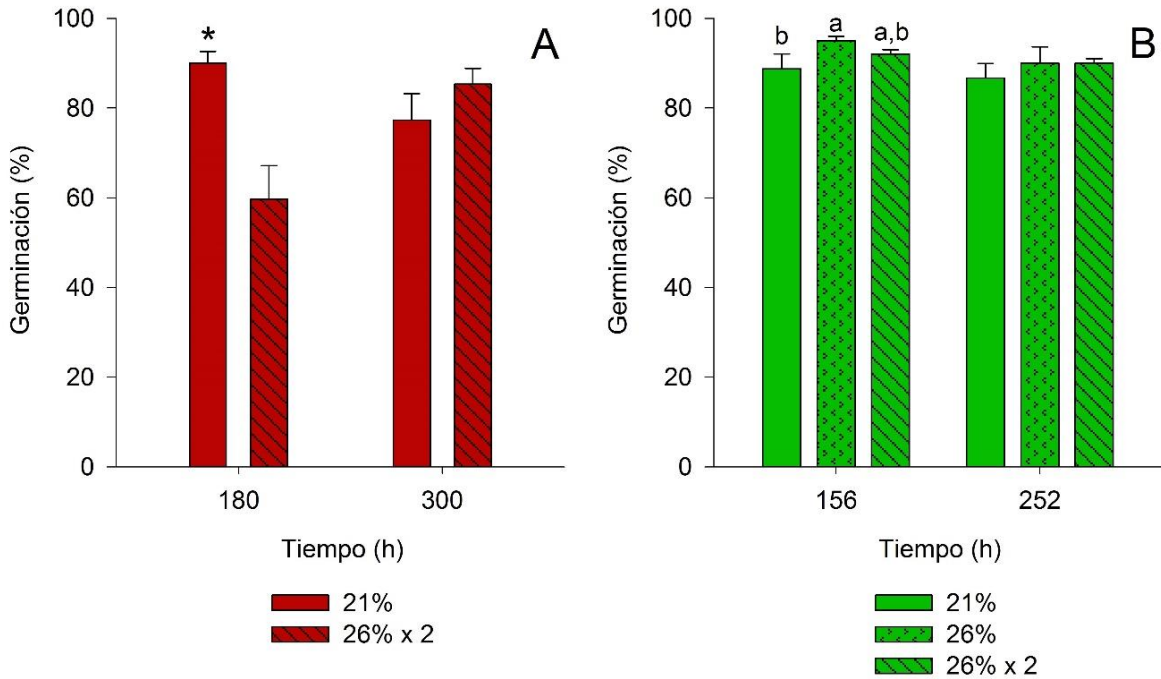


## **7.9. Efecto de los pulsos oxidantes en la calidad de conidios en sistemas con 2.5 gsi en CSól.**

Se determinó el efecto de las atmósferas oxidantes en la calidad de conidios del CSól con el sistema con 2.5 gsi debido a que en este sistema es posible observar un efecto estimulante en la conidiación por parte de las atmósferas oxidantes, y aunque el tratamiento 26% para ARSEF 3302 no mostrará una mejora en la producción de conidios existía la posibilidad de que la calidad se incrementara. Otro motivo por la cual este sistema resulta más interesante que el de 1 gsi es que para una cantidad mayor de sustrato el volumen administrado de oxígeno al 26% es el mismo.

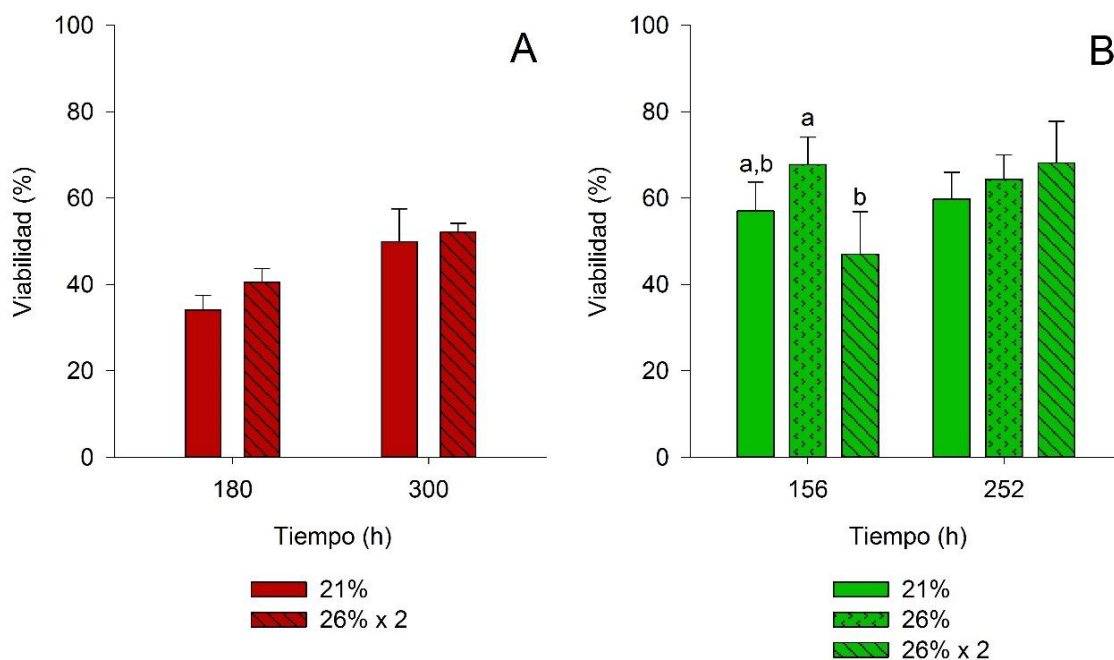
### **7.9.1. Germinación y viabilidad.**

Para la cepa ARSEF 3302 no se realizó la prueba de germinación ni viabilidad en el tratamiento 26% debido a que se observaron numerosos detritos celulares, los cuales no permitían distinguir entre conidios germinados y no germinados o realizar un conteo confiable de conidios en la cámara de Neubauer. Los conidios obtenidos en el tratamiento con atmósfera normal mostraron una germinación 50% mayor respecto al tratamiento 26% x 2 a las 180 h. Sin embargo a las 300 h, ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) (Figura 7.17A). La cepa CNRCB1 a las 156 h incrementó significativamente ( $P<0.05$ ) la germinación (7%) cuando se utilizó el tratamiento 26% respecto al tratamiento 21%, sin embargo entre los tratamiento oxidantes no se observaron diferencias significativas ( $P>0.05$ ). A las 252 h no se encontraron diferencias en ninguno de los tres tratamientos (Figura 7.17B).



**Figura 7.17.** Germinación de los conidios de *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1 en CSól en sistemas con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena.

En cuanto a la viabilidad, en el caso de la cepa ARSEF 3302 no se encontró diferencias entre los tratamientos 21 y 26% x 2 en ninguno de los dos tiempos evaluados (Figura 7.18A). Mientras que la cepa CNRCB1 a las 156 h no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento 21 y 26% o 21 y 26% x 2, sin embargo el tratamiento 26% mostró una mayor viabilidad respecto al 26% x 2. A las 252 h no se observaron diferencias entre ningún tratamiento (Figura 7.18B), de forma similar a la cepa ARSEF 3302.



**Figura 7.18.** Viabilidad de los conidios de *I. fumosorosea* A) ARSEF 3302 y B) CNRCB1 en CSól en sistemas con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena.

### 7.9.2 Termotolerancia.

Se realizó una prueba de termotolerancia a 40°C de los conidios de ambas cepas obtenidos en sistemas de CSól con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena (Tabla 7.5). En estos experimentos se evaluó la termotolerancia de la cepa ARSEF 3302, aun cuando no fue posible o confiable realizar las pruebas de germinación y viabilidad, la razón fue que para determinar el porcentaje de sobrevivencia se normalizan las u.f.c. obtenidas durante los tratamientos térmicos con una viabilidad inicial. A las 180 h los conidios de la cepa ARSEF 3302 obtenidos con el tratamiento 26% mostraron mayor termotolerancia respecto a los obtenidos en el tratamiento con atmósfera normal y 26% x 2, siendo 50 y 45% más tolerantes respecto a 21% y 26% x 2, respectivamente. A las 300 h la mayor termotolerancia fue obtenida con el tratamiento 26% x 2, sin embargo pareciera que este tratamiento fue capaz de mantener la termotolerancia desde las 180 h, mientras que los tratamientos 21 y 26% la disminuyeron de forma importante, en relación a los valores de  $TS_{50}$  obtenidos a las 180 h.

En el caso de la cepa CNRCB1 a las 156 h no se encontraron diferencias significativas ( $P>0.05$ ) en el  $TS_{50}$  entre los tres tratamientos analizados, sin embargo a las 252 h la mayor termotolerancia fue obtenida con el tratamiento 26% x 2, siendo 50 y 30% mayor que los tratamientos 21 y 26%, respectivamente. Estos datos fueron consistentes con los obtenidos para la cepa ARSEF 3302, sin embargo una diferencia importante es que la cepa CNRCB1 sí muestra un incremento significativo ( $P<0.05$ ) en la  $TS_{50}$  del tratamiento 26% x 2 entre las 156 y las 252 h, además que los tratamientos 21 y 26% mantienen prácticamente constante su termotolerancia entre estos tiempos.

**Tabla 7.5.** Termotolerancia de las cepas *Isaria fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1 en CSól en sistemas con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena.

| Cepa                  | Tiempo (h) | Tratamiento | $TS_{50}$ (h) <sup>§</sup> |               |
|-----------------------|------------|-------------|----------------------------|---------------|
| <i>I. fumosorosea</i> | 180        | 21%         | 0.66±0.04b                 |               |
|                       |            | 26%         | 0.99±0.04a                 |               |
|                       |            | 26% x 2     | 0.68±0.02b                 |               |
|                       | ARSEF 3302 | 300         | 21%                        | 0.003±0.0001b |
|                       |            |             | 26%                        | 0.003±0.0001b |
|                       |            |             | 26% x 2                    | 0.76±0.003a   |
| <i>I. fumosorosea</i> | 156        | 21%         | 0.74±0.01                  |               |
|                       |            | 26%         | 0.92±0.04                  |               |
|                       |            | 26% x 2     | 0.86±0.06                  |               |
|                       | CNRCB1     | 252         | 21%                        | 0.74±0.03b    |
|                       |            |             | 26%                        | 0.85±0.01b    |
|                       |            |             | 26% x 2                    | 1.11±0.09a    |

<sup>§</sup> Tiempo de sobrevivencia 50

### 7.9.3. Infectividad en sistemas con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena.

Se determinaron los parámetros de infectividad de ambas cepas para los conidios obtenidos en el sistema de CSól con 2.5 gsi de ambas cepas (Tabla 7.6). Los conidios de la cepa *I. fumosorosea* ARSEF 3302 de los 3 distintos tratamientos cosechados a las 180 h sólo mostraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el parámetro  $k$ , siendo este parámetro mayor en el tratamiento de atmósfera normal respecto a los tratamientos 26 y 26% x 2, los tratamientos con pulsos oxidantes no mostraron diferencias significativas entre sí ( $P > 0.05$ ). A las 300 h sí se observaron mejorías en algunos de los parámetros obtenidos en los tratamientos oxidantes, el  $t_0$  fue menor en los tratamientos oxidantes (1.01 y 1.04 d para 26 y 26% x 2, respectivamente) respecto a la atmósfera normal (1.81 d), este parámetro no difirió entre los dos tratamientos con pulsos de oxígeno. El parámetro  $k$  no mostró diferencias significativas entre los tratamientos 21 y 26% (1.21 y 1.01 d<sup>-1</sup>, respectivamente) ( $P > 0.05$ ), sin embargo, para el tratamiento 26% x 2 (0.59 d<sup>-1</sup>) fue menor respecto a los tratamientos anteriores. El  $TS_{50}$  también mostró diferencias significativas entre tratamientos, siendo menores en los tratamientos oxidantes (1.3 y 1.55 d, para 26 y 26% x 2, respectivamente), respecto a la atmósfera normal (2.05 d) ( $P < 0.05$ ).

Para la cepa CNRCB1 a las 156 h sólo se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el parámetro  $k$  siendo mayor en el tratamiento 26% x 2 (0.67d<sup>-1</sup>), respecto a los tratamientos 21 y 26% (0.31 y 0.37 d<sup>-1</sup>, respectivamente), los cuales no mostraron diferencia significativa entre sí. A las 252 h el  $t_0$  fue más corto en el tratamiento 26% (1.5 d) respecto a 21 y 26% x 2 (2.24 y 1.55 d, respectivamente), ningún otro parámetro mostró diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los tres tratamientos.

**Tabla 7.6.** Infectividad de los conidios obtenidos en sistemas con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena en CSól de las cepas *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1 en larvas de *G. mellonella*.

| Cepa                                | Tiempo (h) | Tratamiento | $t_0^a(d)^{\S}$ | $k^b(d^{-1})^{\S\S}$ | $TS_{50}^c(d)^{\S\S\S}$ |
|-------------------------------------|------------|-------------|-----------------|----------------------|-------------------------|
| <i>I. fumosorosea</i><br>ARSEF 3302 | 180        | 21%         | 1.98±0.02       | 1.72±0.20a           | 2.15±0.05               |
|                                     |            | 26%         | 1.89±0.07       | 0.51±0.04b           | 2.47±0.22               |
|                                     |            | 26% x 2     | 1.96±0.06       | 0.55±0.04b           | 2.51±0.11               |
|                                     | 300        | 21%         | 1.81±0.03b      | 1.21±0.11a           | 2.05±0.09b              |
|                                     |            | 26%         | 1.01±0.01a      | 1.01±0.04a           | 1.30±0.01a              |
|                                     |            | 26% x 2     | 1.04±0.05a      | 0.59±0.04b           | 1.55±0.16a              |
| <i>I. fumosorosea</i><br>CNRCB1     | 156        | 21%         | 1.77±0.19       | 0.31±0.05b           | 2.67±0.43               |
|                                     |            | 26%         | 1.82±0.12       | 0.37±0.04b           | 2.26±0.21               |
|                                     |            | 26% x 2     | 1.78±0.08       | 0.67±0.07a           | 2.31±0.14               |
|                                     | 252        | 21%         | 2.24±0.12b      | 0.38±0.06            | 3.38±0.21               |
|                                     |            | 26%         | 1.50±0.17a      | 0.25±0.04            | 3.04±0.39               |
|                                     |            | 26% x 2     | 1.55±0.21b      | 0.26±0.06            | 3.42±0.46               |

La sobrevivencia final fue cercana a cero y no significativa para ningún tratamiento. Los valores  $R^2$  mínimos obtenidos fueron de 0.92 y 0.90 para la cepa ARSEF 3302 y CNRCB1, respectivamente.

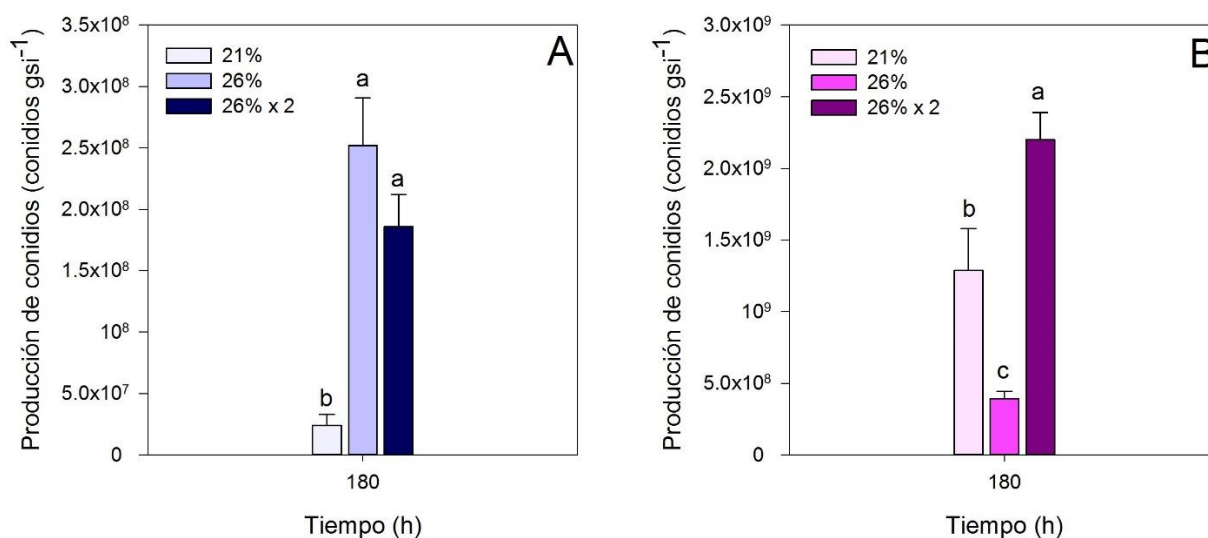
$\S$  Tiempo de muerte de la primera larva.

$\S\S$  Tasa específica de muerte.

$\S\S\S$  Tiempo de sobrevivencia 50.

### 7.10. Efecto de los pulsos oxidantes en sistemas de CSól con 2.5 gsi de la mezcla arroz-avena para otros hongos entomopatógenos.

Con el fin de determinar si los resultados obtenidos con las cepas de *I. fumosorosea* podían ser útiles para la producción de conidios en CSól de otros hongos entomopatógenos, se decidió evaluar los tratamientos oxidantes con 2.5 gsi en *M. anisopliae* CP-OAX y *B. bassiana* 882.5 a un tiempo único (180 h). Las cepas mencionadas anteriormente habían sido utilizadas para la evaluación de la conidiación en CSól con pulsos oxidantes utilizando 5 gsi sin lograr incrementar la conidiación (Garza-López y col., 2012; Gómez-Preciado 2014). Para la cepa *M. anisopliae* CP-OAX se logró un incremento en la conidiación respecto a la atmósfera normal de 10.5 veces utilizando el pulso 26%, y de 7.7 veces con el tratamiento 26% x 2, la producción entre ambos tratamientos oxidantes no mostró diferencias significativas ( $P>0.05$ ) (Figura 7.19A). En el caso de *B. bassiana* 882.5 el tratamiento 26% disminuyó la producción de conidios respecto a la atmósfera normal, sin embargo, con el tratamiento 26% x 2 se incrementó la producción de conidios 80% respecto al control con atmósfera normal (Figura 7.19B).



**Figura 7.19.** Producción de conidios de A) *M. anisopliae* CP-OAX y B) *B. bassiana* 882.5 en CSól con 2.5 gsi con los tratamientos 21, 26 y 26% x 2.

El efecto de los pulsos de oxígeno en la conidiación se observó incluso a simple vista (Figura 7.20), sobre todo en el caso de *M. anisopliae* CP-OAX debido al color verde característico durante la formación de conidios, ya que en los cultivos con tratamientos oxidantes el proceso de conidiación era evidente, en comparación al tratamiento atmósfera normal el cual sólo mostraba micelio de color blanco. En el caso de *B. bassiana* 882.5 con el tratamiento 26% se pudo observar una menor invasión del sustrato en comparación al tratamiento atmosférico, mientras que el tratamiento con doble pulso oxidante parece tener la mejor invasión de los sustratos, aunque no de forma evidente como se observó con *M. anisopliae* CP-OAX y las dos cepas de *I. fumosorosea* (Figura 7.13).



**Figura 7.20.** Morfología de crecimiento de *M. anisopliae* CP-OAX y *B. bassiana* 882.5 en CSól con 2.5 gsi.

## 8. Discusión.

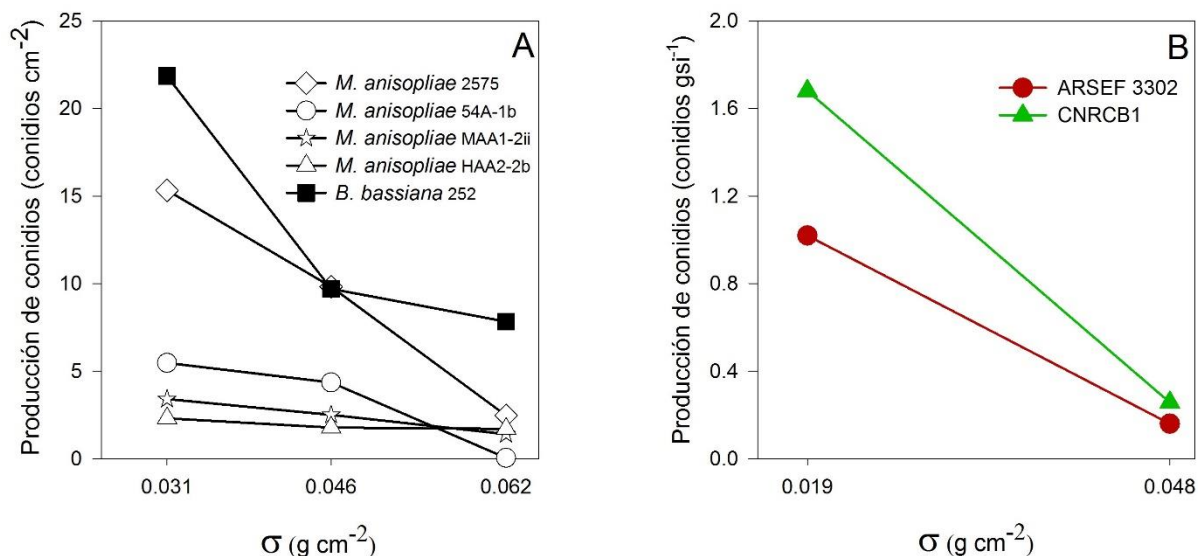
Frecuentemente los CSup son usados como modelos simplificados de CSól, sin embargo, se han reportado diferencias en la producción de biomasa, tasa de crecimiento y consumo de glucosa entre ambos sistemas de cultivo para *Aspergillus niger*, incluso los rendimientos de



biomasa son mayores para este hongo en CSól (Favela-Torres y col., 1998). Las diferencias entre estos cultivos están asociadas a las diferencias en el área específica,  $\alpha$  (relación área/volumen) (Ortega-Sánchez y col., 2012), siendo  $\alpha$  mayor en CSól. Ortega-Sánchez y col., (2012) estimaron con datos obtenidos por Auria y col. (1990) que las esferas de amberlita tienen un  $\alpha \approx 100 \text{ cm}^{-1}$ ; mientras que las placas con agar tienen un  $\alpha \approx 2 \text{ cm}^{-1}$ . El área específica también tenía efecto en la producción de conidios (Kamp y Bidochka, 2002). En el caso de cuatro cepas de *M. anisopliae* y una de *B. bassiana* aumentaron su conidiación al disminuir el grosor del agar, y por lo tanto incrementando  $\alpha$ , a pesar de estos resultados, en *L. lecanii* no se reportó un efecto sobre la conidiación al aumentar el valor de  $\alpha$ . El agar arroz-avena tiene un  $\alpha$  menor en CSup en comparación con el CSól, sin embargo, en este estudio la mayor producción de conidios fue obtenida en CSup, por lo tanto, parece ser que  $\alpha$  no está siempre asociada con una mayor conidiación.

Por otra parte Ortega-Sánchez y col. (2012) propusieron la disponibilidad de sustrato por área ( $\sigma$ ) como un factor para la normalización y comparación de distintos sistemas de CSól, ya que a valores bajos de  $\sigma$ , los rendimientos de biomasa son máximos en *Aspergillus niger*. De acuerdo con los datos reportados por Ortega-Sánchez y col. (2012) para valores de  $\sigma$  con 1 orden de magnitud de diferencia, los rendimientos de biomasa fueron 2.5 veces mayores en el sistema con el menor valor de  $\sigma$ . En este trabajo los valores  $\sigma$  de CSup son menores que en CSól, sin embargo estas diferencias parecerían no ser suficientemente grandes para justificar una producción de conidios 6 veces mayor en CSup respecto al CSól, si se considera el supuesto de que el rendimiento de biomasa es proporcional a la conidiación. Sin embargo, al analizar los datos reportados por Kamp y Bidochka (2002), donde la disminución de la altura del agar disminuye el valor de  $\sigma$ , observamos que la conidiación disminuye conforme aumenta  $\sigma$  (Figura 8.1A). Esto es similar a lo obtenido en este trabajo, cuando se aumenta el valor de  $\sigma$  al pasar de CSup a CSól, disminuye la producción de conidios de ambas cepas de *Isaria* (Figura 8.1B). De hecho, en el caso de los resultados de Kamp y Bidochka (2002) en la cepa *M. anisopliae* 2575, al disminuir a la mitad el valor  $\sigma$  (de 0.062 a 0.031  $\text{g cm}^{-2}$ ) se incrementa la conidiación 6 veces, este incremento es similar a la diferencia de la producción de conidios 6 veces mayor en CSup (0.333 gsi), respecto al CSól (5 gsi), entre los cuales, el valor  $\sigma$  es la mitad en CSup respecto al CSól. Para las otras cepas reportadas por Kamp y Bidochka (2002) disminuir la mitad del valor de  $\sigma$  provoca incrementos de 1.3 hasta 109.4 veces en la

producción de conidios. Este análisis demuestra que el valor de  $\sigma$  podría tener un efecto más importante en los rendimientos de conidiación que en los rendimientos de biomasa.



**Figura 8.1.** Cambios en la producción de conidios respecto a  $\sigma$ . A) Cepas utilizadas por Kamp y Bidochka (2002) en CSup con PDA (los valores de  $\sigma$  se calcularon de acuerdo a la información reportada en la metodología de ese trabajo), y B) cepas de *I. fumosorosea* utilizadas en esta tesis utilizando CSup (agar arroz-avena  $\sigma=0.019$  g cm<sup>-2</sup>) y CSól (arroz-avena  $\sigma=0.048$  g cm<sup>-2</sup>, este valor se calculó como un promedio de los  $\sigma$  de cada uno de los sustratos).

La estructura del sustrato también puede modificar el comportamiento de los hongos, en *Aspergillus oryzae* se han observado diferencias en el consumo máximo de oxígeno, siendo hasta 7 veces mayor cuando es cultivado en discos de harina de trigo en comparación con granos de trigo, esto fue atribuido al salvado de trigo que impide el crecimiento del hongo (Rahardjo y col., 2005); además la estructura del sustrato puede tener un efecto importante en la morfología de crecimiento del hongo, ya que *A. oryzae* fue capaz de formar hifas aéreas en los discos de harina, mientras que en los granos de trigo no se desarrollaron estas estructuras. El arroz no contiene salvado, pero las hojuelas de avena contienen una capa de salvado que podría dificultar el acceso al endospermo, y por lo tanto el crecimiento de biomasa y la producción de conidios podrían ser menores a los obtenidos en CSup, donde todos los

nutrientes se encuentran disponibles, facilitado por el tamaño de las partículas. Con el fin de probar esta hipótesis se realizaron cultivos superficiales y sólidos en los sustratos de forma separada (arroz y avena) y también incluyendo la mezcla arroz-avena, en el caso de ambos sistemas con arroz como único sustrato se obtuvieron resultados ligeramente diferentes a los obtenidos con avena o la mezcla arroz-avena, ya que en el caso de la cepa ARSEF 3302 en el primer tiempo en el que fue analizada la producción de conidios (180 h), el CSól fue mejor en la producción de conidios respecto al CSup, sin embargo este fenómeno se revirtió al segundo tiempo de evaluación (300 h) ya que la producción de conidios fue mayor en CSup respecto al CSól. De forma similar, la cepa CNRCB1 mostró una mayor producción de conidios a las 156 h en CSól, mientras que a las 252 h no hubo diferencia entre ambos sistemas de cultivo utilizando arroz. En algunos casos, el arroz en CSól resultó ser un sustrato equiparable o superior para la producción de conidios en comparación a las hojuelas de avena y la mezcla arroz-avena en CSól. La avena mostró ser superior en CSup respecto al CSól en la producción de conidios, probablemente a que cuando las hojuelas se muelen, la estructura de salvado se rompe y los nutrientes se encuentran disponibles para ser utilizados por los hongos. Además, el tamaño de partícula también disminuye cuando ocurre la molienda de los sustratos, y esto puede tener un efecto importante durante la producción de enzimas. En *Pleurotus ostreatus*, la producción de lacasas y xilanasas tienden a disminuir conforme se reduce el tamaño de partícula de sustrato. Sin embargo, la producción de celulasas incrementa; estos comportamientos varían ligeramente dependiendo del tipo de cepa utilizada, por lo que son criterios que deben evaluarse para los distintos tipos de procesos biotecnológicos (Membrillo y col., 2008). Si bien estos resultados no eran concluyentes para asegurar que las diferencias de producción de conidios entre ambos sistemas de cultivo se deben a la presencia de la capa de salvado en la avena, hay evidencia de que la hipótesis tiene validez. Tlecuítl-Beristain y col. (2010) reportaron que la harina de avena es mejor que la harina de arroz en CSup para la producción de conidios de *M. anisopliae* CP-OAX, sin embargo en ese trabajo no se analizó la mezcla harina de arroz-avena. Por otra parte, Gómez-Preciado (2014) reportó que la mezcla arroz-avena como sustrato sólido, generaba una mayor producción de conidios en *M. anisopliae* CP-OAX, respecto a los granos de arroz, mientras que no existía diferencia significativa entre la mezcla y las hojuelas de avena utilizadas de forma separada. Se sugiere que esta ventaja de la mezcla arroz-avena frente al arroz podría deberse a una complementación de nutrientes por parte de ambos sustratos.

De acuerdo con la información nutrimental de los empaques del arroz y la avena utilizados, las proporciones de carbohidratos y proteínas varían de forma considerable entre ambos sustratos, ya que el arroz contiene 17% más carbohidratos que las hojuelas de avena. Por otra parte las hojuelas de avena poseen 60% más proteína que el arroz (Tabla 8.1). Esto explica porque la avena en CSup es superior en la producción de conidios respecto al arroz, ya que las relaciones C/N bajas pueden favorecer la producción de conidios en *M. anisopliae* CP-OAX, y los valores reportados de C/N para arroz y avena son de 20.46 y 15.71, respectivamente (Tlecuítl-Beristain y col., 2010).

Tabla 8.1. Información nutrimental del arroz y avena reportada por los productos comerciales.

| Sustrato | Carbohidratos (g) | Proteínas (g) | Grasa (g) |
|----------|-------------------|---------------|-----------|
| Arroz    | 0.8               | 0.07          | 0         |
| Avena    | 0.68              | 0.11          | 0.06      |

Los valores de cada nutriente corresponden a 1 g de sustrato.

Las producciones de conidios en los sistemas de CSup con 0.333 gsi estuvieron en el orden de  $10^{10}$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$  para ambas cepas de *I. fumosorosea*, y fueron similares a las producciones de conidios en CSup con agar avena enriquecido con peptona (0.433 gsi), las cuales fueron equivalentes a  $10^9$  y  $1.8 \times 10^{10}$  conidios gsi, para ARSEF 3302 y CNRCB1, respectivamente (Miranda-Hernández y col., 2014). Para estas mismas cepas en CSól con arroz como único sustrato, las producciones de conidios reportadas por Angel-Cuapio y col., (2015), estuvieron en el orden de  $10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ , lo cual coincide con lo observado en este trabajo. En general, las producciones de hongos entomopatógenos suelen estar en el orden de  $10^9$  conidios gsi en CSól (Angel-Cuapio y col., 2015; Garza-López y col., 2014; Gómez-Preciado, 2014; Pham y col., 2010).

Para confirmar que en CSup existía un mejor crecimiento por parte de ambas cepas de *I. fumosorosea* se llevaron a cabo determinaciones indirectas de la producción de biomasa por medio del seguimiento de la producción de  $\text{CO}_2$  en ambos sistemas de cultivo, esto es debido a la dificultad de evaluar la biomasa directamente en los sistemas de estudio utilizados, un

problema frecuente en el CSól (Desgranges y col., 1991). Los resultados obtenidos mostraron que la cantidad de CO<sub>2</sub> producida por gsi era 3 veces mayor en los CSup respecto al CSól, lo cual se puede relacionar con una mayor producción de biomasa en el CSup. Estos valores sí permiten explicar la diferencia de producción de conidios entre ambos sistemas. De acuerdo con Angel-Cuapio (2016) la  $Re_{max}$  de *I. fumosorosea* CNRCB1 en un sistema sólido con arroz como único sustrato fue de 2.1 mg de CO<sub>2</sub> gsi<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, este valor es ligeramente mayor al obtenido en este trabajo, y esto podría estar justificado por el uso de arroz que no posee pared de salvado y cuyos efectos ya han sido descritos anteriormente. Es importante señalar que cuando la  $Re_{max}$  no se estandariza por gsi, los comportamientos entre ambos sistemas se revierten, siendo mayores en CSól respecto al CSup, debido a una mayor cantidad de sustrato en CSól respecto al CSup, más adelante se discute la importancia de esto. Otra utilidad de la respirometría fue determinar el estado de crecimiento fisiológico en el que se inicia la aplicación de los tratamientos oxidantes (60 h). Suponiendo que los sistemas en matraces reflejan el comportamiento en las botellas serológicas, los pulsos oxidantes son aplicados en la etapa estacionaria, independientemente de la cepa y sistema de cultivo. Esto resulta importante ya que en *M. anisopliae* CP-OAX la producción de conidios en atmósfera oxidantes fue evaluado también aplicando los pulsos desde las 60 h de cultivo, sin embargo para esta cepa el estado de crecimiento fisiológico donde inician los pulsos oxidantes es al final de la etapa exponencial (Tlecuitl-Beristain y col., 2010); además de que se ha reportado que el tiempo de aplicación de los pulsos oxidantes tiene un efecto importante en la respuesta de conidiación en *M. anisopliae* (García-Ortiz y col., 2015), por lo tanto las diferencias en la respuesta de conidiación (y probablemente calidad) a la aplicación de pulsos oxidantes entre diferentes cepas podría ser explicada por estas pequeñas variaciones en el estado fisiológico en que los pulsos oxidantes fueron aplicados.

La aplicación de pulsos de oxígeno mejoró la producción de conidios de *M. anisopliae* CP-OAX e *I. fumosorosea* ARSEF 3302 en CSup en el medio agar avena enriquecido con peptona de carne (García Ortiz y col., 2015; Miranda Hernández y col., 2014; Tlecuitl-Beristain y col., 2010). Por esta razón resultaba interesante determinar el efecto de la aplicación de atmósferas oxidantes en la producción de conidios de ambas cepas de *I. fumosorosea* en CSól. Inicialmente se estandarizaron ambos sistemas de cultivo utilizando una relación de inóculo-gramos de sustrato inicial (1x10<sup>6</sup> conidios gsi<sup>-1</sup>). Cuando se evaluó el efecto de los pulsos oxidantes, sin importar el sistema de cultivo, la cepa o la aplicación de 1 o 2 pulsos cada 24 h,

la producción de conidios disminuyó en comparación al control de atmósfera normal. Sin embargo, los tratamientos oxidantes en el CSól resultaron más afectados en comparación a sus contrapartes en CSup, sumado a esta situación también se observó escaso crecimiento e invasión del sustrato, y ningún efecto positivo en la calidad de los conidios.

La primera hipótesis a estos resultados era que debía existir una diferencia importante en la biomasa total en ambos sistemas de cultivo, siendo mayor en el CSól, por lo que la cantidad de oxígeno suministrada debía ser insuficiente para mantener activo el metabolismo y la conidiación del hongo, por lo tanto las condiciones hiperoxidantes debían estar presentes por un periodo de tiempo limitado, y además podría ocurrir una acumulación importante de CO<sub>2</sub> la cual podría ser diferente entre ambos sistemas. Esta hipótesis era apoyada por la diferencia en la cantidad de sustrato inicial, ya que en el CSup esta fue de 0.333 g y en el CSól de 5 g, es decir 15 veces más sustrato en CSól respecto al CSup. Los datos de respirometría sustentaban la hipótesis ya que si la  $Re_{max}$  se expresa como mg de CO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup>, es decir sin estandarizar con los gramos de sustrato inicial, se obtienen valores mayores de  $Re_{max}$  en CSól respecto al CSup, lo que posiblemente reflejaría una mayor cantidad de biomasa total en CSól. La producción de CO<sub>2</sub> no sólo es útil para seguir el proceso fermentativo desde su fisiología (Desgranges y col., 1991), también puede utilizarse como una estimación de la biomasa total (Lareo y col., 2006). La producción de biomasa de *Mucor bacilliformis* presenta una correlación positiva con la producción de CO<sub>2</sub>, es decir entre mayor sea la producción de biomasa mayor será la tasa de producción de CO<sub>2</sub>. Incluso, el incremento en la concentración de nutrientes en un medio, incrementa la tasa de producción de CO<sub>2</sub>, como se observa en este trabajo, sin embargo el incremento no es directamente proporcional, ya que aumentar 2.5 o 4 veces la concentración de nutrientes, sólo incrementa 1.4 y 2.3 veces, respectivamente, la tasa de producción de CO<sub>2</sub> (Lareo y col., 2006).

Debido a las razones mencionadas en el párrafo anterior se decidió analizar los contenidos residuales de oxígeno y CO<sub>2</sub> en los sistemas donde se aplicaron los pulsos de oxígeno. Estos resultados mostraron diferencias importantes en cuanto a los residuales de oxígeno y la acumulación de CO<sub>2</sub>, entre sistemas superficiales y sólidos, ya que los CSup lograban mantener niveles de oxígeno superiores (aunque en condiciones hipóxicas) al CSól y por lo tanto menores niveles de CO<sub>2</sub> acumulado. En los CSól la cantidad de oxígeno era cercana al 0% en numerosos casos, incluso la aplicación de dos pulsos en 24 h no era suficiente para mantener los niveles de oxígeno o, por otra parte, mantener una baja concentración de CO<sub>2</sub>.

Incluso cuando se aplican los pulsos 26%, ambas cepas enfrentaron algún tipo de estrés severo ya que después de la primer aplicación del pulso utilizaron sólo una pequeña cantidad de oxígeno, y este efecto mostró una leve recuperación 24 h después, posteriormente las cepas son capaces de aclimatarse a las condiciones cíclicas de hiperoxia-hipoxia-anoxia. Este tipo de adaptaciones a diferentes formas de estrés cíclico se ha reportado en *Saccharomyces cerevisiae* (Dhar y col., 2013). En *I. fumosorosea* no existe ningún reporte acerca del efecto de las condiciones hipoxia-anoxia, sin embargo en otros hongos aerobios estrictos como *Aspergillus nidulans* y *Trichoderma reesei* se ha observado una modificación transcripcional radical, viéndose subregulada la expresión de genes del ciclo de Krebs y la sobreexpresión de genes que codifican a enzimas del metabolismo de las pentosas bajo condiciones hipóxicas, y que en el caso de *T. reesei* los cambios descritos se ven de forma más pronunciada durante la transición de hipoxia a anoxia (Bonaccorsi y col., 2006; Shimizu y col., 2008). Las condiciones anóxicas pueden llevar a la aparición de marcadores de daño celular como la desaminación de bases nitrogenadas, que está frecuentemente asociada al daño a ADN o la sobreexpresión de proteínas de choque térmico en *T. reesei*.

La acumulación de CO<sub>2</sub>, también puede acarrear problemas al cultivo, ya que la conidiación de *Neurospora crassa* es inhibida por CO<sub>2</sub> y la aeración de los cultivos contribuye a mantener niveles bajos de CO<sub>2</sub> (Sargent y Kaltenbo, 1972). La inhibición de la conidiación por CO<sub>2</sub> en *N. crassa* es atribuida al factor de transcripción CHC-1 (Sun y col., 2011). Además la aplicación de una atmósfera enriquecida con 5% de CO<sub>2</sub> disminuyó hasta en un 85% la producción de conidios en *B. bassiana* 882.5 en CSól en un sistema utilizando botellas serológicas (Garza-López y col., 2011). Miranda-Hernández y col. (2014) mencionan que no hay una respuesta generalizada a la exposición a atmósferas oxidantes, esto es apoyado por el trabajo de Garza-López y col. (2012), ya que no se encuentran diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en la producción de conidios de *B. bassiana* al día 8 de cultivo comparado en tratamiento con pulsos de 26% de oxígeno, respecto al tratamiento con atmósfera normal. Con los resultados obtenidos no se puede concluir si el efecto de los pulsos de oxígeno en la conidiación se debe a un bajo nivel de oxígeno, la acumulación de CO<sub>2</sub> o un efecto combinado de ambos, sin embargo la cantidad de sustrato inicial y la cantidad total de oxígeno, y no sólo su porcentaje en la atmósfera, pueden ser los responsables de la falta de un efecto positivo en la conidiación como ha sido reportado en *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* CNRCB1. Por esta razón se

modificó la cantidad de sustrato inicial en ambos sistemas con el fin de estandarizar completamente los dos sistemas de cultivo.

En el caso del CSup se incrementó el sustrato inicial a 1 gramo y en el CSól se disminuyó a 1 gramo, y posteriormente se evaluó la producción de conidios, los residuales de oxígeno y la acumulación de CO<sub>2</sub> con los mismos tratamientos oxidantes. Los resultados obtenidos en los CSup mostraron en general una disminución en la conidiación cuando se aplicaron los pulsos oxidantes, sin embargo los CSól mostraron un incremento en la producción de conidios. En el caso de la cepa CNRCB1 el incremento fue de hasta 1 orden de magnitud con el tratamiento 26% respecto a la atmósfera control. Como se mencionó en la sección de *Resultados*, este sistema con 1 gsi en CSup y CSól está estandarizado en términos de  $\sigma$ , al comparar la producción de conidios entre ambos sistemas en condiciones de atmósfera normal, se observan diferencias de 5 a 43 veces mayores en la producción de conidios en CSup respecto a CSól. Estos resultados podrían indicar que la ausencia del salvado de avena es el factor más importante para explicar la mayor producción de conidios en CSup, ya que bajo estas condiciones no pueden explicarse en términos de  $\sigma$ . Las diferencias en la conidiación en los sistemas anteriores con 1 gsi contrastan fuertemente con los resultados obtenidos en CSup y CSól con 0.333 y 5 gsi, respectivamente, donde las diferencias de conidios eran 6 veces mayores en CSup respecto al CSól para ambas cepas (Figura 7.1). Estas diferencias se pueden explicar desde el punto de vista de la inoculación, ya que los CSól con 1 gsi poseen muy pocos granos de arroz y hojuelas de avena, por lo que parte del inóculo queda sobre el vidrio de la botella serológica y no sobre los sustratos, lo que probablemente cause un retraso importante en la conidiación. Las producciones de conidios en CSól con 2.5 gsi refuerzan esta idea, ya que las producciones de conidios son mayores a las del sistema con 1 gsi en CSól, y donde el inóculo tiene mayor probabilidad de mantenerse en los sustratos, por la mayor cantidad de estos.

Posteriormente, se decidió estudiar el efecto de los pulsos oxidantes en un tercer sistema con 2.5 gsi, el cual sólo fue realizado en CSól, en este sistema aun fue posible estimular la conidiación de ambas cepas, sin embargo en menor medida y los tratamientos 26% x 2 mostraron ser mejores en comparación al tratamiento 26%, ya que en el caso de la cepa ARSEF 3302 el tratamiento 26% no logró incrementar la producción de conidios respecto al control con atmósfera normal, y en CNRCB1 la respuesta fue mayor conidiación respecto al control, pero menor respecto al doble pulso. En este sentido, al existir una mayor cantidad de



biomasa total en el sistema con 2.5 gsi, los requerimientos de oxígeno deben ser mayores respecto al sistema con 1 gsi, y en consecuencia la atmósfera hiperoxidante se mantiene durante menos tiempo en el sistema, disminuyendo la capacidad de estimular la conidiación. Las producciones de conidios en el sistema de CSól con 2.5 gsi, fueron en su mayoría de  $10^9$  conidios  $\text{gsi}^{-1}$ , lo cual es consistente con las producciones de conidios típicas que se obtienen en CSól.

En cuanto a los residuales de oxígeno y acumulación de  $\text{CO}_2$  en los sistemas con 1 gsi, los mayores residuales de oxígeno fueron obtenidos en el CSól, en comparación al CSup y por lo tanto la mayor acumulación de  $\text{CO}_2$  ocurrió en el CSup, que coincide con el hecho de que el  $\text{CO}_2$  inhibe la conidiación como se mencionó anteriormente. Estos datos son consistentes con los obtenidos en la respirometría donde se ha discutido que podrían explicarse por la diferencia en la disponibilidad de los nutrientes en ambos sistemas de cultivo debido a las estructuras de los sustratos. En el sistema con 2.5 gsi se observó que la cantidad de oxígeno residual no variaba de forma importante entre los tratamientos 26% y 26% x 2, incluso tampoco había una diferencia clara con el sistema con 1 gsi. Sin embargo, el  $\text{CO}_2$  acumulado sí mostraba diferencias en ambas cepas entre los dos tratamientos oxidantes, siendo menores cuando se aplicaban dos pulsos diarios y más notables en las mediciones finales del cultivo; mientras que al comparar con el sistema de 1 gsi, el  $\text{CO}_2$  acumulado fue mayor en el sistema con 2.5 gsi. Estos resultados muestran que el  $\text{CO}_2$  sí tiene un efecto inhibitorio de la conidiación, ya que las diferencias entre los tratamientos 26% y 26% x 2 no pueden explicarse en su totalidad por la cantidad residual de oxígeno. Los sistemas con 1 y 2.5 gsi fueron capaces de mantener, hasta la siguiente aplicación de pulsos oxidantes, niveles de oxígeno cercanos a los que se presenta en la atmósfera, a diferencia del sistema con 5 gsi, esto quiere decir que la atmósfera oxidante se mantuvo durante tiempo suficiente para poder estimular la conidiación de las cepas, debido a menores cantidades de biomasa total producida y en consecuencia menor demanda de oxígeno en comparación al sistema con 5 gsi en CSól.

Gómez-Preciado (2014) reportó que el cultivo de *M. anisopliae* CP-OAX en CSól con 5 gsi de una mezcla de arroz-avena, también resultó en una disminución de la conidiación en el tratamiento con un pulso de 26% de oxígeno respecto a la atmósfera normal, mientras que Garza-López y col., (2012) reportaron que en *B. bassiana* 882.5 en CSól con 5 gsi de arroz la aplicación de dos pulsos diarios de 26% de oxígeno no afectaba de forma significativa la producción de conidios en comparación a la atmósfera normal. Estos resultados pueden

explicarse debido a una incorrecta relación de volumen-sustrato, ya que en este trabajo al disminuir en ambas cepas la cantidad de sustrato se logró estimular la conidiación, lo cual muestra la importancia y robustez de la relación del volumen del reactor y los gramos de sustrato en el que son aplicados los pulsos oxidantes.

Estos resultados señalan que la relación del volumen de la botella serológica y la cantidad de sustrato inicial (que puede limitar la formación de biomasa total) son variables fundamentales que deben ser considerados para el cultivo y sobreproducción de conidios de hongos entomopatógenos durante la aplicación de atmósferas oxidantes. Incluso esta relación podría considerarse como un factor de escalamiento a nivel industrial, que puede definir la factibilidad de esta metodología debido a la restricción en el espacio donde estos hongos son cultivados, ya que para tener resultados positivos en conidiación al menos deberá asegurarse que esta relación sea de 48 mL de volumen por cada gsi (equivalente a 8.12 mmol de oxígeno gsi<sup>-1</sup> L<sup>-1</sup>) en cada pulso oxidante que se aplique, calculado a partir de un volumen de 120 mL en el biorreactor utilizado (botella serológica). Además, será necesario evaluar la aplicación de 1 o 2 pulsos, ya que en algunos casos el pulso único resulta insuficiente para estimular la conidiación. Suponiendo que se desea utilizar 1 kg de sustrato, entonces sería necesario contar con un volumen de por lo menos 48 L para la modificación de la atmósfera. Sin embargo, otras alternativas podrían ser estudiadas como el uso de atmósferas con un mayor porcentaje de oxígeno, que ya se han probado en *M. anisopliae* en CSup (García-Ortiz y col., 2015), o bien la aplicación de sistemas en continuo con oxígeno al 26%. Otra consideración importante que deberá ser tomada en cuenta a la hora de diseñar los reactores que cumplan la relación volumen-sustrato, es la forma del arreglo del sustrato ya que esto es frecuentemente realizado en bolsas donde el tamaño de lecho es considerable y podría tener un efecto importante en los gradientes de oxígeno y la estimulación del micelio que crece en el interior del lecho, que será necesario evaluar antes de realizar escalamientos con los sistemas de pulsos oxidantes. Otra variable identificada es el tiempo en el que se aplica el pulso, conocida como tiempo de competencia (García-Ortiz y col., 2015).

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son producidas en el metabolismo celular, las células pueden lidiar con ellas mediante mecanismos antioxidantes como la reducción del oxígeno mediante el metabolismo de nutrientes, los sistemas enzimáticos antioxidantes y las moléculas con capacidad antioxidantes. Cuando estos mecanismos de protección son superados y por lo tanto las especies reactivas se acumulan y sobrepasan la capacidad antioxidante de la

célula, se lleva a cabo la diferenciación como estrategia de sobrevivencia. En *Neurospora crassa* la diferenciación celular de hifas a conidios es precedida por estados oxidantes en los cuales ocurre la acumulación de especies reactivas de oxígeno y oxidación de proteínas (Hansberg, 1993; Toledo y Hansberg, 1990). En este caso la diferenciación a conidios es parte de una respuesta celular para evitar y limitar el daño por estrés oxidante. La adición de algunos antioxidantes puede retrasar los eventos de diferenciación celular. En *Aspergillus nidulans* la producción de ERO por las enzimas NADPH oxidasas inicia el proceso de diferenciación de cuerpos fructíferos sexuales, cuando el gen de esta enzima se elimina no ocurre la formación de cuerpos fructíferos, sin embargo otros procesos de diferenciación como la conidiación no se afectan (Lara-Ortiz y col., 2003). Los pulsos enriquecidos en oxígeno son capaces de causar estados oxidantes, en el caso de *B. bassiana* se ha detectado que la aplicación de pulsos de 26% de oxígeno incrementan la lipoperoxidación en comparación a la atmósfera normal (Garza-López y col., 2012). Además, recientemente se ha comprobado un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno en *B. bassiana* cuando se realizó la modificación atmosférica (Pérez-Guzmán y col., 2016). Sin embargo, estos resultados deben de tomarse con precaución ya que los sistemas utilizados en esos experimentos utilizan 5 gsi de arroz, por lo que no es posible determinar si este efecto se debe a un estrés oxidante por anoxia o efectivamente a una atmósfera hiperoxidante. Por lo tanto, es posible que la exposición de *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1, *M. anisopliae* CP-OAX y *B. bassiana* 882.5 a una atmósfera hiperoxidante podría ser capaz de promover la diferenciación de micelio a conidios debido a posibles alteraciones en la cantidad de ERO intracelulares.

La germinación es un parámetro de calidad importante porque está relacionada con la eficacia de los micoinsecticidas (Jenkins y Grzywacz, 2000), la virulencia (Altre y col., 1999; Miranda-Hernández y col., 2014) y la estabilidad durante el almacenamiento y la formulación (Batta, 2007). Durante los procesos de selección de cepas es frecuente la evaluación de distintos parámetros de calidad de conidios obtenidos mediante el crecimiento en CSup, sin embargo no existía evidencia de que estos resultados fueran los mismos cuando se producen conidios en CSól. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la germinación de los conidios de ambas cepas no mostró diferencias entre sistema de CSup y CSól, por lo que es posible estimar este parámetro en el CSup siempre y cuando la composición nutricional del medio sea la misma, ya que se ha reportado que diferentes medios de cultivo pueden tener un efecto importante en la germinación de blastosporas de *I. fumosorosea* (Cliquet y Jackson, 2005).

Además, la tasa de germinación de blastosporas y conidios está directamente relacionada con el contenido proteico intracelular, el cual será mayor cuando el crecimiento se realiza en cultivos nutricionalmente ricos en nitrógeno (Jackson y Schisler, 1992). En *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1 se ha reportado que la germinación se incrementa cuando se aplican pulsos de oxígeno de 26% en CSup utilizando el medio agar avena adicionado con peptona de carne (Miranda-Hernández y col., 2014). En este trabajo al utilizar el sistema de CSup y CSól con 0.333 y 5 gsi, la germinación de los conidios no se afectó cuando se aplicaron los pulsos de oxígeno, sin embargo la germinación de los conidios de ambas cepas fue tan alta como las observadas por Miranda-Hernández y col. (2014) en su mejor tratamiento. Cuando se evaluó la germinación del sistema con 2.5 gsi, tampoco se observó una mejoría notable en los tratamientos con pulsos de oxígeno, incluso para la cepa ARSEF 3302 disminuyó en el primer tiempo de evaluación.

La viabilidad de los conidios en general no mostró diferencias en ambos sistemas de cultivo, por lo que puede ser estimada a partir de datos obtenidos en CSup. Aun cuando la germinación no se afectó por los tratamientos con pulsos de oxígeno en sistemas con 0.333 y 5 gsi para sistemas de CSup y CSól, respectivamente, la viabilidad de los conidios de las cepas ARSEF 3302 y CNRCB1 se incrementó en CSup (con 0.333 gsi) a las 180 y 156 h, respectivamente, al aplicar cualquiera de los tratamientos con pulsos oxidantes en comparación a la atmósfera normal. En *B. bassiana* 88 también se reportó un incremento en la viabilidad de los conidios cuando se expone a atmósferas oxidantes respecto al crecimiento en una atmósfera normal, sin embargo este efecto parece restringirse a la cepa silvestre, ya que la mutante derivada no parece afectar su viabilidad cuando se somete a pulsos oxidantes (Rodríguez-Gomez y col., 2015).

Los pulsos de oxígeno de 26% aumentaron la actividad catalasa en ambas cepas de *I. fumosorosea* (Miranda-Hernández y col., 2014), este incremento en la respuesta antioxidante ha sido relacionado con el incremento en la germinación en *M. anisopliae*, ya que la sobreexpresión del gen *cat1* incrementó la tasa de germinación y viabilidad de conidios cuando fueron expuestos a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Morales-Hernández y col., 2010). Estos resultados podrían explicar el aumento en la viabilidad en CSup. Para CSól no se incrementó la viabilidad de los conidios con los pulsos oxidantes en ninguno de los dos sistemas utilizados (5 o 2.5 gsi), en el caso del sistema con 5 gsi podría ser atribuido a la falta de estimulación del pulso enriquecido, ya que como se ha demostrado el consumo de oxígeno es mayor, mientras que para el sistema

con 2.5 gsi aunque la atmósfera hiperoxidante se mantiene por mayor tiempo, no se logra el umbral de tiempo necesario que si ocurre en el CSup o algún otro factor desconocido sea el causante de la variabilidad en las pruebas de calidad.

En el caso de la infectividad, tampoco es recomendable inferirla en CSól a partir de resultados en CSup, ya que en el caso de la cepa ARSEF 3302 los parámetros de infectividad fueron diferentes entre ambos sistemas de cultivo en los dos tiempos en los que fueron evaluados. En el caso de la cepa CNRCB1 la infectividad de los conidios fue igual entre sistema de CSup y CSól en el segundo tiempo de evaluación. En general se observó que los parámetros de infectividad eran mejores en CSól cuando eran evaluados en los primeros tiempos, es decir, cuando se está en el tiempo máximo de producción de conidios en el CSól, mientras que estos parámetros eran superiores en CSup en el segundo tiempo de evaluación, lo que corresponde con el tiempo máximo de producción de conidios en el CSup. También de forma general los parámetros de infectividad parecieran disminuir conforme pasa el tiempo de cultivo. No está claro a que se deben estas diferencias en la infectividad de los conidios entre ambos sistemas de cultivo, sin embargo podría deberse a un efecto del estado fisiológico del cultivo en el que se realiza la cosecha, ya que como se mostró en la Figura 7.1, los máximos de conidiación no ocurren en el mismo tiempo por lo que algunas características podrían modificarse en los conidios. Es importante considerar que si se infiere la infectividad en CSól a partir de datos obtenidos en CSup, en el tiempo máximo de conidiación los datos de infectividad serían menores a los obtenidos en CSól y por lo tanto la infectividad de la cepa podría ser subestimada. Miranda-Hernández y col. (2014), reportaron un incremento en la infectividad de las cepas de *I. fumosorosea* utilizadas en este trabajo cuando se obtuvieron conidios en atmósferas oxidantes a partir de CSup, sin embargo estos resultados no pudieron observarse en la cepa ARSEF 3302 en sistema CSup y CSól con 0.333 y 5 gsi, respectivamente; en el caso de la cepa CNRCB1 se observó un incremento en la infectividad a las 156 h cuando se aplicó el doble pulso en CSup, sin embargo en el segundo tiempo de medición este resultado se revirtió, resultando en una disminución de la infectividad en comparación al tratamiento atmosférico. Resulta interesante que ningún CSól con 5 gsi mostró una mejora general de la infectividad, lo que fortalece la hipótesis sobre el rápido agotamiento de la atmósfera hiperoxidante, que impide un efecto positivo en conidiación y mejoras en la calidad de los conidios.

En el caso de los sistemas de CSól con 2.5 gsi, se observaron algunas mejoras en la infectividad en ambas cepas utilizando los pulsos oxidantes, sobre todo en la cepa ARSEF 3302 en el segundo tiempo de evaluación, donde el tiempo de inicio de muerte y el tiempo de sobrevivencia 50 fueron mejores en ambos tratamientos oxidantes en comparación al tratamiento con atmósfera normal. El incremento en la infectividad bajo atmósferas oxidantes de estas dos cepas, reportado previamente, se relacionó con un incremento en la actividad catalasa, de forma similar al incremento en germinación, ya que algunos estudios han reportado una relación entre estas enzimas y la infectividad en *B. bassiana* (Wang y col., 2013), *M. anisopliae* (Morales-Hernández y col., 2010) y el fitopatógeno *Magnaporthe grisea* (Skamnioti y col., 2007). Las funciones de estas enzimas no siempre son claras, ya que en algunos de estos trabajos se reporta la acción directa de las enzimas a la desintoxicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por el hospedero como mecanismo de defensa y en otros trabajos como parte de la señalización para desarrollo de estructuras de infección y fortificación de la pared celular. Una parte en la complejidad de este análisis se debe a que existen varios genes de catalasas, con regulación diferencial, en los hongos (Wang y col., 2013).

Durante la aplicación en campo, los conidios de hongos entomopatógenos están frecuentemente expuestos a altas temperaturas, por lo que la viabilidad de los propágulos se ve comprometida, además los insectos elevan su temperatura corporal o se exponen a fuentes de calor como un mecanismo de defensa a la infección (Anderson y col., 2013; Kalsbeek y col., 2001). Es por esto que resulta necesario evaluar la capacidad de sobrevivencia de los hongos entomopatógenos en temperaturas superiores a las que se realiza la producción de conidios (28°C). En este trabajo se mejoró la termotolerancia de conidios obtenidos en los sistemas de CSól con 2.5 gsi cuando se aplicaron atmósferas hiperoxidantes. Este efecto fue evidente en los tratamientos 26% x 2 en el segundo tiempo de evaluación, estos resultados son parcialmente consistentes con otros reportes para *M. anisopliae* CP-OAX, *I. fumosorosea* ARSEF 3302 y CNRCB1 en CSup (García-Ortíz y col., 2015; Miranda-Hernández y col., 2014). En *M. anisopliae* este incremento es dependiente del porcentaje de oxígeno que se aplica, ya que la termotolerancia se incrementa sólo en conidios producidos con atmósferas 30 y 40% de oxígeno.

Esta mejora en la termotolerancia podría deberse a un mecanismo de protección cruzada, que ocurre cuando un microorganismo se expone a una condición de estrés subletal, que a su vez le genera protección contra otro tipo de estrés diferente al que fue expuesto inicialmente (Dhar

y col., 2013). Esto se debe a que en los organismos eucariontes numerosos genes involucrados en la respuesta al estrés tienen secuencias reguladoras *cis* conocidas como STRE (*stress response elements*). Los STRE son secuencias de ADN no codificantes con secuencias consenso 5'-AGGGG-3', localizadas en los promotores de numerosos genes implicados en daño a ADN (Kobayashi y McEntee, 1993), catalasas y superóxido dismutasas (Hong y col., 2013; Kandor y col., 2004), y síntesis de trehalosa y polioles (Kobayashi y col., 2013; Parrou y col., 1999). De esta forma cuando un tipo específico de estrés se presenta, se activan las respuestas contra diferentes tipos de estrés (Gasch y col., 2000). Un ejemplo es el factor de transcripción Msn2 en *M. robertsii* y *B. bassiana*, implicado en la resistencia a varios tipos de estrés como oxidativo, hiperosmótico, térmico, y la exposición a luz UV-B (Liu y col., 2013). Además, este factor también está relacionado a procesos de diferenciación como la conidiación. El estrés oxidativo es particularmente efectivo para generar protección cruzada, se cree que esto se debe a que la generación de especies reactivas de oxígeno es un proceso frecuente en la exposición a varios tipos de estrés no-oxidativos como el osmótico (Cazalé y col., 1998; Dhar y col., 2013) o térmico (Fedyeva y col., 2014). Además las mismas especies reactivas de oxígeno son mensajeros secundarios que se asocian con la activación de la respuesta a choque térmico en levaduras, posiblemente por la inducción de factores de transcripción como el de choque térmico 1 (Hsf1) o su activación como ocurre con Msn2/4 (Boisnard y col., 2009; Moraitis y Curran, 2004).

## 9. Resumen de resultados.

- La producción de conidios de *I. fumosorosea* en la mezcla arroz-avena en CSup (0.333 gsi) fue 6 veces mayor respecto al CSól (5 gsi).
- La diferencia en la producción de conidios entre ambos sistemas, está relacionada con la disponibilidad de sustrato por área ( $\sigma$ ) y mayormente con la presencia de la pared de salvado en la avena que dificulta la asimilación de nutrientes.
- La germinación de los conidios en la mezcla arroz-avena entre ambos sistemas de cultivo fue similar, al igual que la viabilidad.
- La producción de conidios en CSól (5 gsi) mostró mayor sensibilidad a la aplicación de atmósferas oxidantes respecto al CSup (0.333 gsi).
- La diferencia en la sensibilidad a los pulsos oxidantes entre sistemas de cultivo se debe a la diferencia en los residuales de oxígeno y la acumulación de CO<sub>2</sub>.
- Los pulsos oxidantes en CSup (0.333 gsi) incrementaron la viabilidad de los conidios obtenidos, respecto a la atmósfera normal.
- Los pulsos oxidantes en CSól con 1 gsi incrementaron la producción de conidios respecto a la atmósfera normal, contrario al CSup (1 gsi) donde continuó disminuyendo.
- El CSól con 2.5 gsi también incrementó la producción de conidios utilizando los pulsos oxidantes.
- El incremento en la conidiación con pulsos oxidantes depende de una relación del volumen de reactor-sustrato inicial, que debe ser por lo menos de 48 mL de volumen  $\text{gsi}^{-1}$  (8.12 mmol de oxígeno  $\text{gsi}^{-1} \text{L}^{-1}$ ).
- La termotolerancia de conidios de *I. fumosorosea* obtenidos en CSól con 2.5 gsi incrementó en los tratamientos oxidantes, respecto a la atmósfera normal.



## 10. Conclusiones.

El tipo de cultivo tiene un efecto importante en la producción de conidios de *I. fumosorosea*, aun cuando se utilice un sustrato con la misma composición química. La mayor producción de conidios fue obtenida en cultivo superficial, en términos de conidios  $\text{gsi}^{-1}$ . Por lo que no es recomendable considerar los cultivos superficiales como modelos del cultivo sólido cuando se desea evaluar la producción de conidios a partir de resultados obtenidos en cultivo superficial.

La diferencia en la producción de conidios se debe a la disponibilidad del sustrato por área ( $\sigma$ ) y principalmente a la estructura del sustrato, ambos factores deben considerarse para mejorar los sistemas de producción de conidios en cultivo sólido. La calidad de los conidios (germinación, viabilidad) fue similar en ambos sistemas de cultivo y puede ser estimada e inferida a partir de cultivos superficiales, siempre y cuando se utilice un medio con la misma composición química. Mientras que la infectividad es recomendable evaluarla en el sistema de producción final, ya que puede ser estimada incorrectamente en sistemas de CSup.

Una incorrecta relación volumen de reactor-sustrato puede incrementar la sensibilidad a los pulsos oxidantes. Por estas razones, la relación volumen de reactor-sustrato en CSól es un parámetro importante a considerar durante la aplicación de pulsos oxidantes, que también determina la reproducibilidad del incremento de la conidiación que se ha reportado en CSup. Este parámetro es importante, no sólo para cubrir la demanda de oxígeno y evitar alteraciones en los rendimientos de biomasa y conidios cuando se aplican atmósferas oxidantes, sino para estimular la conidiación en *I. fumosorosea*, *M. anisopliae* y *B. bassiana*.

Se sugiere que este parámetro sea por lo menos de  $48 \text{ mL } \text{gsi}^{-1}$  (equivalente a  $8.12 \text{ mmol de oxígeno } \text{gsi}^{-1} \text{ L}^{-1}$ ). La consideración de la relación volumen-cantidad de sustrato no sólo resulta importante para el estudio de laboratorio, si no para el escalamiento de este proceso a nivel de producción masiva de conidios, que a su vez puede determinar la factibilidad del escalamiento del proceso.

## 11. Perspectivas.

- Identificar el efecto de la relación volumen de reactor-sustrato y los pulsos oxidantes en la calidad de los conidios.
- Evaluar el efecto de pulsos oxidantes > 26% de oxígeno en cantidades de sustrato inicial  $\geq$  a 5 gsi.
- Evaluar la aplicación de atmósferas oxidantes en continuo sobre la producción y conidiación.
- Determinar el efecto del tamaño de lecho en la aplicación de pulsos de oxígeno manteniendo una relación volumen de reactor-sustrato de 48 mL gsi<sup>-1</sup>.
- Determinar si el efecto de los pulsos oxidantes en el incremento de la conidiación y calidad, es un efecto puntual o hereditario en generaciones posteriores de conidios.

## 12. Referencias.

Allen M., Levy L. 2013. Parkinson's disease and pesticide exposure – a new assessment. *Critical Reviews in Toxicology*. 43(6): 515-534.

Altre J., Vandenberg J., Cantone F. 1999 Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 73(3): 332-338.

Anderson R., Blanford S., Jenkins N., Thomas M. 2013. Discriminating fever behavior in house flies. *PLOS ONE*. 8(4): 1-4.

Auria R., Hernandez S., Raimbault M., Revah S. 1990. Ion exchange resin: A model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Techniques*. 4(6): 391-396.

Angel-Cuapio A. 2016. Uso del lirio acuático como texturizante en la producción de conidios de hongos entomopatógenos en cultivo en soporte sólido. Universidad Autónoma Metropolitana.

Angel-Cuapio A., Figueroa-Montero A., Favela-Torres E., Viniegra-González G., Perraud-Gaime I. Loera O. 2015. Critical values of porosity in rice cultures of *Isaria fumosorosea* by adding water hyacinth: effect on conidial yields and quality. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 177(2): 446-457.

Barelli L., Moonjely S., Behie S., Bidochka M. 2016. Fungi with multifunctional lifestyles: endophytic insect pathogenic fungi. *Plant Molecular Biology*. 90(6): 657-664.

Batta Y. 2007 Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology*. 103(5): 1406-1414.

Bhargav S., Panda B., Ali M., Javed S. 2008. Solid-state fermentation: An overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 22(1): 49-70.

Boguś M., Kędra E., Bania J., Szczepanik M., Czygier M., Jabłoński, Pasztaleniec A., Samborski J., Mazgajska J., Polanowski A. 2007. Different defense strategies of *Dendrolimus*

*pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection. *Journal of Insect Physiology*. 53: 909-922.

Boisnard S., Lagniel G., Garmendia-Torres C., Molin M., Boy-Marcotte E., Jacquet M., Toledano M., Labarre J., Chédin S. 2009. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates the nuclear localization of Msn2 and Maf1 through thioredoxins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*. 8(9): 1429-1438.

Bonaccorsi E., Ferreira A., Chambergo F., Ramos A., Mantovani M., Farah J., Sorio C., Gombert A., Tonso A., El-Dorry H. 2006. Transcriptional response of the obligatory aerobe *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen. *Biochemistry*. 45(12): 3912-3924.

Candas M., Bulla L. 2002. Insecticides, Microbial. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley and Sons. 1709-1717.

Cazalé A., Rouet-Mayer M., Barbier-Brygoo H., Mathieu Y., Laurière C. 1998. Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. *Plant Physiology*. 116(2): 659-669.

Chandler D., Bailey A., Tatchell G., Davidson G., Greaves J., Grant W. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical transactions of the Royal Society B*. 366(1573): 1987-1998.

Cliquet S., Jackson M. 2005. Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32(5): 204-210.

Desgranges C., Georges M., Vergoignan C., Durand A. 1991a. Biomass estimation in solid state fermentation. II. On-line measurements. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35(2): 206-209.

Desgranges C., Vergoignan C., Georges M., Durand A. 1991b. Biomass estimation in solid state fermentation. I. Manual of biochemical methods. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 35(2): 200-225.

Dhar R., Sägeser R., Weikert C., Wagner A. 2013. Yeast adapts to a changing stressful environment by evolving cross protection and anticipatory gene regulation. *Molecular Biology and Evolution*. 30(3): 573-588.

EPA. 2016. <http://www.epa.gov/pesticides/food/risks.htm>.

Fang W., Pava-Ripoll M., Wang S., St Leger R. 2009. Protein kinase A regulates production of virulence determinants by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*. 46(3): 277-285.

Fargues J., Goettel M., Smits N., Ouedraogo A., Vidal C., Lacey L., Lomer C., Rougier M. 1996. Variability in susceptibility to stimulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. *Mycopathologia*. 135(3): 171-181.

Fargues J., Rougier M., Goujet R., Smits N., Coustere C., Itier B. 1997. Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*. 69(1): 70-78.

Faria M., Wraight S. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43(3): 237-256.

FAO, 2016. <http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/ipm/en/>

Favela-Torres E., Cordova-López J., García-Rivero M., and Gutiérrez-Rojas M. 1998. Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. *Process Biochemistry*. 33(2): 103-107.

Fedyayeva A., Stepanov A., Lyubushkina I., Pobezhimova T., Rikhvanov E. 2014. Heat shock induces production of reactive oxygen species and increases inner mitochondrial membrane potential in winter wheat cells. *Biochemistry (Moscow)*. 79(11): 1202-1210.

Feng M., Poprawski T., Khachatourians G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*. 4(1): 3-34

Foster S., Denholm I., Thompson R. 2003. Variation in response to neonicotinoid insecticides in peach-potato aphids, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science*. 59(2): 166-173.

- Fukuto T. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environmental Health Perspectives*. 87: 245-254.
- Garcia-Ortiz N., Tlecuítl-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 Microbial and Cell Physiology*. 99(6): 2783-2791.
- Garza-López, P., Konigsberg M., Saucedo-Castañeda G., and Loera O. 2011. Differential profiles of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. as a response to CO<sub>2</sub>: production of conidia and amylases. *Agrociencia*. 45(7): 761-770.
- Garza-López, P., Konigsberg M., Gómez-Quiroz L., 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.
- Gasch A., Spellman P., Kao C., Carmel-Harel O., Eisen M., Storz G., Botstein D., Brown P. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*. 11(12): 4241-4257.
- Gallou A., Serna-Domínguez M., Berlanga-Padilla A., Ayala-Zermeño M., Mellín-Rosas M., Montesinos-Matías R., Arredondo-Bernal H. 2016. Species clarification of *Isaria* isolates used as bicontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biology*. 120(3): 414-423.
- Gillespie J., Bailey A., Cobb B., Vilcinskis A. 2000. Fungi as elicitors of insect immune responses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 44(2): 49-68.
- Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., Marrone P., Morin L., Stewart A. 2012. Have biopesticides come to age? *Trends in Biotechnology*. 30(5): 250-258.
- Golo P., Gardner D., Grilley M., Takemoto J., Krasnoff S., Pires M., Fernandes E., Bittencourt V., Roberts D. 2014. Production of destruxins from *Metarhizium* spp. Fungi in artificial medium and in endophytically colonized cowpea plants. *PLOS ONE*. 9(8): 1-9.
- Gómez-Preciado D. 2014. Efecto del sistema de cultivo con pulsos oxidantes en la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*. Universidad Autónoma Metropolitana.

- Goulson D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*. 50(4): 977-987.
- Hansberg W., De Groot H., Sies H. 1993. Reactive oxygen species associated with cell differentiation in *Neurospora crassa*. *Free Radical Biology and Medicine*. 14(3): 287-293.
- Hof A., Svahlin A. 2016. The potential effect of climate change on the geographical distribution of insect pest species in the Swedish boreal forest. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 31(1): 29-39.
- Holder D., Kirkland B., Lewis M., Keyhani N. 2007. Surface characteristics of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana*. *Microbiology*. 153(10): 3448-3457.
- Hölker U., Höfer M., Lenz J. 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64(2): 175-186.
- Hong S., Roze L., Wee J., Linz J. 2013. Evidence that transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *MicrobiologyOpen*. 2(1): 144-160.
- Hoy M., Singh R., Rogers M. 2010. Evaluations of a novel isolate of *Isaria fumosorosea* for control of the Asian citrus Psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psylliadae). *Florida Entomologist*. 93(1):24-32.
- Hunter W., Avery P., Pick D., Powell C. 2011. Broad spectrum potential of *Isaria fumosorosea* against insect pest of citrus. *Florida Entomologist*. 94(4): 1051-1054.
- Ibrahim, L., Butt T., Jenkinson, P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 106(6): 705-715.
- Ivanova E., Nguyen S., Webb H., Hasan J., Truong V., Lamb R., Duan X., Tobin M., Mahon P., Crawford R. 2013. Molecular organization of the nanoscale surface structures of the Dragonfly *Hemianax papuensis* wing epicuticle. *PLOS ONE*. 8(7): 1-8.

Jackson M., Schisler D. 1992. The composition and attributes of *Colletotrichum truncatum* spores are altered by the nutritional environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(7): 2260-2265.

James R., Buckner J., Freeman T. 2003. Cuticular lipids and silverleaf whitefly stage affect conidial germination of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 84(2): 67-74.

Jaronski S., Jackson M. 2012. Mass production of entomopathogenic Hypocreales. *Manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey A. (ed) 2nd ed. Academic Press, New York, pp 255-284.

Jenkins N., Grzywacz D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents-assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology* 10(6): 753-777.

Jenkins N., Heviefio G., Langewald J., Cherry A., Lomer C. 1998. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information*. 19(1): 21N-31N.

Jenkins N., Prior C. 1993. Growth and formation of true conidia by *Metarhizium flavoviride* in a simple liquid medium. *Mycological Research*. 97(12): 1489-1494.

Jong J., McCormack B., Smirnoff N., Talbot N. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389(244): 244-245.

Kalsbeek V., Mullens B., Jespersen J. 2001. Field studies of *Entomophthora* (Zygomycetes: Entomophthorales)-induced behavioral fever in *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in Denmark. *Biological Control*. 21(3): 264-273.

Kamp, A., Bidochka M. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*. 35(1): 74-77.

Kandor O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg L. 2004. Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Molecular Cell*. 13(6): 771-781.



- Karami-Mohajeri S., Abdollahi M. 2011. Toxic influence of organophosphate, carbamate, and organochlorine pesticides on cellular metabolism of lipids, proteins, and carbohydrates: a systematic review. *Human and Experimental Toxicology*. 30(9): 1119-1140.
- Kersahw M., Moorhouse E., Bateman R., Reynolds S., Charnley A. 1999. The role of destruxins in the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* for three species of insect. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74(3): 213-223.
- Kim J., Je Y., Roh J. 2010. Production of thermotolerant entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidia in corn-corn oil mixture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 37(4): 419-423.
- Kim J., Lee S., Lee H. Enhancing the thermotolerance of entomopathogenic *Isaria fumosorosea* SFP-198 conidial powder by controlling the moisture content using drying and adjuvants. *Mycobiology*. 42(1): 59-65.
- Kobayashi N., McEntee K. 1993. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*. 13(1): 248-256.
- Kobayashi Y., Yoshida J., Iwata H., Koyama Y., Kato J., Ogihara J., Kasumi T. 2013. Gene expression and function involved in polyol biosynthesis of *Trichosporonoides megachiliensis* under hyper-osmotic stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115(6): 645-650.
- Kruger R., Posadas J., Lewylle M., Mini J., Lecuona R. 2014. Solid substrate production and formulation of an isolate of *Metarhizium anisopliae* for biological control of stem bug *Tibraca limativentris*. *World Applied Sciences Journal*. 32(7): 1242-1251.
- Lai T., Su J. 2011. Assessment of resistance risk in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae). *Pest Management Science*. 67(11): 1468-1472.
- Lara-Ortíz T., Riveros-Rosas H., Aguirre J. 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*. 50(4): 1241-1255.

- Lareo C., Sposito A., Bossio A., Volpe D. 2006. Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and Microbial Technology*. 38(3-4): 391-399.
- López-Lastra C., Hajek A., Humber R. 2002. Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*. 80(10): 1126-1130.
- Lu Y., Wu K., Jiang Y., Xia B., Li P., Feng H., Wyckhuys K., Guo Y. 2010. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of Bt cotton in China. *Science*. 328(5982): 1151-1154.
- Luangsa-Ard J., Houbraken J., van Doorn T., Hong S., Borman A., Hywel-Jones N., Samson R. 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*. 321(2): 141-149.
- Membrillo I., Sánchez C., Meneses M., Favela E., Loera O. 2008. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*. 99(16): 7842-7847
- Mietkiewski R., Tkaczuk C., Zurek M., Van der Geest L. 1994. Temperature requirements of four entomopathogenic fungi. *Acta Mycologica*. 29(1): 109-120.
- 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*. DOI 10.1002/ps.3605
- Montesinos-Matías R., Viniestra-González G., Alatorre-Rosas R., Loera O. 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(9): 2095-2102.
- Moraitis C., Curran B. 2004. Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 21(4): 313-323.
- Morales-Hernandez C., Padilla-Guerrero I., Gonzalez-Hernandez G., Salazar-Solis E., Torres-Guzman J. 2010. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the

pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 87(3): 1033-1044.

Morano K., Grant C., Moye-Rowley W. 2012. The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 10(4): 1157-1195.

Moura G., Naomi N., Dias E., Delalibera I. 2013. The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial producing using solid substrate fermentation. Biological Control. 66(3): 209-218.

Muratori F., Hance T., Lognay G. 2008. Chemical characterization of the cuticular extracts of *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae). Annals of the Entomological Society of America. 101(3): 589-603.

Naeahashi T. 1971. Bulletin World Health Organization. 44(1-2-3): 337-345.

Oerke E., Dehne H. 2004. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. Crop Protection. 23(4): 275-285.

Ortega-Sánchez E., Loera O., Viniegra-González G. 2012. The effect of the ratio between substrate concentration and specific area of the support on the biomass yield of fungal surface cultures. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 11(3): 485-494.

Parrou J., Enjalbert B., Plourde L., Bauche A., Gonzalez B., François J. 1999. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 15(3): 191-203.

Pendland J., Hung S., Boucias D. 1993. Evasion of host defense by *in vivo*-produced protoplast-like cells of the insect mycopathogen *Beauveria bassiana*. Journal of Bacteriology. 175(18): 5962-5969.

Pérez-Guzmán D., Montesinos-Matías R., Arce-Cervantes O., Gómez-Quiroz L., Loera O., Garza-López P. 2016. Reactive oxygen species production, induced by atmospheric modification, alter conidial quality of *Beauveria bassiana*. Journal of Applied Microbiology. 121(2): 453-460.

- Rahardjo Y., Jolink F., Haemers S., Tramper J., Rinzema A. 2005. Significance of bed porosity, bran and specific surface area in solid-state cultivation of *Aspergillus oryzae*. *Biomolecular Engineering*. 22(4): 133-139.
- Rangel D., Anderson A., Roberts D. 2006. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*. 93(2): 127-134.
- Rodríguez del Bosque L. 2007 Terminología sobre control biológico. En: Aplicación del control biológico. Rodríguez del Bosque L., Arredondo Bernal H. (eds.). Sociedad Mexicana de Control Biológico. México, pp 277-303.
- Rodríguez-Gomez D., Marcial-Quino J., Loera O. 2015. Modulation of conidia production and expression of the gene *bbrgs1* from *Beauveria bassiana* by oxygen pulses and light. *Journal of Invertebrate Pathology*. 130:82-87.
- 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.
- Sallam M. 2000. Insect damage: damage. En Post-harvest. FAO
- Samuels K, Heale J., Llewellyn M. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53(1): 25-31.
- Santoro P., Zorzetti J., Constanski K., Neves P. 2015. Quality of *Beauveria bassiana* conidia after successive passages through *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista Colombiana de Entomología*. 41(1): 87-94.
- Sargent M., Kaltenbo S. 1972. Effects of medium composition and carbon-dioxide on circadian conidiation in *Neurospora*. *Plant Physiology*. 50(1): 171-175.
- Schrank A., Vainstein M. 2010. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*. 56(7): 1267-1274.

- Shimizu M., Fujii T., Fujita K., Takaya N. 2009. Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteomics*. 9(1): 7-19.
- Skaminioti P., Henderson C., Zhang Z., Robinson Z., Gurr S. 2007. A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 20(5): 568-580.
- Smalling K., Kuivila K., Orlando J., Phillips B., Anderson B., Siegler K., Hunt J., Hamilton M. 2013. Environmental fate of fungicides and other current-use pesticides in a central California estuary. *Marine Pollution Bulletin*. 73(1): 144-153.
- Soderlund D., Clark J., Sheets L., Mullin L., Piccirillo V., Sargent D., Stevens J., Weiner M. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. 171(1): 3-59.
- Stuedler S., Bley T. 2015. Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. *Bioprocess and Biosystems engineering*. 38(7): 1313-1323.
- Suchail S., Guez D., Belzunces L. 2000. Characteristics of imidacloprid toxicity in two *Apis mellifera* subspecies. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 19(7): 1901-1905.
- Sun X., Zhang H., Zhang Z., Wang Y., Li S. 2011. Involvement of a helix-loop-helix transcription factor CHC-1 in CO<sub>2</sub>-mediated conidiation suppression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*. 48(12): 1077-1086.
- Tan Q., Pang R., Gao X., Zhang Z., Yuan Y., Chen B., Zhang H., Wu G. 2014. Adhesion capacity of *Lecanicillium lecanii* conidia on body surface of *Boettcherisca peregrine* (Diptera: Sarcophagidae) at different developmental stages and its relationship with surface structures of host body. *Acta Entomologica Sinica*. 57(10): 1245-1252.
- Tarocco F., Leucona R., Couto A., Arcas J. 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.

- Tian J., Diao H., Liang L., Hao C., Arthurs S., Ma R. 2015. Pathogenicity of *Isaria fumosorosea* to *Bemisia tabaci*, with some observations on the fungal infection process and host immune response. *Journal of Invertebrate Pathology*. 130: 147-153.
- Tlecuitl-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.
- Toledo I., Hansberg W. 1990. Protein oxidation related to morphogenesis in *Neurospora crassa*. *Experimental Mycology*. 14(2): 184-189.
- Vega F., Goettel M., Blackwell M., Chandler D., Jackson M., Keller S., Koike M., Maniania N., Monzón A., Ownley B., Pell J., Rangel D., Roy H. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*. 2(4): 149-159.
- Vidal C., Fargues J., Lacey L. 1997. Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70(1): 18-26.
- Vilcinskas A., Jegorov A., Landa Z., Götz P., Matha V. 1999. Effects of beauverolide L and cyclosporine A on humoral and cellular immune response of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Comparative Biochemistry and Physiology part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 122(1): 83-92.
- Wanchoo A., Lewis M., Keyhani N. 2009. Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in *in vitro* and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*. 155(9): 3121-3133.
- Wang C., St. Leger R. 2005. Developmental and transcriptional responses to host and nonhost cuticles by the specific locust pathogen *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Eukaryotic Cell*. 4(5): 937-947.
- Wang C., St. Leger R. 2007. The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic Cell*. 6(5):808-816.

Wang Z., Zhang L., Ying S., Feng M. 2013. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environmental Microbiology*. 15(2): 409-418.

Weber F., Tramper J., Rinzema A. 1999. A simplified material and energy balance approach for process development and scale-up of *Coniothyrium minutans* conidia production by solid-state cultivation in a packed-bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 65(4): 447-458.

Westhus C., Ugelvig L., Tourdot E., Heinze J., Doums C., Cremer S. 2014. Increased grooming after repeated brood care provides sanitary benefits in a clonal ant. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 68(810): 1701-1710.

Wraight S., Jackson M., Kock S. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. En: *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. Butt T., Jackson C., Magan N. (eds.). CABI Publishing. United Kingdom, pp 253-288.

Ye S., Ying S., Chen C., Feng M. 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*. 28(11): 799-804.

Zhang S., Xia Y., Kim B., Keyhani N. 2011. Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Molecular Microbiology*. 80(3): 811-826.

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.

## **Anexo I**

Muñiz-Paredes F., Garza-López M, Viniegra-González G., Loera O. 2016. Comparison between superficial and solid-state cultures of *Isaria fumosorosea*: conidial yields, quality and sensitivity to oxidant conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 32(111). doi: 10.1007/s11274-016-2072-x