



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Tesis

“Dopa-melanina, componente y factor de calidad de conidios de dos especies de
Cordyceps”

Para obtener el grado de
Doctor en Biotecnología

Presenta:

M. en B. Gerardo Suárez Vergel

Director: Dr. Octavio Loera Corral
Co-director: Dr. Paul Misael Garza López
Asesor: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez

Octubre 2022, Ciudad de México

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa está incluido en el Padrón Nacional de Posgrados (PNPC) del CONACYT en el nivel de Competencia Internacional, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con número de referencia 001466.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de doctorado: 592571.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

Ciudad de México, octubre 2022

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

“Dopa-melanina, componente y factor de calidad de conidios de dos especies de
Cordyceps”

que presentó:

Gerardo Suárez Vergel

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Co-director: Dr. Paul Misael Garza López. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ICAP

Asesor: Dr. Francisco Javier Figueroa Martínez. Cátedras-CONACyT, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Jurado:

Presidente: _____

Secretario: _____

Vocal: _____

Vocal: _____

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma Metropolitana, es un orgullo ser egresado de esta institución.

Al Conacyt por la beca otorgada para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Octavio Loera Corral por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, por respaldar mi tesis doctoral y por ser un ejemplo a seguir.

A mis asesores, el Dr. Francisco Figueroa y el Dr. Paul Misael por la paciencia y por todos sus aportes que enriquecieron este trabajo.

A Julio Montiel F. y al Dr. Héctor Escalona, por su invaluable apoyo para ingresar a este posgrado, esto fue posible gracias a ustedes.

A la Lic. Violeta Luna Caballero por su apoyo incondicional y trabajo profesional a lo largo de este proceso.

A la Dra. Nohemí García Ortiz por el apoyo, aprendizaje, soporte, amistad... por tanto.

A mis amigos y compañeros Jorge Lima, Francisco Miranda, José Luis Reyes, Daniel Solís, Briseida, Jazmín, Lilianha, Ángel Cuapio, Josefa Espitia, Emmanuel y Miguel por tantos momentos y conocimientos invaluableles.

A mis queridos maestros el Dr. Mariano Gutiérrez y la Dra. María del Socorro Imelda Retana por ser ejemplo de pasión a la ciencia y a la docencia.

A mi amada familia por siempre estar para mí.

Resumen

La melanina es un pigmento heterogéneo presente en todos los reinos biológicos con muchas funciones biológicas, principalmente relacionadas con el manejo del estrés ambiental. En algunas especies de hongos, la melanina está involucrada en una mayor virulencia contra plantas y animales; sin embargo, poco se sabe sobre la presencia y el tipo de melanina que se encuentra en los hongos entomopatógenos (HE), y de qué manera este pigmento puede influir en la calidad de los conidios de estos hongos utilizados para el control biológico de plagas.

En este trabajo exploramos la presencia de melanina en conidios de *Cordyceps fumosorosea* CHE-CNRCB 303 y *Cordyceps javanica* ARSEF 3302. La melanina de ambos aislados fue purificada y caracterizada por UV, espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) y resonancia paramagnética electrónica (RPE). La vía DOPA-melanina se estableció como la ruta utilizada por el género *Cordyceps* para sintetizar el pigmento, el cual presentó la capacidad de reducir el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), confirmando su capacidad antioxidante. Por otro lado, se produjeron conidios no melanizados, conidios con una concentración de melanina basal o normal y conidios con ~2 veces más melanina que aquella encontrada en los conidios normales. Estos últimos se obtuvieron de cultivos bajo una atmósfera modificada al 26% de oxígeno (AM), en contraste a los cultivados bajo una atmósfera normal (AN), cuya concentración de melanina se consideró como un nivel basal, por otro lado, los conidios no melanizados se obtuvieron de un cultivo con una concentración mínima necesaria de ácido kójico para inhibir la síntesis de melanina.

La melanina y su concentración en los conidios de ambas especies que pertenecen al género *Cordyceps* mostró ser un importante factor de resistencia a diferentes tipos de estrés; tal es el caso de los conidios de la especie *C. fumosorosea* ARSEF 3302 provenientes de una AM, los cuales fueron más termotolerantes, mostraron mayor resistencia radiación UVB así como al insecticida dimetoato; además, tuvieron una mayor germinación y fueron más virulentos que aquellos conidios provenientes de un cultivo bajo una AN, mientras que aquellos conidios no

melanizados mostraron menor resistencia a radiación UVB, menor termotolerancia, menor resistencia a dimetoato y fueron menos viables que los conidios cultivados bajo una AN. A través de esta serie de ensayos se comprobó por primera vez la influencia de la melanina en la resistencia de estos conidios a diferentes tipos de estrés; es decir, la concentración de melanina influye en la calidad en los conidios de las especies *C. javanica* CHE-CNRCB 303 y *C. fumosorosea* ARSEF 3302. Esta es la primera vez que se caracteriza la melanina y se verifica su influencia en la calidad de los conidios en dos especies de *Cordyceps*, que se utilizan ampliamente para el control de plagas. Este conocimiento podría mejorar tanto la persistencia de los conidios en el campo como la efectividad en el control biológico.

Abstract

Melanins are heterogeneous pigments present in all biological kingdoms with many biological functions, mainly related to coping with environmental stress. In some fungal species, melanin is involved in higher virulence against plants and animals; however, little is known about the presence and type of melanin found in entomopathogenic fungi (EF), and how this pigment can influence the conidia quality of these fungi used for biological control of pests.

In this work we explore the presence of melanin in conidia from *Cordyceps fumosorosea* CHE-CNRCB 303 and *Cordyceps javanica* ARSEF 3302. The melanin of both isolates was purified and characterized by UV, Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR) and electron paramagnetic resonance (ERP). The DOPA-melanin pathway was confirmed as the route used by the *Cordyceps* genus to synthesize the pigment, which presented the ability to reduce 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), confirming its antioxidant capacity.

Moreover, conidia with different concentrations of melanin were produced: non-melanized conidia (NA-K), conidia with basal or normal melanin concentration (NA) and conidia with ~2-fold more melanin (MA) than that found in normal conidia. The MA conidia were obtained from cultures under a modified atmosphere at 26% oxygen (MA), NA conidia were obtained from a normal atmosphere with 21% oxygen

(NA), while non-melanized conidia were obtained from a culture with a minimum concentration of kojic acid necessary to inhibit melanin synthesis. Melanin has shown an important role in the resistance in conidia of both *Cordyceps* species to different types of stress; such is the case of the conidia from an AM of the *C. fumosorosea* ARSEF 3302 strain, which were more thermotolerant, showed greater resistance to UVB radiation as well as to the insecticide dimethoate; In addition, they had a higher germination and were more virulent than those conidia from a culture under normal atmosphere (NA), while those non-melanized conidia showed lower resistance to UVB radiation, lower thermotolerance, lower resistance to dimethoate and were lower viable than those conidia grown under a NA. Through this series of tests, the influence of melanin on the resistance of these conidia to different types of stress was verified for the first time; that is, melanin is a quality factor in the conidia of the species *C. javanica* CHE-CNRCB 303 and *C. fumosorosea* ARSEF 3302. This is the first time that melanin has been characterized and its influence on the quality of conidia has been verified in two species of *Cordyceps*, which are widely used for pest control. This knowledge could improve both, the persistence of conidia in the field and the effectiveness of biological control.

Contenido

1	Introducción	2
1.1	Melanina.....	3
1.2	Melanina fúngica y sus vías de síntesis	4
1.3	Deposición de melanina en hongos	5
1.4	Propiedades fisicoquímicas y espectrales de la melanina	8
1.4.1	Propiedades fisicoquímicas	8
1.4.2	Espectro UV-Visible.....	8
1.4.3	Espectroscopía de Infrarrojo (IR).....	9
1.4.4	Morfología y tamaño de gránulos de melanina.....	10
1.5	Roles de la melanina en hongos	11
1.5.1	Fotoprotección.....	12
1.5.2	Capacidad antioxidante	13
1.5.3	Unión con metales	13
1.5.4	Protección contra la desecación	14
2	Antecedentes.....	16
3	Hipótesis	19
4	Objetivo general.....	19
5	Materiales y métodos.....	21
5.1	Microorganismos.....	21
5.2	Conservación de cepas.....	21
5.3	Cultivo de inóculo inicial	22
5.4	Caracterización de melanina.....	22
5.4.1	Identificación de la vía de síntesis de melanina.....	22

5.4.2	Extracción y purificación de melanina.....	22
5.4.3	Propiedades espectrales	23
5.4.4	Capacidad antioxidante	24
5.4.5	Determinación de la morfología y tamaño de las partículas de melanina	25
5.5	Cuantificación de melanina en conidios cultivados en diferentes atmósferas (AN y AM).....	26
5.5.1	Producción de conidios bajo una atmósfera normal (AN) y atmósfera modificada (AM).....	26
5.5.2	Curva estándar de melanina.....	26
5.5.3	Cuantificación de melanina.....	26
5.6	Condiciones de cultivo para obtener conidios no melanizados	27
5.6.1	Crecimiento radial a diferentes concentraciones de ácido kójico o triciclazol	27
5.6.2	Producción de conidios a diferentes concentraciones de ácido kójico	27
5.7	Obtención de conidios con diferentes concentraciones de melanina.....	28
5.7.1	Producción de conidios no melanizados (AN-K).....	28
5.7.2	Obtención de muestras experimentales	28
5.8	Pruebas de calidad.....	28
5.8.1	Germinación	28
5.8.2	Viabilidad	29
5.8.3	Crecimiento radial en presencia de dimetoato.....	29
5.8.4	Resistencia a dimetoato	29
5.8.5	Termotolerancia.....	30

5.8.6	Resistencia a UVB.....	30
5.8.7	Bioensayo.....	30
6	Análisis estadístico	31
7	Resultados y Discusión.....	32
7.1	Vía de síntesis de melanina	32
7.2	Propiedades fisicoquímicas de melanina	36
7.3	Análisis Espectrales de melanina.....	37
7.3.1	Espectro de absorción de luz visible UV.....	37
7.3.2	Espectroscopía infrarroja (FT-IR)	40
7.3.3	Resonancia paramagnética electrónica (RPE)	41
7.4	Actividad antioxidante	43
7.5	Morfología de gránulos de melanina por SEM	46
7.6	Producción de melanina en conidios de <i>Cordyceps</i> cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno.	49
7.7	Producción de conidios no melanizados a partir de la dosis mínima inhibitoria de melanina	51
7.7.1	Crecimiento radial a diferentes concentraciones de ácido kójico	51
7.7.2	Producción de conidios a diferentes concentraciones de ácido kójico	55
7.8	Influencia de la melanina en conidios, pruebas de calidad	56
7.8.1	Germinación	56
7.8.2	Viabilidad.....	59
7.8.3	Resistencia a UVB.....	61
7.8.4	Termotolerancia.....	65
7.8.5	Resistencia a dimetoato	69



Casa abierta al tiempo

7.8.6	Crecimiento radial en presencia de dimetoato.....	72
7.8.7	Infectividad	74
8	Conclusiones	79
9	Perspectivas	80
10	Referencias	81
11	Anexo I – Artículo científico	97

Lista de abreviaciones

ADS: Agar dextrosa Sabouraud

AM: Atmósfera modificada con 26 % de O₂

AN: Atmósfera normal con 21 % de O₂

AN-K: Atmósfera normal y ácido kójico

CNRCB: Centro Nacional de Referencia de Control Biológico

DHN: 1,8-dihidroxi-naftaleno

DOPA: 3,4 dihidroxifenilalanina

DPPH: 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo

EITF: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

ERO: Especies reactivas de oxígeno

GDHB: g-glutaminil-3,4-dihidroxibenceno

IC₅₀: concentración de antioxidante que elimina el 50 % de los radicales DPPH

MEB: Microscopía electrónica de barrido

mL: mililitros

PAP: p-aminofenol

PPO: polifenol oxidasa

RPE: Resonancia paramagnética electrónica

SOD: superóxido dismutasa

UFC: unidades formadoras de colonias

UVB: Radiación ultravioleta tipo B

1 Introducción

Desde hace seis décadas los insecticidas de síntesis química han sido la primera opción para el manejo de plagas (Chandler et al., 2011), en consecuencia, la población humana está inevitablemente expuesta a estas sustancias tóxicas que contribuyen a la contaminación ambiental de forma directa o indirectamente, a través de sus productos de degradación en aire, suelo, agua y alimentos (Bolognesi, 2003). Desde hace varios años se han evidenciado sus efectos: incremento en la resistencia de insectos plaga (Bolognesi, 2003) y toxicidad para el ser humano, entre otros.

Una alternativa al uso de insecticidas de síntesis química se basa en el control biológico, en el que se incluye el control de plagas utilizando diferentes microorganismos, como los hongos entomopatógenos, para disminuir la población plaga a niveles que no sean económicamente significativos; de estos, los géneros de hongos entomopatógenos más importantes son: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Cordyceps* (antes *Isaria*) y *Lecanicillium* (Muñiz-Paredes et al., 2017).

Los hongos entomopatógenos al ser microorganismos eucarióticos aerobios producen especies reactivas de oxígeno (ERO) en su metabolismo celular, debido a la fuga de electrones en la cadena respiratoria, así como por acción de las NADPH oxidasas (NOX), entre otros mecanismos. El radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) son algunos ejemplos de ERO que generan toxicidad celular cuando alcanzan concentraciones intracelulares superiores a las basales. La concentración de moléculas oxidantes debe de mantenerse en una proporción adecuada con las moléculas antioxidantes para conservar un equilibrio en la célula (Boveris et al., 2008), de lo contrario la célula puede incurrir en un fenómeno conocido como estrés oxidante, éste se define como un desequilibrio que favorece el estado oxidante y se ve reflejado en la oxidación de DNA, proteínas y lípidos. (Boveris et al, 2008; Sies et al., 2017).

Para evitar el daño celular causado por ERO, los hongos utilizan mecanismos antioxidantes que pueden ser del tipo enzimático y no enzimático. Los primeros tienen como objetivo reducir la concentración de ERO (Jamieson, 1998; Lushchak, 2014; Sies y Jones, 2020), uno de estos sistemas es el de glutatión peroxidasa (GPx) que transforma el H_2O_2 a dos moléculas de agua y glutatión oxidado (GSSG), haciendo uso de dos moléculas de glutatión reducido (GSH) (Castillo-Minjarez et al., 2019).

Además, existen diferentes moléculas con capacidad antioxidante que confieren resistencia a los hongos frente a ambientes adversos, como la melanina. Estos últimos, son pigmentos constituidos por son biopolímeros sintetizados a partir de compuestos fenólicos. Confieren ciertas ventajas a los hongos, como el aumento de su supervivencia en algunos entornos y la mejora de su virulencia (Henson et al., 1999; Suryanarayanan et al., 2004) . Aunque se han investigado pigmentos de melanina de hongos patógenos de plantas (Howard y Ferrari 1989), hongos patógenos humanos (Suryanarayanan et al., 2004) y hongos saprófitos (Ravishankar et al., 1995), hasta el momento no existían reportes que confirmaran la síntesis de melanina en por hongos entomopatógenos y que influencia podría tener en la calidad de sus conidios

1.1 Melanina

La melanina está definida como un polímero heterogéneo derivado de la oxidación de fenoles y la posterior polimerización de fenoles intermedios y sus quinonas resultantes (Solano, 2014). La melanina es un pigmento único en la naturaleza y se encuentra presente en todos los reinos biológicos. Debido a que su estructura y composición es diversa y de tamaño molecular indefinido, es capaz de poseer diferente color y funciones. La melanina puede ser clasificada en eumelanina, feomelanina, neuromelanina, alomelanina y piomelanina (Solano, 2014 y Ambrico, 2016), sin embargo; no siempre hay una buena correlación entre la fuente (precursor) y tipo de melanina. La melanina es un polifenol heterogéneo con capacidad de absorción óptica de banda ancha, paramagnetismo, transporte de

carga y notable estabilidad estructural. Estas propiedades permiten que la melanina realice diversas funciones en los sistemas biológicos como protección a radiación UV, quelación de metales, proporcionar rigidez a estructura celular, protección a calor, frío o desecación, de este modo la síntesis de melanina representa un mecanismo general de adaptación a los cambios climáticos (Roulin, 2014).

1.2 Melanina fúngica y sus vías de síntesis

En el reino fúngico se observa melanización en todos los filos. Existen especies fúngicas que sintetizan melanina constitutivamente y son nombrados hongos melanóticos. Aquellas especies que melanizan sólo bajo ciertas condiciones se denominan hongos melanóticos facultativos (Cordero y Casadevall, 2017). Los hongos melanóticos son filogenéticamente diversos con una distribución mundial, típicamente colonizan nichos ambientales hostiles que no son adecuados para la mayoría de las formas de vida, por ejemplo los polos Ártico y Antártico (Roulin, 2014; Buzzini y Margesin, 2013; Selbmann et al., 2013), zonas radiactivas como la planta de energía nuclear de Chernobyl (Dighton et al., 2008; Ragon et al., 2011), aguas hipersalinas (Gunde-Cimerman y Zalar, 2014), ambientes ácidos (Baker et al., 2004), en el interior y superficie de rocas (Selbmann et al., 2015), entre otras. Dichos entornos se caracterizan por presentar condiciones tan diversas como fluctuaciones drásticas de temperatura, exposición elevada a la radiación, alta presión osmótica, baja actividad del agua y baja disponibilidad de nutrientes. La melanización permite que estos microorganismos altamente melanóticos toleren diversas tensiones físicas y químicas de su entorno convirtiéndolos en poliextremófilos (Gessler et al., 2014)

Con base en los precursores bioquímicos y/o componentes a partir de los cuales se sintetiza, se han descrito varias clases de melanina fúngica como g-glutaminil-3,4-dihidroxibenceno (GDHB)-melanina, 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA)-melanina, 1,8-dihidroxinaftaleno (DHN)-melanina, catecol-melanina, piomelanina, p-aminofenol (PAP)-melanina, Asp-melanina, entre otros (Solano, 2014).

Las vías biosintéticas de melanina comúnmente reportadas en hongos son la DOPA-melanina y la DHN-melanina. La primera es usada principalmente por hongos Ascomycetos como *Aspergillus terreus*, *Aspergillus tubingensis* y *Botrytis cinerea* (Pal et al., 2013, Doss et al., 2003); la segunda vía biosintética es menos común y ha sido reportada para algunas especies de *Aspergillus* como *A. niger*, *A. tamarrii* y *A. flavus* (Pal et al., 2013).

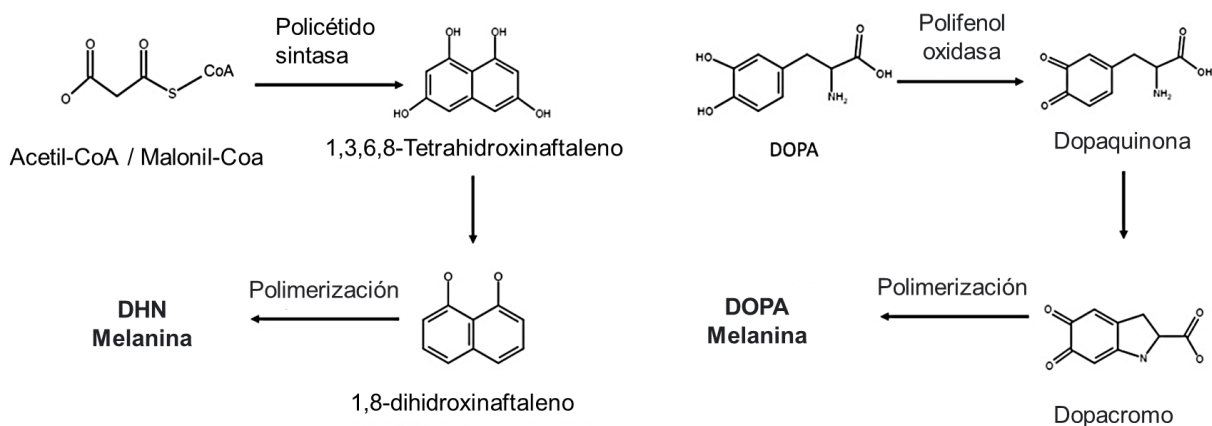


Figura 1.- Vías DOPA y DHN de síntesis de melanina en hongos. Tomado y modificado de Liu et al., (2021)

La síntesis de melanina por la vía DHN-melanina es anulada por el triciclazol debido a que inhibe la actividad enzimática de la reductasa (**Figura 1**) (Franzen et al., 2006), por otro lado, la vía Dopa-melanina es inhibida por el ácido kójico por la actividad quelante del cobre, que es un cofactor necesario para la actividad de la polifenol oxidasa (PPO) (**Figura 1**) (Chen et al., 2015; Mishima et al., 1988; Chang, 2009), por otro lado,

1.3 Deposición de melanina en hongos

La melanina sintetizada a partir de las vías DHN-melanina y DOPA-melanina se han asociado principalmente a los hongos ascomicetos y basidiomicetos, respectivamente. Además, en muchos casos producen pigmentos en estructuras específicas. En este sentido, algunos hongos tienen la capacidad de sintetizar un

tipo particular de melanina de acuerdo con las condiciones ambientales, así como la etapa de desarrollo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Tipo, localización y papel supuesto de la melanina en diferentes hongos.

Variedad*	Tipo de melanina	Localización	Rol asociado	Referencia
<i>Aspergillus terreus</i>	DHN-melanina	Conidios	Tolerancia a la radiación UV y ambientes ácidos, y defensa contra la depredación por ameba	(Pal et al., 2013)
		Caldo de cultivo		
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	DHN-melanina	Pared hifas y conidios	Desarrollo, estado físico y sobrevivencia a condiciones ambientales extremas.	(Bashyal et al., 2010; Chand et al., 2014)
<i>Cenococcum geophilum</i>	DHN-melanina	Pared de las hifas	Tolerancia al estrés hídrico.	(Koide et al., 2014)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	DHN-melanina	Pared hifas y conidios	Tolerancia al estrés impuesto por fungicidas o el medio ambiente.	(Llorente et al., 2012)
<i>Cryptococcus neoformans</i>	DOPA-melanina	Vesículas extracelulares y pared celular	Patogenicidad Factor de virulencia. Protección contra los sistemas de defensa del huésped (células efectoras inmunes, fagocitosis y daño oxidativo)	(Rodrigues et al., 2014)
<i>Metarhizium anisopliae</i>	DHN-melanina	No determinado	Factor de virulencia, germinación de conidios y tolerancia al estrés oxidativo.	(Tseng et al., 2014)
<i>Monilinia laxa</i>	DHN-melanina	Todas las estructuras diferenciadas.	Patogenicidad y tolerancia al estrés ambiental.	(Villarino et al., 2011)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Piomelanina	Medio extracelular	Supervivencia bajo nutrientes y estrés hídrico	(Vasanthakumar et al., 2015)
<i>Pseudocercospora griseola</i>	DHN-melanina	Muro en hifas y conidios	Morfogénesis	(Bárcena et al., 2015)
<i>Sporothrix schenckii</i>	DHN-melanina	Constitucionalmente en células conidiales y de levadura	Virulencia relacionada con infección y contra fagocitosis	(Almeida-Paes et al., 2016)
	DOPA-melanina	Pared de conidios e hifas	Virulencia relacionada con la infección y contra la fagocitosis. Protección contra drogas antimicóticas	
	Piomelanina	Medio extracelular	Atenuador del estrés oxidativo. Protección frente a antimicóticos	

La presencia de melanina en hongos adaptados a diferentes climas, y el hecho de que la misma melanina es sintetizada por un hongo, independientemente de las condiciones ambientales, sugiere que esta molécula juega diferentes roles biológicos cruciales en la naturaleza, aunque aún se desconoce el papel específico de los diferentes tipos de melanina en los procesos biológicos (Toledo et al., 2017). En los hongos, la melanina puede estar contenida en la superficie celular o liberada en el espacio extracelular (Dong y Yao, 2012; Doss et al., 2003; Jalmi et al., 2012). La ubicación exacta de la melanina en la superficie celular varía entre las especies de hongos. Por ejemplo, en *Cryptococcus neoformans* los gránulos de melanina se depositan entre la membrana plasmática y la parte más interna de la pared celular (Eisenman et al., 2005). En otras especies de hongos, la melanina se encuentra en la superficie o entre la pared celular (Carzaniga et al., 2002; Kogej et al., 2007).

El depósito de melanina en la pared celular fúngica involucra interacciones moleculares con estructuras de quitina (Baker et al., 2007; Banks et al., 2005; Chatterjee et al., 2015; Walker et al., 2010). La interrupción del metabolismo de la quitina da como resultado un fenotipo de "melanina permeable", donde el pigmento ya no está contenido en la pared celular y se libera al medio extracelular (Baker et al., 2007); por otro lado, siempre se detectan rastros de quitina por resonancia magnética nuclear (RMN) en aislados de melanina de *C. neoformans* (Chatterjee et al., 2015), lo que significa que estos polisacáridos están en estrecha asociación con el pigmento de manera que resisten los pasos de hidrólisis durante las preparaciones de melanina. También se han detectado otras biomoléculas como lípidos, péptidos y carbohidratos en las purificaciones de melanina criptocócica, pero su identificación y relevancia en la melanogénesis aún se desconocen (Chatterjee et al., 2015; Zhong et al., 2008). Una posible relación de la melanina fúngica con diferentes componentes de la pared celular de *C. neoformans* (**Figura 2**) fue propuesta por Nosanchuk et al (2015).

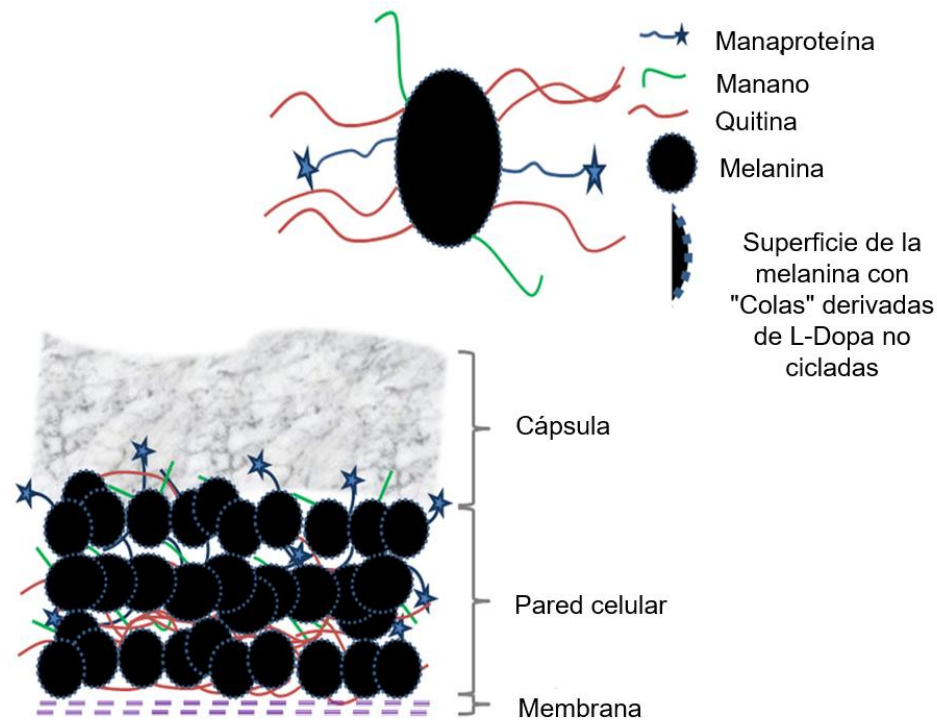


Figura 2.- Una conceptualización de la organización de la melanina y sus interacciones con estructuras macromoleculares en la pared celular de *Cryptococcus neoformans*. Tomado y modificado de Nosanchuk et al (2015).

1.4 Propiedades fisicoquímicas y espectrales de la melanina

Debido a la variedad en composición, origen, estructura, color y precursores de la melanina, se determinan características fisicoquímicas y espectrales que posee este pigmento para su identificación. El análisis de estas características permite respaldar que el pigmento aislado podría ser melanina, cuando se desconoce la naturaleza química de algún pigmento presente en un organismo, como es el caso de los hongos *Cordyceps javanica* y *Cordyceps fumosorosea* cuyos conidios poseen una pigmentación gris oscura.

1.4.1 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas características de la melanina incluyen la solubilidad en condiciones alcalinas, así como una baja solubilidad en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos e inorgánicos. Además, posee resistencia a la degradación por ácidos, y se presenta blanqueamiento cuando se somete a la acción de agentes oxidantes como el permanganato de potasio, dicromato de potasio, hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, entre otros; también tiene reacción positiva para la prueba de polifenoles (test con FeCl_3) (Solano, 2014; Suryanarayanan et al., 2004; Selvakumar et al., 2008; Dong y Yao, 2012; Hu et al., 2015; Sun et al., 2016; Raman y Ramasamy, 2017).

1.4.2 Espectro UV-Visible

El espectro de absorción UV-visible de melanina se ha utilizado principalmente para identificar y caracterizar el pigmento extraído. Para la mayoría de los tipos de melanina, la longitud de onda de absorción máxima de sus soluciones alcalinas de melanina oscila entre 196–300 nm y disminuye gradualmente hacia longitudes de onda más grandes. La absorción elevada de la melanina en el rango UV aparentemente se debe a las moléculas complejas conjugadas en la estructura de la melanina, que absorben y dispersan los fotones de la luz ultravioleta (Hou et al., 2019). La disminución de la absorción al aumentar la longitud de onda es casi lineal, por lo tanto, cuando el logaritmo de absorbancia

de una solución de melanina alcalina se representa gráficamente frente a la longitud de onda, se obtienen líneas rectas con pendientes negativas. Estas pendientes se utilizan a menudo como un criterio para la identificación y caracterización de melanina (Suryanarayanan et al., 2004; Selvakumar et al., 2008; Hou et al., 2019). Además, los espectros de absorción de la melanina no deben presentar picos de absorción a 260 nm y 280 nm, para asegurar que la absorción no se debe a contaminación por ácidos nucleicos, lípidos o proteínas (Liu et al., 2018; Sun et al., 2016).

1.4.3 Espectroscopía de Infrarrojo (IR)

Uno de los métodos más importantes para identificar y caracterizar la estructura de la melanina es la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Aunque los espectros IR de la melanina fúngica son ligeramente diferentes según el tipo de melanina y el procedimiento de extracción, existen varias bandas características que pueden rastrearse para identificar los principales grupos funcionales de la macromolécula de melanina, y se pueden utilizar melanina sintética o biológicas ya identificadas como referencia. Los espectros FTIR de melanina generalmente incluyen bandas características que cubren 3600–3000 cm^{-1} , 1650–1600 cm^{-1} y 1500–1400 cm^{-1} . La fuerte y amplia banda de absorción observada a 3600–3000 cm^{-1} se ha asignado a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH y -NH que pertenecen a los grupos funcionales amina, amida, ácido carboxílico, fenólico y amino (Haining y Achat-Mendes, 2017; Selvakumar et al., 2008; Hu et al., 2015). Se han registrado espectros IR de melanina con picos de absorción entre 2950–2850 cm^{-1} y entre 1465–1375 cm^{-1} , que se atribuyen a la vibración de estiramiento de los grupos CH alifáticos (Selvakumar et al., 2008; Ito, 1986; Youngchim et al., 2004; Chen et al., 2008; D'Ischia et al., 2013). La banda de absorción fuerte y característica entre 1650–1600 cm^{-1} generalmente se atribuye a las vibraciones de los tramos aromáticos C=C y C=O del grupo carboxílico (Dong y Yao, 2012; Hou et al., 2019). También se existen estiramientos específicos de melanina entre 1500–1400 cm^{-1} , que se atribuyen a la vibración de flexión de NH y la vibración de estiramiento de CN (amina secundaria) de un sistema indólico

(Selvakumar et al., 2008; Dadachova et al., 2007). En varios espectros de melanina también se han reportado bandas de absorción entre 1250–1180 cm^{-1} , causadas por la vibración de estiramiento del -OH de los grupos fenólicos (Wang y Rhim, 2019). Las bandas de absorción débiles identificadas entre 1150–1100 cm^{-1} podrían ser el resultado de la vibración de contracción simétrica del enlace COC. Por debajo de 1100 cm^{-1} , las bandas de absorción generalmente débiles se asignan a la deformación en el plano del enlace CH, grupos aromáticos CH (Wang y Rhim, 2019; Xin et al., 2015; Hou et al., 2019; Raman y Ramasamy, 2017). Sin embargo, dependiendo de la fuente de melanina, también se han identificado otras bandas específicas.

1.4.4 Morfología y tamaño de gránulos de melanina

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es un método poderoso para la caracterización morfológica (Figura 3) y la distribución del tamaño de partículas de diferentes tipos de melanina (Mboniyirivuze et al., 2015; Strube et al., 2015).

Tabla 2.- Análisis SEM de diferentes tipos de melanina.

Fuente de melanina		Morfología y tamaño de gránulos	Referencia
Sintético		Forma esférica de 30–60 nm / 40–200 nm / 100–150 nm	(Strube et al., 2015)
Hongos	<i>Auricularia auricula</i>	Fragmentos amorfos de una estructura cristalina de 20-30 nm	(Wu et al., 2018)
	<i>Cryptococcus neoformans</i> / <i>Cryptococcus gattii</i>	Forma irregular amorfa	(Correa et al., 2017)
	<i>Inonotus hispidus</i>	Tamaño hidrodinámico promedio / estructuras esféricas y elipsoidales irregulares de 89 y 33 nm	(Hou et al., 2019)
	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	Gránulos esféricos de 100–300 nm	(Beltrán-García et al., 2014)
	<i>Rubrivivax benzoatilyticus</i>	Estructuras esféricas.	(Mekala et al., 2019)

Varios métodos de preparación de muestras descritos en la literatura consideran el tamaño, la forma, el estado y conductividad eléctrica de la muestra (Beltrán-García et al., 2014). Para volverse conductoras, las muestras de melanina deben recubrirse primero. Para ello se recubre a la muestra con una capa delgada de oro (Li et al., 2018; Araujo et al., 2012; Costa et al., 2012) o aleación de oro/paladio (Srisuk et al., 2015). Dependiendo de la fuente de melanina y la morfología, el tamaño de los gránulos puede variar entre 30 y 1000 nm, además los gránulos de melanina suelen ser esféricos o amorfos con forma irregular (Tabla 2).

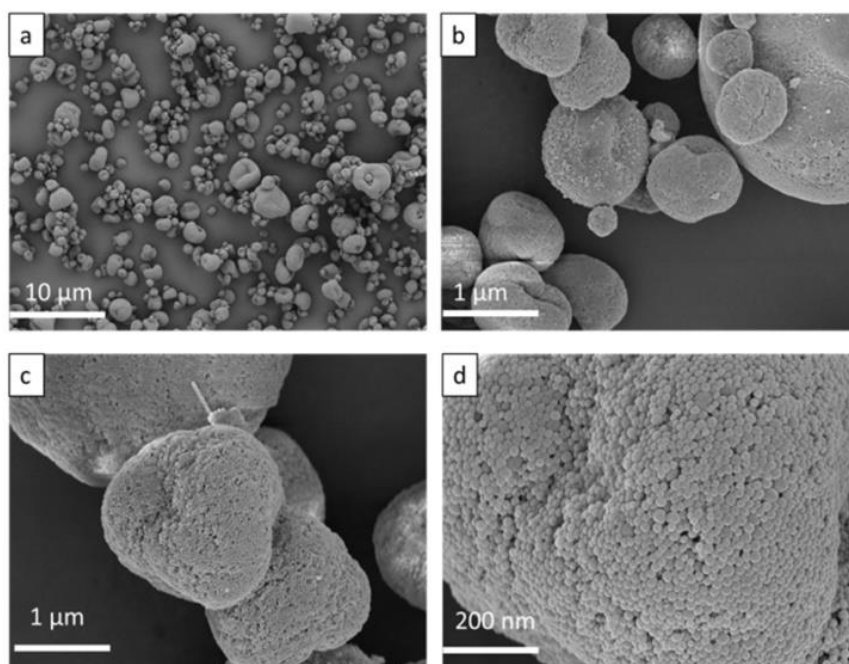


Figura 3.- Micrográficas SEM de gránulos de melanina sepia a 1K X (a), 10K X (b), 20 K X (c) y 50k X (d). Tomado y modificado de Mboniyivuze et al (2015).

1.5 Roles de la melanina en hongos

La amplia distribución geográfica de los hongos con pigmentación oscura sugiere que la melanina proporciona a estos organismos propiedades especiales, que se traducen en ventajas de supervivencia y/o adaptación en condiciones ambientales extremas. La contribución de la melanina a la virulencia fúngica y su

patogenicidad hacia los humanos ha estimulado importantes estudios de caracterización funcional y era desconocida hasta ahora en HE. La melanina fúngica se considera un factor de virulencia importante en varias especies de hongos, ya que actúa como armadura no específica que protege al hongo contra los mecanismos inmunes del huésped durante la infección (Butler et al., 2001; Nosanchuk y Casadevall, 2003); por ello aumenta el interés por el estudio de este pigmento en HE donde podría estar involucrada como un sistema de protección frente al sistema inmune del insecto. Sin embargo, la melanización fúngica claramente sirve para muchos propósitos biológicos fuera del huésped, incluyendo fotoprotección, neutralización de radicales libres, protección contra el estrés por calor y frío, quelación de metales, resistencia celular, resistencia a la desecación y desarrollo celular, que a también pudieran afectar el éxito del hongo en infectar al insecto (Cordero y Casadevall, 2017).

1.5.1 Fotoprotección

La radiación electromagnética es necesaria para la vida sobre la Tierra tal y como la conocemos, ya que permite reacciones importantes como la fotosíntesis; sin embargo, y contradictoriamente, es potencialmente dañina para la vida, dependiendo de la frecuencia y el tiempo de exposición. Muchos efectos nocivos están asociados con la exposición a longitudes de onda electromagnéticas de alta energía o radiación ionizante (incluidos los rayos gamma, rayos X, y frecuencias ultravioletas (UVA, UVB, UVC). Estas altas frecuencias pueden reaccionar con el oxígeno y promover la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que pueden oxidar biomoléculas como el ADN y proteínas. Estas ERO son: anión superóxido, (O_2^-) peróxido (O_2^{2-}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) radical hidroxilo ($\cdot OH$) e ion hidroxilo (OH^-) (Ikehata y Ono, 2011). Se sabe que las ERO pueden dañar la estructura y función de moléculas intracelulares importantes como proteínas, lípidos, DNA y RNA. Como resultado, varios mecanismos biológicos han evolucionado para limitar y reparar el fotodaño. La melanización es un mecanismo de protección contra la radiación ionizante gracias a las propiedades ópticas y antioxidantes de la melanina.

El papel de la melanina en la fotoprotección es ampliamente conocido en la piel humana, funcionando como un protector solar natural al absorber y disipar los fotones de la radiación ionizante dentro de su estructura. Mientras que otros pigmentos biológicos solo son capaces de absorber un rango estrecho de frecuencias de luz, la estructura de la melanina resulta en la absorción de toda la porción UV y Visible del espectro electromagnético (Meredith y Sarna, 2006).

1.5.2 Capacidad antioxidante

Una propiedad común de todos los pigmentos biológicos es su capacidad para aceptar y neutralizar los radicales libres exógenos (McGraw, 2005), y la melanina no son la excepción, pues son poderosos antioxidantes. En los hongos, la melanina contribuye a la virulencia al interferir con los factores de defensa del huésped, incluida la neutralización del estallido oxidativo de las células fagocíticas (Cunha et al., 2010; Nosanchuk y Casadevall, 2003; Schnitzler et al., 1999). La melanina fúngica también puede proteger contra el hipoclorito, el permanganato y el peróxido de hidrógeno.

Además de actuar como potentes desactivadores de radicales, la melanina contiene electrones no apareados que pueden responder a los campos magnéticos, de ahí su carácter paramagnético. Debido al intercambio de electrones que ocurre en la molécula de melanina con metales esta ha sido utilizada como plataformas para la síntesis de nanopartículas metálicas (Apte et al., 2013). Se puede detectar el paramagnetismo de la melanina utilizando resonancia de paramagnética electrónica (RPE); por lo que este análisis es comúnmente utilizado para caracterizar a la melanina y diferenciarla de otros pigmentos oscuros (Cordero y Casadevall, 2017).

1.5.3 Unión con metales

Dada la composición aromática de los polímeros de melanina y la variedad de grupos funcionales hidroxilo, carboxilo, amina y fenólicos presentes en el pigmento, no es sorprendente que la melanina forme interacciones moleculares con

muchas moléculas orgánicas e inorgánicas. De hecho, la melanina fúngica puede formar enlaces covalentes, iónicos e interacciones hidrofóbicas con proteínas, polisacáridos, plaguicidas, medicamentos y otros compuestos (Fogarty y Tobin, 1996). La melanina exhibe una gran afinidad y capacidad de unión a una gran cantidad de iones metálicos, por ejemplo, Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Cd^{+2} y Pb^{+2} . Estas uniones dependen del pH, el tipo de melanina y del ion metálico (Fogarty y Tobin, 1996; Ben-Shachar et al., 1991; Hong et al., 2007; Hong and Simon, 2006; Samokhvalov et al., 2007; Costa et al., 2012), pues la unión a metales implica interacciones con grupos funcionales carboxilo, amina e hidroxilo del pigmento (Costa et al., 2012; Hong et al., 2007; Hong y Simon, 2006; Samokhvalov et al., 2007).

1.5.4 Protección contra la desecación

La melanización fúngica se ha asociado con la protección y la adaptación a las condiciones secas (Zhdanova y Pokhodenko, 1973). Por ejemplo, la inhibición de la síntesis de melanina por *Cenococcum geophilum* resultó en una mayor susceptibilidad al estrés osmótico y desecación (Koide y Fernandez, 2013). La melanina fúngica puede proteger contra la desecación al aumentar la capacidad de las células para absorber y retener agua. La melanina es conocida por su carácter higroscópico y su fuerte asociación con el agua que determina sus propiedades electroconductoras (Jastrzebska et al., 1995). Los estudios con melanina sintética y naturales (de origen no fúngico) han mostrado que la melanina se une débilmente con el agua y esta última puede eliminarse fácilmente mediante secado o calentamiento por encima de los 60 °C o generar uniones más fuertes con el agua cuando esta se encuentra unida dentro de la estructura de melanina por lo que requiere temperaturas más altas (superiores a 150 °C) para su eliminación de la melanina (Albanese et al., 1984).

Dado que la melanización puede cambiar la porosidad en la pared celular (Eisenman et al., 2005; Kogej et al., 2007), la melanina podría afectar el intercambio

de osmolitos haciendo que la célula sea más hipertónica y reducir la pérdida de agua.

La efectividad de los HE depende mucho de la capacidad de sobrevivir a las condiciones bióticas y abióticas del sistema donde son asperjados, ya que suelen enfrentarse a altas y bajas temperaturas, radiación solar, baja disponibilidad de agua, además del sistema de defensa del insecto blanco, por lo que el estudio de moléculas sintetizadas por el HE que le permitan enfrentar estas condiciones son de interés dentro de los programas de control biológico; sin embargo, hasta este trabajo no se había reportado la presencia de melanina en HE. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia del pigmento melanina en dos especies de *Cordyceps*, su caracterización y determinar su influencia en la calidad de los conidios de ambas especies de hongos.

2 Antecedentes

Los procesos oxidantes a los que se enfrentan los hongos entomopatógenos limitan su uso como agentes de control biológico debido a que disminuyen su viabilidad, por lo que se han generado estrategias para propiciar una protección al daño oxidante. Entender estos mecanismos y cómo afectan a los hongos entomopatógenos ayudará a mejorar el sistema de producción que actualmente se usa.

Una de las estrategias utilizadas para mejorar la calidad de hongos entomopatógenos (HE) ha sido su cultivo bajo un estrés subletal, que se aplica en etapas específicas de su desarrollo. El estrés genera un ambiente oxidativo suficiente para generar las señales necesarias para la síntesis de moléculas que le permitan desarrollar resistencia al ambiente oxidante, y a su vez desencadena otros mecanismos que le permitiría hacer frente a otros factores de estrés, fenómeno conocido como protección cruzada; sin embargo, son poco conocidos y entendidos dichos mecanismos de señalización y qué moléculas se modifican en su síntesis.

Este fenómeno ha sido observado en dos especies de *Cordyceps* que al ser cultivados bajo una atmósfera modificada al 26% de oxígeno (AM), producen conidios con mejor calidad; en especial estos conidios tienen una mayor resistencia a radiación UV-B que conidios obtenidos de los mismos hongos en condiciones de cultivo “normales” (21% de O₂) (Miranda Hernández, et al., 2014; Muñiz Paredes, et al., 2017).

Una gran parte de los estudios enfocados en la calidad de HE, relacionan la calidad de los conidios con la abundancia de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión superoxidasa (GPX), entre otras, ya que ellas se encargan de hacer frente a las ERO que, si se acumulan, podrían generar un estrés oxidante en la célula que se traduciría en daño a moléculas importantes como proteínas, lípidos, ADN y ARN. A su vez, varios de los factores a los que se enfrentan los HE una vez son asperjados en campo, son factores bióticos y abióticos (calor, frío, radiación UV, desecación y sistema de defensa del insecto) que generan

diferentes tipos de estrés y que desembocan en un estrés oxidativo, por lo que un incremento en la capacidad antioxidante total del conidio se traduciría en una mayor calidad.

De este modo, se han correlacionado el incremento en la concentración intracelular de enzimas antioxidantes con la resistencia a radiación UV-B en HE (Li et al., 2015; Wang et al., 2013; Zhang y Feng, 2018); sin embargo, es muy probable que otros mecanismos de defensa estén involucrados en la resistencia a este tipo de radiación, tal es el caso de la melanina, pigmento que debido a sus propiedades espectrales puede absorber en todas las longitudes de onda del UV-Visible, por lo que la melanina presente en las células forman parte de los mecanismos que pueden prevenir el daño de diferentes fuentes de estrés como la radiación UV.

En los hongos melanogénicos, la melanina brinda protección contra el estrés ambiental como la radiación UV (Romero-Martinez et al., 2000), el estrés por calor y frío (Rosas y Casadevall, 1997), la presencia de metales pesados (Fogarty y Tobin, 1996) entre otros. Además, la melanina es un factor de virulencia importante en los hongos, ya que puede interferir con las defensas inmunes del huésped (Cordero y Casadevall, 2017; Cunha et al., 2010) y neutralizar el estallido oxidativo de las células fagocíticas (Schnitzler et al., 1999)

Hasta la fecha, no existen reportes que identifiquen y caractericen la melanina presente en HE utilizados en el control de plagas, aunque varias especies de HE poseen conidios con pigmentación oscura. Con el fin de mejorar la calidad de los conidios de *M. anisopliae*, se añadió por ingeniería metabólica una ruta biosintética de melanina en este hongo lo que resultó en una mayor virulencia y tolerancia a las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la cepa modificada (Tseng et al., 2014).

El ascomiceto *Cordyceps fumosorosea* es un hongo entomopatógeno comercial ampliamente utilizado para el control biológico de plagas de insectos de impacto global (Muñiz Paredes et al., 2017; De Faria y Wraight, 2007), como *Plutella xylostella* (Huang et al., 2010; Xu et al., 2011) y *Bemisia tabaci* (Tian et al., 2015). El micelio de *C. fumosorosea* es blanco, pero sus conidios poseen una pigmentación

marrón/gris; sin embargo, se desconoce si este pigmento es melanina. Dada la importancia de la melanina para proteger los hongos del estrés ambiental, como factor de virulencia, y considerando que *C. fumosorosea* es un importante agente de control biológico, surge el interés por el estudio de este pigmento en estos hongos, así como una estrategia que pueda incrementar su concentración en los conidios.

3 Hipótesis

La pigmentación oscura en los conidios de *Cordyceps* se debe a la presencia de melanina, y este pigmento está relacionado con la virulencia y capacidad de los conidios a tolerar estrés por calor, UV-B y dimetoato.

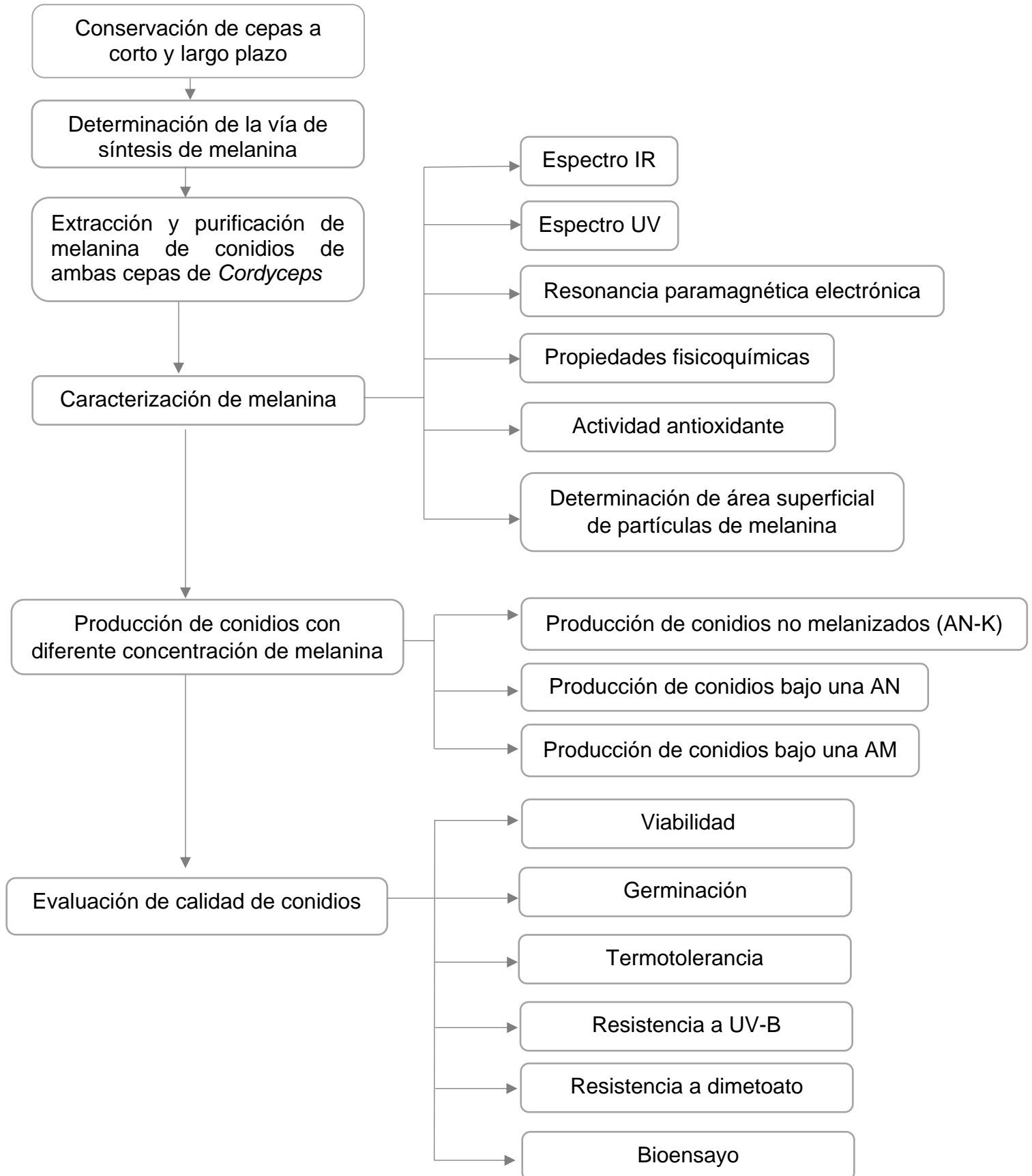
4 Objetivo general

Caracterizar químicamente la melanina y determinar la influencia de este pigmento en la calidad de los conidios de dos especies de *Cordyceps*.

Objetivos particulares

- Comprobar la presencia de melanina en los conidios de dos cepas de *Cordyceps*.
- Determinar la vía de síntesis de la melanina de dos especies de *Cordyceps*.
- Caracterizar fisicoquímica y espectralmente el pigmento oscuro presente en los conidios de ambas especies de *Cordyceps*.
- Establecer el efecto de una atmósfera enriquecida con O₂ al 26% en la concentración de melanina en los conidios de ambas especies de *Cordyceps*.
- Determinar las condiciones de cultivo para la obtención de conidios albinos.
- Comprobar la influencia de melanina en la calidad de ambas especies de *Cordyceps*.

Diagrama de Estrategia Experimental



5 Materiales y métodos

5.1 Microorganismos

Se utilizaron dos especies de hongos entomopatógenos: *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB 303, perteneciente al Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNCRB, Colima, México) (Gallou et al., 2016) y *Cordyceps fumosorosea* ARSEF 3302, obtenida de la colección de cultivos de hongos entomopatógenos del Departamento de Investigación Agrícola (ARSEF, por sus siglas en inglés), perteneciente al Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América (USDA, por sus siglas en inglés), con número de catálogo 3302.

Estas cepas fueron propagadas por estría en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de agar dextrosa Sabouraud (ADS) (agar 15g/L, maltosa 20 g/L, peptona de caseína 5 g/L, peptona de carne 5 g/L, dextrosa 40 g/L), previamente esterilizados en autoclave a 15 PSI durante 15 min. Posteriormente se incubaron a 28 °C ± 1 °C por 10 días con fotoperiodo 12/12 h luz/obscuridad (modificado de Miranda-Hernández, 2010).

5.2 Conservación de cepas

Con el objetivo de trabajar con los mismos estados fisiológicos de las dos especies de *Cordyceps* que se evaluaron en el trabajo de maestría (Suárez-Vergel 2017), se utilizaron conservados liofilizados de ambas cepas para los ensayos de este trabajo. Para ello, se agregó 1 mL de Tween 80 0.5% a cada liofilizado y se dejó humectar por 1 min homogenizando por pipeteo, posteriormente se tomaron 300 µL de esta suspensión y se inocularon a matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio ADS, los cuales fueron incubados por 10 días a 28 °C con fotoperiodo 12/12 h luz/oscuridad. Transcurrido este tiempo, se cosecharon los conidios y se preparó una suspensión estándar de 1X10⁶ conidios/mL y se procedió a inocular por punción cada una de las cepas en cajas Petri que contenían medio ADS, las cuales fueron incubadas bajo las condiciones antes mencionadas. A partir

de estos cultivos monoclonia se tomaron trozos del medio ADS esporulado y se colocaron en viales de vidrio de 10 mL que contenían 4 mL de agua destilada, previamente esterilizados. Estos viales se sellaron con Parafilm y se almacenaron en refrigeración a 4 °C.

5.3 Cultivo de inóculo inicial

Los conidios conservados en agua destilada se propagaron en matraces Erlenmeyer que contenían 50 mL de medio ADS, posteriormente se incubaron a 28 °C con fotoperiodo 12/12 h por 10 días. Los conidios obtenidos de este cultivo se utilizaron para iniciar todos los experimentos.

5.4 Caracterización de melanina

5.4.1 Identificación de la vía de síntesis de melanina

Se utilizaron concentraciones subletales de inhibidores de la síntesis de melanina para determinar la vía de síntesis de este pigmento que utiliza cada cepa de *Cordyceps*: ácido kójico (Sigma-Aldrich, EE. UU.) el cual es un inhibidor de la vía de melanina-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y triciclazol (Sigma-Aldrich, EE. UU.), como inhibidor de la vía de la melanina-1,8-dihidroxinaftaleno (DHN) (Wheeler y Greenblatt, 1988). Cada inhibidor se disolvió en el solvente apropiado (agua estéril para ácido kójico o etanol para triciclazol), y se agregó al medio ADS estéril y frío a una concentración final de 0, 1, 10 o 100 µg /mL (Elliott, 1995). Posteriormente, los medios de cultivo conteniendo cada inhibidor a diferentes concentraciones, se vertieron en cajas Petri. Cuando fue necesario, se utilizaron concentraciones más altas de inhibidores de melanina para lograr la inhibición total de la pigmentación de los conidios de ambas cepas de *Cordyceps* (0 a 10 mg/ml). Las placas de Petri con inhibidores se inocularon por punción con cada especie de *Cordyceps* y se incubaron durante 10 días a 28 °C ± 1 con un fotoperíodo de 12/12 h (Luz / Oscuridad).

5.4.2 Extracción y purificación de melanina

Los pigmentos de los conidios se extrajeron utilizando los métodos descritos por Gadd (2009), Sava et al., (2001) y Ghamrawi et al., (2014) con modificaciones. Los conidios del punto 5.3 “cultivo de inóculo inicial” se cosecharon agregando 20 ml de Tween 80 (0.05 % v/v) a cada matraz seguido de agitación magnética vigorosa durante 10 minutos, posteriormente fueron recuperados por centrifugación a 9000 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 20 mL de una solución que contenía NaOH 1 M y se colocó en baño con agua hirviendo durante 20 minutos. Posteriormente, los conidios se lisaron en un disruptor celular (Mini-beadbeater 16, Biospec Products, Bartlesville, Ok, EE. UU.) durante 2 min, para ello se utilizaron 500 mg de perlas de vidrio estériles (0.5 mm de diámetro, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE. UU.), se centrifugaron a 2500 g por 10 min y se repitió este proceso dos veces. Para recuperar la melanina, el sobrenadante se acidificó a pH 2.5 usando HCl 6 M y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. La melanina precipitada se recuperó por centrifugación durante 10 min a 9000 g, se sometió a hidrólisis ácida en HCl 6 M a 100 °C durante 2 h, se lavó con diferentes solventes concentrados (cloroformo, acetato de etilo y etanol) en una relación 1:1:5 respectivamente, posteriormente se centrifugó, se decantó el sobrenadante y se secó a temperatura ambiente. Posteriormente la melanina se solubilizó en NaOH 1 M, se centrifugó y el sobrenadante se acidificó a pH 2,5 con HCl 2 M. Finalmente, se centrifugó a 2500 g por 3 min, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 mL de agua desionizada, se homogenizó por pipeteo, se centrifugó y se retiró el sobrenadante, este lavado con agua desionizada se realizó 3 veces y posteriormente las muestras fueron liofilizadas.

5.4.3 Propiedades espectrales

5.4.3.1 Espectro UV-Visible de melanina

Se prepararon soluciones de los pigmentos purificados a una concentración de 1.81 µg/mL con una disolución acuosa de NaOH 10 mM. Sus espectros de absorción UV-visible se registraron en el rango de longitud de onda de 190-700 nm en un espectrofotómetro UV-visible (GENESYS 10S UV-Vis, Waltham, MA, EUA) y se compararon con el espectro de absorción de una solución de melanina sintética

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) la cual fue preparada del mismo modo que las muestras de melanina purificadas.

5.4.3.2 Espectro IR de melanina

El análisis de espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) se realizó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, Ciudad de México). Basado en las condiciones reportadas por Pal et al., (2013), el espectro IR se obtuvo de melanina purificada de cada cepa *Cordyceps* y de melanina sintética (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como control; se realizó mediante el método de tableta en KBr en un espectrómetro IR (FT-IR SPECTRUM 400, PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). Los espectros se leyeron en un rango espectral de 400–4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

5.4.3.3 Espectro RPE

Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (RPE) se tomaron en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, Ciudad de México). El análisis de los pigmentos purificados de cada especie de *Cordyceps* y de la melanina sintética se realizó en estado sólido a 25 °C en un espectrómetro de resonancia paramagnética electrónica (espectrómetro de ESR de banda X JES-TE300, Jeol, Tokio, Japón), a una frecuencia de modulación de 100 kHz, con una cavidad cilíndrica de modo TE₀₁₁ basada en las condiciones reportadas por Pal et al., (2013). Para los análisis, 15 mg de las muestras individuales se colocaron en tubos de cuarzo de 5 mm de diámetro (Wilma Lab Glass, Vineland, NJ, EE. UU.). La calibración del campo magnético externo se realizó utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH).

5.4.4 Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante (AA) de cada muestra de melanina se evaluó utilizando el ensayo de eliminación de radicales libres DPPH (2,2-difenil-1-

picrilhidracilo) siguiendo el método de Brand-Williams et al., (1995) con modificaciones. La melanina fúngica se solubilizó en dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a 2500, 2000, 1500, 1000, 500 y 100 µg/mL. Para cada concentración de melanina, se mezclaron 40 µL de la solución de melanina fúngica con 960 µL de solución DPPH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) preparada en metanol el día que se realizó el ensayo.

Después de mantener las muestras en la oscuridad durante 30 min, se determinó la reducción de DPPH midiendo la absorbancia a 517 nm. A modo de comparación, se realizó el mismo ensayo utilizando melanina sintética (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a 500, 400, 300, 200, 100 y 10 µg/mL. Las curvas estándar para la reducción de DPPH se prepararon utilizando ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) como un antioxidante de referencia (1, 10, 30, 50, 70 y 90 µg/mL), utilizando el mismo método. El porcentaje de actividad de barrido de DPPH de cada muestra se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de eliminación de DPPH (\%)} = \{1 - [(A_s - A_z) / A_c]\}$$

donde A_s es la absorbancia de las muestras mezcladas con la solución DPPH, A_z es la absorbancia de las muestras de melanina sin solución DPPH y A_c es la absorbancia de la solución DPPH sin muestras. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

5.4.5 Determinación de la morfología y tamaño de las partículas de melanina

Las micrografías de partículas de melanina de ambas cepas de *Cordyceps* se tomaron en el Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Autónoma Metropolitana–Iztapalapa (Ciudad de México, México). Las muestras se montaron en soportes metálicos con cinta conductora de carbono de doble cara, posteriormente se recubrieron con oro para aumentar su conductividad. Las micrografías fueron tomadas en el microscopio JEOL JSM-5900LV SEM y se operó a un voltaje de aceleración de 15 kV.

5.5 Cuantificación de melanina en conidios cultivados en diferentes atmósferas (AN y AM)

5.5.1 Producción de conidios bajo una atmósfera normal (AN) y atmósfera modificada (AM)

Las atmósferas normal y modificada fueron aplicadas en las cepas de *C. fumosorosea* ARSEF 3302 y *C. javanica* CHE-CNRCB 303 de acuerdo con la metodología descrita por Miranda-Hernández et al., (2014) y Tlecuítl-Beristain et al., (2010). A partir del inóculo inicial se preparó una suspensión a 1×10^8 conidios/mL, de la cual se tomaron 100 μ L, equivalente a 1×10^7 conidios, y a continuación se inocularon frascos serológicos que contenían 10 mL de medio ADS, los cuales fueron incubados a 28 ± 1 °C con fotoperiodo 12/12 h. Las botellas serológicas que se cultivaron bajo una AN conservaron el tapón de algodón. A las 60 h de incubación, se tomó una fracción de las botellas serológicas, se les aplicó el tratamiento AM; para ello se les cambió el tapón de algodón por uno hermético de hule, posteriormente se les inyectó una mezcla gaseosa, proveniente de un tanque con O₂ al 26 % (PRAXAIR), a un flujo de 20 cm³/s, por 1 min, además, se usó una aguja de salida (purga). A partir del inicio de la modificación atmosférica, estos recambios se efectuaron cada 24 h hasta las 156 h de incubación. Posteriormente la melanina fue aislada de los conidios de cada tratamiento como se mencionó en el apartado 5.4.2.

5.5.2 Curva estándar de melanina

Se construyó una curva estándar de melanina sintética (Sigma-Aldrich), para ello se prepararon soluciones 0, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70 y 90 μ g/mL de este pigmento en NaOH 10 mM. Las muestras se midieron en un espectrofotómetro UV-Visible (Thermo Scientific, Genesys 10S) en celda de cuarzo a 405 nm.

5.5.3 Cuantificación de melanina

Las muestras de melanina fúngica purificadas y liofilizadas de ambas cepas de *Cordyceps* del apartado 5.1 fueron solubilizadas en NaOH 10 mM, y se midió su absorbancia a 405 nm en celdas de cuarzo.

5.6 Condiciones de cultivo para obtener conidios no melanizados

5.6.1 Crecimiento radial a diferentes concentraciones de ácido kójico o triciclazol

Para determinar la influencia de la melanina en la calidad de los conidios se produjeron conidios con diferentes concentraciones de melanina usando diferentes estrategias, una de ellas fue la producción de conidios no melanizados a través del uso de inhibidores de la vía de síntesis de melanina, por lo que se determinó la concentración de ácido kójico mínima necesaria para obtener conidios no melanizados sin afectar el crecimiento radial y producción de conidios de los hongos, para ello se llevó a cabo la siguiente metodología:

Tras obtener las muestras se prepararon suspensiones de 1×10^8 conidios/mL, a partir de éstas se inocularon por punción el centro de cajas Petri que contenían medio ADS, las cuales fueron preparadas a diferentes concentraciones de ácido kójico (0, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 2, 5, 8 y 10) mg/mL o 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ de triciclazol. Posteriormente, fueron incubadas a 28 ± 2 °C con fotoperiodo 12/12 h luz/oscuridad, y a partir del séptimo día se tomaron fotografías de las colonias. Esto se realizó en campana de flujo laminar y a 10 cm de distancia sobre la superficie de las cajas Petri. Para obtener el crecimiento radial de las monoclonias se utilizó el programa ImageJ^{MR}.

5.6.2 Producción de conidios a diferentes concentraciones de ácido kójico

Se añadieron 10 mL de medio ADS en botellas serológicas a las cuales se les añadió 0, 0.1 y 1 mg/mL de ácido kójico, posteriormente fueron inoculadas con una suspensión de conidios de cada especie de *Cordyceps*, fueron incubadas por 10 días a mismas condiciones del apartado 5.1. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 20 ml de Tween 80 al 0.05% a cada una de las botellas y se agitó en parrilla magnética por 10 min. El conteo de los conidios se realizó en cámara de

Neubauer con un microscopio óptico (BOECO). La producción se reportó como conidios por centímetro cuadrado (con/cm²).

5.7 Obtención de conidios con diferentes concentraciones de melanina

5.7.1 Producción de conidios no melanizados (AN-K)

Se adicionó 1 mg/mL de ácido kójico al medio de cultivo ADS estéril y frío. Se adicionaron 10 mL de este medio a botellas serológicas. A partir del inóculo inicial se estandarizó una suspensión a 1×10^8 conidios/mL y a continuación se inocularon las botellas serológicas que contenían 10 mL de medio ADS y ácido kójico con 1×10^7 conidios, los cuales fueron incubados a 28 ± 1 °C con fotoperiodo 12/12 h. Estas botellas serológicas se cultivaron bajo una atmósfera normal a 21% de O₂ con ácido kójico (AN-K).

5.7.2 Obtención de muestras experimentales

Los conidios de los tratamientos AN, AM y AN-K se cosecharon a las 156 h de incubación, para ello se adicionaron 20 mL de solución Tween 80 al 0.05 % v/v a las botellas serológicas con sus respectivos triplicados por tratamiento, y se agitaron durante 10 minutos con un agitador magnético. Transcurrido ese tiempo se depositó la solución final en tubos Falcón de 50 mL, y a partir de estas suspensiones se realizaron las pruebas de calidad de los conidios de ambas especies de *Cordyceps*.

5.8 Pruebas de calidad

5.8.1 Germinación

Una vez obtenidas las muestras experimentales se estandarizaron suspensiones a una concentración de 1×10^8 conidios/mL. Se tomaron 30 µL de estas suspensiones y se inocularon en cajas de Petri que contenían medio Agar-Agua (Garcia, 2012). El inóculo se distribuyó uniformemente con ayuda de una

varilla de vidrio. Las cajas se sellaron con Parafilm y se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 10 h (Miranda Hernández, 2014), posteriormente se observó al microscopio (40 X) y se registró la germinación de al menos 100 conidios observados. Se consideró a un conidio germinado cuando su tubo germinal es igual o mayor a la anchura del conidio sin germinar (Safavi et al., 2007).

5.8.2 Viabilidad

A partir de las muestras experimentales de los tres tratamientos se obtuvieron suspensiones a una concentración de 1×10^4 conidios/mL, con la que se inocularon 300 conidios en cajas de Petri con medio ADS, posteriormente las placas se incubaron durante 48 h en fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, posteriormente se cuantificó el porcentaje de viabilidad (%) con base en las unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas en cada unidad experimental.

5.8.3 Crecimiento radial en presencia de dimetoato

A partir de las muestras experimentales de los tres tratamientos se prepararon suspensiones de 1×10^8 conidios/mL, a partir de éstas se inocularon por punción el centro de cajas Petri que contenían medio ADS, éstas cajas contenían diferentes concentraciones de dimetoato (0, 50, 100, 200 y 400 ppm). Las placas de Petri se incubaron durante 7 días en fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Se tomaron fotografías a los 7 días de crecimiento. Esto se realizó en campana de flujo laminar a 10 cm de distancia sobre la superficie de las cajas de Petri. Se analizó el crecimiento radial de las monoclonias con el programa ImageJ^{MR}.

5.8.4 Resistencia a dimetoato

A partir de las muestras experimentales de los tres tratamientos (AN, AM y AN-K) se obtuvieron suspensiones a una concentración de 1×10^4 conidios/mL, con la que se inocularon 300 conidios en cajas Petri con medio ADS, que contenían diferentes concentraciones de dimetoato (0, 50, 100, 200 y 400 ppm). Posteriormente, las placas se incubaron durante 48 h en fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, posteriormente se cuantificó la sobrevivencia (%) con

base en las unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas en cada unidad experimental.

5.8.5 Termotolerancia

A partir de las muestras experimentales de los tres tratamientos (AN, AM y AN-K) se obtuvieron suspensiones a una concentración de 1×10^4 conidios/mL, con la que se inocularon 300 conidios en cajas de Petri con medio ADS, y se mantuvieron a una temperatura de $38 \text{ }^\circ\text{C}$ a diferentes tiempos de exposición (0, 40, 80, 120 y 160 min) (Miranda Hernández et al., 2014). Después de la exposición, las placas se incubaron durante 48 h en fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se cuantificó la sobrevivencia (%) con base en las unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas en cada unidad experimental.

5.8.6 Resistencia a UVB

Las pruebas de resistencia a radiación UVB se realizaron con base en lo descrito por García-Ortiz et al., (2018). Se utilizó una lámpara fluorescente UVB (UVB Narrowband PL-L / PL-S, Philips, Eindhoven, Holanda) en una cámara de esterilización Torrex a $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, donde la irradiancia fue medida con un luxómetro UV (LT-YK35UV, Twilight, Monterrey, México). A partir de las muestras experimentales de los tres tratamientos (AN, AM, AN-K) se obtuvieron suspensiones a una concentración de 1×10^4 conidios/mL, con las que se inocularon 300 conidios en cajas de Petri con medio ADS, y fueron expuestas a diferentes dosis de radiación UVB (0, 3.5, 7, 10 y 14 kJ/m^2). Después de la exposición, las placas se incubaron durante 48 h en fotoperiodo de 12/12 h luz/oscuridad a $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, posteriormente se cuantificó la sobrevivencia (%) con base en las unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas en cada unidad experimental.

5.8.7 Bioensayo

Una vez obtenidas las muestras experimentales de los tres tratamientos (AN, AM, AN-K) se estandarizaron suspensiones con una concentración de 1×10^8 conidios viables/mL. Se utilizaron larvas del insecto *Galleria mellonella* para el bioensayo.

Este insecto es conocido como el gusano de la cera, plaga para los panales de abejas, y ha sido utilizado para evaluar la infectividad de HE (Fang et al., 2009; Jabbour et al., 2011). En tubos Falcon de 50 mL se colocaron 15 larvas de *G. mellonella*, las cuales fueron sumergidas por 5 segundos en 20 mL la suspensión de conidios, se secaron y fueron colocadas en cajas de Petri, posteriormente fueron incubadas a 28 °C con fotoperiodo 12/12 h luz/oscuridad y se evaluó la mortalidad de las larvas cada 24 h por 10 días. Este proceso se realizó por quintuplicado para cada tratamiento, y se utilizó una solución de Tween al 0.05 % sin conidios como control negativo.

6 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado, a excepción de los ensayos de caracterización de melanina por técnicas espectrales y/o por microscopia electrónica de barrido, por otro lado, el bioensayo fue realizado por quintuplicado. Los datos obtenidos se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) o la prueba t de Student. La comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron con un nivel de significancia (α) de 0.05, para ello se utilizó el programa “*Estadísticas de IBM SPSS 25*” para Windows.

7 Resultados y Discusión

7.1 Vía de síntesis de melanina

El uso de inhibidores de las vías de síntesis de melanina es una de las principales técnicas que se han utilizado en diferentes trabajos para determinar la ruta de síntesis de este pigmento (Suryanarayanan et al., 2004; Pal et al., 2013; Ghamrawi et al., 2014). De hecho, esta es una prueba rápida para confirmar si un microorganismo es capaz de producir melanina de forma natural. Las dos cepas de *Cordyceps* fueron cultivadas usando diferentes concentraciones de ácido kójico, inhibidor de la síntesis de melanina por la vía DOPA, y triclazol, inhibidor de la vía de síntesis DHN. La despigmentación total de los conidios en ambas especies de *Cordyceps* se consideró como una inhibición completa de la biosíntesis de melanina.

Las concentraciones crecientes de inhibidores de melanina producen una disminución gradual de la pigmentación en los hongos melanóticos probados, fenómeno que se observó en ambas especies de *Cordyceps* (**Figura 1 y 2**). Ante la presencia de ácido kójico, inhibidor de la enzima polifenol oxidasa (PPO), a partir de una concentración de 0.1 mg/mL disminuyó la pigmentación en los conidios de ambas cepas de *Cordyceps*. A su vez se detectó una variación en el crecimiento radial de los hongos, probablemente debido a la actividad quelante del ácido kójico que, al capturar el cobre en el medio (Griffith et al., 2007) podría disminuir la actividad de varias cuproproteínas importantes, por su participación frente a estrés oxidativo o involucradas en el desarrollo celular, como la superóxido dismutasa (SOD), o la citocromo c oxidasa.

El uso de triciclazol como inhibidor de la vía de la DHN-melanina produjo resultados negativos. En la **Figura 3** no se observó una disminución de la pigmentación en ambas especies de *Cordyceps* cuando se cultivaron con este inhibidor de melanina. A partir de estas observaciones podríamos asumir que el pigmento producido en los conidios de ambas especies de *Cordyceps* corresponde a melanina y es producida por la vía de la DOPA-melanina.

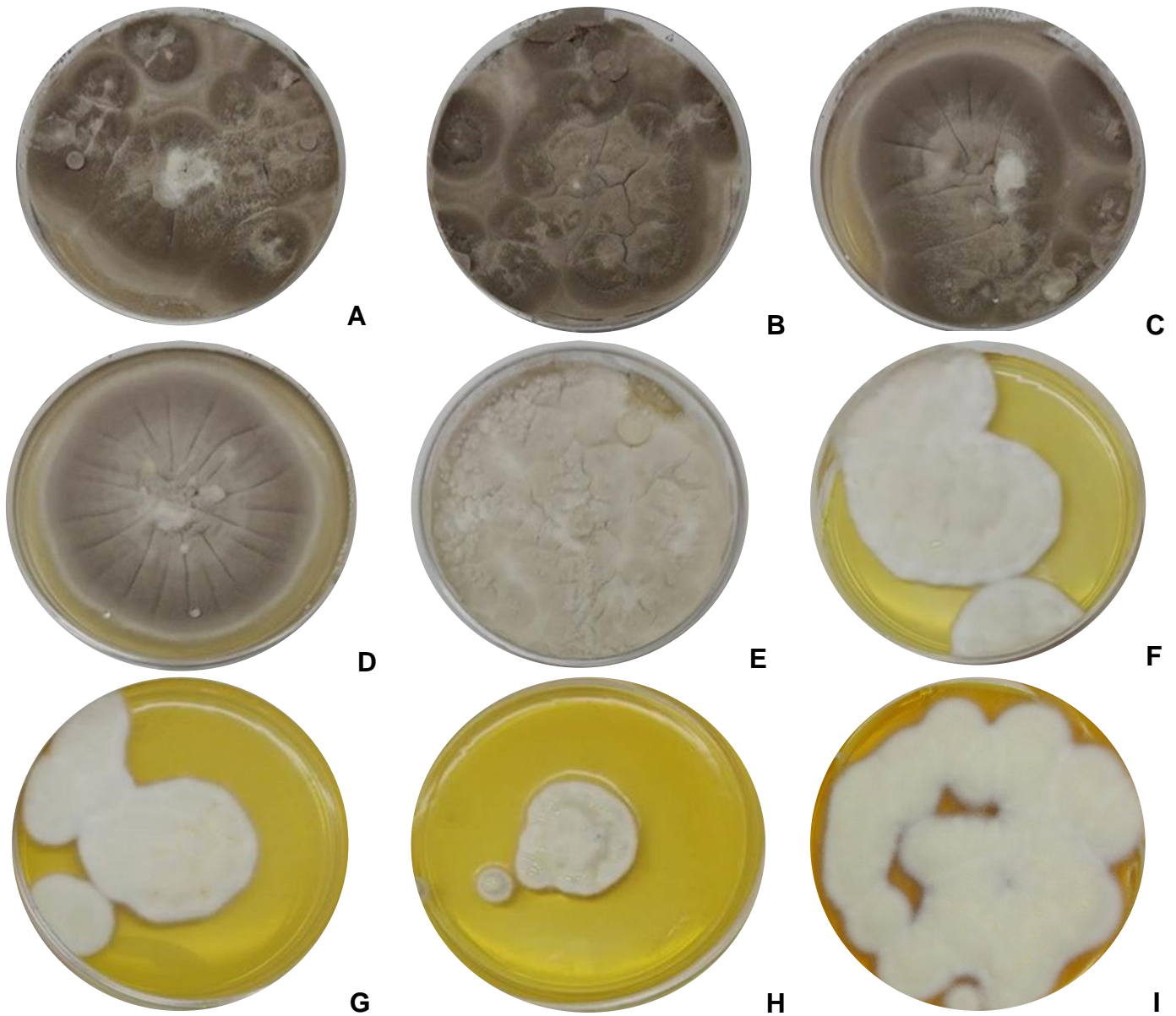


Figura 1.- Cultivo de *Cordyceps javanica* CHE-CNRCB 303 a 0 (A), 0.001 (B), 0.01 (C), 0.1 (D), 1 (E), 2 (F), 5 (G), 8 (H) y 10 (I) mg/mL de ácido kójico.

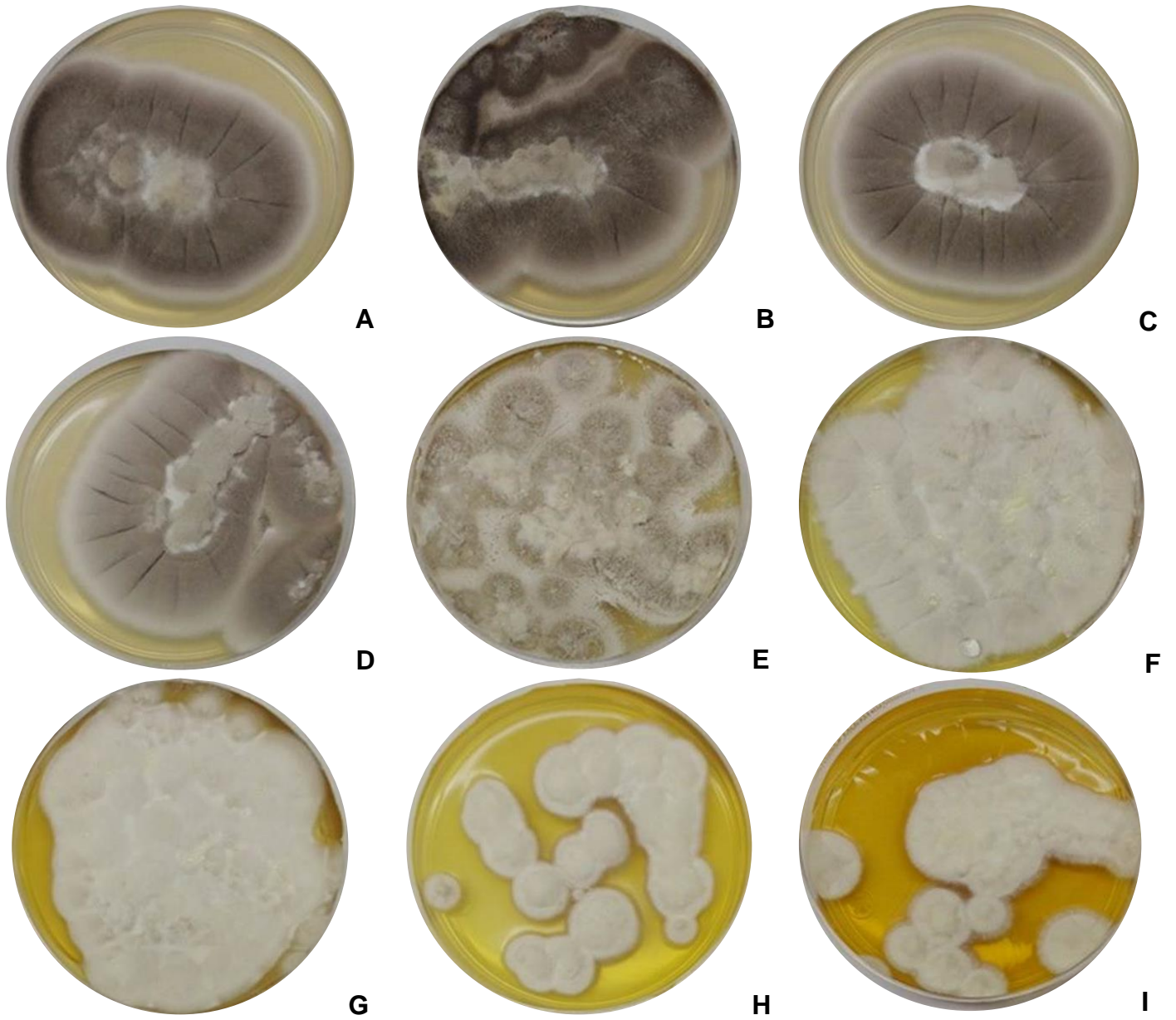


Figura 2.- Cultivo de *Cordyceps fumosorosea* ARSEF 3302 a 0(A), 0.001 (B), 0.01 (C), 0.1 (D), 1 (E), 2 (F), 5 (G), 8 (H) y 10(I) mg/mL de ácido kójico.

***C. fumosorosea* ARSEF 3302**

***C. javanica* CHE-CNRCB 303**

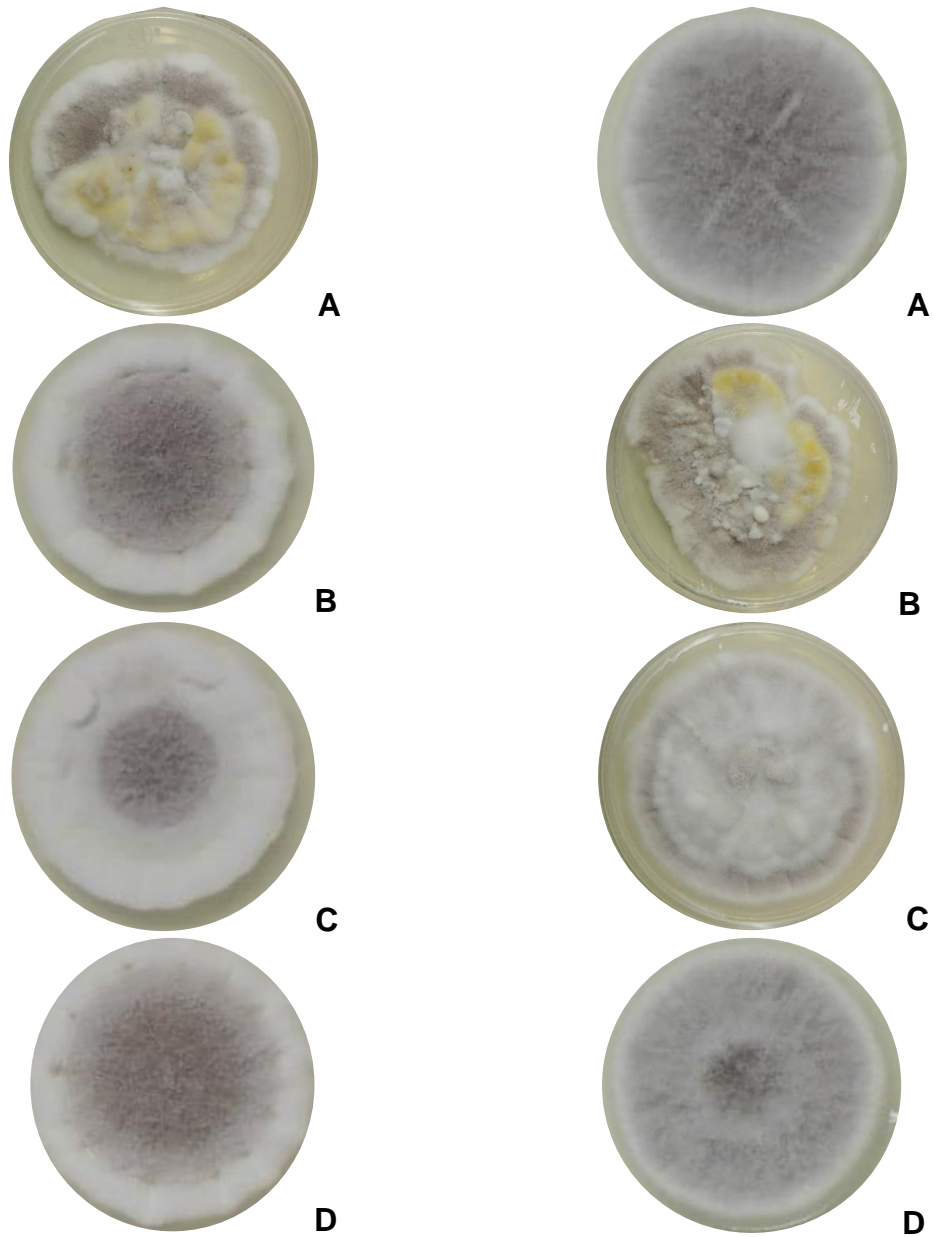


Figura 3.- Cultivo de las especies de *Cordyceps* a 0 (A), 1 (B), 10 (C) y 100 (D) µg/mL de triclicazol.

7.2 Propiedades fisicoquímicas de melanina

Debido a las propiedades de solubilidad y reactividad distintivas de la melanina, un primer paso hacia su identificación y caracterización generalmente se representa mediante pruebas fisicoquímicas convencionales, cuya función es respaldar, que el pigmento aislado es melanina, lo que permite proceder con análisis más avanzados como los de espectroscopía.

El esclarecimiento de las propiedades fisicoquímicas de la melanina fúngica es un requisito para comprender mejor las diversas funciones de este pigmento en la biología del hongo. Los pigmentos extraídos de los conidios de ambas cepas de *Cordyceps* tuvieron propiedades fisicoquímicas similares entre ellas (**Tabla 1**), y con la melanina sintética (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); a su vez, los resultados fueron consistentes con los reportados para melanina de diferentes orígenes biológicos en otros trabajos (Sava et al., 2001; Suryanarayanan et al., 2004; Pal et al., 2013 y Pacelli et al., 2020). Todos los pigmentos probados fueron solubles en KOH 1 M, NaOH 1 M y buffer de borato; además, no eran solubles en agua o solventes orgánicos (acetona, benceno, metanol, hexano o éter de petróleo). Estos compuestos también precipitaron con HCl 2 M y FeCl₃ al 1%, además generaron una coloración negro-marrón. Los pigmentos aislados se decoloraron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) e hipoclorito de sodio (NaOCl). Las pruebas químicas y las propiedades físicas confirmaron que los pigmentos aislados de ambas cepas de *Cordyceps* eran melanina.

Tabla 1.- Pruebas fisicoquímicas de melanina aislada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 y *C. fumosorosea* ARSEF 3302 comparadas con melanina sintética.

Prueba	Melanina sintética	<i>C. fumosorosea</i> ARSEF 3302	<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB 303
Solubilidad en H ₂ O a 25 °C	-	-	-
Solubilidad en cloroformo, acetato de etilo, acetona y etanol	-	-	-
Solubilidad en Na ₂ CO ₃	+	+	+
Solubilidad en NaOH a 20 °C	+	+	+
Solubilidad en NaOH a 50 °C	+	+	+
Decoloración por agentes oxidantes (H ₂ O ₂ y NaClO)	+	+	+
Precipitación con HCl y FeCl ₃	+	+	+

7.3 Análisis Espectrales de melanina

7.3.1 Espectro de absorción de luz visible UV

El espectro de absorción UV-visible de melanina se ha utilizado principalmente para identificar y caracterizar el pigmento extraído en una etapa preliminar. La longitud de onda de absorción máxima de las soluciones alcalinas de melanina oscila entre 196–300 nm, dependiendo de la fuente de melanina.

Las propiedades espectrales del pigmento confirmaron la naturaleza química de estos compuestos purificados de los conidios de cada cepa de *Cordyceps*. Las soluciones de melanina alcalina exhiben una fuerte absorbancia en la región UV, que disminuye gradualmente hacia longitudes de onda mayores. El espectro UV-visible (190 – 700 nm) de los pigmentos purificados mostró una alta capacidad de absorción en la región UV que disminuyó con el aumento de la longitud de onda (**Figura 4**). Hubo un pico de absorción característico de la melanina a 213 y 211 nm para los pigmentos aislados de *C. fumosorosea* y *C. javanica*, respectivamente (**Tabla 2**). Estos resultados fueron consistentes con el pico de absorción obtenido con melanina sintética (211 nm).

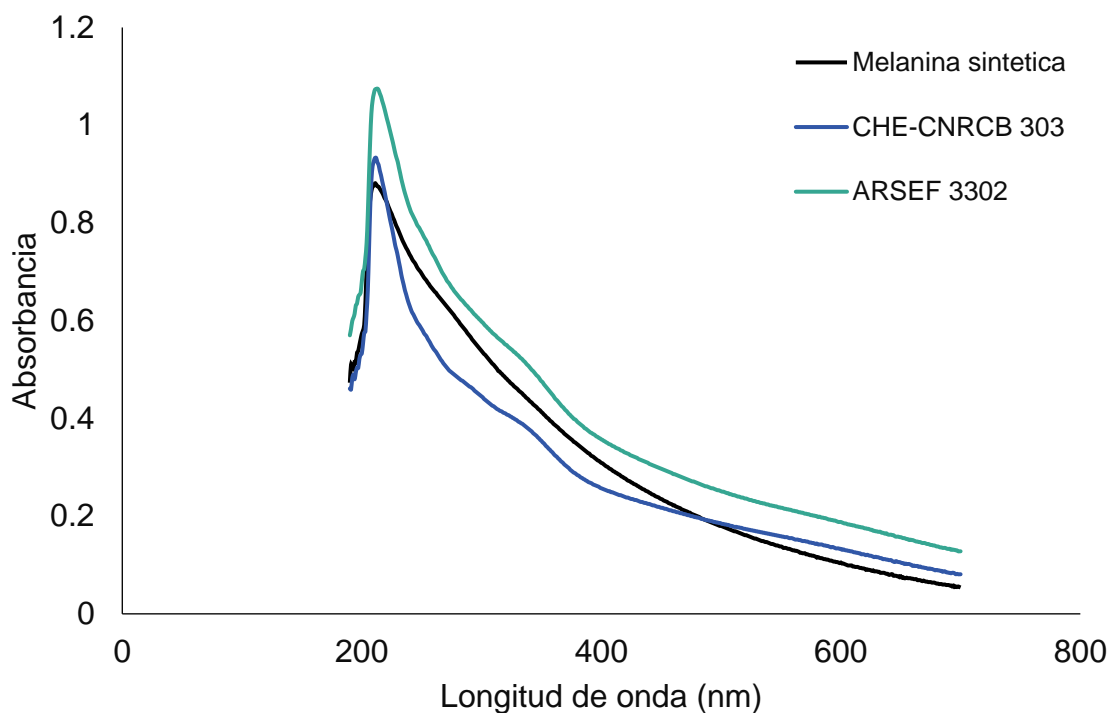


Figura 4. Espectro UV-visible de melanina aislada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (línea azul), *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (línea verde) y melanina sintética (línea negra).

Tabla 2.- Longitud de onda a la cual se alcanzó la máxima absorbancia de soluciones alcalinas de melanina aislada de ambas especies de *Cordyceps* y melanina sintética.

Origen de melanina	Máxima absorbancia (nm)
<i>C. fumosorosea</i> ARSEF 3302	213
<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB 303	211
Melanina sintética	211

La alta absorción de melanina por la luz ultravioleta se debe a las complejas moléculas conjugadas en la estructura de la melanina, que absorben y dispersan los fotones de la luz ultravioleta (Cockell y John, 1999) . Después del punto máximo de absorción de la melanina, la siguiente disminución de la absorción es casi lineal en la mayoría de los estudios con melanina y la falta de picos de absorción a 260

nm y 280 nm sugiere la ausencia de impurezas de ácidos nucleicos, lípidos o proteínas (Liu et al., 2018; Sun et al., 2016). Por lo tanto, cuando el logaritmo de la absorbancia de una solución alcalina de melanina se representa frente a la longitud de onda, se obtienen líneas rectas con pendientes negativas.

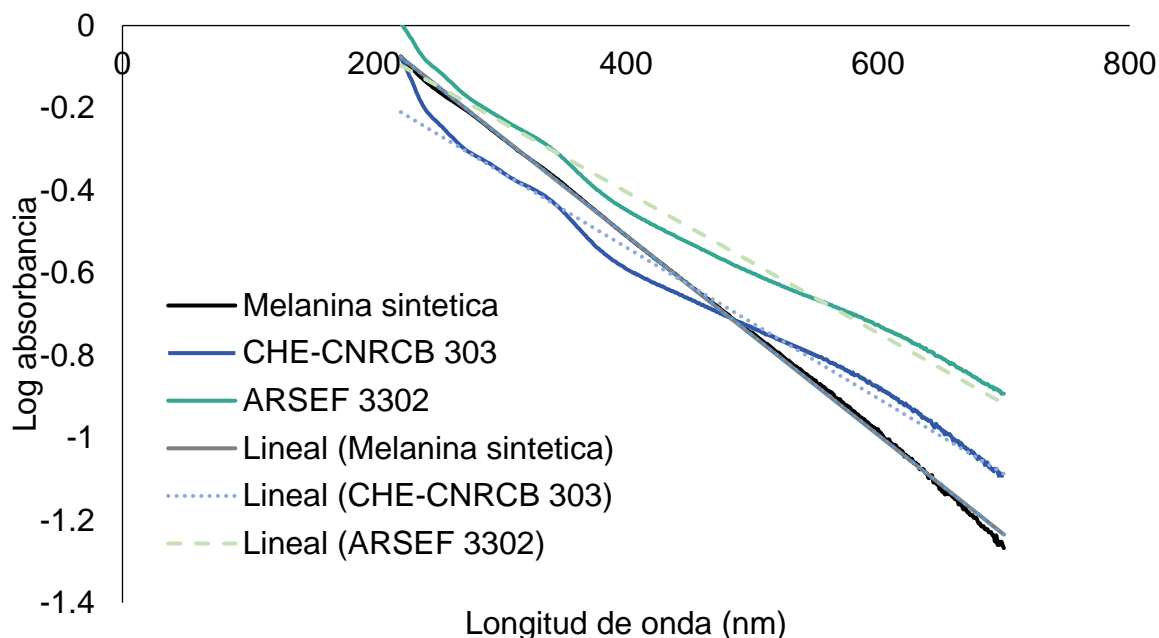


Figura 5. Gráficos del logaritmo de la absorbancia contra la longitud de onda. Para todos los casos, se obtuvieron líneas rectas con pendientes negativas, características de la melanina.

Dichas curvas rectas se observaron por primera vez para melanina de ratón en 1938 (Daniel, 1938), y también se ha confirmado para melanina fúngica (Ellis y Griffiths, 1974), y ha sido ampliamente adoptado como un parámetro de caracterización de melanina (Pal et al., 2013 y Hou et al., 2019). Las pendientes de las curvas de las muestras de melanina fueron -0.0018 y -0.0017 (**Tabla 3**) para la melanina purificada de *C. javanica* y *C. fumosorosea*, respectivamente (**Figura 5**), cercana al valor obtenido para la melanina sintética (-0.0024).

Tabla 3.- Pendiente obtenida del logaritmo de la absorbancia de una solución alcalina de melanina.

Origen de melanina	Pendiente
<i>C. fumosorosea</i> ARSEF 3302	-0.0017 ± 2.729 E-05
<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB 303	-0.0018 ± 2.611 E-05
Melanina sintética	-0.0024 ± 1.440 E-06

7.3.2 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Uno de los métodos más importantes para identificar y caracterizar la estructura de la melanina es la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR). Aunque los espectros IR de la melanina fúngica son ligeramente diferentes según el tipo de melanina y el procedimiento de extracción, existen varias bandas características que pueden rastrearse para identificar los principales grupos funcionales de la melanina. Los espectros FT-IR de la melanina generalmente incluyen bandas características que cubren 3600–3000 cm^{-1} , 1650–1600 cm^{-1} y 1500–1400 cm^{-1} . La prueba FT-IR se realizó para identificar melanina y comparar los pigmentos de melanina aislados de las dos cepas de *Cordyceps* (**Figura 6**).

Los espectros FT-IR para la melanina de ambos aislamientos de *Cordyceps* fueron similares y también fueron consistentes con el espectro de la melanina sintética. La fuerte y amplia banda de absorción observada con picos en el rango de ~ 3376–3200 cm^{-1} se atribuyeron a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH y -NH que a su vez pertenecen a las de los grupos amina, amida, ácido carboxílico, fenólico y aromático presente en los compuestos indol y pirrol (Haining y Achat-Mendes, 2017; Selvakumar et al., 2008; Hu et al., 2015; Dadachova et al., 2007).

Los espectros de melanina reportados en diversos trabajos también registraron picos de absorción alrededor de los 1220 cm^{-1} , que se atribuyeron a la vibración de estiramiento de los grupos CH alifáticos (Selvakumar et al., 2008; Ito, 1986; Chen et al., 2008; Youngchim et al., 2004; D'Ischia et al., 2013).

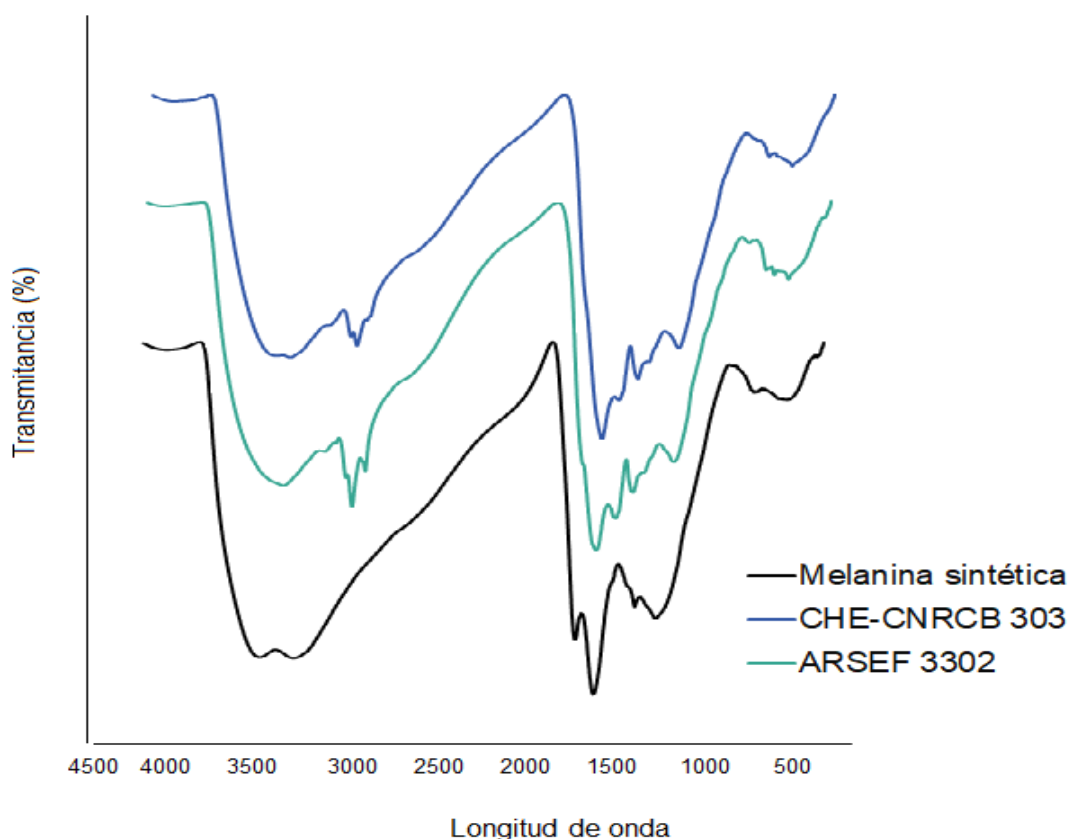


Figura 6.- Espectros IR de melanina aislada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (línea azul), *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (línea verde) y melanina sintética (línea negra).

La segunda banda fuerte característica tenía señales en el rango de ~ 1618 - 1632 cm^{-1} y se atribuyó a los modos de vibración de flexión del anillo aromático C = C y C = N enlace del sistema aromático. Además, un pico de absorción en el rango de ~ 1440 y ~ 1224 cm^{-1} se atribuyó a la flexión OH de los grupos fenólicos y carboxílicos (Dong y Yao, 2012; Hou et al., 2019).

Por debajo de 1100 cm^{-1} , las bandas de absorción, generalmente débiles, se asignaron a la deformación en el plano del enlace CH y los grupos aromáticos CH (Wang y Rhim, 2019; Xin et al., 2015; Hou et al., 2019; Raman y Ramasamy, 2017).

7.3.3 Resonancia paramagnética electrónica (RPE)

La melanina es una molécula estable frente a radicales libres que contiene electrones no apareados que pueden responder a los campos magnéticos, de ahí su carácter paramagnético. Por lo tanto, la melanina puede recibir o donar protones dependiendo de las condiciones. La firma paramagnética de la melanina se puede detectar mediante resonancia paramagnética electrónica (RPE), una técnica comúnmente utilizada para diferenciarla de otros pigmentos oscuros.

Muestra de melanina	Valor de G ± 0.0003	ΔH_{p-p}	Intensidad de señal (%)
<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB 303	2.0039	0.44	100
<i>C. fumosorosea</i> ARSEF 3302	2.0039	0.40	33
Melanina sintética	2.0037	0.43	21

Tabla 4.- Valores de G, ancho de pico y valores de intensidad de señal encontrados en el espectro RPE para melanina aislada de ambas cepas de *Cordyceps* y melanina sintética.

Se detectó la presencia de una señal isotrópica sin división hiperfina en el espectro RPE de los pigmentos (**Figura 7**) con valores G de 2.0039, 2.0039 y 2.0037 ± 0.0003 para melanina aislada de *C. javanica*, *C. fumosorosea* y melanina sintética, respectivamente y ancho de línea de pico a pico en el rango de 0.4 a 0.45 mT, estos resultados coinciden con los reportados para diferentes tipos de melanina (Mostert et al., 2013 y Pacelli et al., 2020).

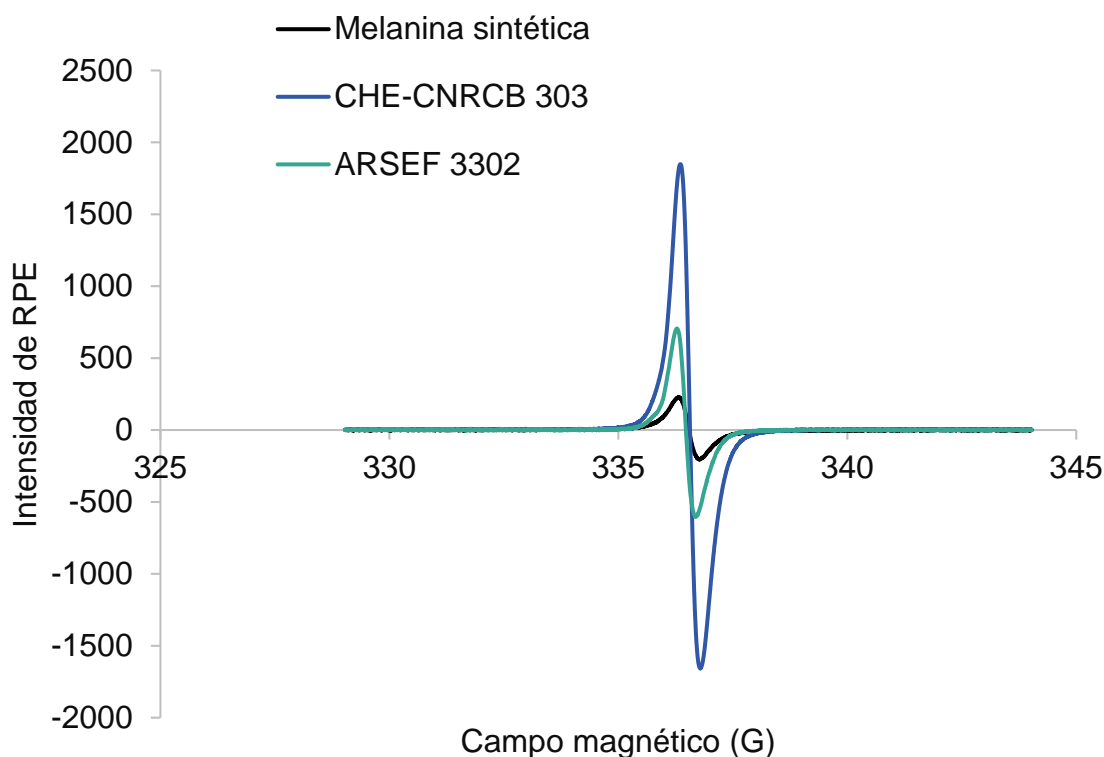


Figura 7.- Espectros de resonancia paramagnética electrónica (RPE) de melanina aislada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (línea azul), *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (línea verde) y melanina sintética (línea negra).

De acuerdo con los valores de G calculados y el ancho de línea, estas señales se asignaron a la presencia de radicales y tomando la señal más intensa arbitrariamente como 100% (*C. javanica*), se calculó la intensidad de las señales, proporcional al número de especies paramagnéticas presentes en cada muestra (**Tabla 4**). La abundancia de radicales libres en la molécula de melanina depende de la temperatura, el pH, la humedad y la presencia de metales (Enochs et al., 1993 y Mostert et al., 2012).

7.4 Actividad antioxidante

Una propiedad común de todos los pigmentos biológicos es su capacidad para aceptar y neutralizar los radicales libres exógenos (McGraw, 2005). La

melanina es un poderoso antioxidante. En los hongos, contribuyen a la virulencia al interferir con los factores de defensa del huésped, incluida la neutralización del estallido oxidativo de las células fagocíticas (Cunha et al., 2010; Nosanchuk y Casadevall, 2003; Schnitzler et al., 1999). Para evaluar actividad antioxidante se recurre a diferentes métodos, siendo uno de ellos el método DPPH, el cual determina actividades de captura de radicales en presencia de una molécula antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso (Hseu et al., 2008).

Ambas muestras de melanina fúngica actuaron como agentes antioxidantes, aunque su actividad de eliminación de DPPH no fue tan alta como la observada para la melanina sintética. Las curvas de eliminación de radicales DPPH se muestran en la **Figura 8**, donde el ácido gálico y la melanina sintética fueron las primeras muestras en alcanzar su mayor porcentaje de eliminación de radicales DPPH, con valores IC₅₀ (la concentración de antioxidante que elimina el 50% de los radicales DPPH) de 28.44 y 139,75 µg/mL respectivamente (**Tabla 5**); los valores de IC₅₀ obtenidos para melanina aislada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 y *C. fumosorosea* ARSEF 3302 fueron 924.21 y 854.59 µg / mL respectivamente, alrededor de 30 y 32 veces más que los obtenidos para el ácido gálico.

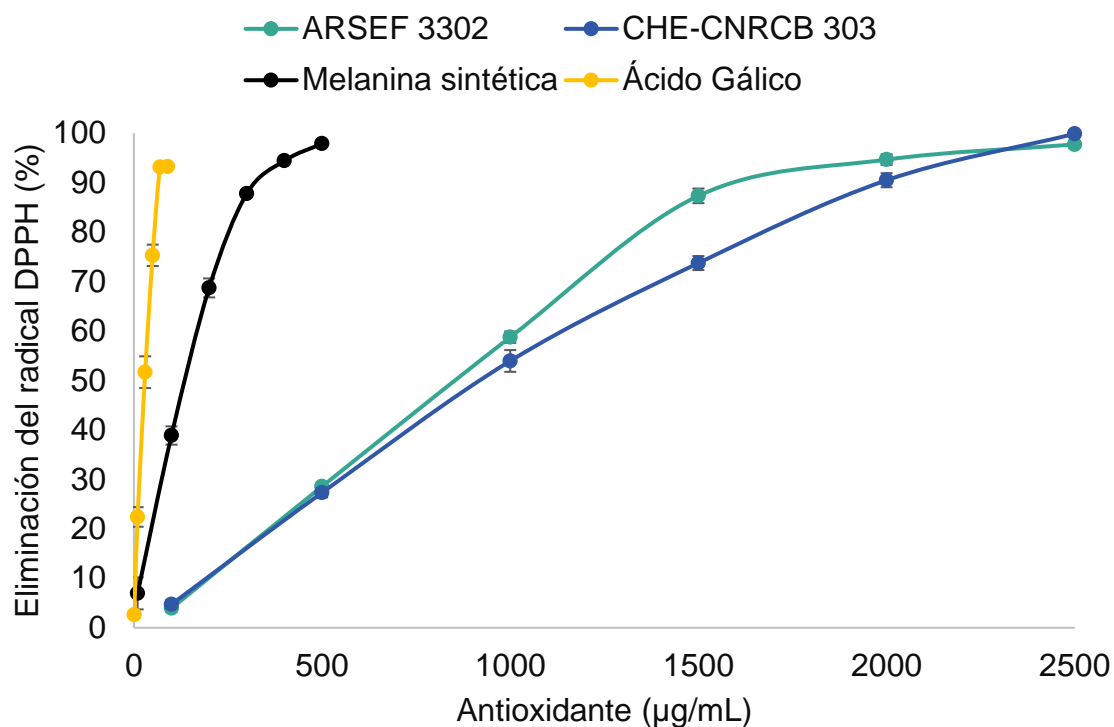


Figura 8. Eliminación de DPPH por melanina aislada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (línea azul), *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (línea verde), de origen sintético (línea negra) y ácido gálico (línea amarilla) a diferentes concentraciones.

Tabla 5.- Valores de la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) para la eliminación de radicales DPPH por melanina y ácido gálico fúngicos y sintéticos.

Origen de melanina	IC_{50} (µg/mL)
<i>C. fumosorosea</i> ARSEF 3302	854.59 ± 0
<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB 303	924.21 ± 0.28
Melanina sintética	139.75 ± 0.35
Ácido gálico	28.44 ± 0.31

7.5 Morfología de gránulos de melanina por SEM

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es un método para la caracterización morfológica y la distribución del tamaño de partícula de los diferentes tipos de melanina (Mbonyiryivuze et al., 2015; Strube et al., 2015). Se ha reportado melanina con diferente morfología y tamaño, además los gránulos suelen ser esféricos o de forma irregular dependiendo de la fuente de melanina (Mbonyiryivuze et al., 2015; Wang y Rhim, 2019).

En nuestro estudio, las partículas de melanina purificadas de ambas cepas de *Cordyceps* fueron amorfas (**Figura 9 y 10**) y de un diámetro promedio variado que, aproximadamente, oscilan entre 100-14000 μm^2 (**Figura 11**). Las partículas de melanina de ambas especies mostraron una mayor frecuencia de partículas con un área inferior a 2000 μm^2 . El área de contacto estimada de las partículas de melanina de ambas cepas de *Cordyceps* presentó una distribución de tamaño similar, donde el 70% de sus partículas tuvieron un área aproximada de $\leq 2000 \text{ mm}^2$.

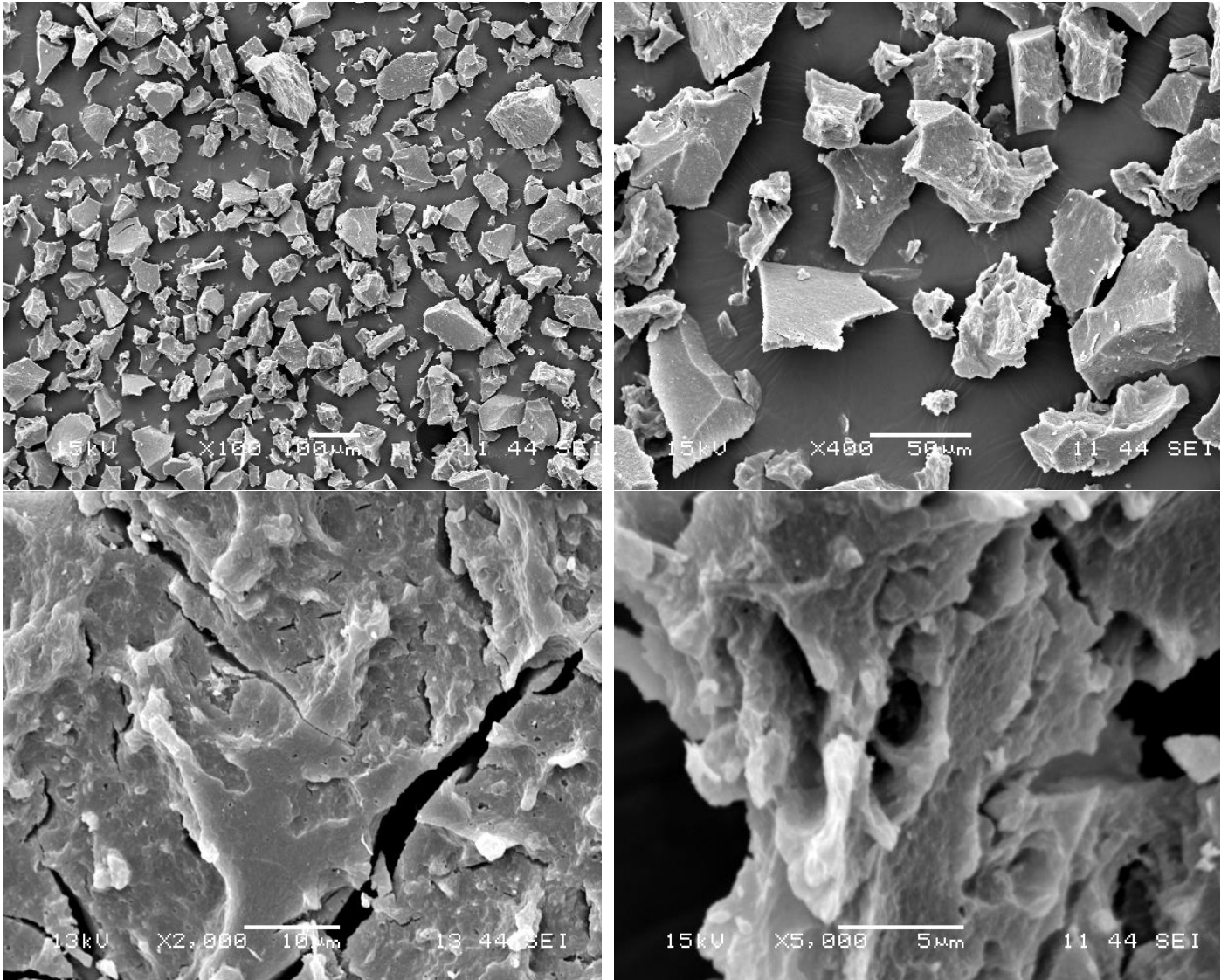


Figura 9.- Micrografías por SEM obtenidas de muestras de melanina en polvo purificada de *C. fumosorosea* ARSEF 3302

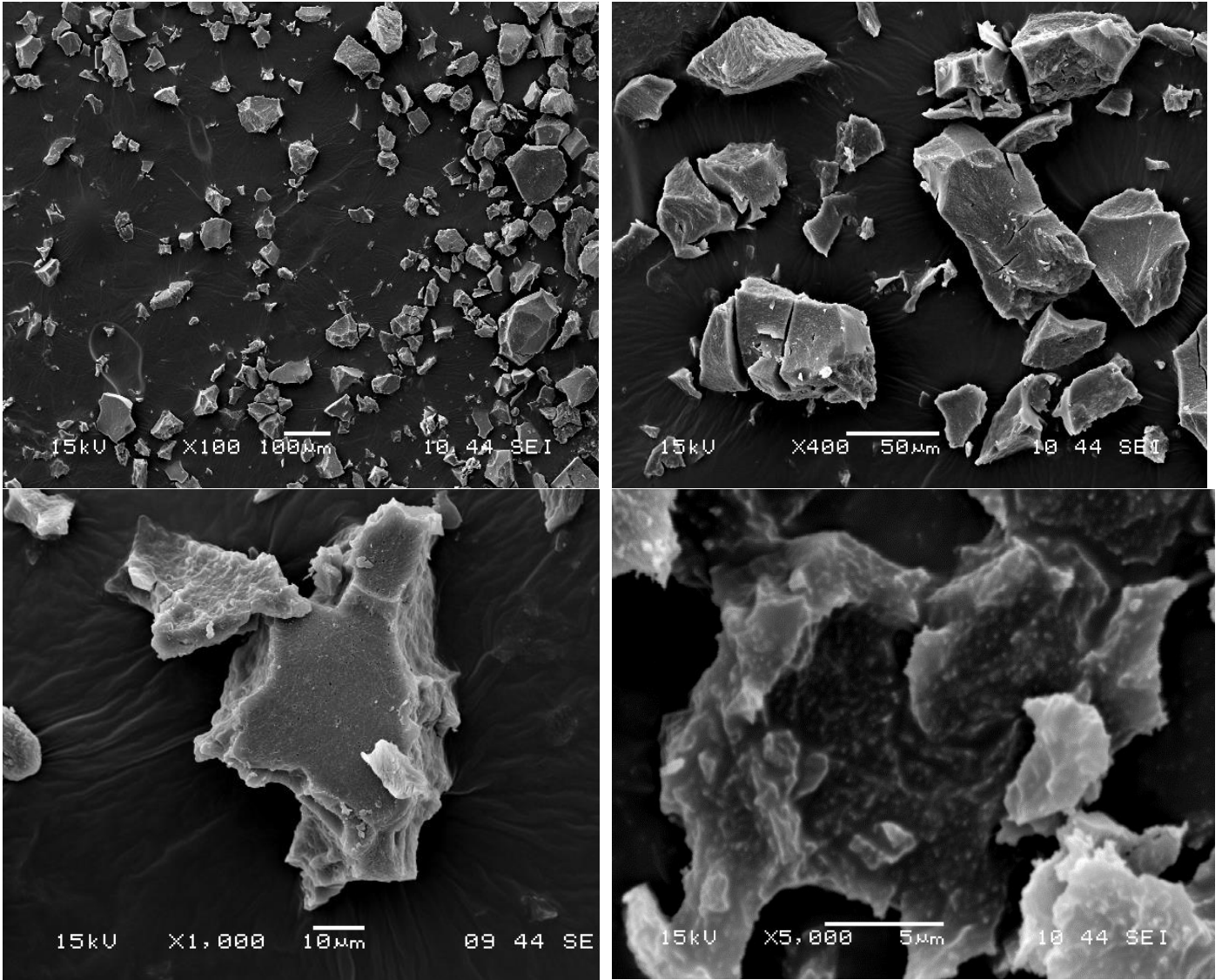


Figura 10.- Micrografías por SEM obtenidas de muestras de melanina en polvo purificada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303

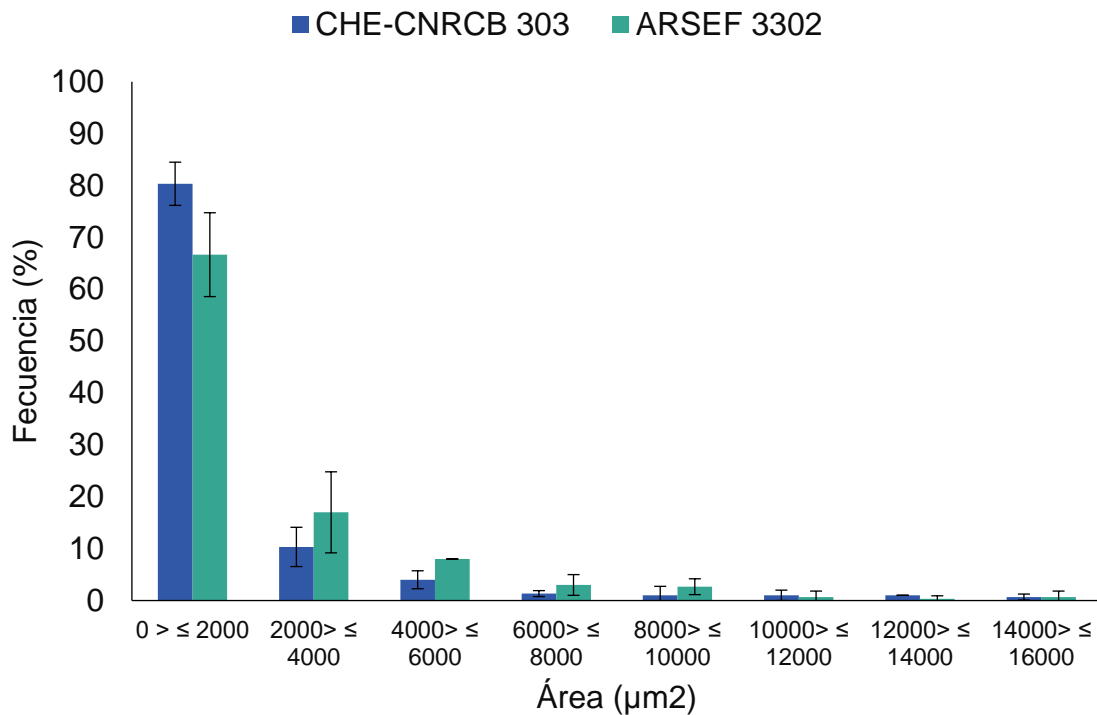


Figura 11. Porcentaje de la frecuencia aproximada del tamaño de partículas de melanina aislada de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (barra azul), *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (barra verde).

7.6 Producción de melanina en conidios de *Cordyceps* cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno.

En hongos melanogénicos, la melanina brinda protección contra el estrés ambiental como la radiación UV (Romero-Martinez et al., 2000), el estrés por calor y frío (Rosas y Casadevall, 1997), la presencia de metales pesados (Fogarty y Tobin, 1996; (García-Rivera y Casadevall, 2001) entre otros.

Uno de los sistemas para incrementar la resistencia de HE a diferentes condiciones de estrés ha sido el cultivo de HE bajo una atmósfera enriquecida con oxígeno al 26% (AM) (Miranda Hernández et al., 2014).

Se cuantificaron concentraciones de 12.09 y 8.47 ng de melanina por cada 10⁶ conidios para *C. fumosorosea* ARSEF3302 y *C. javanica* CHE-CNRCB 303 respectivamente, cuando fueron cultivadas bajo una atmósfera normal (AN). Por otro lado, al ser cultivadas bajo una AM obtuvieron ~1.68 y ~0.81 veces más

cantidad de melanina para *C. fumosorosea* ARSEF 3302 y *C. javanica* CHE-CNRCB 303 respectivamente (**Figura 12**), por lo que el cultivo de estas cepas de *Cordyceps* bajo una atmósfera enriquecida en oxígeno al 26% propició una mayor síntesis de melanina en los conidios de ambas especies fúngicas. Este incremento en la síntesis de melanina puede ser una respuesta del hongo frente a las condiciones de cultivo oxidantes ya que además de incrementar la concentración de melanina, un agente antioxidante, también se propicia una mayor síntesis de enzimas y moléculas antioxidantes como la catalasa (Suárez Vergel, 2017) y el glutatión (Castillo-Minjarez et al., 2019) con el fin de evitar un estado de estrés oxidativo en la célula.

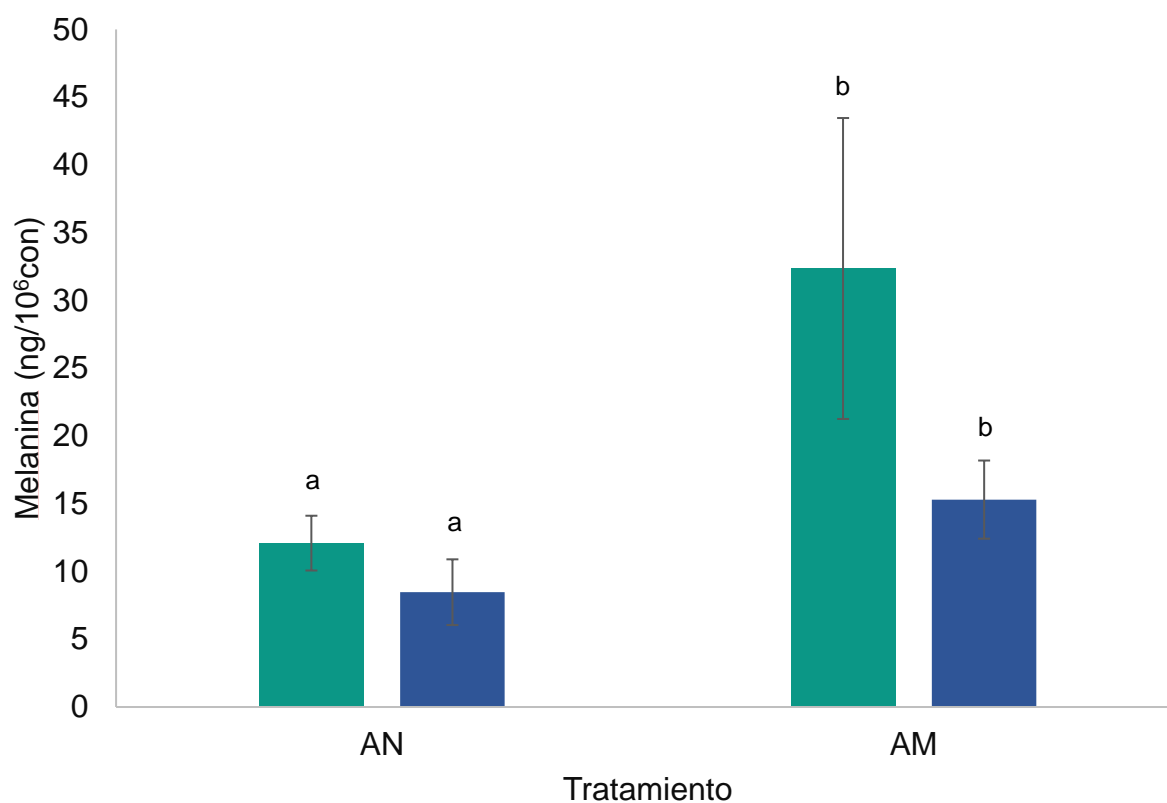


Figura 12.- Concentración de melanina presente en los conidios de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (barra azul), *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (barra verde) cultivadas a diferentes concentraciones de oxígeno.

Debido a que la melanina se encuentra relacionada con una mayor resistencia a diferentes tipos de estrés en hongos, una mayor concentración de melanina en los conidios de estos EH se vería reflejado en una mayor calidad de los mismos y posiblemente se reflejaría una diferencia en los parámetros de calidad entre ambas especies de *Cordyceps* en que la melanina se encontrara involucrada, ya que bajo condiciones normales de cultivo (AN) la especie *C. fumosorosea* ARSEF 3302 presentó ~30.0% más melanina que la especie *C. javanica* CHE-CNRCB 303.

7.7 Producción de conidios no melanizados a partir de la dosis mínima inhibitoria de melanina

El ácido kójico es un agente quelante del cobre (Chang, 2009; Chen et al., 2015; Mishima et al., 1988), que inhibe la actividad de la PPO; sin embargo, a altas concentraciones podría limitar la actividad de varias enzimas involucradas en el desarrollo celular, e incluso podría disminuir la producción de conidios. Por lo que estos factores se consideraron como elementos de selección de conidios albinos; es decir, la dosis mínima inhibitoria que produzca conidios no melanizados será aquella que inhiba la síntesis de melanina, no modifique el crecimiento radial ni la producción de conidios de ambas cepas de *Cordyceps*. Por otro lado, el uso de inhibidores de la síntesis de melanina ha sido utilizado para evaluar los cambios morfológicos de células de *Cryptococcus neoformans* melanizadas y no melanizadas frente a radiación ionizante (Malo et al., 2018); sin embargo, no señalan el posible efecto de la concentración del inhibidor con el crecimiento del hongo.

Con base en lo anterior se buscó la dosis mínima inhibitoria de ácido kójico para producir conidios no melanizados sin afectar su crecimiento radial y producción de conidios.

7.7.1 Crecimiento radial a diferentes concentraciones de ácido kójico

En ambas especies de *Cordyceps*, el crecimiento radial disminuyó proporcionalmente al incrementar la concentración de ácido kójico (**Figura 13 y 14**).

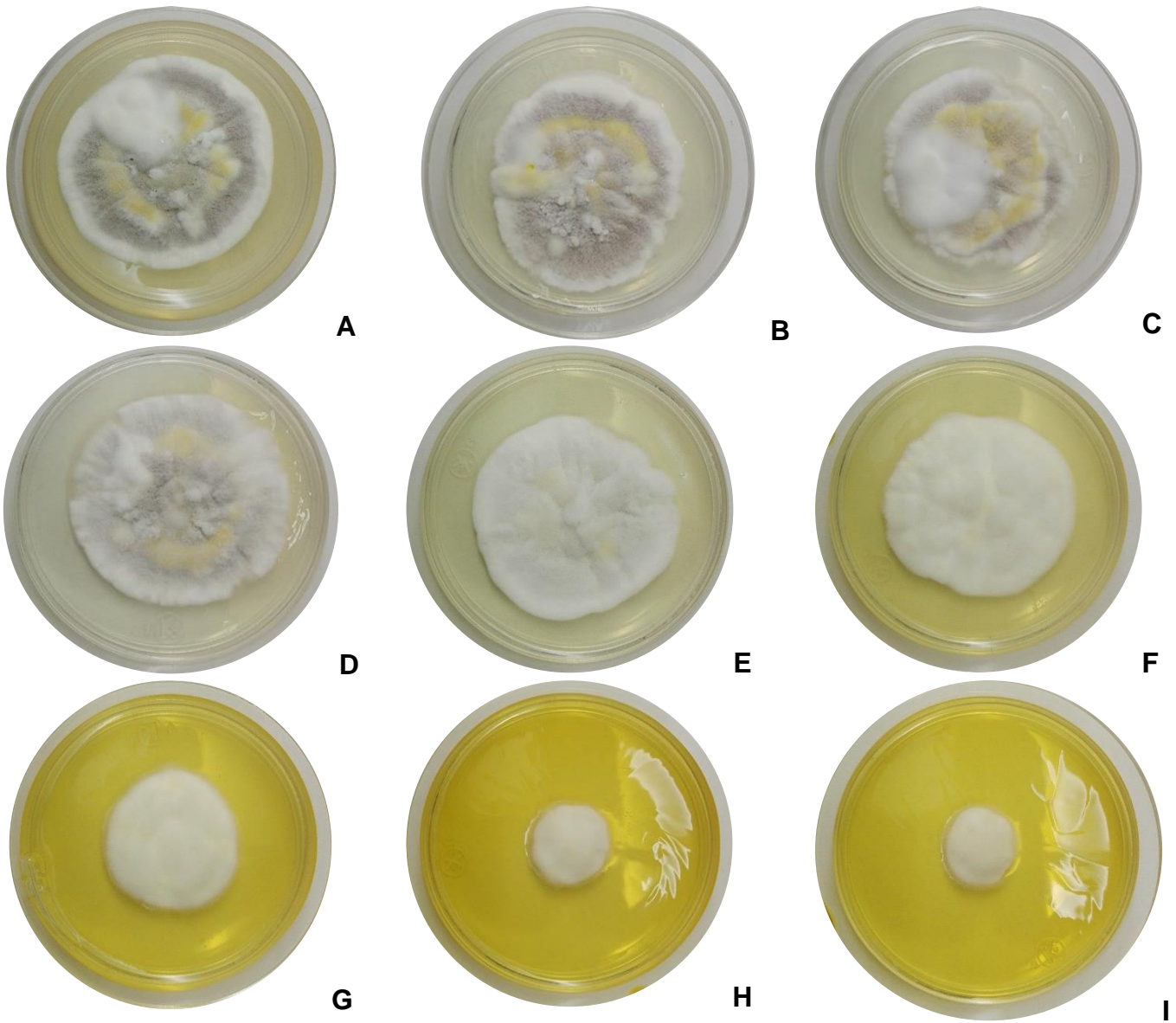


Figura 13.- Crecimiento monoclonia de la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 a 0 (A), 0.001 (B), 0.01 (C), 0.1 (D), 1 (E), 3 (F), 5 (G), 8 (H) y 10 (I) mg/mL de ácido kójico.

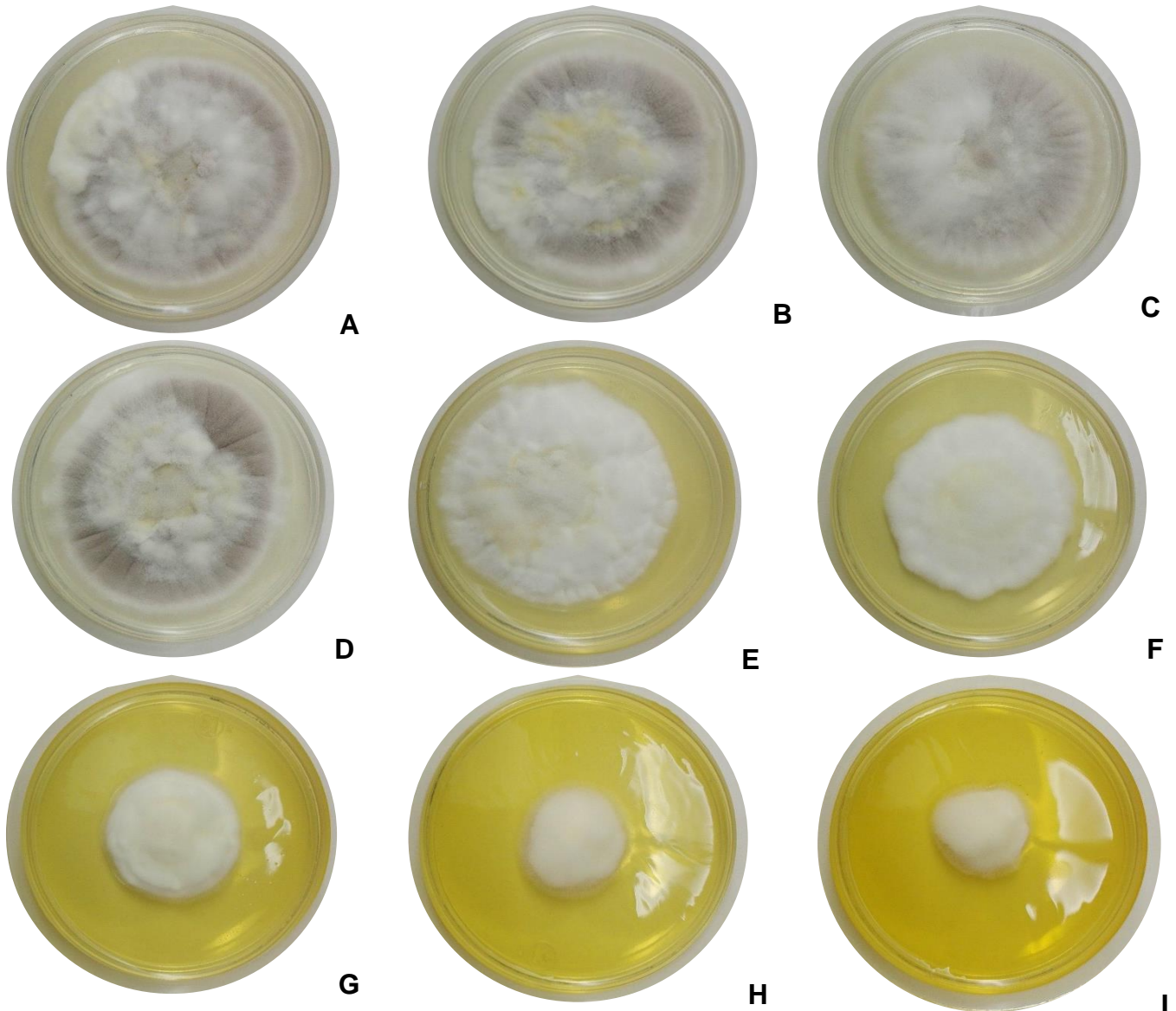


Figura 14.- Crecimiento monoclonia de la cepa *C. javanica* CHE-CNRCB 303 a 0 (A), 0.001 (B), 0.01 (C), 0.1 (D), 1 (E), 3 (F), 5 (G), 8 (H) y 10 (I) mg/mL de ácido kójico.

Desde una concentración de 0 mg/mL hasta 1 mg/mL de ácido kójico no se observó diferencia significativa en el crecimiento radial de ambas especies de *Cordyceps* (**Figura 15**); sin embargo, a partir de una concentración de 2 mg/mL en adelante del inhibidor de la DOPA-melanina se observó que el crecimiento radial comenzó a

disminuir, y hasta en más del 50 % en concentraciones desde los 8 mg/mL de ácido kójico en ambas cepas.

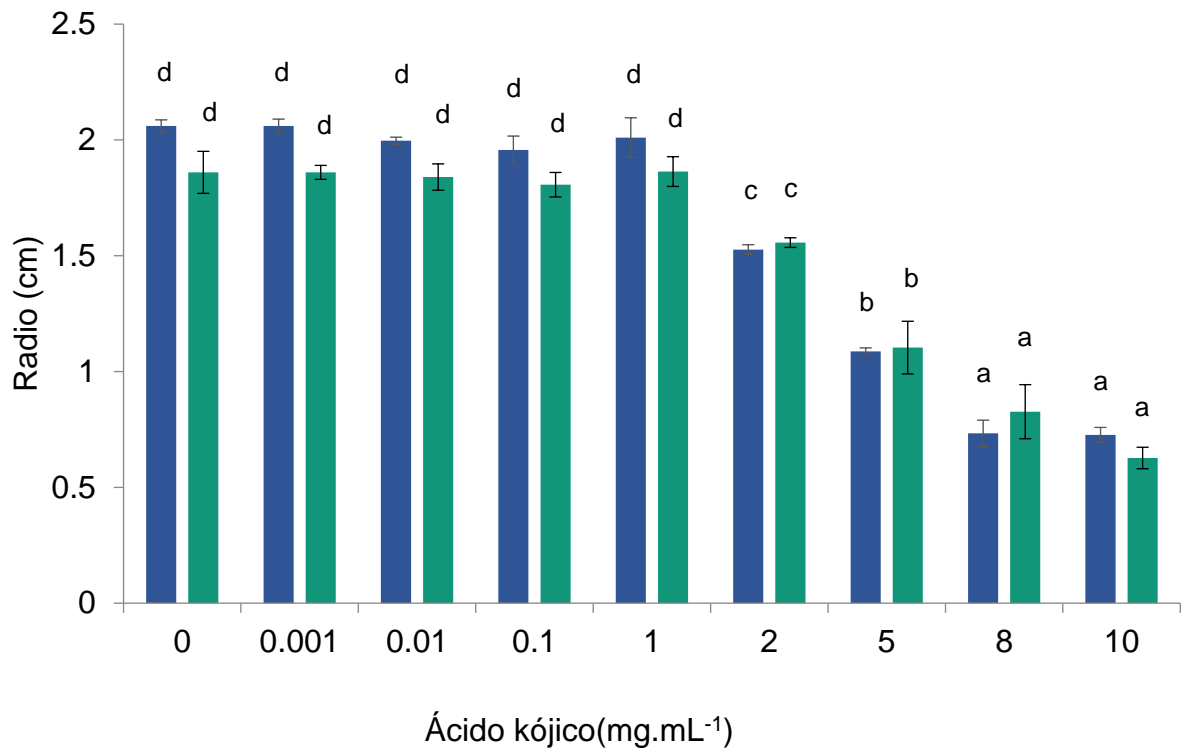


Figura 15.- Crecimiento radial de la especie *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (barras azules) y *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (barras verdes) a diferentes concentraciones de ácido kójico.

Esta disminución gradual del crecimiento radial se correlacionó al incremento en la concentración de ácido kójico. Por otro lado, las concentraciones del rango 0 a 1 mg/mL de ácido kójico no afectaron el crecimiento radial; sin embargo, sólo con la concentración de 1 mg/mL del inhibidor de DOPA-melanina generó una total despigmentación en ambas cepas (**Figura 13E y 14E**). Así que las concentraciones de ácido kójico que se utilizaron para la prueba de producción de conidios fueron 0, 0.1 y 1 mg/mL.

7.7.2 Producción de conidios a diferentes concentraciones de ácido kójico

Bajo las tres concentraciones de ácido kójico testeadas no se observó diferencia significativa en la producción de conidios para ambas cepas (**Figura 16**); sin embargo, sólo la concentración de 1 mg/mL de ácido kójico produjo conidios no melanizados sin afectar el crecimiento radial y la producción de conidios así que esta concentración del inhibidor de la DOPA-melanina fue utilizado para producir conidios no melanizados.

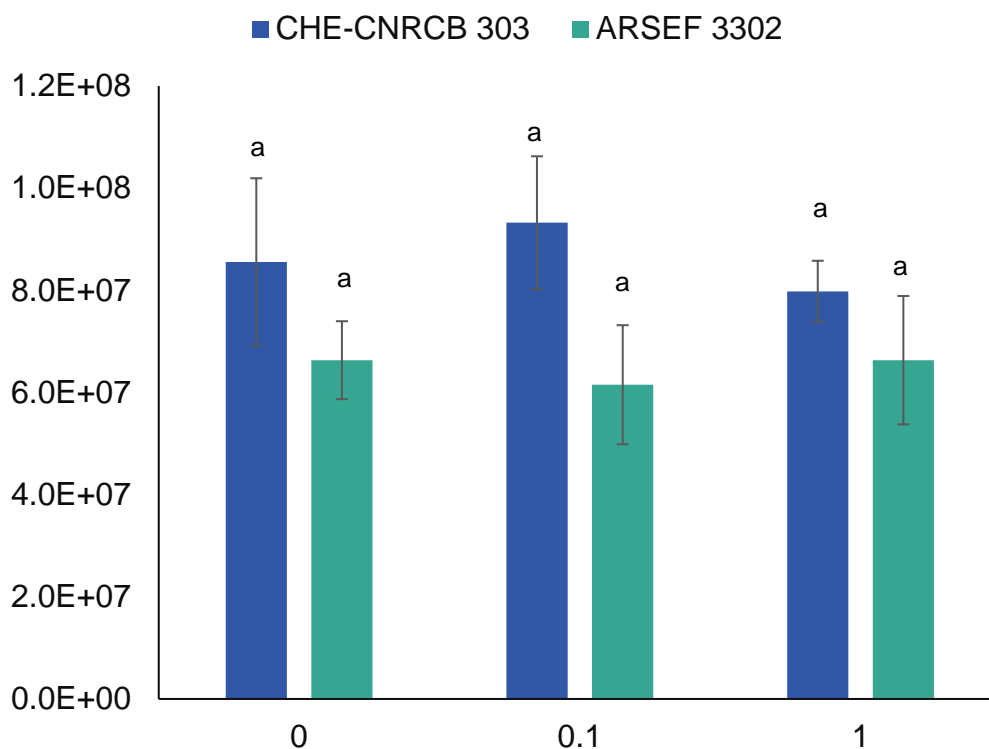


Figura 16.- Producción de conidios de las cepas CHE-CNRCB 303 (barra azul) y ARSEF 3302 (barra verde) a diferentes concentraciones de ácido kójico.

Por otro lado, la producción de conidios es un parámetro de calidad de los hongos entomopatógenos y varios han sido los trabajos dedicados a incrementarlo. En las dos especies de *Cordyceps* aquí probadas el promedio de la producción de conidios de la cepa *C. javanica* CHE-CNRCB 303 fue de 8.61×10^7 con/cm² y de 6.47×10^7

con/cm² para la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302; sin embargo, estos valores de producción de conidios de ambas cepas han sido mejoradas en medios de cultivo superficial o sólido, así como la aplicación de pulsos oxidantes durante el crecimiento de estos hongos (Muñiz-Paredes et al., 2016; Miranda Hernández et al., 2014).

7.8 Influencia de la melanina en conidios, pruebas de calidad

Diferentes estudios sugieren que la melanina se asocian frecuentemente con la pared celular fúngica, lo que proporciona una función protectora para los conidios contra los daños causados por la radiación ultravioleta (UV), agentes oxidantes y condiciones climáticas extremas (Butler y Day, 1998; Calvo et al., 2002; Eisenman et al., 2005; Zhong et al., 2008), por lo que se realizaron pruebas de calidad con los conidios de ambos aislados de *Cordyceps* producidos bajo una atmósfera normal (AN), y se compararon con conidios obtenidos bajo una atmosfera modificada (AM) y con conidios no melanizados (AN-K) obtenidos bajo atmósfera normal.

7.8.1 Germinación

La germinación es una de las primeras pruebas que determina la calidad de los conidios de los hongos entomopatógenos (Jenkins y Grzywacz, 2000; Lopes et al, 2013) ya que es clave en el inicio del proceso de infección. En los conidios de la cepa CHE-CNRCB 303 y ARSEF 3302, cultivados con el tratamiento AM, se encontró 20.7 y 29.0 % más germinación que en los conidios obtenidos con el tratamiento AN, respectivamente (**Figura 17**). Esta tendencia ya se había reportado (Suárez Vergel 2017) y se había correlacionado con un incremento en la actividad de la enzima catalasa, así como del aumento en la expresión de *catA*, un gen que se expresa exclusivamente en conidios. Dicha enzima podría hacer frente al incremento temporal de ERO producidas por el aumento de la respiración en el proceso de germinación. Debido a las propiedades antioxidantes de la melanina, esta también podría participar en mitigar el efecto oxidante de las ERO durante la germinación; sin embargo, para que esto suceda la melanina debe estar en contacto con estas ERO, las cuales se producirían dentro del conidio por el aumento

del metabolismo, y para las especies de *Cordyceps* estudiadas en este trabajo aún se desconoce la ubicación de este pigmento en los conidios de *Cordyceps*, por lo que sería aventurado hacer esta hipótesis en estos hongos. Sin embargo, existen estudios que identificaron el pigmento melanina en el interior de la célula fúngica, en la pared celular e incluso fuera de la pared celular, brindándole al hongo diferentes funciones con base en su ubicación (Walker et al., 2010; Toledo et al., 2017).

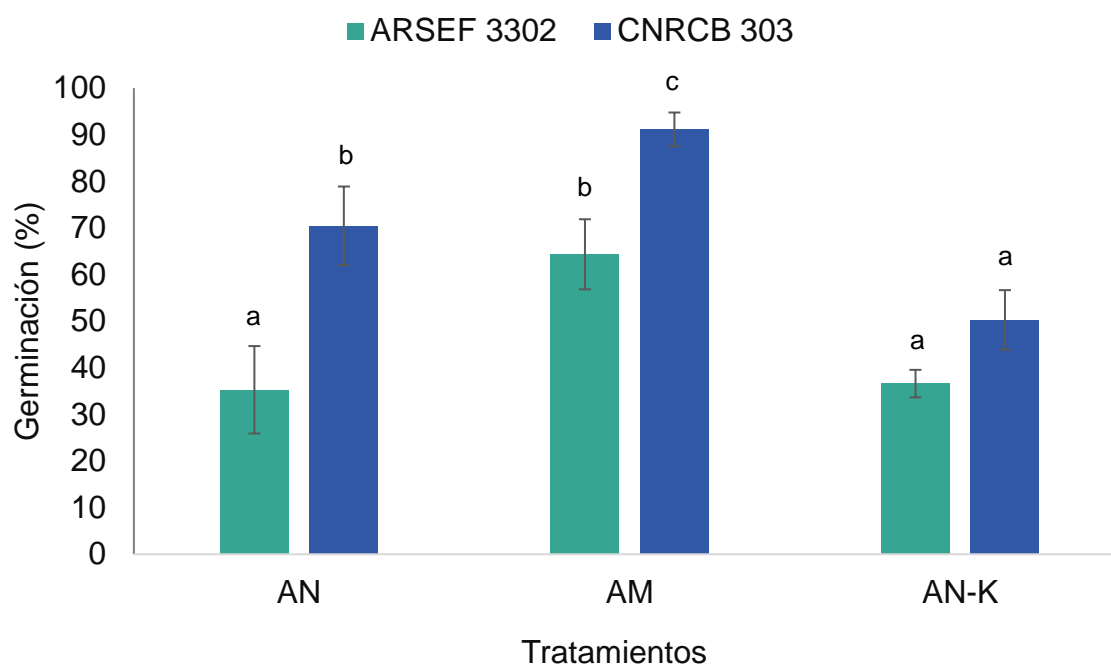


Figura 17.- Porcentaje de germinación de conidios obtenidos de los tratamientos atmósfera normal (AN), atmósfera modificada (AM) y atmósfera normal con ácido fólico AN-K para la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (barra verde) y *C. javanica* CHE-CBRCB 303 (línea azul).

Por otro lado, los conidios no melanizados (AN-K) de la especie CHE-CNRCB 303 presentaron 20.2% menos germinación que aquellos conidios cultivados bajo una AN, caso que no se observó en la especie ARSEF 3302 ya que sus conidios no melanizados no presentaron diferencia significativa en la germinación respecto a la encontrada en aquellos conidios provenientes del tratamiento AN. Estos resultados podrían interpretarse como contradictorios entre ambas especies de *Cordyceps*, ya que se ha reportado que la melanina se encuentra generalmente en la pared celular

de hongos filamentosos por lo que es un componente que le brinda estabilidad y rigidez, de este modo al inhibir la síntesis de este pigmento en los conidios posiblemente disminuyó la rigidez de la pared celular del conidio que podría alterar el crecimiento polarizado del conidio y con ello la germinación, esto podría estar implicado en el fenómeno observado para el hongo CHE-CNRCB 303. Por otro lado, la especie ARSEF 3302 no mostró diferencias en los porcentajes de germinación entre los conidios no melanizados y aquellos provenientes de una AN, y podría deberse a que otros componentes de la pared celular como los glucanos, quitina, mananos y glicoproteínas (Mendoza, 1992; Oka et al., 2015) podrían estar en mayor proporción en esta especie que en CHE-CNRB 303, teniendo una mayor participación en la integridad y rigidez de la pared celular en la cepa ARSEF 3302, en donde la ausencia de la melanina no afectaría la germinación, por lo que diferentes estudios que determinen la ubicación de la melanina podría ayudarnos a explicar las diferencias en la germinación de ambas especies de *Cordyceps*. La ubicación de este pigmento volvería más o menos sensibles a cualquier estímulo de estrés como radiación solar o el propio oxígeno ambiental ya que la melanina es un componente estructural de pared celular de varios hongos. Por ejemplo, en *Magnaporthe grisea* la melanina forma parte de una capa estrechamente asociada a la membrana plasmática en el lado interno de la pared celular, así como en el apresorio. En otros hongos como *Cryptococcus neoformans*, la melanina se deposita en toda la pared celular en forma de anillos concéntricos. Alternativamente, la melanina se deposita en las capas más externas, como en las hifas de *Pseudocercospora griseola* o como gránulos en la superficie de las paredes de sus levaduras, como *Candida albicans* (Mandal et al., 2007; Walker et al., 2010).

La importancia de la melanina en el desarrollo de hongos se ha observado principalmente en especies filamentosas que, a pesar de poseer hifas translúcidas o micelio blanco, algunas producen estructuras melanizadas como apresorios, esclerocios, conidios y estructuras reproductivas (Bell y Wheeler, 1986; Butler y Day, 1998; Henson et al., 1999). Varios estudios han mostrado una relación entre la biosíntesis de melanina con la conidiación y germinación. Por ejemplo, la

interrupción de la biosíntesis de melanina en el hongo endófito *Pestalotiopsis microspore* mostró poco efecto sobre el crecimiento vegetativo, pero causó alteraciones sustanciales en la producción, morfogénesis y germinación de conidios (Yu et al., 2015). Estos conidios deficientes en melanina también parecen haber alterado la integridad de la pared celular; un defecto también observado con otras especies (Engh et al., 2007; Tsai et al., 1997; Yu et al., 2015). Se reportó una morfología superficial alterada en conidios mutantes de *Aspergillus fumigatus* que carecen de melanina (Jahn et al., 1997; Langfelder et al., 1998; Tsai et al., 1997). La inhibición de la biosíntesis de melanina por triciclazol, inhibidor de la vía biosintética DHN-melanina, produce defectos en la formación de conidios y la germinación en *Chaetomium globosum* (Hu et al., 2012). Los mutantes de *Alternaria alternata* defectuosos en la producción de melanina producen conidios de tamaño reducido, mayor susceptibilidad a la luz ultravioleta y separación de las hifas desarrolladas (Kawamura et al., 1999).

La presencia de melanina debería mejorar la resistencia mecánica y química de las estructuras fúngicas, relevantes en ciertas etapas del desarrollo, ya que la melanización fúngica a su vez está regulada por factores genéticos que controlan el desarrollo celular (Engh et al., 2007; Fetzner et al., 2014; Islamovic et al., 2015; Tsai et al., 1999, 1998; Upadhyay et al., 2013; Wu et al., 2012).

7.8.2 Viabilidad

La viabilidad de los conidios de HE utilizados para su aplicación en campo tienen como recomendación un porcentaje mínimo de conidios viables como medida de calidad, y esta tiene que ser mayor al 80% (Jenkins y Grzywacz, 2000) y es comúnmente evaluado en unidades formadoras de colonias (UFC).

Bajo las condiciones de evaluación de este estudio, los conidios de ambas especies de *Cordyceps* cultivados con una AM mostraron una viabilidad sin diferencia significativa, respecto a los conidios cultivados bajo una AN, con valores del 65% para *C. fumosorosea* ARSEF 3302 y del 75% *C. javanica* CHE-CNRCB 303 ~

(Figura 18). Estos lotes de conidios no alcanzaron el porcentaje mínimo de viabilidad recomendado (80%) para su comercialización, aparentemente esta viabilidad encontrada en estos HE mantiene esta tendencia de baja viabilidad bajo las condiciones de cultivo utilizadas, ya que en otros estudios se reportaron valores ~60% para ambas cepas de *Cordyceps* bajo condiciones similares (Muñiz-Paredes, 2016); sin embargo, a pesar de las modificaciones del cultivo, este parámetro no se ve afectado.

Una de las estrategias utilizadas para incrementar la calidad de los conidios de estas cepas ha sido el uso de pulsos de O₂ al 26% durante el cultivo de estos hongos, el cual se ha correlacionado con una mayor respuesta antioxidante. Esto posee aplicaciones prácticas ya que es posible utilizar estos conidios con mejores parámetros de calidad sin alterar el medio ambiente, puesto que estos hongos regresarían a su estado fisiológico “basal”, en contraste con los hongos que se obtienen por manipulación genética, mismos que tienen por el momento restricciones para su liberación en campo (son transgénicos). Es decir, estos conidios (AM) cuyo fenotipo fue modificado por ser expuestos a un estrés subletal y su alcance finalizaría una vez utilizado dicho fenotipo.

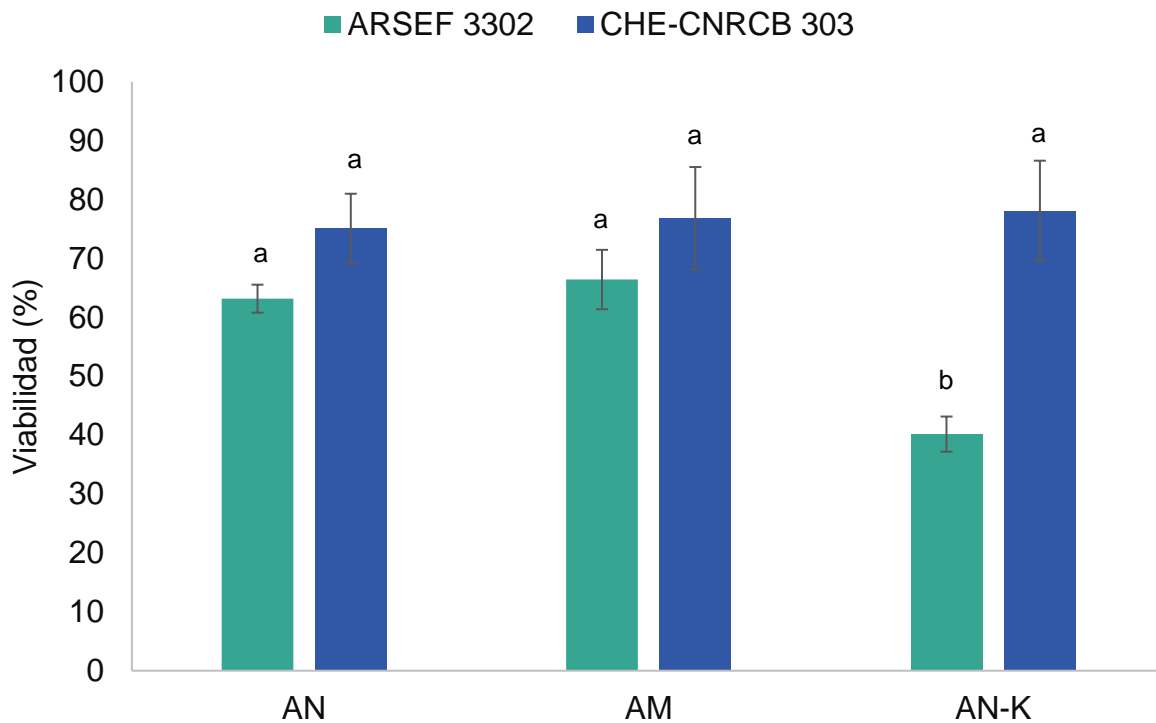


Figura 18.- Porcentaje de viabilidad de conidios obtenidos de los tratamientos atmósfera normal (AN), atmósfera modificada (AM) y atmósfera normal con ácido fólico AN-K para la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (barra verde) y *C. javanica* CBRCB (barra azul).

Por otro lado, se ha reportado que la melanina fúngica juega diferentes roles en la célula ya que posee actividad antioxidante. Tan importante es la melanina en las cepas de *Cordyceps* que una de las especies evaluadas (ARSEF 3302) mostró una disminución del 36% de viabilidad en conidios albinos (AN-K), respecto a la obtenida en los conidios cultivados bajo una AN. Cabe señalar que la concentración de melanina en esta especie es ~30.0% mayor que la encontrada en la especie CHE-CNRCB 303.

7.8.3 Resistencia a UVB

La radiación UV y altas temperaturas, pueden desnaturalizar proteínas y generar daño en el ADN de los conidios de HE, por lo que son factores que considerar para la aplicación en campo ya que pueden impactar la eficacia de las estrategias de control usando HE. Algunos de los principales mecanismos de los

hongos para hacer frente a la radiación UV es la síntesis de moléculas fotoprotectoras como la melanina. Si la melanina ofrece protección frente a radiación UVB, aquellos conidios provenientes de una AM, que poseen una mayor concentración de este pigmento, mostrarían una caída en su viabilidad menor respecto a aquellos conidios provenientes de una AN cuando se exponen a radiación ultravioleta, mientras que la caída de la viabilidad de los conidios albinos sería aún mayor respecto a los conidios de AN.

Esta hipótesis se confirmó con los conidios de la especie *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (**Figura 19**) que provinieron de una AN, ya que desde la primera dosis de radiación UVB (3.5 kJ/m²) la viabilidad disminuyó un 20%; este descenso continuó hasta que se obtuvo sólo un 60% de la viabilidad de estos conidios a la última dosis de radiación UVB (14 kJ/m²).

Por otro lado, comprobamos que los conidios provenientes de una AM mantuvieron una viabilidad mayor respecto a los conidios provenientes de una AN ya que, a pesar de tener un 80% de viabilidad desde la primera dosis de radiación UVB (3.5 kJ/m²), este porcentaje se mantuvo en todas las dosis de radiación UVB. Hasta este punto podríamos concluir que la DOPA-melanina se encuentra involucrada en la protección a radiación UV-B, fenómeno que ya ha sido reportado para diferentes organismos y microorganismos (Bultler, 1987, Durrell y Shields, 1960, Gauslaa y Solhaug, 2001; Selbmann et al., 2011) y que por primera vez se comprueba en HE.

Por otro lado, con el objetivo de corroborar la contribución de la melanina en la fotoprotección, se evaluaron conidios albinos (conidios sin melanina) del tratamiento AN-K a las diferentes dosis de radiación UVB, y observamos que el descenso de la viabilidad de estos conidios disminuyó paulatinamente al incrementar la dosis de radiación UVB empleada, pasando de un 80% de viabilidad en la primer dosis (3.5 kJ/m²) a tan sólo un 40% de viabilidad en la última dosis (14k J/m²) de radiación UVB, estos resultados mostraron diferencia significativa entre los tratamientos AN y AN-K en las dosis 10 y 14 kJ/m², así que por primera vez se comprobó que la

melanina tiene un papel fundamental en la fotoprotección en conidios de HE y en específico de *C. fumosorosea* ARSEF 3302.

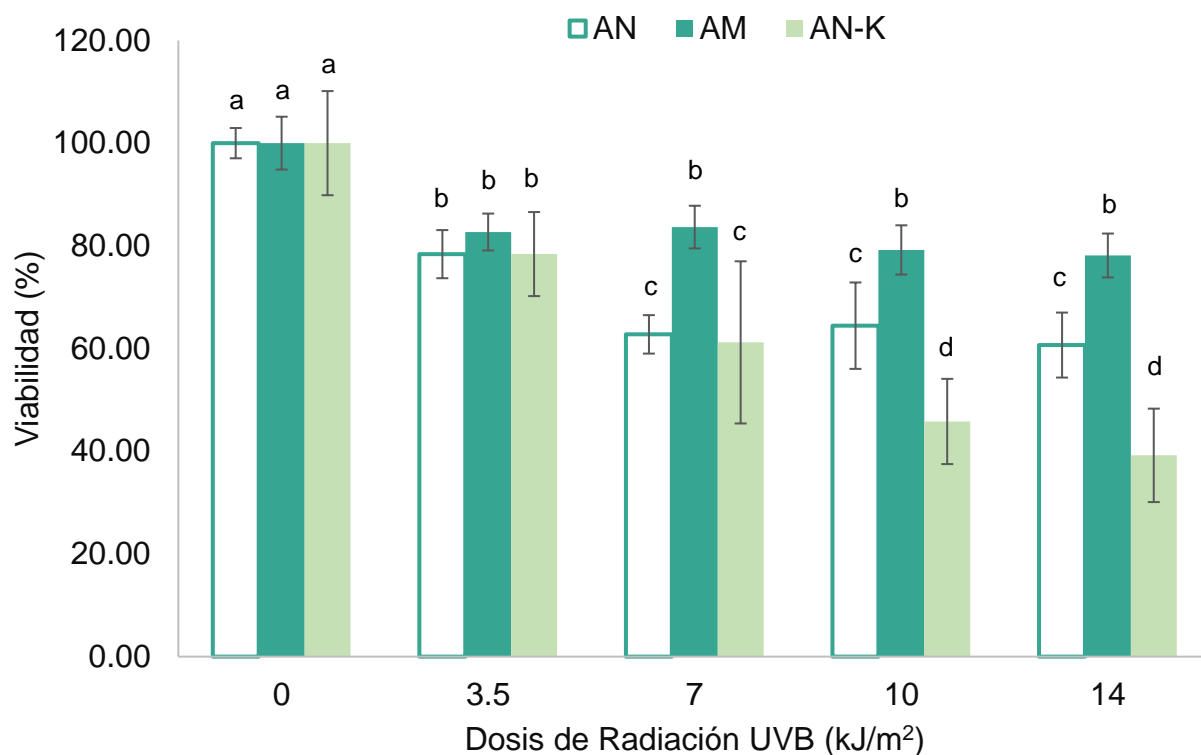


Figura 19.- Viabilidad de la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 a diferentes dosis de radiación UVB.

Esta misma prueba se realizó para conidios provenientes de los tratamientos AN, AM y AN-K del hongo *C. javanica* CHE-CNRCB-303. A pesar de que los conidios de esta cepa poseen ~30.0% menos melanina que los conidios de la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 al ser cultivados bajo una AN (**Figura 12**), presentaron una mayor resistencia a la radiación UVB ya que la viabilidad de los conidios (AN) de la cepa *C. javanica* CHE-CNRCB 303 se mantuvo cerca del 90% en todas las dosis testeadas de radiación UVB (**Figura 20**). En otros estudios, tres aislados de *Beauveria bassiana* (Bb 19, CG 310 y CG 481) obtuvieron un porcentaje de germinación menor al 20% a una dosis de radiación UVB de 10,56 kJ /m². Esto puede deberse a una mayor efectividad de sus mecanismos de prevención y

corrección del daño causado por la radiación UVB.

Por otro lado, el incremento de melanina en esta cepa fue de 0.81 veces; es decir, esta cepa posee poca melanina bajo condiciones normales (AN) y cuando es cultivada bajo un ambiente oxidante (AM) incrementa poco la concentración de melanina en los conidios, lo que no permite observar una diferencia significativa en la resistencia a radiación UVB entre los tratamientos AN y AM. Posiblemente al exponer los conidios de esta cepa a dosis mayores a 14 kJ/m² de radiación UVB permitiría disminuir la viabilidad de los conidios y evidenciar el efecto protector de la melanina en los conidios AM.

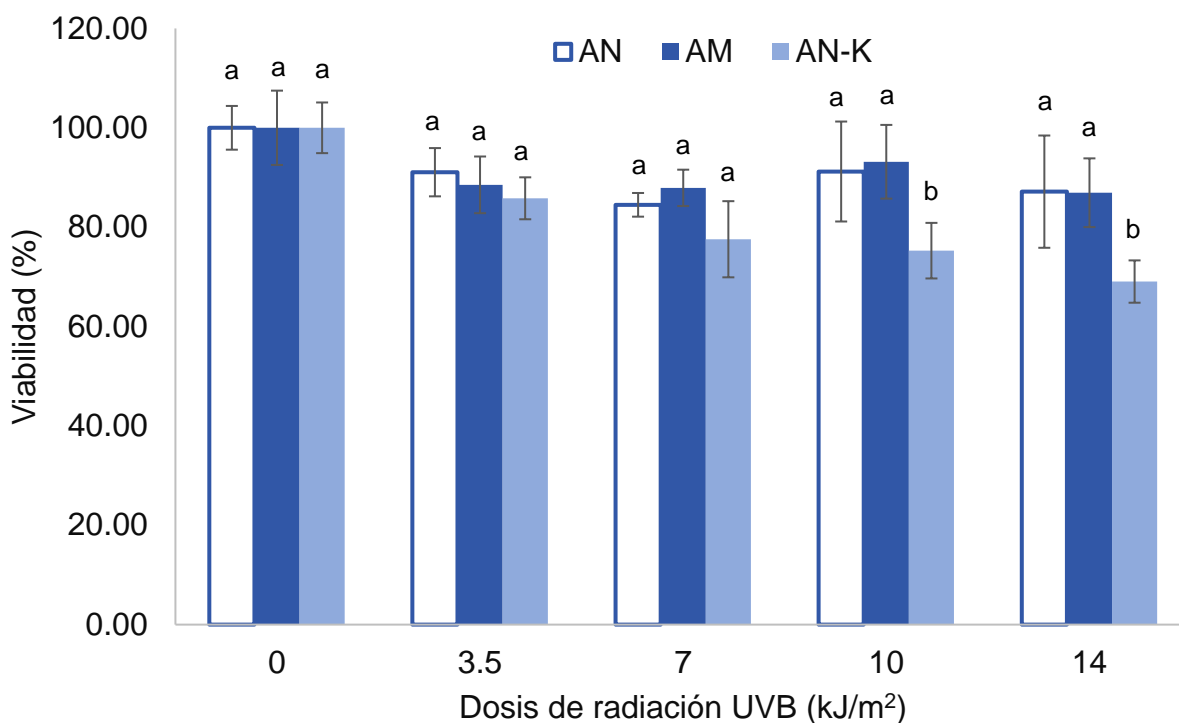


Figura 20.- Viabilidad de la cepa *C. javanica* CHE-CNRCB 303 a diferentes dosis de radiación UVB.

A pesar de lo anterior, la viabilidad de los conidios albinos (AN-K) sí disminuyó gradualmente al incrementar la dosis de radiación UVB. En la última dosis probada

(14 kJ/m²) su viabilidad fue menor al 70% siendo significativamente diferente a la viabilidad de los conidios cultivados bajo los tratamientos AN y AM bajo la misma dosis de UVB, por lo que la melanina se encuentra correlacionada con la protección a radiación UVB en ambas cepas de *Cordyceps*, pero podría ser necesario un incremento de la concentración de melanina para observar una mayor resistencia a la radiación UVB.

7.8.4 Termotolerancia

En la naturaleza, la exposición al calor por conducción en el suelo o por radiación directa es uno de los factores de estrés más importantes para los hongos entomopatógenos en el campo, además algunos insectos aumentan la temperatura de su hemolinfa como un sistema de defensa frente a una infección fúngica (Blanford y Thomas, 2000). Por lo que el calor es un factor que afecta la persistencia y desarrollo de estos hongos en campo, así que la termotolerancia de los conidios es considerada un factor de calidad.

Al evaluar los conidios cosechados bajo una AN de la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 a diferentes tiempos de exposición a 38 °C, se observó un decremento radical de la viabilidad, ya que la viabilidad de los conidios (AN) transitó de 65% a 8% a los 40 min y a los 160 min de exposición, respectivamente. El TL₅₀ de los conidios expuestos a diferentes tiempos a 38 °C tuvo un valor de 65.33 ± 9.98 min

Por otro lado, los conidios de esta misma cepa (**Figura 21**) cosechados bajo una AM y que contenían 1.68 veces más melanina, se esperaría tuvieran una mayor termotolerancia ya que debido a su capacidad antioxidante podría frenar el daño oxidativo que posiblemente se esté generando por acción de calor, debido a que se acelera la producción de ERO. Estos conidios cosechados de una AM mantuvieron una viabilidad del 87% a los 40 min siendo mayor que aquellos cosechados de una AN y a pesar de que los conidios de una AM también mostraron un decremento en su viabilidad a diferentes tiempos de exposición a 38 °C, este decremento fue más lento, ya que a los 160 min se observó un 34% de la viabilidad de los conidios, por lo que el valor de TL₅₀ de los conidios cultivados bajo una AM fue de 119.65 ± 19.91

min, significativamente mayor al TL₅₀ de los conidios cosechados de una AN. Por lo que se observa una correlación entre una mayor termotolerancia y la presencia de melanina en los conidios de *Cordyceps fumosorosea* ARSEF 3302. A pesar de que la TL₅₀ de los conidios albinos (66 ± 21.17min) no es diferente significativamente de la proveniente de los conidios de AN, se observó una diferencia significativa de la viabilidad de estos conidios albinos respecto a los conidios cosechados de una AN a los 80, 120 y 160 min de exposición, por lo que se corrobora la participación de la melanina en la termotolerancia de los conidios del hongo *C. fumosorosea* ARSEF 3302.

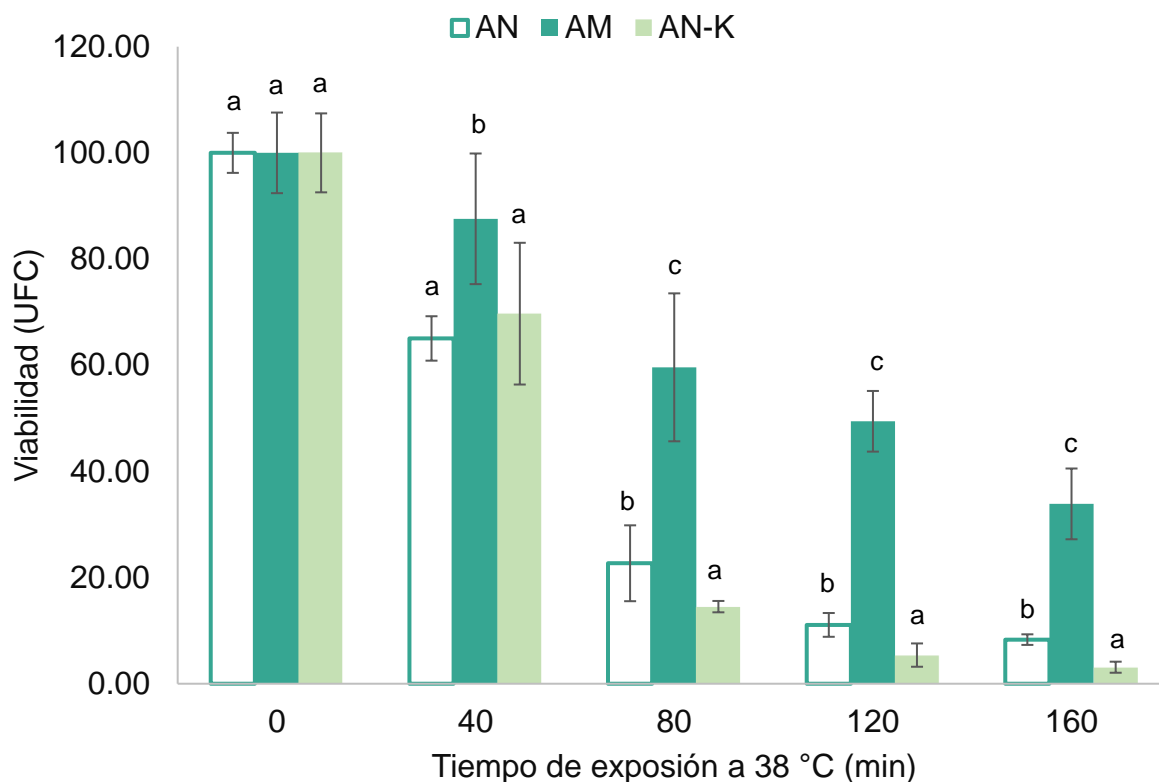


Figura 21.- Viabilidad de la cepa ARSEF 3302 a diferentes tiempos de exposición a 38 °C.

Por otro lado, los conidios de la especie *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (**Figura 22**), observamos que también hubo un decremento de la viabilidad para los conidios de todos los tratamientos a mayor tiempo de exposición a una temperatura de 38 °C.

La tendencia de la termotolerancia en los tratamientos de los conidios de la especie *C. javanica* CHE-CNRCB 303 fue similar a lo observado en los conidios de la especie *C. fumosorosea* ARSEF 3302, ya que, efectivamente, hubo una fuerte disminución de la viabilidad de los conidios, independientemente de su tratamiento de origen.

Los conidios cultivados con AN mostraron una disminución de su viabilidad de un 14% en el tiempo más extenso de exposición (160 min) con un valor de TL_{50} de 114.18 ± 5.72 por lo que esta cepa es más termoresistente que la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 al tener TL_{50} mayor y mostrar una viabilidad más grande en todos los tiempos de exposición.

Por otro lado, la TL_{50} de los conidios provenientes de los tratamientos AM, AN-K y AN no son diferentes significativamente entre si (**Tabla 6**); sin embargo, los conidios cultivados bajo una AM tuvieron una mayor viabilidad respecto a los conidios AN de (~10% y ~13% mayor) a los 80 y 160 min de exposición, respectivamente, mientras que viabilidad de los conidios albinos (AN-K) fueron ~12%, ~6% y 5% más bajos significativamente a los 80, 120 y 160 min respectivamente respecto a los valores obtenidos con el resto de los tratamientos. Estos datos sugieren en esta especie de *Cordyceps* una correlación entre la melanina y una mayor termotolerancia en los conidios de este hongo, aunque podría ser necesaria una mayor diferencia de concentraciones de melanina en los conidios provenientes los tratamientos AN y AM para observar con mayor claridad la contribución de la melanina en la termotolerancia en esta cepa de *Cordyceps*.

Aunque el rol de la melanina en la resistencia a calor en hongos es escaso, existen reportes donde han observado un papel en la protección contra el estrés por calor para *Exophiala* (Paolo et al., 2006). Otro ejemplo es lo reportado por Rehnstrom y Free (1996), donde mutantes deficientes en melanina de *Monilinia fructicola* produjeron conidios que eran más susceptibles a temperaturas elevadas (40 °C) y otros factores estresantes. En *C. neoformans*, la presencia de melanina aumentó la tolerancia al estrés por calor y frío a través de un mecanismo aún desconocido que

posiblemente involucra la extinción de ERO inducidas por el calor (Rosas y Casadevall, 1997).

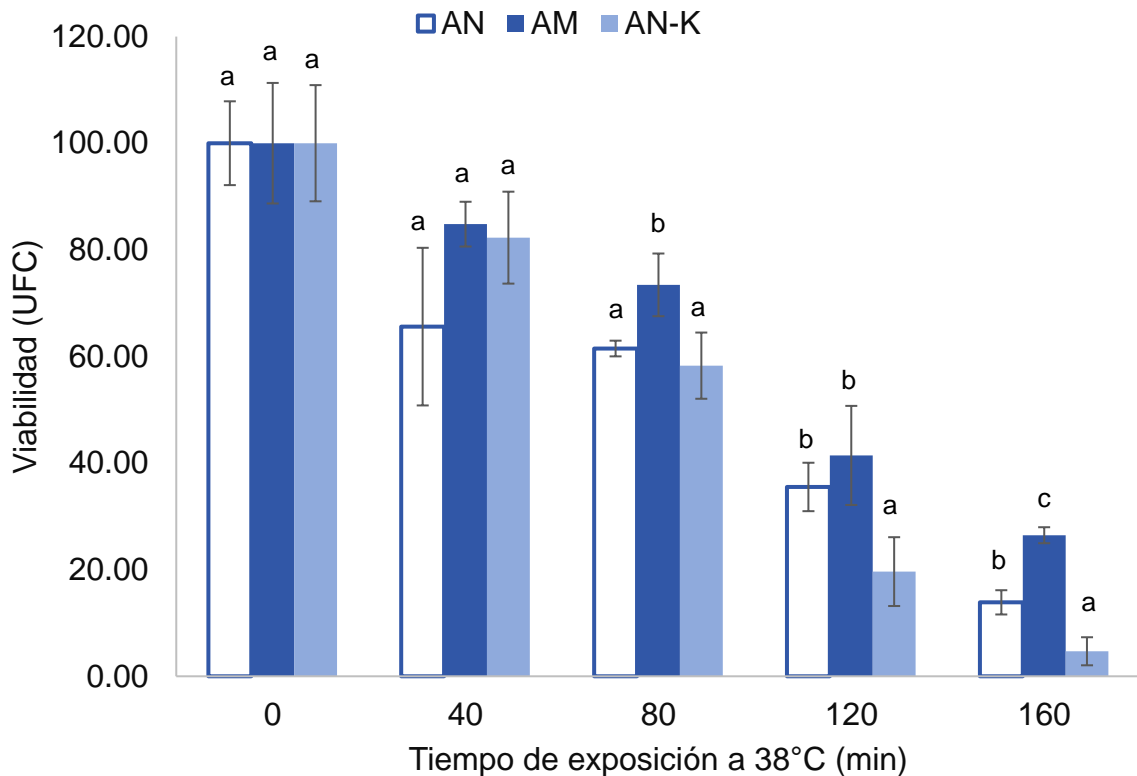


Figura 22.- Viabilidad de la cepa *C. javanica* CNRCB a diferentes tiempos de exposición a 38 °C.

Otro ejemplo donde la melanina desempeña un papel en la termotolerancia se observó en escenarios simbióticos entre plantas y hongos, donde los endófitos melanizados ayudan a la planta a adaptarse a los cambios de temperatura, posiblemente ayudando a disipar el calor y/o absorber las ERO (Redman et al., 2002). Por otro lado, la síntesis de melanina a través de la vía enzimática tirosinasa/lacasa está regulada por la temperatura (Jacobson y Emery, 1991; Kim et al., 2003) por lo que estos microorganismos al estar expuestos a estas temperaturas podrían incrementar mayores concentraciones de melanina o de otros componentes en lo que participan estas enzimas, en especial la lacasa.

Tabla 6.- Valores del tiempo necesario para que sobreviva el 50% (TL₅₀) de los conidios de los tratamientos AN, AM y AN-K expuestos a 38 °C.

Tratamiento	TL ₅₀ (min)	
	<i>C. fumosorosea</i> ARSEF 3302	<i>C. javanica</i> CHE-CNRCB 303
AN	65.33 ± 9.98	114.18 ± 5.72
AM	119.65 ± 19.91	96.83 ± 23.20
AN-K	66 ± 21.17	105.27 ± 23.89

7.8.5 Resistencia a dimetoato

El éxito de un programa de control de plagas que utiliza hongos entomopatógenos depende de la supervivencia de los conidios en el ambiente de campo (Benz 1987); sin embargo, la sobrevivencia de los conidios puede verse afectada por factores ambientales (Furlong y Pell 1997), plaguicidas o productos químicos utilizados para proteger a los cultivos (Anderson y Roberts 1983, Loria et al. 1983, Alves y Lecuona 1998 y Sain et al., 2019), por lo que evaluar la tolerancia de los HE frente a insecticidas de uso común podría contribuir a una selección de cepas que mejor se desempeñen en campo.

Las especies *javanica* y *fumosorosea* de *Cordyceps* podrían entrar en contacto en campo con insecticidas que atacan los mismos insectos blanco, tal es el caso del dimetoato. El dimetoato es un insecticida organofosforado y se introdujo en 1956 y se usa ampliamente en muchos países en una gran cantidad de cultivos para el control de insectos como áfidos, ácaros rojos, mosquitos de los guisantes, trips, bulbos de trigo, aserrados, chupones y áfidos lanudos. (Kidd y James, 1991; Deshpande et al., 2001; Christos y Nikolaos, 2003). El dimetoato mata insectos por contacto y acción estomacal, al interferir con las actividades de la acetilcolinesterasa, la cual es esencial para el buen funcionamiento del sistema nervioso tanto de humanos como de insectos (Lopez-Carillo y Lopez-Crevantes, 1993).

Dada la composición aromática de los polímeros de melanina y la variedad de grupos funcionales hidroxilo, carboxilo, amina y fenólicos presentes en el pigmento, la melanina puede formar interacciones moleculares con muchas moléculas

orgánicas e inorgánicas. De hecho, la melanina fúngica puede formar enlaces covalentes, iónicos e hidrófobos con proteínas, polisacáridos, pesticidas, drogas y otros contaminantes (Fogarty y Tobin, 1996).

En las **Figuras 23 y 24** podemos observar una disminución de la viabilidad de los conidios de ambas cepas al incrementar la dosis del insecticida. En el caso de la especie *C. fumosorosea* ARSEF 3302, los conidios provenientes de una AM mantuvieron 26% más viabilidad que los provenientes de una AN a la dosis más alta probada, mientras que los conidios albinos presentaron 20% menos viabilidad que los de AN. Por lo que, para esta cepa, la melanina podría representar un factor para la protección frente al insecticida; sin embargo, otros estudios serían necesarios para fundamentar esta correlación.

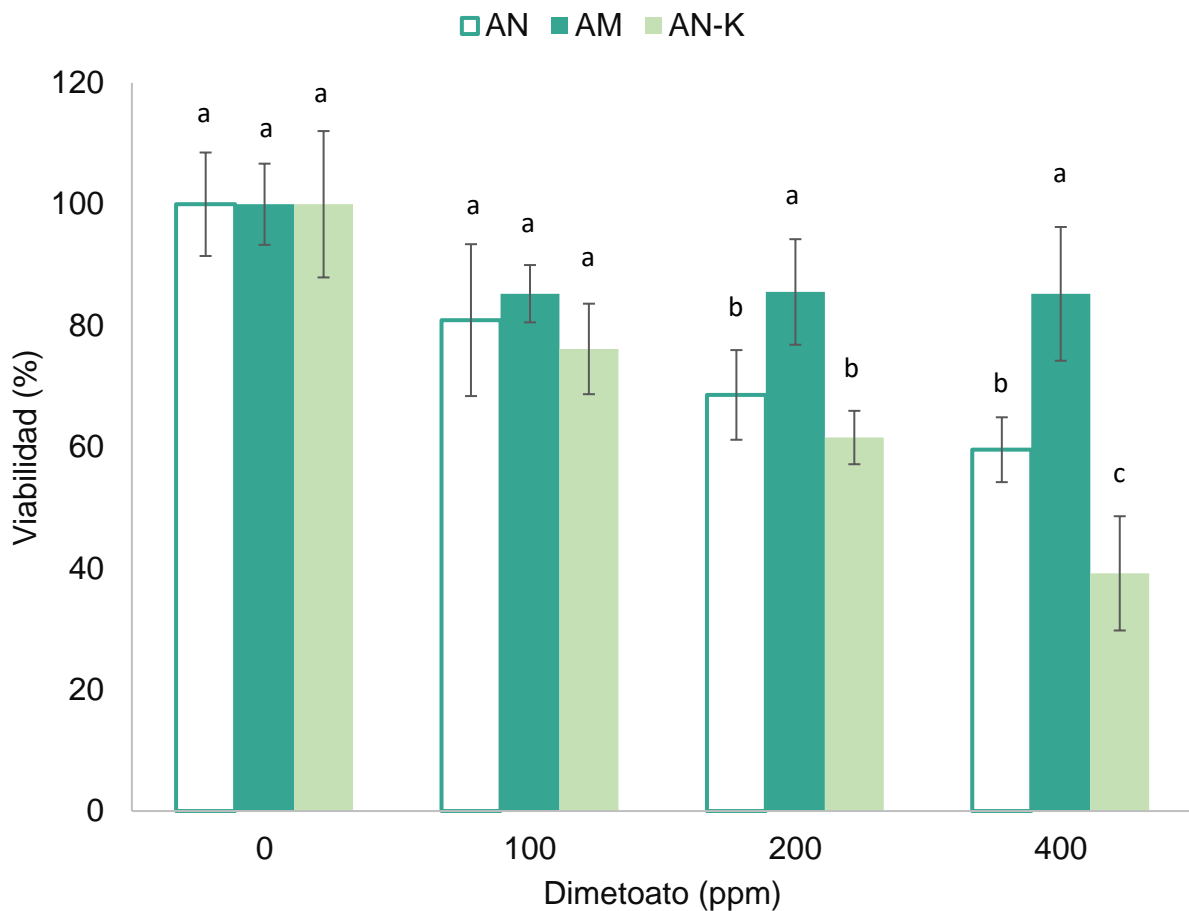


Figura 23.- Viabilidad de la cepa *C. fumosorosea* ARSEF 3302 a diferentes concentraciones de dimetoato.

En el caso de la especie *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (**Figura 24**) todos los tratamientos mantuvieron una viabilidad superior al 70% sin importar la dosis del insecticida, además se observó una alta variación en los resultados mostrando una tendencia en que el hongo *C. fumosorosea* ARSEF 3302 es más sensible a la presencia de este insecticida; sin embargo, otros deben ser los mecanismos que posee para hacer frente al dimetoato, ya que su viabilidad no se modifica sin importar el incremento de la concentración del insecticida.

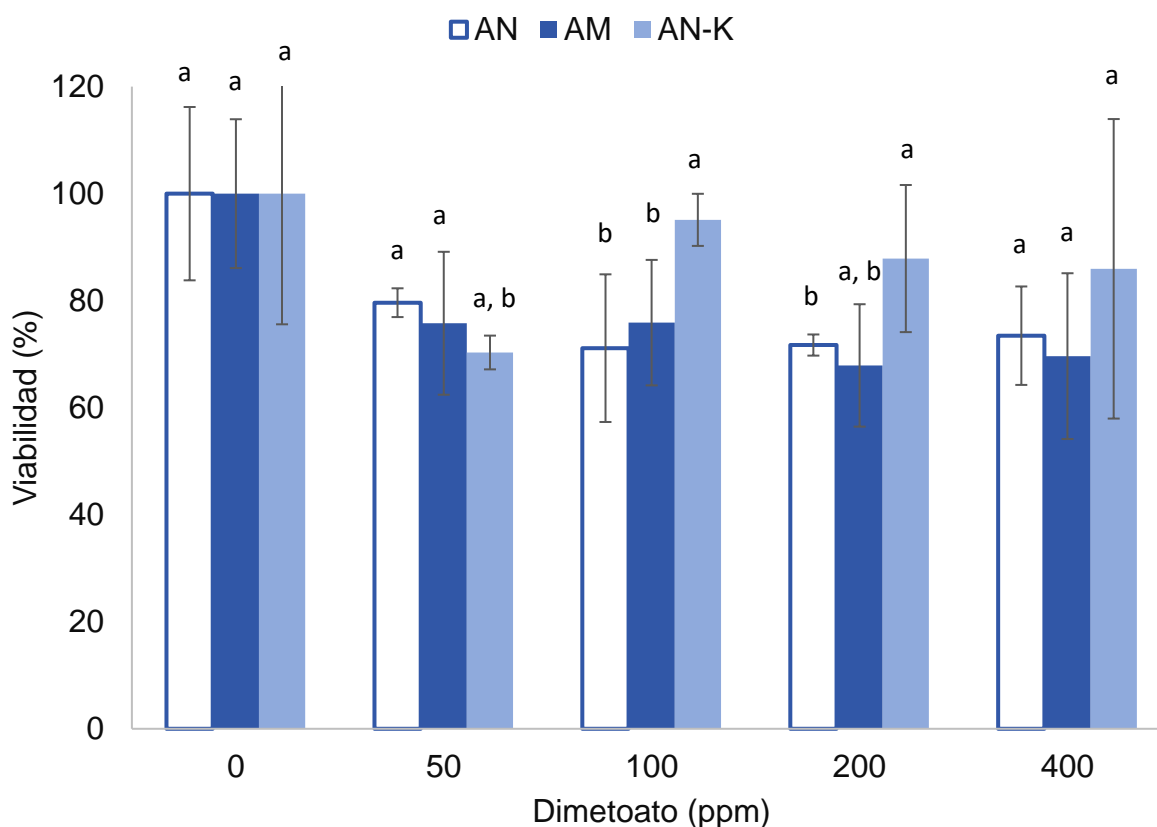


Figura 24.- Viabilidad de la cepa *C. javanica* CNRCB a diferentes concentraciones de dimetoato.

7.8.6 Crecimiento radial en presencia de dimetoato

Dentro del análisis de compatibilidad de *Cordyceps fumosorosea* ARSEF 3302 (**Figura 25**) podemos observar que hubo una disminución del crecimiento radial de todos los tratamientos al incrementar la dosis del insecticida; sin embargo, esta disminución sólo fue de entre el 10% y 20% para la dosis 400 ppm para los tratamientos AN y AN-K, respectivamente; mientras que los conidios provenientes de la AM no disminuyeron su crecimiento radial, sin importar la dosis del dimetoato.

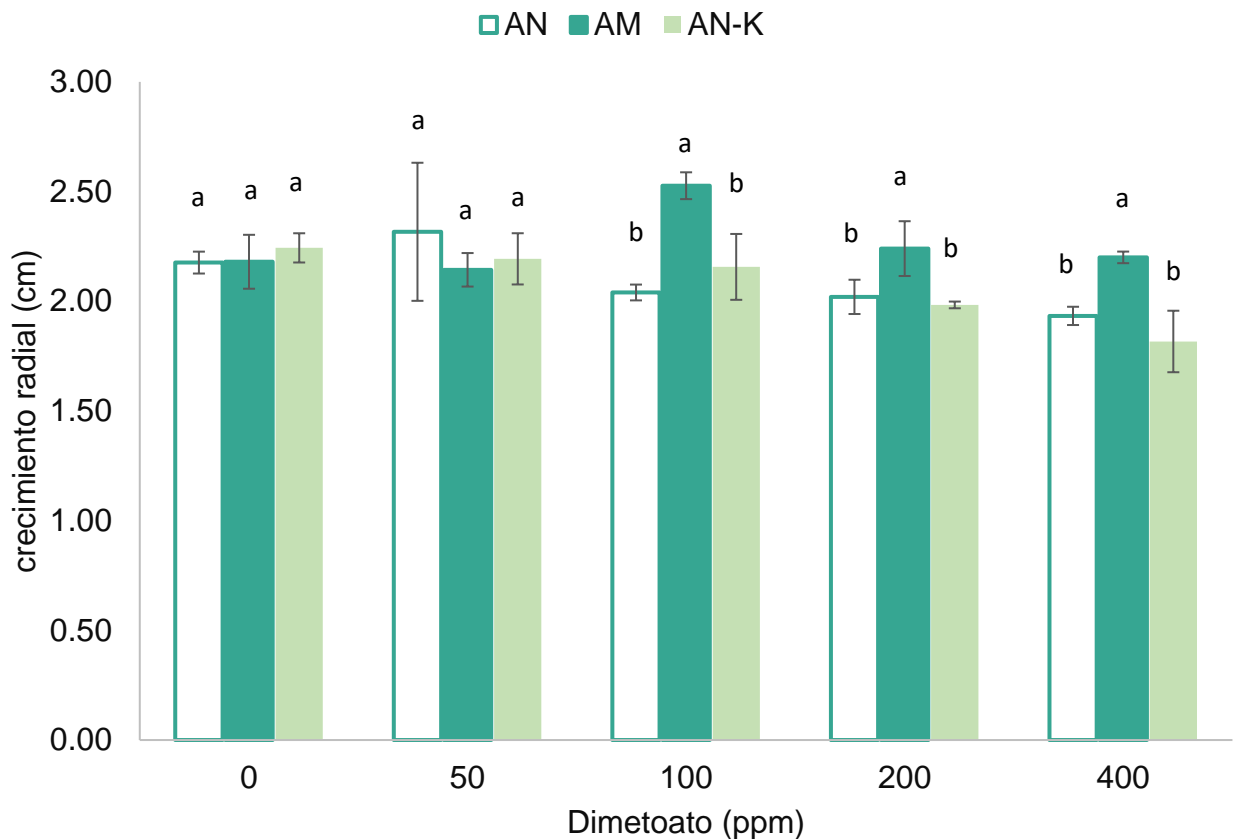


Figura 25.- Crecimiento radial de la especie *C. fumosorosea* ARSEF 3302 a diferentes concentraciones de dimetoato.

Por otro lado, el crecimiento radial de la cepa *C. javanica* CHE-CNRCB 303 (**Figura 26**) disminuyó al incrementar la dosis de dimetoato, siendo los conidios provenientes

de una AN los que tuvieron un menor crecimiento radial, y los provenientes de AM y AN-K sólo disminuyeron menos del 10% de su crecimiento sin importar la dosis del insecticida, estos resultados son similares a lo reportado para los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en los que se demostró que el dimetoato al 0.05 % generó una disminución del ~10% del crecimiento radial de ambos hongos, por lo que se catalogó como un insecticida que se podría utilizar a la par con estos hongos (Khan et al., 2012). Cabe señalar que la actividad metabólica del hongo se encuentra activa una vez iniciada la germinación, además se encuentra en un medio libre de inhibidores de la síntesis de melanina, así que los conidios provenientes del tratamiento AN-K pueden volver a sintetizar melanina, por lo que la síntesis de este pigmento podría contribuir a neutralizar al dimetoato. Por otro lado, se ha reportado para la cepa ZHY256 de *Aspergillus niger* la capacidad de degradar el dimetoato enzimáticamente por la fosfotriesterasa y carboxilesterasa (Liu et al., 2001) cabe señalar que estas enzimas se encuentran presentes en ambas especies de *Cordyceps*, por lo que podrían degradar el dimetoato y por ello mantener un alto porcentaje de crecimiento radial a pesar de las altas dosis de dimetoato probadas en este estudio.

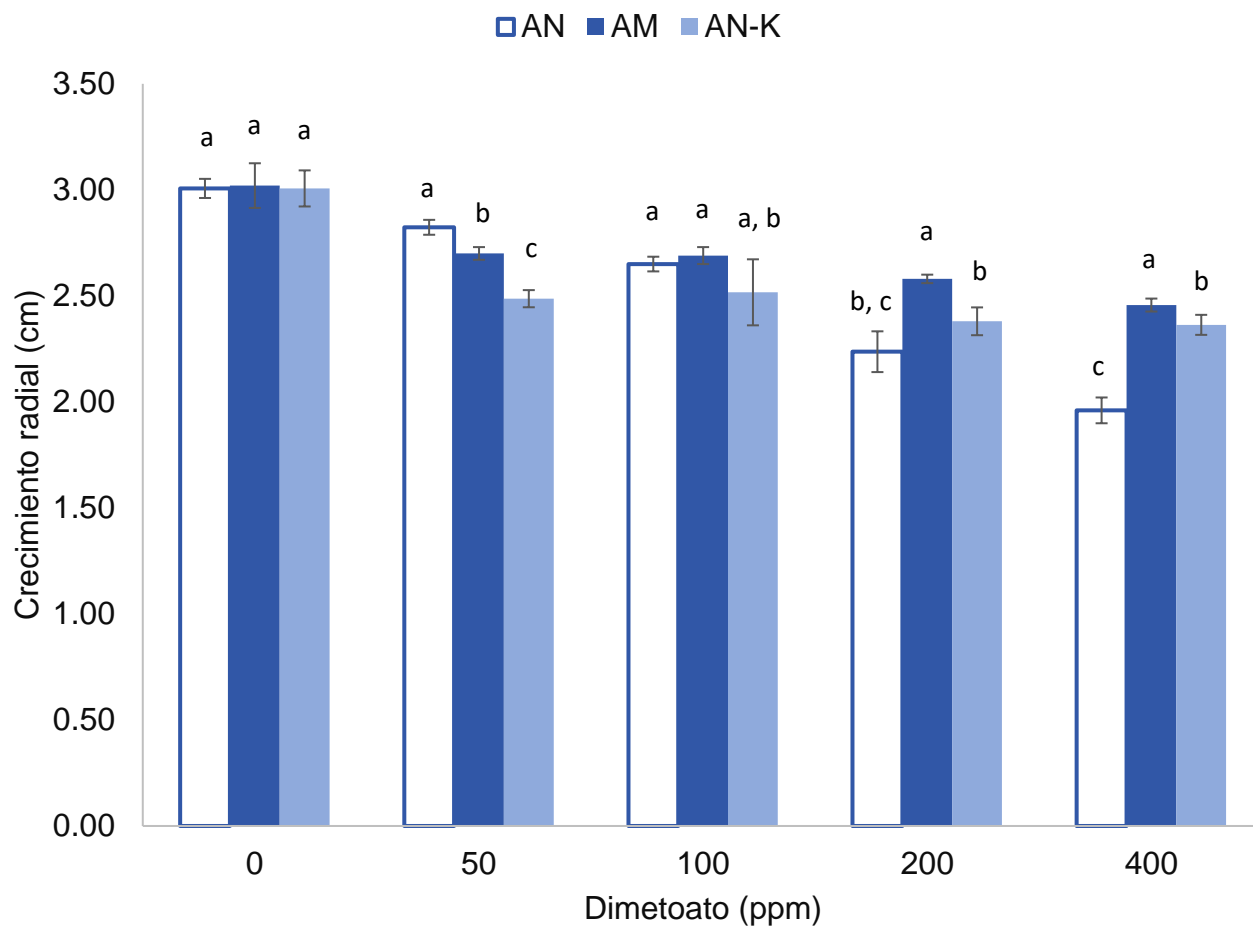


Figura 26.- Crecimiento radial de la cepa *C. javanica* CHE-CNRCB 303 a diferentes concentraciones de dimetoato.

7.8.7 Infectividad

El incremento en la capacidad infectiva de los hongos entomopatógenos es un fenómeno multicausal, es decir, no está restringido a sólo un tipo estímulo o condición. En este sentido, la melanina es requerida por hongos patógenos de plantas, animales y humanos, debido a esto se han asociado con la virulencia Jahn et al., 1997; Butler et al., 2001; Nosanchuk and Casadevall, 2003). La naturaleza química de la melanina sugiere que podrían funcionar como un escudo contra los sistemas de defensa químicos y/o enzimáticos del huésped ya que la melanina podrían secuestrar proteínas y metales pesados (Toledo et al., 2017).

Se determinó el porcentaje de sobrevivencia que se obtuvo al infectar larvas de *Galleria mellonella* con los conidios provenientes de los tres tratamientos (AN, AM y AN-K), los cuales poseían diferentes concentraciones de melanina. La mortalidad obtenida después de 10 días con el tratamiento AM de la especie *C. javanica* CHE-CNRCB 303 fue de 84%; es decir, este tratamiento produjo conidios más infectivos respecto a la mortalidad obtenida con el tratamiento AN (mortalidad de 42%) (**Figura 28**). Por otro lado, la mortalidad de los insectos con el tratamiento AN-K fue del 62 %; es decir, que los conidios albinos fueron 34% más infectivos que los conidios provenientes de una AN. Este último resultado es contradictorio con lo que se ha reportado en diferentes hongos patógenos, donde la melanina juega un papel importante en la virulencia. Posiblemente, la metodología utilizada para la producción de conidios albinos predisponga enzimáticamente a los conidios a incrementar la producción de melanina, cuando se encuentren en condiciones de producirla ya que, estos conidios albinos son capaces de volver a generar este pigmento una vez se encuentran en un medio libre de ácido kójico, tal es el caso de un insecto.

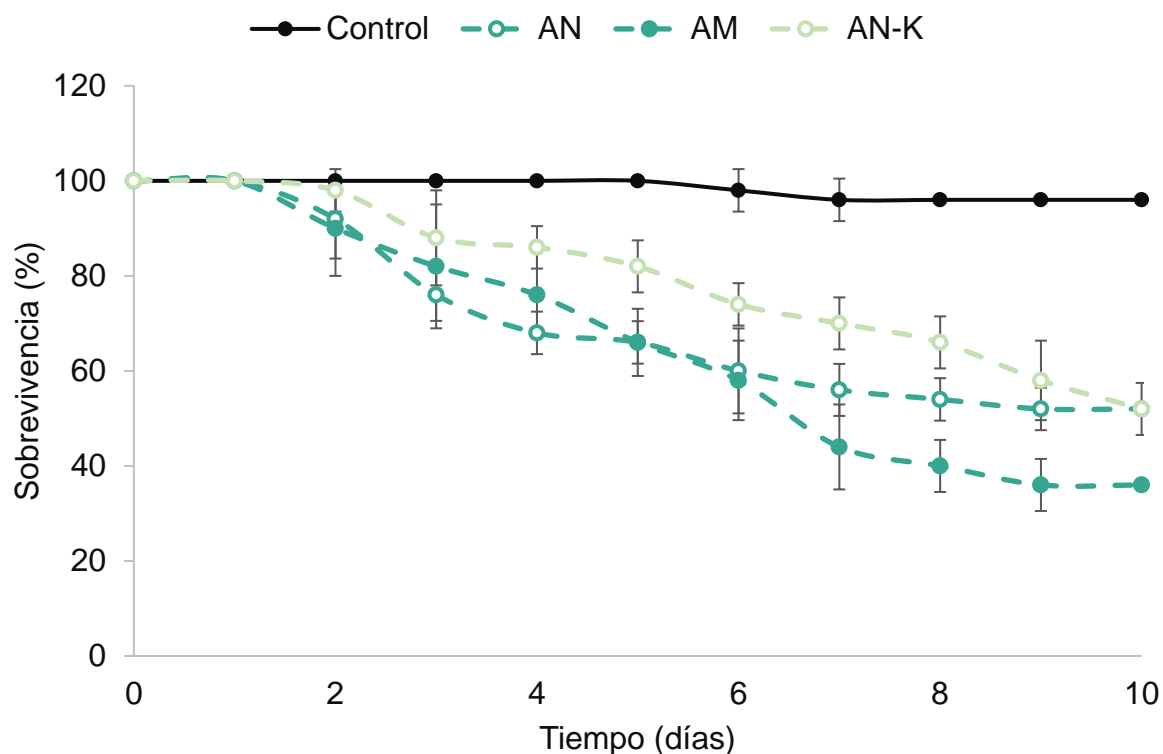


Figura 27.- Mortalidad obtenida en larvas de *Galleria mellonella* infectadas con los tratamientos atmósfera normal (AN), atmósfera modificada (AM) y atmósfera normal con ácido kójico AN-K para el hongo *C. fumosorosea* ARSEF 3302.

Para entender mejor este fenómeno debemos esclarecer las fases de producción de este pigmento en el ciclo de vida del HE *Cordyceps*, ya que, como en otros hongos, sólo presenta pigmentación en los conidios; es decir, sólo producen melanina en ciertas fases específicas de desarrollo (conidios, crecimiento filamentoso de levadura) en respuesta a cambios ambientales y/o en presencia de precursores de melanina fenólicos (Bell y Wheeler, 1986), mientras que algunas especies de hongos son melanizantes constitutivamente y son conocidos como hongos melanóticos, negros, dematiáceos, microcoloniales o meristemáticos (Cordero y Casadevall, 2017). En varios patógenos de plantas, la melanina desempeña un papel fundamental en la generación de presión osmótica dentro del apresorio, cuando las hifas penetran en las paredes celulares de las plantas, que se describió para las especies *Magnaporthe* y *Colletotrichum* (Ludwig et al., 2014;

Wolkow et al., 1983). En estos patógenos, las mutaciones dirigidas a inhibir la melanización llevaron a una reducción de la virulencia.

Hasta el momento se desconoce si *Cordyceps* es capaz de producir melanina en el proceso infectivo (formación de apesorio, invasión del hemocele, producción de blastosporas) o si es capaz de influir en alguna de estas etapas, por lo que mutantes albinas de este hongo podrían esclarecer parte de los fenómenos encontrados en este estudio, así como contribuir con nuevo conocimiento dentro del campo de los HE al determinar el ciclo de producción de melanina en el ciclo de vida del hongo.

El porcentaje de mortalidad encontrada en la especie *C. fumosorosea* ARSEF 3302 (**Figura 27**) con el tratamiento AM fue del 64%, por lo que los conidios de este tratamiento fueron 30% más infectivos respecto a la mortalidad (48%) obtenida por los conidios cosechados de una AN, lo cual se correlaciona con el incremento de melanina de los conidios provenientes de una AM.

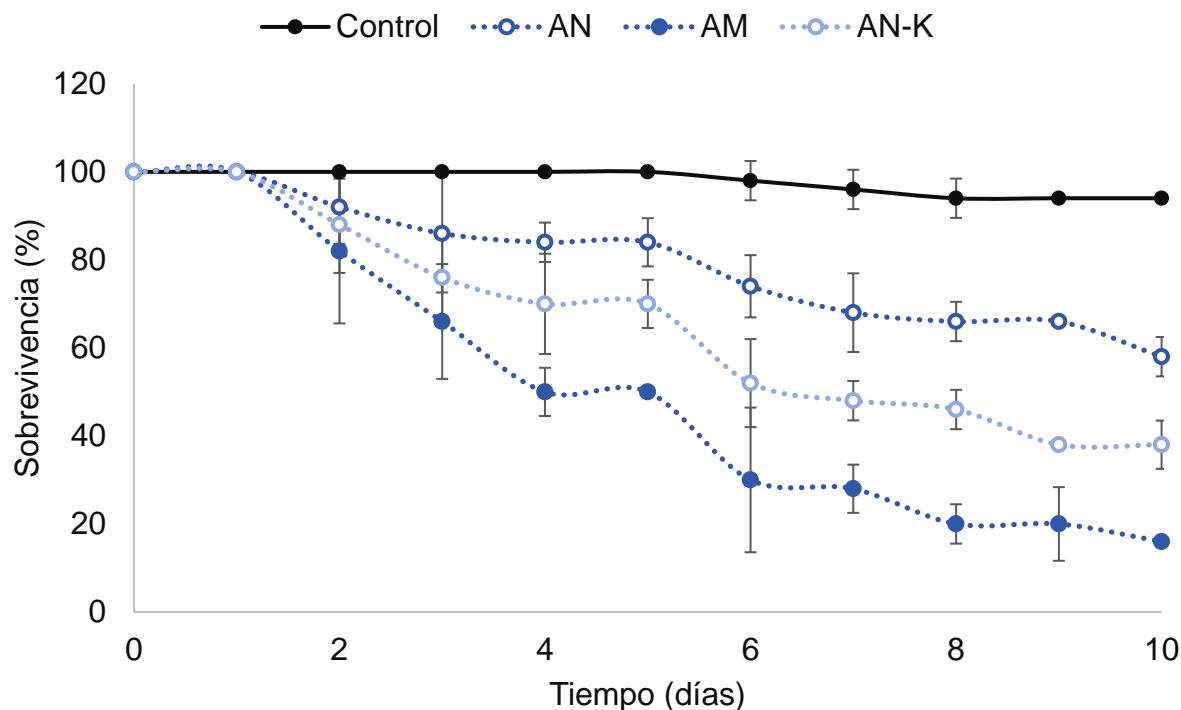


Figura 28.- Mortalidad obtenida en larvas de *Galleria mellonella* infectadas con los tratamientos atmósfera normal (AN), atmósfera modificada (AM) y atmósfera normal con ácido kójico AN-K para la cepa *C. javanica* CHE-CNRCB 303.

Por otro lado, no hubo diferencia significativa entre la mortalidad obtenida con los conidios albinos (AN-K) y la mortalidad observada con los conidios cosechados de una AN. Por lo que, estos estudios y bajo estas condiciones muestran que la melanina no se relaciona con la virulencia de este hongo. Sin embargo, este análisis posee una limitante, la cual es que los conidios al no ser mutantes conservan toda la maquinaria enzimática para reestablecer su nivel basal de melanina en cuanto dejen de estar expuestos a ácido kójico; es decir, cuando entran en contacto con un insecto. Por otro lado, aún desconocemos si además del conidio, en otra estructura o fase de desarrollo del HE se sintetiza este pigmento por lo que se requieren análisis detallados que esclarezcan la posible síntesis de este pigmento en otras fases de desarrollo de los HE, y de estar presente reconocer su participación en cada fase.

8 Conclusiones

La pigmentación oscura en conidios de *C. javanica* CHE-CNRCB 303 y *C. fumosorosea* ARSEF 3302 se debe a la presencia de melanina; además, ambos aislados fúngicos producen melanina por la vía biosintética de DOPA-melanina. Por otro lado, se presentó una correlación entre la presencia de melanina en los conidios de ambas especies de *Cordyceps* y una mejoría en la resistencia al estrés por calor y la radiación UV-B. Este es el primer estudio que caracterizó y evaluó la posible contribución de la melanina en la resistencia a diferentes tipos de estrés como calor, radiación UVB y dimetoato. Este conocimiento podría mejorar tanto la persistencia de los conidios en el campo como la efectividad en el control biológico.

Además, se comprobó que el cultivo bajo una atmósfera enriquecida de oxígeno al 26% de ambas especies de *Cordyceps* incrementa la concentración de melanina en los conidios, los cuales presentaron una mayor calidad respecto a los conidios cultivados bajo una AN.

Este conocimiento tiene implicaciones prácticas, puesto que coloca a la melanina como un posible parámetro a cuantificar que pudiera proteger a los conidios contra el estrés en algunos hongos. El contenido de melanina podría ser un criterio para la selección de aislamientos en los enfoques de control biológico, sin embargo, se requieren más análisis enfocados a determinar la ubicación de la melanina en los conidios y su presencia en el desarrollo y proceso infectivo de estos hongos entomopatógenos, con el objetivo de diseñar estrategias para mejorar el contenido de melanina en los conidios, que tendrían una mejor tolerancia al estrés y una mayor virulencia cuando se aplica en los campos.

9 Perspectivas

- I. Incrementar la concentración de dimetoato, temperatura y dosis de radiación UVB hasta que la viabilidad de los conidios (AN, AM y AN-K) en estudios de calidad sea menor al 90 %.
- II. Producir conidios albinos de ambas especies de *Cordyceps* y corroborar la contribución de la melanina en la calidad de los conidios.
- III. Determinar si la melanina se produce en alguna etapa de infección del hongo; es decir, si la melanina se encuentra en el apresorio, si se encuentra involucrada en el proceso de penetración o si se sintetiza en etapas posteriores a la penetración de la cutícula.
- IV. Evaluar la producción de melanina de HE cultivados en medio sólido.
- V. Optimizar el proceso de extracción y purificación de melanina de HE cultivados en medio sólido.
- VI. Evaluar la melanina fúngica como fotoprotectores/antioxidantes en las formulaciones de HE que se aplican en campo.
- VII. Determinar la compatibilidad entre HE y melanina fúngica purificada de diferentes géneros de hongos.

10 Referencias

- Albanese, G., Bridelli, M.G., Deriu, A., 1984. Structural dynamics of melanin investigated by Rayleigh scattering of Mössbauer radiation. *Biopolymers* 23, 1481–1498. <https://doi.org/10.1002/bip.360230805>
- Almeida-Paes, R., Figueiredo-Carvalho, M.H.G., Brito-Santos, F., Almeida-Silva, F., Oliveira, M.M.E., Zancopé-Oliveira, R.M., 2016. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152796>
- Ambrico, M., 2016. SPECIAL ISSUE: Melanin, a long lasting history bridging natural pigments and organic bioelectronics. *Polym. Int.* 65, 1249–1250. <https://doi.org/10.1002/pi.5239>
- Apte, M., Girme, G., Bankar, A., RaviKumar, A., Zinjarde, S., 2013. 3, 4-dihydroxy-L-phenylalanine-derived melanin from *Yarrowia lipolytica* mediates the synthesis of silver and gold nanostructures. *J. Nanobiotechnology* 11, 2. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-11-2>
- Araujo, M., Xavier, J.R., Nunes, C.D., Vaz, P.D., Humanes, M., 2012. Marine sponge melanin: A new source of an old biopolymer. *Struct. Chem.* 23, 115–122. <https://doi.org/10.1007/s11224-011-9843-7>
- Baker, B.J., Lutz, M.A., Dawson, S.C., Bond, P.L., Banfield, J.F., 2004. Metabolically active eukaryotic communities in extremely acidic mine drainage. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6264–6271. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6264-6271.2004>
- Baker, L.G., Specht, C.A., Donlin, M.J., Lodge, J.K., 2007. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 6, 855–867. <https://doi.org/10.1128/EC.00399-06>
- Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., Lodge, J.K., 2005. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 4, 1902–1912. <https://doi.org/10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005>
- Bárcena, A., Petroselli, G., Velasquez, S.M., Estévez, J.M., Erra-Balsells, R., Balatti, P.A., Saparrat, M.C.N., 2015. Response of the fungus *Pseudocercospora griseola* f. mesoamericana to Tricyclazole. *Mycol. Prog.* 14, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11557-015-1102-7>
- Bashyal, B.M., Chand, R., Kushwaha, C., Sen, D., Prasad, L.C., Joshi, A.K., 2010. Association of melanin content with conidiogenesis in *Bipolaris Sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0177-1>
- Almeida-Paes, R., Figueiredo-Carvalho, M.H.G., Brito-Santos, F., Almeida-Silva, F., Oliveira, M.M.E.,

- Zancopé-Oliveira, R.M., 2016. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152796>
- Ambrico, M., 2016. SPECIAL ISSUE: Melanin, a long lasting history bridging natural pigments and organic bioelectronics. *Polym. Int.* 65, 1249–1250. <https://doi.org/10.1002/pi.5239>
- Baker, L.G., Specht, C.A., Donlin, M.J., Lodge, J.K., 2007. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 6, 855–867. <https://doi.org/10.1128/EC.00399-06>
- Bell, A.A., Wheeler, M.H., 1986a. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 411–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002211>
- Bell, A.A., Wheeler, M.H., 1986b. Biosynthesis and Functions of Fungal Melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24, 411–451. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.24.090186.002211>
- Beltrán-García, M.J., Prado, F.M., Oliveira, M.S., Ortiz-Mendoza, D., Scalfio, A.C., Pessoa, A., Medeiros, M.H.G., White, J.F., Di Mascio, P., 2014. Singlet molecular oxygen generation by light-activated DHN-melanin of the fungal pathogen *Mycosphaerella fijiensis* in black sigatoka disease of bananas. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091616>
- Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 543, 251–272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Boveris A, Repetto M G, Boveris A D, V.L.B., 2008. Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. 008. Determ. del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. En *Radicales Libr. y Estrés Oxidativo, Apl. Médicas*. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editor. El Man. Mod. S. A. C. V. México. Capítulo 2, 319–328.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Butler, M. J., Day, A.W., 1998. Fungal melanins: A review. *Can. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1139/w98-119>
- Butler, M J, Day, A.W., 1998. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* 44, 1115–1136. <https://doi.org/10.1139/w98-119>
- Butler, M.J., Day, A.W., Henson, J.M., Money, N.P., 2001. Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia* 93, 1–8. <https://doi.org/10.1080/00275514.2001.12061273>

- Buzzini, P., Margesin, R., 2013. Cold-adapted yeasts: Biodiversity, adaptation strategies and biotechnological significance, *Cold-adapted Yeasts: Biodiversity, Adaptation Strategies and Biotechnological Significance*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6>
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., Keller, N.P., 2002. Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 447–459. <https://doi.org/10.1128/membr.66.3.447-459.2002>
- Carzaniga, R., Fiocco, D., Bowyer, P., O'Connell, R.J., 2002. Localization of melanin in conidia of *Alternaria alternata* using phage display antibodies. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 216–224. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.216>
- Castillo-Minjarez, J.M., Garza-López, P.M., Barrios-González, J., Loera, O., 2019. Free conidia of entomopathogenic fungi modify quality traits by changing glutathione levels after an oxidant stimulus. *Biol. Control* 137, 104011. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104011>
- Chand, R., Kumar, M., Kushwaha, C., Shah, K., Joshi, A.K., 2014. Role of melanin in release of extracellular enzymes and selection of aggressive isolates of *Bipolaris sorokiniana* in barley. *Curr. Microbiol.* 69, 202–211. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0559-y>
- Chandler, D., Bailey, A.S., Tatchell, G.M., Davidson, G., Greaves, J., Grant, W.P., 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 366.
- Chang, T.-S., 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 10, 2440–2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Chatterjee, S., Prados-Rosales, R., Itin, B., Casadevall, A., Stark, R.E., 2015. Solid-state NMR reveals the carbon-based molecular architecture of *Cryptococcus neoformans* fungal eumelanins in the cell wall. *J. Biol. Chem.* 290, 13779–13790. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618389>
- Chen, C.-Y., Lin, L.-C., Yang, W.-F., Bordon, J., D. Wang, H.-M., 2015. An Updated Organic Classification of Tyrosinase Inhibitors on Melanin Biosynthesis. *Curr. Org. Chem.* 19, 4–18. <https://doi.org/10.2174/1385272819666141107224806>
- Chen, S.R., Jiang, B., Zheng, J.X., Xu, G.Y., Li, J.Y., Yang, N., 2008. Isolation and characterization of natural melanin derived from silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). *Food Chem.* 111, 745–749. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.053>
- Cockell, Charles S. Knowland, J., 1999. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biol. Rev.* 74, 311–345. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00189.x>
- Cordero, R.J.B., Casadevall, A., 2017. Functions of fungal melanin beyond

virulence. *Fungal Biol. Rev.* 31, 99–112.
<https://doi.org/10.1016/J.FBR.2016.12.003>

- Correa, N., Covarrubias, C., Rodas, P.I., Hermosilla, G., Olate, V.R., Valdés, C., Meyer, W., Magne, F., Tapia, C. V., 2017. Differential Antifungal Activity of Human and Cryptococcal Melanins with Structural Discrepancies. *Front. Microbiol.* 8, 1292. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01292>
- Costa, T.G., Younger, R., Poe, C., Farmer, P.J., Szpoganicz, B., 2012. Studies on Synthetic and Natural Melanin and Its Affinity for Fe(III) Ion [WWW Document]. *Bioinorg. Chem. Appl.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2012/712840>
- Cunha, M.M., Franzen, A.J., Seabra, S.H., Herbst, M.H., Vugman, N. V, Borba, L.P., de Souza, W., Rozental, S., 2010. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.* 10, 80. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-80>
- D'Ischia, M., Wakamatsu, K., Napolitano, A., Briganti, S., Garcia-Borron, J.C., Kovacs, D., Meredith, P., Pezzella, A., Picardo, M., Sarna, T., Simon, J.D., Ito, S., 2013. Melanins and melanogenesis: Methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res.* <https://doi.org/10.1111/pcmr.12121>
- Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A.D., Aisen, P., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., 2007. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000457>
- Daniel, J., 1938. Studies of multiple allelomorphic series in the house-mouse - III. A spectrophotometric study of mouse melanin. *J. Genet.* 36, 139–143. <https://doi.org/10.1007/BF02982378>
- Dighton, J., Tugay, T., Zhdanova, N., 2008. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 109–120. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01076.x>
- Dong, C., Yao, Y., 2012. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 474–479. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.12.001>
- Doss, R.P., Deisenhofer, J., Krug von Nidda, H.-A., Soeldner, A.H., McGuire, R.P., 2003. Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63, 687–691. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00323-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00323-6)
- Eisenman, H.C., Nosanchuk, J.D., Webber, J.B.W., Emerson, R.J., Camesano, T.A., Casadevall, A., 2005. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry* 44, 3683–3693. <https://doi.org/10.1021/bi047731m>
- El-Naggar, N.E.A., El-Ewasy, S.M., 2017. Bioproduction, characterization,

- anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. *Sci. Rep.* 7, 1–19. <https://doi.org/10.1038/srep42129>
- Elliott, M.L., 1995. Effect of Melanin Biosynthesis Inhibiting Compounds on *Gaeumannomyces* Species. *Mycologia* 87, 370–374. <https://doi.org/10.2307/3760835>
- Ellis, D.H., Griffiths, D.A., 1974. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. *Can. J. Microbiol.* 20, 1379–1386. <https://doi.org/10.1139/m74-212>
- Engh, I., Nowrousian, M., Kück, U., 2007. Regulation of melanin biosynthesis via the dihydroxynaphthalene pathway is dependent on sexual development in the ascomycete *Sordaria macrospora*. *FEMS Microbiol. Lett.* 275, 62–70. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00867.x>
- Enochs, W.S., Nilges, M.J., Swartz, H.M., 1993. A standardized test for the identification and characterization of melanins using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. *Pigment cell Res.* 6, 91–9.
- 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 Genet. Biol.* 46, 277–285. <https://doi.org/10.1016/J.FGB.2008.12.001>
- Fetzner, R., Seither, K., Wenderoth, M., Herr, A., Fischer, R., 2014. *Alternaria alternata* transcription factor CmrA controls melanization and spore development. *Microbiol. (United Kingdom)* 160, 1845–1854. <https://doi.org/10.1099/mic.0.079046-0>
- Fogarty, R. V., Tobin, J.M., 1996. Fungal melanins and their interactions with metals. *Enzyme Microb. Technol.* 19, 311–317. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(96\)00002-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(96)00002-6)
- Franzen, A.J., Cunha, M.M.L., Batista, E.J.O., Seabra, S.H., De Souza, W., Rozental, S., 2006. Effects of tricyclazole (5-methyl-1,2,4-triazol[3,4]benzothiazole), a specific DHN–melanin inhibitor, on the morphology of *Fonsecaea pedrosoi* conidia and sclerotic cells. *Microsc. Res. Tech.* 69, 729–737. <https://doi.org/10.1002/JEMT.20344>
- Gadd, G.M., 2009. Effects of media composition and light on colony differentiation and melanin synthesis in *Microdochium bolleyi*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 78, 115–122. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(82\)80083-1](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(82)80083-1)
- Gallou, A., Serna-Domínguez, M.G., Berlanga-Padilla, A.M., Ayala-Zermeño, M.A., Mellín-Rosas, M.A., Montesinos-Matías, R., Arredondo-Bernal, H.C., 2016. Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biol.* 120, 414–423.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.11.009>

García-Ortiz, N., Figueroa-Martínez, F.J., Carrasco-Navarro, U., Favela-Torres, E., Loera, O., 2018. The oxygen concentration in cultures modulates protein expression and enzymatic antioxidant responses in *Metarhizium lepidiotae* conidia. *Fungal Biol.* 122, 487–496.

<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.013>

García-Rivera, J., Casadevall, A., 2001. Melanization of *Cryptococcus neoformans* reduces its susceptibility to the antimicrobial effects of silver nitrate. *Med. Mycol.* 39, 353–7.

Garcia, O., 2012. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum* en atmósferas oxidantes. Universidad Autónoma Metropolitana.

Gessler, N.N., Egorova, A.S., Belozerskaya, T.A., 2014. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* <https://doi.org/10.1134/S0003683814020094>

Ghamrawi, S., Rénier, G., Saulnier, P., Cuenot, S., Zykwinska, A., Dutilh, B.E., Thornton, C., Faure, S., Bouchara, J.-P., 2014. Cell Wall Modifications during Conidial Maturation of the Human Pathogenic Fungus *Pseudallescheria boydii*. *PLoS One* 9, e100290. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100290>

Griffith, G.W., Easton, G.L., Detheridge, A., Roderick, K., Edwards, A., Worgan, H.J., Nicholson, J., Perkins, W.T., 2007. Copper deficiency in potato dextrose agar causes reduced pigmentation in cultures of various fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 165–171. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00923.x>

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., 2014. Extremely halotolerant and halophilic fungi inhabit brine in solar salterns around the globe. *Food Technol. Biotechnol.*

Haining, R.L., Achat-Mendes, C., 2017. Neuromelanin, one of the most overlooked molecules in modern medicine, is not a spectator. *Neural Regen. Res.* <https://doi.org/10.4103/1673-5374.202928>

Henson, J.M., Butler, M.J., Day, A.W., 1999. THE DARK SIDE OF THE MYCELIUM : Melanins of Phytopathogenic Fungi . *Annu. Rev. Phytopathol.* 37, 447–471. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.37.1.447>

Hong, L., Liu, Y., Simon, J.D., 2007. Binding of Metal Ions to Melanin and Their Effects on the Aerobic Reactivity¶. *Photochem. Photobiol.* 80, 477–481. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2004.tb00117.x>

Hong, L., Simon, J.D., 2006. Insight into the Binding of Divalent Cations to Sepia Eumelanin from IR Absorption Spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 82, 1265. <https://doi.org/10.1562/2006-02-23-ra-809>

Hou, R., Liu, X., Xiang, K., Chen, L., Wu, X., Lin, W., Zheng, M., Fu, J., 2019.

- Characterization of the physicochemical properties and extraction optimization of natural melanin from *Inonotus hispidus* mushroom. *Food Chem.* 277, 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.002>
- Hseu, Y.C., Chang, W.H., Chen, C.S., Liao, J.W., Huang, C.J., Lu, F.J., Chia, Y.C., Hsu, H.K., Wu, J.J., Yang, H.L., 2008. Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem. Toxicol.* 46, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.003>
- Hu, W.L., Dai, D.H., Huang, G.R., Zhang, Z.D., 2015. Isolation and characterization of extracellular melanin produced by *Chaetomium rutilus* D447. *Am. J. Food Technol.* 10, 68–77. <https://doi.org/10.3923/ajft.2015.68.77>
- Hu, Y., Hao, X.R., Lou, J., Zhang, P., Pan, J., Zhu, X.D., 2012. A PKS gene, *pks-1*, is involved in chaetoglobosin biosynthesis, pigmentation and sporulation in *Chaetomium globosum*. *Sci. China Life Sci.* 55, 1100–1108. <https://doi.org/10.1007/s11427-012-4409-5>
- Ikehata, H., Ono, T., 2011. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *J. Radiat. Res.* 52, 115–125. <https://doi.org/10.1269/jrr.10175>
- Islamovic, E., García-Pedrajas, M.D., Chacko, N., Andrews, D.L., Covert, S.F., Gold, S.E., 2015. Transcriptome analysis of a *Ustilago maydis* *ust1* deletion mutant uncovers involvement of laccase and polyketide synthase genes in spore development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28, 42–54. <https://doi.org/10.1094/MPMI-05-14-0133-R>
- Ito, S., 1986. Reexamination of the structure of eumelanin. *BBA - Gen. Subj.* 883, 155–161. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90146-7](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90146-7)
- Jabbour, R., Crowder, D.W., Aultman, E.A., Snyder, W.E., 2011. Entomopathogen biodiversity increases host mortality. *Biol. Control* 59, 277–283. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2011.07.016>
- Jacobson, E.S., Emery, H.S., 1991. Temperature regulation of the cryptococcal phenoloxidase. *Med. Mycol.* 29, 121–124. <https://doi.org/10.1080/02681219180000201>
- Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S., Brakhage, A.A., 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* 65.
- Jalmi, P., Bodke, P., Wahidullah, S., Raghukumar, S., 2012. The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28, 505–512. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0841-0>
- Jamieson, D.J., 1998. Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-)

0061(199812)14:16<1511::AID-YEA356>3.0.CO;2-S

- Jastrzebska, M.M., Isotalo, H., Paloheimo, J., Stubb, H., 1995. Electrical conductivity of synthetic DOPA-melanin polymer for different hydration states and temperatures. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 7, 577–586. <https://doi.org/10.1163/156856295X00490>
- Jenkins, N.E., Grzywacz, D., 2000. Quality Control of Fungal and Viral Biocontrol Agents - Assurance of Product Performance. *Biocontrol Sci. Technol.* 10, 753–777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>
- Kawamura, C., Tsujimoto, T., Tsuge, T., 1999. Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 59–63. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.1.59>
- Khan, S., LiHua, G., Maimaiti, Y.J., Mijit, M., DeWen, Q., 2012. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Mol. Plant Breed.* 2012, 63–79.
- Kidd, H. ed., James, D.R. ed., 1991. *The Agrochemicals handbook* /.
- Kim, D.S., Park, S.H., Kwon, S.B., Joo, Y.H., Youn, S.W., Sohn, U.D., Park, K.C., 2003. Temperature regulates melanin synthesis in melanocytes. *Arch. Pharm. Res.* 26, 840–845. <https://doi.org/10.1007/BF02980030>
- Kogej, T., Stein, M., Volkmann, M., Gorbushina, A.A., Galinski, E.A., Gunde-Cimerman, N., 2007. Osmotic adaptation of the halophilic fungus *Hortaea werneckii*: role of osmolytes and melanization. *Microbiology* 153, 4261–4273. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010751-0>
- Koide, R.T., Fernandez, C., Malcolm, G., 2014. Determining place and process: Functional traits of ectomycorrhizal fungi that affect both community structure and ecosystem function. *New Phytol.* 201, 433–439. <https://doi.org/10.1111/nph.12538>
- Langfelder, K., Jahn, B., Gehringer, H., Schmidt, A., Wanner, G., Brakhage, A.A., 1998. Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Med. Microbiol. Immunol.* 187, 79–89. <https://doi.org/10.1007/s004300050077>
- Li, C., Ji, C., Tang, B., 2018. Purification, characterisation and biological activity of melanin from *Streptomyces* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 365. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny077>
- Li, F., Shi, H.Q., Ying, S.H., Feng, M.G., 2015. Distinct contributions of one Fe- and two Cu/Zn-cofactored superoxide dismutases to antioxidation, UV tolerance and virulence of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genet. Biol.* 81, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.09.006>
- Liu, Q., Xiao, J., Liu, B., Zhuang, Y., Sun, L., 2018. Study on the preparation and

- chemical structure characterization of melanin from *Boletus griseus*. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19123736>
- Liu, S., Youngchim, S., Zamith-Miranda, D., Nosanchuk, J.D., 2021. Fungal Melanin and the Mammalian Immune System. *J. Fungi* 2021, Vol. 7, Page 264 7, 264. <https://doi.org/10.3390/JOF7040264>
- Liu, Y.H., Chung, Y.C., Xiong, Y., 2001. Purification and Characterization of a Dimethoate-Degrading Enzyme of *Aspergillus niger* ZHY256, Isolated from Sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3746. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3746-3749.2001>
- Llorente, C., Bárcena, A., Vera Bahima, J., Saparrat, M.C.N., Arambarri, A.M., Rozas, M.F., Mirífico, M. V., Balatti, P.A., 2012. *Cladosporium cladosporioides* LPSC 1088 Produces the 1,8-Dihydroxynaphthalene-Melanin-Like Compound and Carries a Putative pks Gene. *Mycopathologia* 174, 397–408. <https://doi.org/10.1007/s11046-012-9558-3>
- Lopes, R.B., Martins, I., Souza, D.A., Faria, M., 2013. Influence of some parameters on the germination assessment of mycopesticides. *J. Invertebr. Pathol.* 112, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.12.010>
- Lopez-Carillo, L., Lopez-Crevantes, M., 1993. Effect of exposure to organophosphate pesticides on serum cholinesterase levels. *Arch. Environ. Health* 48, 359–363. <https://doi.org/10.1080/00039896.1993.9936726>
- Ludwig, N., Löhner, M., Hempel, M., Mathea, S., Schliebner, I., Menzel, M., Kiesow, A., Schaffrath, U., Deising, H.B., Horbach, R., 2014. Melanin is not required for turgor generation but enhances cell-wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 27, 315–327. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0267-R>
- Lushchak, V.I., 2014. Classification of oxidative stress based on its intensity. *EXCLI J.* <https://doi.org/10.17877/DE290R-7035>
- Malo, M.E., Bryan, R.A., Shuryak, I., Dadachova, E., 2018. Morphological changes in melanized and non-melanized *Cryptococcus neoformans* cells post exposure to sparsely and densely ionizing radiation demonstrate protective effect of melanin. *Fungal Biol.* 122, 449–456. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.08.010>
- Mandal, P., Roy, T.S., Das, T.K., Banerjee, U., Xess, I., Nosanchuk, J.D., 2007. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. *Brazilian J. Microbiol.* 38, 662–666. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400015>
- Mbonyirivuze, A., Nuru, Z.Y., Kotsedi, L., Mwakikunga, B., Dhlamini, S.M., Park, E., Maaza, M., 2015. Multi-scale Assembly in Nano-scaled *Sepia* Melanin

Natural Dye, in: *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd, pp. 3988–3997.
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2015.08.028>

- Mbonyiryivuze, Agnes, Y. Nuru, Z., Diop Ngom, B., Mwakikunga, B., Mokhotjwa Dhlamini, S., Park, E., Maaza, M., 2015. Morphological and Chemical Composition Characterization of Commercial Sepia Melanin. *Am. J. Nanomater.* 3, 22–27. <https://doi.org/10.12691/ajn-3-1-3>
- McGraw, K.J., 2005. The antioxidant function of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? *Anim. Behav.* 69, 757–764. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2004.06.022>
- Mekala, L.P., Mohammed, M., Chinthalapati, S., Chinthalapati, V.R., 2019. Pyromelanin production: Insights into the incomplete aerobic L-phenylalanine catabolism of a photosynthetic bacterium, *Rubrivivax benzoatilyticus* JA2. *Int. J. Biol. Macromol.* 126, 755–764.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.142>
- Mendoza, C.G., 1992. Cell wall structure and protoplast reversion in basidiomycetes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1992 81 8, 36–38.
<https://doi.org/10.1007/BF02421486>
- Meredith, P., Sarna, T., 2006. The physical and chemical properties of eumelanin. *Pigment Cell Res.* 19, 572–594. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2006.00345.x>
- Miranda Hernández, F., Saucedo Castañeda, G., Alatorre Rosas, R., Loera, O., 2014. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Manag. Sci.* 70, 661–666. <https://doi.org/10.1002/ps.3605>
- Mishima, Y., Hatta, S., Ohyama, Y., Inazu, M., 1988. Induction of Melanogenesis Suppression: Cellular Pharmacology and Mode of Differential Action. *Pigment Cell Res.* 1, 367–374. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1988.tb00136.x>
- Mostert, A.B., Hanson, G.R., Sarna, T., Gentle, I.R., Powell, B.J., Meredith, P., 2013. Hydration-controlled X-band EPR spectroscopy: A tool for unravelling the complexities of the solid-state free radical in eumelanin. *J. Phys. Chem. B* 117, 4965–4972. <https://doi.org/10.1021/jp401615e>
- Mostert, A.B., Powell, B.J., Pratt, F.L., Hanson, G.R., Sarna, T., Gentle, I.R., Meredith, P., 2012. Role of semiconductivity and ion transport in the electrical conduction of melanin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 8943–8947.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1119948109>
- Muñiz-Paredes, F., 2016. Comparación en la producción de conidios del genero *Isaria* en cultivos superficiales y sólidos sometidos a pulsos oxidantes. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Muñiz-Paredes, F., Garza-López, P.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 J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2072-x>
- Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., Loera, O., 2017. Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2229-2>
- NMDeshpande, Dhakephalkar, P.K., PPKanekar, 2001. Plasmid-mediated dimethoate degradation in *Pseudomonas aeruginosa* MCMB-427. *Lett. Appl. Microbiol.* 33, 275–279. <https://doi.org/10.1046/J.1472-765X.2001.00995.X>
- Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., 2003. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* <https://doi.org/10.1046/j.1462-5814.2003.00268.x>
- Nosanchuk, J.D., Stark, R.E., Casadevall, A., 2015. Fungal melanin: What do we know about structure? *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01463>
- Oh, Y., Donofrio, N., Pan, H., Coughlan, S., Brown, D.E., Meng, S., Mitchell, T., Dean, R.A., 2008. Transcriptome analysis reveals new insight into appressorium formation and function in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Genome Biol.* 9, 1–24. <https://doi.org/10.1186/GB-2008-9-5-R85/FIGURES/7>
- Oka, T., Futagami, T., Goto, M., 2015. Cell Wall Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Stress Biol. Yeasts Fungi Appl. Ind. Brew. Ferment.* 151–168. https://doi.org/10.1007/978-4-431-55248-2_10
- Pacelli, C., Cassaro, A., Maturilli, A., Timperio, A.M., Gevi, F., Cavalazzi, B., Stefan, M., Ghica, D., Onofri, S., 2020. Multidisciplinary characterization of melanin pigments from the black fungus *Cryomyces antarcticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 6385–6395. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10666-0>
- Pal, A.K., Gajjar, D.U., Vasavada, A.R., 2013. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Med. Mycol.* 52, 1–9. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.826879>
- Paolo, W.F., Dadachova, E., Mandal, P., Casadevall, A., Szaniszlo, P.J., Nosanchuk, J.D., 2006. Effects of disrupting the polyketide synthase gene *WdPKS1* in *Wangiella* [*Exophiala*] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. *BMC Microbiol.* 6, 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-55>
- Ragon, M., Restoux, G., Moreira, D., Møller, A.P., López-García, P., 2011.

- Sunlight-Exposed Biofilm Microbial Communities Are Naturally Resistant to Chernobyl Ionizing-Radiation Levels. *PLoS One* 6, e21764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021764>
- Raman, N.M., Ramasamy, S., 2017. Genetic validation and spectroscopic detailing of DHN-melanin extracted from an environmental fungus. *Biochem. Biophys. Reports* 12, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.08.008>
- Ravishankar, J.P., Muruganandam, V., Suryanarayanan, T.S., 1995. Isolation and Characterization of Melanin from a Marine Fungus. *Bot. Mar.* 38, 413–416. <https://doi.org/10.1515/botm.1995.38.1-6.413>
- Redman, R.S., Sheehan, K.B., Stout, R.G., Rodriguez, R.J., Henson, J.M., 2002. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* (80-.). <https://doi.org/10.1126/science.1072191>
- Rehnstrom, A.L., Free, S.J., 1996. The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 49, 321–330. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0057>
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Almeida, I.C., Nimrichter, L., 2014. The impact of proteomics on the understanding of functions and biogenesis of fungal extracellular vesicles. *J. Proteomics* 97, 177–186. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2013.04.001>
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., Torres-Guerrero, H., 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 68, 3696–703.
- Rosas, Á.L., Casadevall, A., 1997. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol. Lett.* 153, 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00239-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00239-5)
- Roulin, A., 2014. Melanin-based colour polymorphism responding to climate change. *Glob. Chang. Biol.* 20, 3344–3350. <https://doi.org/10.1111/gcb.12594>
- Safavi, S.A., Shah, F.A., Pakdel, A.K., Reza Rasouljan, G., Bandani, A.R., Butt, T.M., 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* 270, 116–123. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00666.x>
- Sain, S.K., Monga, D., Kumar, R., Nagrale, D.T., Hiremani, N.S., Kranthi, S., 2019. Compatibility of entomopathogenic fungi with insecticides and their efficacy for IPM of *Bemisia tabaci* in cotton. *J. Pestic. Sci.* 44, 97. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.D18-067>
- Sava, V.M., Galkin, B.N., Hong, M.Y., Yang, P.C., Huang, G.S., 2001. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with immuno-stimulating activity. *Food Res. Int.* 34, 337–343. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00173-3](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00173-3)

- Schnitzler, N., Peltroche-Llacsahuanga, H., Bestier, N., Zündorf, J., Lütticken, R., Haase, G., 1999. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* on phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. *Infect. Immun.* 67, 94–101.
- Selbmann, L., Grube, M., Onofri, S., Isola, D., Zucconi, L., 2013. Antarctic Epilithic Lichens as Niches for Black Meristematic Fungi. *Biology (Basel)*. 2, 784–797. <https://doi.org/10.3390/biology2020784>
- Selbmann, L., Zucconi, L., Isola, D., Onofri, S., 2015. Rock black fungi: excellence in the extremes, from the Antarctic to space. *Curr. Genet.* 61, 335–345. <https://doi.org/10.1007/s00294-014-0457-7>
- Selvakumar, P., Rajasekar, S., Periasamy, K., Raaman, N., 2008. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidiosus* (telomorph of *Antromycopsis macrocarpa*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2125–2131. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9718-2>
- Sies, H., Berndt, C., Jones, D.P., 2017. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 715–748. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>
- Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Solano, F., F., 2014. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New J. Sci.* 2014, 1–28. <https://doi.org/10.1155/2014/498276>
- Srisuk, P., Correlo, V.M., Leonor, I.B., Palladino, P., Reis, R.L., 2015. Effect of Melanomal Proteins on *Sepia* Melanin Assembly. *J. Macromol. Sci. Part B* 54, 1532–1540. <https://doi.org/10.1080/00222348.2015.1103430>
- Strube, O.I., Büngeler, A., Bremser, W., 2015. Site-specific in situ synthesis of eumelanin nanoparticles by an enzymatic autodeposition-like process. *Biomacromolecules* 16, 1608–1613. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.5b00187>
- Suárez Vergel, G., 2017. PRODUCCIÓN DE CONIDIOS DE DOS CEPAS DE *Isaria* EN DOS TIPOS DE ATMÓSFERA: RELACIÓN DE LA CALIDAD CON LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Sun, S., Zhang, X., Chen, W., Zhang, L., Zhu, H., 2016. Production of natural edible melanin by *Auricularia auricula* and its physicochemical properties. *Food Chem.* 196, 486–492. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.069>
- Suryanarayanan, T.S., Ravishankar, J.P., Venkatesan, G., Murali, T.S., 2004a. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycol. Res.* 108, 974–8.

- Suryanarayanan, T.S., Ravishankar, J.P., Venkatesan, G., Murali, T.S., 2004b. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte. *Mycol. Res.* 108, 974–8.
- 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. *J. Invertebr. Pathol.* 130, 147–153. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2015.08.003>
- Tlecuítl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, G., Loera, O., 2010. Medium Selection and Effect of Higher Oxygen Concentration Pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* Conidial Production and Quality. *Mycopathologia* 169, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s11046-009-9268-7>
- Toledo, A.V., Franco, M.E.E., Yanil Lopez, S.M., Troncozo, M.I., Saparrat, M.C.N., Balatti, P.A., 2017. Melanins in fungi: Types, localization and putative biological roles. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 99, 2–6. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2017.04.004>
- Tsai, H., Washburn, R.G., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., 1997. *Aspergillus fumigatus arp1* modulates conidial pigmentation and complement deposition. *Mol. Microbiol.* 26, 175–183. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5681921.x>
- Tsai, H.F., Chang, Y.C., Washburn, R.G., Wheeler, M.H., Kwon-Chung, K.J., 1998. The developmentally regulated *alb1* gene of *Aspergillus fumigatus*: Its role in modulation of conidial morphology and virulence. *J. Bacteriol.* 180, 3031–3038. <https://doi.org/10.1128/jb.180.12.3031-3038.1998>
- Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C., Kwon-Chung, K.J., 1999. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *J. Bacteriol.* 181, 6469–6477. <https://doi.org/10.1128/jb.181.20.6469-6477.1999>
- Tseng, M.-N., Chung, C.-L., Tzean, S.-S., 2014. Mechanisms Relevant to the Enhanced Virulence of a Dihydroxynaphthalene-Melanin Metabolically Engineered Entomopathogen. *PLoS One* 9, e90473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090473>
- Upadhyay, S., Torres, G., Lin, X., 2013. Laccases involved in 1,8-dihydroxynaphthalene melanin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus* are regulated by developmental factors and copper homeostasis. *Eukaryot. Cell* 12, 1641–1652. <https://doi.org/10.1128/EC.00217-13>
- Vasanthakumar, A., Dearaujo, A., Mazurek, J., Schilling, M., Mitchell, R., 2015. Pyromelanin production in *penicillium chrysogenum* is stimulated by L-tyrosine. *Microbiol. (United Kingdom)* 161, 1211–1218. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000030>

- Villarino, M., Sandín-España, P., Melgarejo, P., De Cal, A., 2011. High chlorogenic and neochlorogenic acid levels in immature peaches reduce monilinia laxa infection by interfering with fungal melanin biosynthesis. *J. Agric. Food Chem.* 59, 3205–3213. <https://doi.org/10.1021/jf104251z>
- Walker, C.A., Gómez, B.L., Mora-Montes, H.M., Mackenzie, K.S., Munro, C.A., Brown, A.J.P., Gow, N.A.R., Kibbler, C.C., Odds, F.C., 2010. Melanin Externalization in *Candida albicans* Depends on Cell Wall Chitin Structures. *Eukaryot. Cell* 9, 1329–1342. <https://doi.org/10.1128/EC.00051-10>
- Wang, L.F., Rhim, J.W., 2019. Isolation and characterization of melanin from black garlic and sepia ink. *LWT* 99, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.033>
- Wang, Z.L., Zhang, L. Bin, Ying, S.H., Feng, M.G., 2013. Catalases play differentiated roles in the adaptation of a fungal entomopathogen to environmental stresses. *Environ. Microbiol.* 15, 409–418. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02848.x>
- Wheeler, M.H., Greenblatt, G.A., 1988. The inhibition of melanin biosynthetic reactions in *Pyricularia oryzae* by compounds that prevent rice blast disease. *Exp. Mycol.* 12, 151–160. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(88\)90004-7](https://doi.org/10.1016/0147-5975(88)90004-7)
- Wolkow, P.M., Sisler, H.D., Vigil, E.L., 1983. Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiol. Plant Pathol.* 23, 55–71. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(83\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0048-4059(83)90034-6)
- Wu, D., Oide, S., Zhang, N., Choi, M.Y., Turgeon, B.G., 2012. ChLae1 and ChVel1 Regulate T-toxin Production, Virulence, Oxidative Stress Response, and Development of the Maize Pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *PLoS Pathog.* 8, e1002542. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002542>
- Wu, Z., Zhang, M., Yang, Huandong, Zhou, H., Yang, Hailong, 2018. Production, physico-chemical characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of the mushroom *Auricularia auricula*. *Food Biosci.* 26, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.09.008>
- Xin, C., Ma, J. hua, Tan, C. jia, Yang, Z., Ye, F., Long, C., Ye, S., Hou, D. bin, 2015. Preparation of melanin from *Catharsius molossus* L. and preliminary study on its chemical structure. *J. Biosci. Bioeng.* 119, 446–454. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.09.009>
- Ye, M., Guo, G. yi, Lu, Y., Song, S., Wang, H. yan, Yang, L., 2014. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum* YM404. *Int. J. Biol. Macromol.* 63, 170–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.046>
- Youngchim, S., Morris-Jones, R., Hay, R.J., Hamilton, A.J., 2004. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* 53, 175–181. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05421-0>

- Yu, X., Huo, L., Liu, H., Chen, L., Wang, Y., Zhu, X., 2015. Melanin is required for the formation of the multi-cellular conidia in the endophytic fungus *Pestalotiopsis microspora*. *Microbiol. Res.* 179, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.06.004>
- Zhang, L. Bin, Feng, M.G., 2018. Antioxidant enzymes and their contributions to biological control potential of fungal insect pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9033-2>
- Zhdanova N N, Pokhodenko V D, 1973. [Possible Participation of Melanin Pigment in Protecting the Fungal Cell From Desiccation] - PubMed. *Mikrobiologija* 42, 848–853.
- Zhong, J., Frases, S., Wang, H., Casadevall, A., Stark, R.E., 2008. Following fungal melanin biosynthesis with solid-state NMR: Biopolymer molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. *Biochemistry* 47, 4701–4710. <https://doi.org/10.1021/bi702093r>

11 Anexo I – Artículo científico

Suárez-Vergel, G., Figueroa-Martinez, F., Garza-López, P.M., García-Ortiz, N., Loera, O., 2021. DOPA-melanin, component and tolerance factor to heat and UV-B radiation in the conidia of two species of Cordyceps. 32, 437–454.
<https://doi.org/10.1080/09583157.2021.2016626>



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00272
Matrícula: 2153804232

Dopa-melanina, componente y factor de calidad de conidios de dos especies de Cordyceps

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 20 del mes de octubre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA
DR. JOSE MIGUEL ANGEL CASTILLO MINJAREZ
DRA. GLORIA ANGELICA GONZALEZ HERNANDEZ
DR. FRANCISCO JAVIER FIGUEROA MARTINEZ

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

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA
DE: GERARDO SUAREZ VERGEL

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

APROBAR

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

