

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



***“COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS ABIOTICO DE CONIDIOS
AÉREOS y PROPAGULOS SUMERGIDOS DE DOS CEPAS DE *Isaria
fumosorosea (Cordycipitaceae: Hypocreales)*”***

TESIS

Que para Obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

ESTHER CARRILLO PÉREZ

Director

Dra. María Mayra de la Torre Martínez

Mexicali, Baja California

Enero de 2013.

***“COMPARACIÓN DE LA RESISTENCIA AL ESTRÉS ABIOTICO DE
CONIDIOS AÉREOS y PROPAGULOS SUMERGIDOS DE DOS
CEPAS DE *Isaria fumosorosea* (Cordycipitaceae: Hypocreales)”***

Mexicali Baja California, Enero de 2013.

DEDICATORIA

❖ A MIS HIJAS

Diana Cristina y Grecia María

Por ser el motivo de mi superación

❖ A MI ESPOSO

Lupín

Con todo mi amor

Gracias por todo el apoyo recibido

❖ A MIS PADRES

María Dolores y Felipe

Con todo mi cariño y gratitud por haberme dado la vida, por sus bendiciones y por ser un ejemplo de fortaleza y responsabilidad.

❖ A MIS HERMANOS Y HERMANAS

Reyes, Jesús, Alberto, Guadalupe, Eugenia y Virginia

Con todo cariño

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios, por ser el ser supremo del universo, ya que por el existo.
- ❖ Al Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California por darme la oportunidad de cursar este postgrado y poder alcanzar esta meta académica.
- ❖ A la Universidad de Sonora y al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por el apoyo brindado y por darme la oportunidad de estudiar este postgrado.
- ❖ Al sistema PROMEP UNISON-279 por el apoyo recibido
- ❖ A la Dra. Mayra De la Torre Martínez por la dirección de mi trabajo de tesis y por los conocimientos recibidos.
- ❖ A la Dra. Rosa María Montesinos Cisneros y al Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez por su ayuda y colaboración para sacar adelante los resultados de este proyecto de tesis.
- ❖ A los Drs. Benjamín Valdez Salas, Juan Antonio Noriega Rodríguez, Mónica Carrillo Beltrán, Margarita Stoycheva Stillianova, Rosa María Montesinos Cisneros y Mayra De la Torre Martínez por la revisión de este trabajo y por sus sugerencias para mejorarlo.
- ❖ A los M. en C. Arturo Ruíz Manríquez y J. Haydeé Yeomans Reina por su gran amistad y por todo el apoyo que siempre me brindaron para superarme.
- ❖ .A mis compañeros de trabajo y amigos Dr. Juan Antonio Nortiega R., al Dr. Abraham R. Martín G., a la Q.B. María Elena Ochoa Landín, Erika Acosta, Ismael Amaya, David; Mendoza, Ana Lilia Duarte, Jorge Rocha, Alejandro Murillo y Kareen Encinas, por el apoyo brindado cuando lo necesite, por su sonrisa, por sus consejos y por alentarme para seguir adelante.

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
NOMENCLATURA	xi
RESUMEN	xii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Introducción	2
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.2.1 Objetivos específicos	4
1.3 Hipótesis	5
1.4 Justificación	5
CAPITULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	7
2.1 Agentes de control biológico	10
2.1.1 Bioinsecticidas	10
2.1.2 Hongos entomopatógenos	10
2.2 Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos	13
2.3 Factores que influyen en la virulencia de los hongos entomopatógenos	15
2.4 Producción de hongos entomopatógenos	17
2.4.1 Fermentación en estado sólido	17
2.4.2 Fermentación en dos fases	20
2.4.3 Fermentación sumergida o líquida	20
2.5 Factores abióticos que afectan la viabilidad de los hongos entomopatógenos	22
2.5.1 Temperatura	22
2.5.2 Humedad relativa	24
2.5.3 Radiación solar	25
CAPITULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
3.1 Microorganismos	30
3.2 Medios de cultivo	31
3.2.1 Agar dextrosa Sabouraud con extracto de levadura (ADSY)	31
3.2.2 Caldo dextrosa Sabouraud (CDS)	31

3.2.3 Agar-arroz	31
3.2.4 Arroz	31
3.2.5 Medio M1	32
3.2.6 Medio M2	32
3.3 Preparación de inóculos y condiciones de crecimiento	32
3.3.1 Agar-arroz	32
3.3.2 Arroz	33
3.3.3 Germinación de las conidias	33
3.3.4 Cultivo sumergido	33
3.3.5 Efecto de la temperatura en el crecimiento de las cepas	34
3.3.5.1 cultivo sólido	34
3.3.5.2 Cultivo sumergido	34
3.4 Actividad enzimática	35
3.4.1 Cultivo sólido	35
3.4.1.1 Actividad lipolítica	36
3.4.1.2 Actividad proteolítica	36
3.4.1.3 Actividad de quitinasa	36
3.4.1.4 Índice de actividad enzimática	37
3.4.2 Cultivo sumergido	37
3.4.2.1 Actividad proteolítica	38
3.4.2.2 Actividad lipolítica	38
3.5 Virulencia de las conidias aéreas y sumergidas en larvas <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera:Piralidae)	39
3.6 Curvas de secado	40
3.6.1 Índice de sobrevivencia	41
3.6.2 Coeficientes difusivos de secado	41
3.7 Tolerancia a la irradiación ultravioleta	42
3.8 Rompimiento de las conidias	43
3.9 Extracción de azúcares alcohol y trehalosa	43
3.10 Extracción de melanina	44
3.11 Técnicas analíticas	44
3.11.1 Análisis de azúcares alcoholes y trehalosa	44
3.11.2 Cuenta total de conidias aéreas y propágulos sumergidos	45
3.11.3 Determinación de humedad	45
3.11.4 Determinación de biomasa	46
3.11.5 Cuantificación de melanina	46
3.12 Análisis estadístico	46
 CAPITULO 4. RESULTADOS	 47
4.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento	50

4.2 Producción de proteasas, lipasas y quitinasas	52
4.3 Virulencia de conidias aéreas y propágulos sumergidos de los aislados en larvas de <i>Galleria mellonella</i> (Lepidoptera:Piralidae)	57
4.4 Secado de conidias aéreas y propágulos sumergidos	58
4.4.1 Curvas de secado	58
4.4.2 Coeficientes difusivos de secado y la temperatura	59
4.4.3 Efecto de la temperatura de secado en la sobrevivencia	61
4.4.4 Efecto de la temperatura de secado en la germinación	62
4.4.5 Temperatura letal 50 ($T_{empL-50}$)	64
4.4.6 Coeficientes difusivos de secado y el índice de sobrevivencia al secado	64
4.5 Irradiación ultravioleta	65
4.5.1 Efecto de la irradiación UV $_{366\text{ nm}}$ en la sobrevivencia	65
4.5.2 Efecto de la irradiación UV $_{254\text{ nm}}$ en la sobrevivencia	68
4.5.3 Efecto de la irradiación UV $_{254\text{ nm}}$ en la germinación	69
4.5.4 Dosis letal 50 y tiempo letal 50 de la irradiación con luz UV a 254 nm	69
4.6 Factores biológicos relacionados con la resistencia a la temperatura e irradiación	70
4.6.1 Trehalosa	70
4.6.2 Manitol	71
4.6.3 Glicerol	72
4.6.4 Melanina	73
 CAPITULO 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	 75
 CONCLUSIONES	 89
 RECOMENDACIONES	 91
 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 92
 ANEXOS	 102
 Anexo 1. Curvas Estándar de trehalosa, glicerol, manitol y melanina	 102
1.1 Curva estándar de trehalosa	102
1.2 Curva estándar de glicerol	102
1.3 Curva estándar de manitol	103
1.4 Curva estándar de melanina	103
Anexo 2. Cromatogramas de estandares de trehalosa y azúcares alcoholes por HPLC con detector de índice de refracción	104

2.1 Cromatograma de estándares de azúcares y polialcoholes	104
2.2 Cromatograma del análisis de azúcares y polialcoholes de las conidias aéreas de la cepa P43A	104
2.3 Cromatograma de azúcares y polialcoholes de los propágulos sumergidos de la cepa P43A	105
2.4. Cromatograma de azúcares y polialcoholes de las conidias aéreas de la cepa PCC	105
2.5 Cromatograma de azúcares polialcoholes de los propágulos sumergidos de la cepa PCC	106
Anexo 3. Temperaturas promedio máximas y mínimas del estado de Sinaloa y Sonora durante los años 2009-2012 proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional	107
3.1 Estado de Sinaloa	107
3.2 Estado de Sonora	107
Anexo 4. Porcentaje (%) de humedad relativa promedios de los estados de Sinaloa y Sonora durante los años 2009 a 2012 datos proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional	108
4.1 Estado de Sinaloa	108
4.2 Estado de Sonora	108
Anexo 5. Promedios de flujo de energía de radiación solar global (W/m²) en los estados de Sinaloa y Sonora durante los años 2009 a 2012 proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional	109
5.1 Estado de Sinaloa	109
5.2 Estado de Sonora	109
Anexo 6. Publicaciones	110
6.1 Memorias en congresos	110
6.1.1 EFECTO DE LAS CONDICIONES Y EL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA CALIDAD DE CONIDIAS DE <i>Paecilomyces sp</i>	111
6.1.2 EFECTO DE LAS CONDICIONES Y EL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA CALIDAD DE LAS CONIDIAS DE <i>Paecilomyces sp</i> : <i>Efecto de la temperatura de secado.</i>	113
Tercer Coloquio de Postgrado Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería. Noviembre de 2008. Mexicali , Baja California.	
6.1.3 Efecto de la Temperatura de Secado y la Irradiación con Luz UV sobre la Viabilidad de Conidias Aéreas de <i>Paecilomyces fumosorocetus</i> Cepa P43A.	114
Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto Ingeniería, Noviembre de 2009. Mexicali, Baja California.	

6.1.4 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO SÓLIDO Y LIQUIDO DE <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> Cepas P43A y PCC. 2do Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería Noviembre de 2010. Mexicali, Baja California.	115
6.2. Artículo Publicado	116
6.2.1 Performance of two isolates of <i>Isaria fumosorosea</i> from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules. REVISTA: World Journal of Microbiology and Biotechnology	116

LISTA DE FIGURAS

2.1	Partes de un insecto (saltamontes).	14
2.2	Ciclo de infección de los hongos entomopatógenos.	15
3.1	Diagrama general del proyecto de tesis.	24
4.1	Colonias de <i>I. fumosorosea</i> cepas A) P43A y B) PCC cultivadas en ADSY a 28 °C.	49
4.2	Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento ($\mu \text{ h}^{-1}$) de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC en cultivo sólido y en cultivo sumergido.	51
4.3	Producción de proteasas en agar nutritivo con leche descremada por los aislados de <i>I. fumosorosea</i> . A) P43A y B) PCC.	53
4.4	Producción de lipasas en medio mineral con Tween 20 de los aislados de <i>I. fumosorosea</i> . A) P43A y B) PCC.	54
4.5	Producción de quitinasas en medio mineral con quitina por los aislados de <i>I. fumosorosea</i> A) P43A y B) PCC.	55
4.6	Producción de enzimas proteasas y lipasas en el cultivo sumergido de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC utilizando 1% caseína ó 2% aceite de olivo como única fuente de carbono.	56
4.7	Velocidad específica de crecimiento de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC en medio M2 utilizando caseína al 1% y aceite de olivo al 2% como única fuente de carbono.	56
4.8	Mortalidad corregida de larvas de <i>Galleria mellonella</i> tratadas con conidias aéreas o propágulos sumergidos (conidios y blastosporas) de las cepas P43A y PCC.	57
4.9	Curvas de secado con convección de aire a diferentes temperaturas de conidias aéreas y de <i>I. fumosorosea</i> de las cepas P43A y PCC: A) P43A conidias aéreas, B) P43A propágulos sumergidos, C) PCC conidias aéreas y D) PCC propágulos sumergidos.	59
4.10	Coeficientes difusivos de secado a diferentes temperatura de A) conidias aéreas y B) propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	61
4.11	Índices de sobrevivencia a diferentes temperaturas de secado con convección de aire de esporas de <i>I. fumosorosea</i> de las cepas P43A y PCC producidas en cultivos sólido ó sumergido.	63

4.12	Coeficientes de difusión de secado e índice de sobrevivencia de A) conidias aéreas y B) propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	66
4.13	Efecto de la irradiación UV _{366 nm} en la sobrevivencia de conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	67
4.14	Efecto de la irradiación UV _{254 nm} en la sobrevivencia de conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	68
4.15	Concentración de trehalosa en conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	71
4.16	Concentración de manitol de conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	72
4.17	Concentración de glicerol en conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	73
4.18	Concentración de melanina en conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	74

LISTA DE TABLAS

2.1	Principales hongos entomopatógenos utilizados comercialmente para el control de insectos plaga.	11
2.2	Insecticidas comerciales a base de hongos entomopatógenos	12
2.3	Ventajas y desventajas que presenta la fermentación en estado sólido.	19
2.4	Diferencias básicas en fermentación sólida y sumergida.	23
4.1	Índices enzimáticos de la producción extracelular de quitinasas, lipasas y proteasas en cultivo sólido por <i>Isaria fumosorosea</i> aislados P43A and PCC.	52
4.2	Tiempo letal 50 (TL ₅₀) de conidias aéreas y sumergidas de <i>Isaria fumosorosea</i> de los aislados P43A and PCC en larvas de <i>G. mellonella</i> .	58
4.3	Contenidos de humedad y tiempos de equilibrio durante el secado con convección de aire de conidias aéreas (CA) y propágulos sumergidos (PS) de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	60
4.4	Efecto de la temperatura de secado en el tiempo de germinación de conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	64
4.5	Temperatura letal 50 (T _{empL-50}) de conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC secadas con aire a 30, 40, 50 y 60 °C.	65
4.6	Efecto de la irradiación UV _{366 nm} en el tiempo de germinación después de irradiar las conidias aéreas y los propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC por 24 h a una dosis de 822.88 J/cm ² .	67
4.7	Efecto de la irradiación UV _{254 nm} en el tiempo de germinación de las conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC.	69
4.8	Dosis letal 50 (DL ₅₀) y tiempo letal 50 (T _{imeL-50}) de conidias aéreas y propágulos sumergidos de <i>I. fumosorosea</i> cepas P43A y PCC irradiadas con luz UV de 254 nm.	70

NOMENCLATURA

UV ₃₆₆	Luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm
°UV ₂₅₄	Luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm
μ	Velocidad específica de crecimiento
TL ₅₀	Tiempo letal 50
T _{emp} L ₅₀	Temperatura letal 50
DL ₅₀	Dosis letal 50
T _{ime} L ₅₀	Tiempo letal 50
CL ₅₀	Concentración letal 50
PDA	Papa dextrosa agar
ADSY	Agar dextrosa Sabouraud con extracto de levadura
pH	Potencial de hidrógeno
<i>x</i>	Biomasa
<i>t</i>	tiempo
<i>x</i> ₀	Biomasa al tiempo cero
<i>x</i> _{<i>t</i>}	Biomasa a tiempo <i>t</i>
T	Temperatura
DNA	Ácido desoxirribonucleico
μg	Microgramo
μl	Microlitro
rpm	Revoluciones por minuto
IE	Índice enzimático
TCA	Ácido tricloro acético
D.O.	Densidad óptica
Tris/HCL	Trisma/Ácido clorhídrico
mM	Milimolar
μmol	Micromol
μm	Micrometro ó micra
A ₅₄₀ nm	Absorbancia a 540 nanómetros
N	Concentración normal
p	P valor, significancia de la prueba estadística
<	Menor que
>	Mayor que
<<	Mucho menor que
J/cm ²	Jouls por centímetro cuadrado

RESUMEN

Con el propósito de evaluar su potencial para el desarrollo de micoinsecticidas para zonas con clima caliente, se estudió la resistencia al estrés abiótico de dos cepas del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea*. Una de ellas nativa del estado de Sonora (P43A) y la otra nativa del estado de Sinaloa (PCC) en donde prevalece clima semiárido y tropical seco, respectivamente. Se evaluaron el efecto del sistema de cultivo (cultivo sólido y cultivo sumergido) y de la temperatura, sobre el crecimiento, la producción de esporas y la viabilidad y patogenicidad de las mismas; así mismo se estudió el efecto del secado con convección de aire y la exposición a la luz ultravioleta (UV-A y UV-C) sobre la viabilidad de las esporas. Con el propósito de encontrar una explicación a los resultados obtenidos se estudiaron la producción de enzimas extracelulares (proteasas, lipasas y quitinasas) por ambas cepas, la concentración de trehalosa, polialcoholes y melanina de las esporas. La cepa PCC presentó la más alta velocidad específica de crecimiento (μ) en el rango de temperaturas de 20 a 28°C en medio sólido, pero en medio sumergido el aislado P43A tuvo la μ más alta en todas las temperaturas de prueba. La temperatura óptima de crecimiento para ambos aislados en cultivo sólido fue de 25 °C y en cultivo sumergido fue de 28 °C. En medio sólido P43A produjo 1.5 veces más actividad proteasica que PCC, pero en medio sumergido ambas cepas tuvieron actividades similares de esta enzima. En medio mínimo (cultivo sumergido) a las condiciones óptimas de crecimiento, la relación de blastosporas:conidias para PCC fue de 1:2 y para P43A fue 1:5. Para las conidias aéreas de PCC el tiempo Letal 50 (TL_{50}) en larvas de *Galleria mellonella* fue de 4.86 días, pero las conidias aéreas de P43A y los propágulos sumergidos de P43A y PCC tuvieron un LT_{50} igual. Las conidias aéreas de ambas cepas producidas en medio sólido presentaron una mayor resistencia al secado e irradiación UV₂₅₄ nm en relación a los propágulos sumergidos. La radiación UV₃₆₆ nm fue la menos perjudicial solo afectó en un 10% la viabilidad de las conidias. La irradiación UV₂₅₄ nm fue la más letal con pérdida de viabilidad de 95 % al 98 %. La cepa PCC aérea fue la que presentó mayor sobrevivencia al secado e irradiación, tuvo una temperatura letal 50 (T_{empL50}) de 64.76°C, una dosis letal UV₂₅₄ nm de (DL_{50}) de 6.74 J/cm²; sin embargo las conidias aéreas y los propágulos sumergidos

de la cepa P43A tuvieron el mayor contenido de melanina. De esta investigación podemos concluir que las conidias aéreas de cepa PCC aérea, dadas su mayor sobrevivencia al secado y a la exposición a la radiación UV₂₅₄ nm y virulenta, esta cepa es adecuada para utilizarla en cultivo sólido para la producción de micoinsecticidas. Puesto que P43A presentó la más alta velocidad de crecimiento en medio sumergido, fue capaz de crecer a temperaturas entre 30 a 34°C, presentó una relación más alta de conidias sumergidas, las cuales tienen un tiempo de germinación corto, podría producirse en este sistema como micoinsecticida para aplicarse en zonas de clima caliente. Cada aislado se desempeña de manera diferente en cada sistema de cultivo, por lo que el método de producción planeado debe ser tomado en cuenta como criterio de selección de hongos entomopatógenos.

Palabras clave: *Isaria fumosorosea*, cultivo sumergido, cultivo solido, virulencia, secado e irradiación UV.

CAPÍTULO

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

El desarrollo de la agricultura moderna y los altos rendimientos en los cultivos ha sido posible gracias a la tecnología, que ha facilitado el desempeño de las labores del campo, así como al uso masivo de productos agroquímicos incluyendo herbicidas e insecticidas. Estos agroquímicos frecuentemente causan contaminación al medio ambiente, especies vivas y al hombre. Existe la preocupación por minimizar el uso de estos productos químicos reduciendo el riesgo de contaminación, por lo que se han investigado alternativas para el control de plagas tanto en agricultura como en la ganadería y plagas domésticas [57, 54, 43, 31].

Una alternativa es el uso de bioinsecticidas, los cuales están formulados a base de microorganismos vivos, que son patógenos de insectos plaga. Entre los más utilizados son aquellos a base de bacterias como *Bacillus thuringensis* y de hongos, entre los que destacan *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* (antes *Paecilomyces fumosoroseus*) y *Lecanicillium lecani*. Las conidias aéreas y propágulos sumergidos (conidias y blastosporas) de los hongos se han utilizado como unidades infectivas. Estas, se adhieren por contacto al insecto y producen enzimas que digieren la cutícula del mismo y junto con la formación de apresorios, los cuales ejercen presión mecánica, facilitan la penetración del hongo al insecto huésped. Una vez en el hemocelo el hongo se propaga en forma de levaduras y causa la muerte del insecto [19, 89].

El uso de hongos entomopatógenos como agentes de control de plagas en el campo ha sido limitado porque factores abióticos como la temperatura, la humedad relativa baja y la radiación solar reducen su viabilidad [45, 37, 17, 50, 89]. Especialmente en regiones semidesérticas. Por lo anterior es importante estudiar las características de resistencia a dichos factores abióticos en aislados de hongos nativos de estas regiones, ya que por su adaptación a estos factores climáticos pudieran tener una mayor tolerancia a altas temperaturas, estrés hídrico y radiación

ultravioleta, pudiendo ser los mejores candidatos para desarrollar micoinsecticidas aplicables a estas condiciones climatológicas [17,45, 89].

Otra de las características a considerar para el desarrollo de un micoinsecticida es la producción de sus unidades infectivas en sistema sólido o sumergido, y estudiar las características de resistencia a factores abióticos así como la virulencia que le confiere el sistema de cultivo, para de esta forma establecer los criterios de selección del sistema de producción más adecuado de aislados con mayor posibilidad de ser aplicados a zonas de climas calientes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Comparar la resistencia a estrés abiótico de las conidias aéreas de *Isaria fumosorosea* cepa P43A y PCC producidas en medio sólido y de sus propágulos producidos en medio sumergido y proponer una explicación.

1.2.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar la velocidad específica de crecimiento *Isaria fumosorosea* en cultivos sólido y sumergido a diferentes temperaturas.
- 2) Evaluar la producción de enzimas proteasas, lipasas y quitinasas de *Isaria fumosorosea* en medio sólido y sumergido.
- 3) Evaluar la virulencia de las conidias aéreas y de los propágulos sumergidos por medio del bioensayo.
- 4) Evaluar la resistencia de las conidias aéreas producidas en cultivo sólido y los propágulos producidos en cultivo sumergido de *Isaria fumosorosea* al someterlos

al secado a diferentes temperaturas e irradiación ultravioleta a dos longitudes de onda.

- 5) Determinar los contenidos de compuestos osmoprotectores y melanina de las conidias producidas en cultivo sólido y de los propágulos producidos en cultivo sumergido.

1.3 Hipótesis

El sistema de cultivo tiene influencia en la resistencia al estrés abiótico de las conidias aéreas y de los propágulos sumergidos de una cepa de *Isaria fumosorosea* y distintos aislados de la misma especie se comportan diferente.

1.4 Justificación

Los hongos entomopatógenos han sido utilizados como micoinsecticidas para el control de insectos plaga en la agricultura, sin embargo diversos estudios han revelado que las conidias aéreas y los propágulos sumergidos de estos hongos son muy lábiles a factores ambientales como altas temperaturas, desecación y exposición a la radiación solar. Por estas razones en este trabajo se investigará si los propágulos de aislados de *Isaria fumosorosea* de zonas de clima caliente presentan distinta tolerancia al estrés abiótico cuando son producidos en cultivo sólido y en cultivo sumergido.

CAPÍTULO

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La obtención de altos rendimientos de los cultivos por hectárea en la agricultura ha sido el reflejo de la tecnificación en las labores del campo, el diseño de variedades mejoradas y el uso de agroquímicos para fertilización y control de plagas y enfermedades. El uso masivo de estos productos químicos, el manejo inadecuado de los implementos de fumigación durante las aplicaciones, ha venido generando en las áreas agrícolas un problema de contaminación de suelos y aguas a niveles de toxicidad que representan un riesgo para el desarrollo de especies sensibles y para la salud de la población. Por lo que existe la preocupación por desarrollar estrategias alternativas en el control de plagas que reduzcan los riesgos señalados y que generen mejores condiciones de protección, tanto a la salud de la población, como la preservación de un ambiente más limpio, promoviendo una agricultura sustentable con el uso alternativo de bioinsecticidas amigables para el ambiente, reduciendo el número de aplicaciones de los productos químicos, así como minimizando el contacto humano con estos productos [7, 57, 54].

Se tiene como alternativa el manejo integrado de plagas, que es la combinación de todos los métodos para el control de plagas en una estrategia flexible. Dentro de estas alternativas están los métodos de control biológico. El control biológico es la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga para limitar su población. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos para insectos. Las formulaciones comerciales de los microorganismos son conocidas como bioinsecticidas [7, 57].

La aplicación de estas metodologías permite desarrollar productos ecológicos los cuales han demostrado tener la capacidad de reducir el número de aplicaciones del insecticida en el manejo de los cultivos y como consecuencia se ven reducidos los costos de producción [2, 54].

2.1 Agentes de control biológico

2.1.1 Bioinsecticidas

Entre los agentes de control biológico se encuentran varios tipos de microorganismos, a los cuales se les ha denominado bioinsecticidas, ya que para su formulación se emplean microorganismos vivos, los cuales son patógenos de insectos plaga y son útiles para controlar el crecimiento de estas poblaciones [19]. Estos microorganismos, son denominados entomopatógenos, por ser específicos para insectos plaga ya que sólo afectan a determinados grupos de insectos (hospederos) y son inofensivos para insectos benéficos, el humano y otros organismos superiores [7].

Entre los organismos utilizados como bioinsecticidas se incluyen a diferentes géneros y especies de bacterias, hongos y virus. En el grupo de bacterias tenemos a *Bacillus thuringensis* que es ampliamente utilizado para el control de lepidópteros fitófagos y mosquitos. Entre los hongos se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria fumosorosea* y *Lecanicillium lecanii*, los cuales han sido aplicados en el combate de insectos chupadores, masticadores y barrenadores (Tabla 2.1). En el caso de los virus su uso se ha visto limitado debido principalmente a su especificidad [9].

2.1.2 Hongos entomopatógenos

Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, actualmente son clasificados en dos reinos: Straminipila (antes Chromista) y Eumycota (hongos verdaderos). Los Straminipila incluyen a los patógenos de insectos en el grupo conocido como Oomycota (por ejemplo, *Lagenidium*) mientras que los Eumycota incluyen entomopatogenos en los Zygomycota (por ejemplo, *Entomophthora*, *Entomophaga*, *Neozygites*), Ascomycota (por ejemplo, *Cordyceps*) y Deuteromycota (por ejemplo, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Lecanicillium* e *Isaria fumosorosea*).

Tabla 2.1 Principales hongos entomopatógenos utilizados comercialmente para el control de insectos plaga.

ESPECIE DE HONGO	INSECTO PLAGA
<i>Beauveria bassiana</i>	Langostas, chapulines, áfidos, escarabajos, mosquita blanca, garrapatas.
<i>Beauveria brogniartii</i>	Moscas, escarabajos.
<i>Langenedium giganteum</i>	Mosquitos
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Termitas, chapulines, gallina ciega, langostas, picudos del chile y algodón, escarabajos, garrapatas.
<i>Isaria fumosorosea</i>	Mosquita blanca
<i>Lecanicillium lecanii</i>	Áfidos, garrapatas, mosquita blanca

Adaptado de: [72, 43, 31]

Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos identificadas representadas en los reinos Straminipila y Eumycota. Las conidias aéreas de los Deuteromycota son comúnmente usadas en los bioinsecticidas formulados a base de hongos entomopatógenos, también llamados micoinsecticidas. Otros propágulos (fragmentos miceliales, conidias sumergidas y blastoporas) han sido investigados, pero aún no tienen aplicaciones agronómicas significativas [19, 22, 89].

Sólo una pequeña porción de hongos entomopatógenos son utilizados comercialmente, entre los que destacan *Beauveria sp.*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* e *Isaria fumosoresea* [72]. En la Tabla 2.2 se muestran algunos insecticidas comerciales a base de hongos entomopatógenos.

Tabla 2.2 Insecticidas comerciales a base de hongos entomopatógenos

PRODUCTO	HONGO	HUESPED	PRODUCTOR
Vertalec	<i>L. lecanii</i>	Pulgonos	Kopper, Holanda
Biogreen	<i>L. lecanii</i>	Gusanos blancos	Bio-care, Ttech., Australia
Bio-Path	<i>M. anisopliae</i>	Cucarachas	EcoScience, USA
Bio-blast	<i>M. anisopliae</i>	Termitas	EcoScience
Mycotol GH	<i>B. bassiana</i>	Saltamontes y Langostas	Mycotech, USA
Mycotrol WP	<i>B. bassiana</i>	Moscas blancas, pulgones	Mycotech, USA
Boverosil	<i>B. bassiana</i>	Escarabajo de la patata	Ex Checoslovaquia
EngernligPilz	<i>B. bassiana</i>	Gusanos blancos	Andermatt, Suiza
Green Muscle	<i>M. flavoviridae</i>	Saltamontes y langostas	CABI Bioscience, UK
PRF97	<i>P. fumosoroseus</i>	Moscas blancas	ECO-Teck, USA
Pae-Sin	<i>P. fumosoroseus</i>	Moscas blancas	Agrobionsa, México
Laginex	<i>Lagenidium giganteum</i>	Larvas de mosquito	AGRAQuest, USA

Adaptada de: [55]

La exploración de sitios con climas tropicales y subtropicales ha revelado consistentemente que *Isaria fumosorosea* es una de las especies de hongos entomopatógenos capaz de infectar a una gran variedad de insectos plaga en los campos agrícolas, incluyendo a la mosquita blanca (*Bemisia spp*) en todas sus etapas de desarrollo, y provocar altos niveles de mortalidad a una velocidad mayor que otros hongos entomopatógenos. Este insecto chupador se encuentra extendido en todo el mundo y anualmente causa pérdidas millonarias en la agricultura [7, 54].

2.2 Mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos

El mecanismo de infección de los hongos entomopatógenos se caracteriza por invadir el cuerpo del insecto a través del exoesqueleto y de la cutícula, frecuentemente la invasión puede ocurrir a través del área bucal de las membranas intersegmentales y de los espiráculos. La Figura 2.1 muestra las partes de un insecto. Estos sitios se caracterizan por tener un alto contenido de humedad, lo cual es una característica que favorece la germinación de las esporas y facilita la penetración de las hifas. Las propiedades físicas y químicas de la cutícula del insecto afectan este proceso, influyendo en el rango de hospederos del hongo. Las esporas se adhieren a la cutícula del insecto por contacto a través de fuerzas hidrofóbicas y a menudo es ayudada por materiales mucilaginosos [2,72].

La espora adherida germina y el tubo germinal se desliza en el integumento del hospedero buscando puntos de apertura para facilitar la penetración del hongo. La cutícula completamente endurecida presenta una barrera mayor a la penetración fungosa que la cutícula nueva, haciendo que los insectos sean más susceptibles después de una muda [2]. La penetración es ayudada por la formación de células apresoriales (apresorio) que ejercen presión física sobre el área del exoesqueleto parcialmente degradado, el cual muestra una zona clara a su alrededor por la acción de enzimas antes de la invasión de las hifas. Una vez que las enzimas que degradan la cutícula son absorbidas dentro de las estructuras del insecto, van degradando progresivamente los polímeros liberando precursores monoméricos utilizables. Las enzimas que intervienen son aquellas que degradan proteínas, quitinas, ceras y lípidos y otras capas de exoesqueleto. La cutícula del insecto está formada principalmente de quitina y proteína (60-70%), [19, 3, 4, 63, 91].

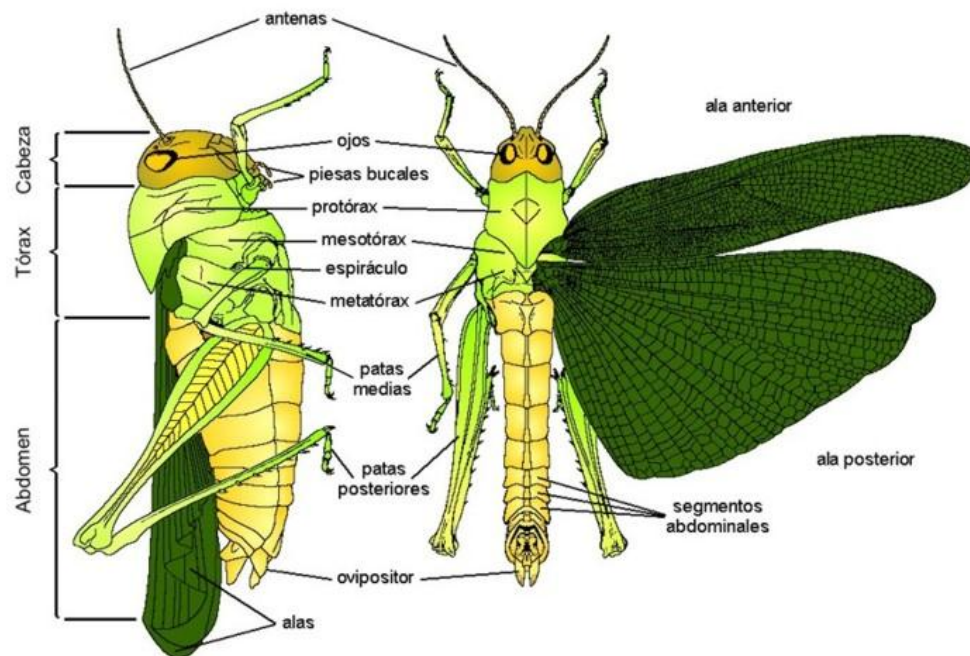


Figura 2.1 Partes de un insecto (saltamontes).

<http://www.sieduca.net/basico/ficha128.html>

Una vez que el hongo penetra va destruyendo la epicutícula a través de sus distintas capas. Ya invadido el hemocoele empieza la colonización. Los hongos pueden crecer como hifas, cuerpos similares a levaduras llamadas blastosporas y protoplastos sin paredes en la hemolinfa. Los protoplastos ayudan a vencer las defensas del hospedero porque no son reconocidos por el sistema inmune. Las blastosporas producen toxinas que ayudan a suprimir las reacciones inmunes. El insecto muere como consecuencia de los daños mecánicos que produce el crecimiento del hongo, por la desnutrición y por la acción de metabolitos secundarios o toxinas. Una vez que muere el insecto, el hongo invade al hospedero por medio de sus hifas para posteriormente formar conidióforos bajo condiciones apropiadas de humedad y temperatura dando origen a las esporas asexuales o conidios aéreos que son las unidades de infección. Las temperaturas de 20-30 °C son más favorables

para las infecciones fungosas. A menudo se requiere una alta humedad (85-95%) pero sin agua libre, para la germinación de conidias y para la producción de conidias en el insecto. Cada insecto infectado es un foco de infección que puede infectar a otros insectos de la población (Figura 2.2) [2, 54].



Figura 2.2 Ciclo de infección de los hongos entomopatógenos

2.3 Factores que Influyen en la virulencia de los hongos entomopatógenos

La patogenicidad es la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible. La virulencia es un término cuantitativo que define el

grado en que un patógeno puede causar enfermedad; esto a menudo está relacionado con el número de microorganismos que se requieren para causar la infección o la frecuencia de infección en una población dada y los determinantes de virulencia de la cepa [77]. La virulencia puede ser expresada en términos de la concentración letal media (CL_{50}) y se refiere a la dosis de conidias u otra clase de propagulos que resulta mortal para la mitad de la población de insectos de prueba. También es utilizado el término tiempo letal medio o tiempo letal cincuenta (TL_{50}) y se refiere al tiempo requerido a una determinada concentración de conidias/ml para matar al 50% de la población del insecto de prueba. Se han asociado a la virulencia con la germinación rápida de las esporas, la presencia de toxinas, ácidos productos del metabolismo microbiano y a niveles altos de las enzimas extracelulares que degradan proteínas, quitinas, ceras y lípidos y otras capas de exoesqueleto, así como tejidos del insecto, hemocele y hemolinfa [53].

Altre y col. [5] correlacionaron la virulencia de diferentes aislamientos de *Isaria fumosorosea* con el tamaño de las conidias, su velocidad de germinación, degradación de la cutícula de las larvas donde fueron probadas. Mientras que James [49] observó un efecto muy marcado de los nutrientes que se adicionaron al medio de cultivo en la germinación de la espora, como azúcares que estimularon únicamente el 11% de germinación, mientras que medios de cultivo formulados con extracto de levadura o peptona dieron como resultado de 95 a 100% de germinación. Lacey y col. [52] encontraron que la producción de blastosporas frescas de *P. fumosoroseus* fueron más infecciosas para ninfas de mosquita blanca que las conidias aéreas del mismo aislado.

La toxicidad potencial de los compuestos químicos secretados por los hongos, especialmente durante su producción en medios de cultivo ricos en nutrientes, es un factor de virulencia. En especies de *Beauveria*, *Metarhizium*, *Isaria* y otros grupos, se han encontrado un grupo de metabolitos secundarios potencialmente tóxicos para insectos tales como endo destruxinas, efrapeptinas, oosporeina, beauvericina, beauveriólidos, ácido dipicolínico y ácido oxálico [8, 53, 6, 81].

2.4 Producción de hongos entomopatógenos

El desarrollo comercial de un micoinsecticida requiere una etapa inicial en la que resulta decisiva la selección del aislado fúngico más adecuado. El aislamiento e identificación de cepas activas contra un determinado hospedante requiere un intenso trabajo de campo en busca de insectos infectados o bien de muestras de suelo que son las dos fuentes de hongos entomopatógenos en la naturaleza. De las cepas aisladas se recomienda llevar a cabo una serie de pruebas para su selección como: pruebas de eficacia y estabilidad, pruebas de seguridad ambiental, preservación de cepas, posibilidades de formulación, pruebas de estabilidad de almacenamiento, evaluación de costo del producto, investigación de mercado, comercialización y distribución del agente de control biológico [60].

La actividad insecticida de una colección de cepas se debe evaluar en condiciones de laboratorio para seleccionar las más virulentas [55].

Por otra parte se ha utilizado la concentración de propágulos producida bajo determinadas condiciones de cultivo, como criterio de selección para hongos entomopatógenos, conidias aéreas en el caso de producción en fermentación en estado sólido y propágulos para la fermentación sumergida [37]. Se ha asociado que la composición del medio de cultivo juega un papel importante en el crecimiento del hongo en cuanto a la producción de biomasa y propágulos, así como de metabolitos con actividad insecticida [32].

2.4.1 Fermentación en estado sólido.

La fermentación en estado sólido puede ser definida como el crecimiento de microorganismos principalmente, hongos filamentosos sobre materiales sólidos húmedos en ausencia de agua libre. El contenido de agua del sustrato debe soportar el crecimiento del hongo. La fermentación en estado sólido puede ser llevada a cabo en dos tipos de matrices: 1) soporte inerte impregnado con un medio líquido nutritivo,

entre los materiales utilizados se encuentran bagazo de caña de azúcar, amberlita, vermiculita, espuma de poliuretano, y esferas de poliuretano; 2) sustratos que actúan como soporte y como fuente de nutrientes, entre los sustratos que han sido tradicionalmente utilizados en fermentaciones en estado sólido se incluyen una variedad de productos agrícolas tales como arroz, trigo, cebada, frijol, maíz y soya [67, 13, 58]. Los hongos filamentosos son los microorganismos mejor adaptados para crecer en sustratos sólidos con contenidos de humedad relativamente bajos debido a sus propiedades fisiológicas, enzimáticas y bioquímicas. Las hifas penetran dentro del sustrato sólido y la combinación de la extensión apical de la hifa y su ramificación permite la colonización y la accesibilidad a los nutrientes [67, 71, 13, 58].

Altos contenidos de humedad reducen la porosidad de la matriz sólida, limitan la transferencia de oxígeno e incrementan el riesgo de contaminación con bacterias y levaduras. Bajos contenidos de humedad dan como resultado un limitado crecimiento del microorganismo y una distribución heterogénea de los nutrientes en el sustrato [13, 58].

Las conidias que son la clase de esporas producidas en fermentación en sustrato sólido ofrecen las siguientes ventajas: 1) son más tolerantes a la radiación UV, 2) resistentes al secado, 3) mayor vida de anaquel [13]. La Tabla 2.3 muestra las ventajas y desventajas de una fermentación en estado sólido.

Los hongos utilizados para control biológico pueden ser producidos a nivel laboratorio (capacidad g-kg) y a nivel planta piloto e industrial (kg-ton). Los biorreactores a escala de laboratorio comprenden dispositivos sencillos tales como cajas Petri, matraces Erlenmeyer, jarras y frascos de Roux [13]. A nivel de laboratorio se han cultivado los hongos entomopatógenos en papa dextrosa agar (PDA), agar dextrosa Sabouraud suplementado con extracto de levadura (ADSY) [60]. También se utilizan bolsas de plástico de polipropileno estériles a nivel laboratorio e industrial; así como biorreactores tipo columna con monitoreo de gases,

reactores de tambor rotatorio, biorreactor Zymotes que contienen placas para control de calor, humedad y aireación durante la fermentación [13].

Tabla 2.3 Ventajas y desventajas que presenta la fermentación en estado sólido

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Simplicidad del medio de cultivo. El sustrato generalmente provee todos los nutrientes necesarios para el crecimiento	Exceso de generación de calor. La aireación y enfriamiento algunas veces puede ser difícil debido a la alta concentración de sólidos.
La inoculación con esporas facilita una distribución uniforme a través del sustrato. Ausencia de residuos líquidos. Reducción de contaminación debido al bajo contenido de agua.	Problemas de transferencia de calor y de masa.
Las condiciones de cultivo simulan las condiciones naturales del medio ambiente.	Dificultad de monitoreo y control de los parámetros del proceso: pH, contenido de humedad, sustrato, concentración de O ₂ y biomasa.
Utilización directa del material fermentado	La ingeniería y caracterización de algunos bioreactores de Fermentación en Estado Sólido no está completamente madura, por lo que existe escasa información acerca del diseño y operación de reactores a gran escala.
Fácil procesamiento por su alto rendimiento.	Las condiciones estáticas son preferidas en su mayoría.
Fácil de deshidratar. Secado del producto <i>in situ</i> .	Es posible la contaminación de especies de hongos no deseables.
Reactores de diseño simple y requerimientos de poco espacio pueden ser utilizados debido a la concentración del sustrato. Bajos requerimientos de energía reducen los costos de producción.	Reactores de diseño simple y requerimientos de poco espacio pueden ser utilizados debido a la concentración del sustrato. Bajos requerimientos de energía reducen los costos de producción.

Adaptado de: [13, 58].

2.4.2 Fermentación en dos fases

La mayoría de los hongos filamentosos empleados como agentes de control biológico son producidos en sistemas de producción industrial en dos etapas de fermentación, cuyo primer paso consiste en la producción de micelio o blastosporas que serán utilizados como inóculo para la etapa de producción. El inóculo es producido en cultivo líquido en frascos agitados o fermentadores, crece hasta el final de la fase log y después es transferido al sustrato sólido para incrementar la producción de conidias [62, 19]. Esta técnica ha sido desarrollada como una manera alternativa para mejorar la producción industrial de conidias aéreas en sustratos sólidos, resultando un período de incubación corto, alta productividad volumétrica de conidias y un mejor control de calidad [62]. Existen algunas ventajas del sistema de producción de hongos en dos fases: se disminuye el riesgo de contaminación durante la preparación del inóculo en cultivo líquido y se asegura una colonización uniforme del sustrato sólido reduciendo el tiempo de incubación [73].

Esta técnica resulta adecuada dado que se combinan la facilidad y la eficiencia de la producción de hongo a gran escala y resulta exitoso en la elaboración de un producto comercial. Algunos micopesticidas basados en *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium spp.*, *Hirsutella thompsonii* e *Isaria spp.* también pueden ser desarrollados usando estas técnicas dado el bajo costo del medio líquido y los sustratos naturales, tales como productos agroindustriales y residuos [62].

2.4.3 Fermentación sumergida o líquida

La fermentación líquida ha sido el método preferido de fermentación para aplicaciones comerciales la transferencia de masa calor y oxígeno son mejores y la homogeneidad del cultivo son generalmente superiores, éste sistema es más confiable y reproducible, el monitoreo y control de los parámetros de operación son más fáciles que los de una fermentación en estado sólido [29].

Los hongos en este sistema de cultivo pueden formar agregados o esférulas, en este caso el crecimiento inicial es exponencial porque en las primeras etapas todas las hifas del micelio de la biomasa contribuyen al crecimiento; pero a medida que el diámetro de las esférulas se incrementa, se limita la transferencia de masa por lo que el crecimiento exponencial se ve limitado, en el interior de la esférula se acumulan metabolitos y disminuye la concentración de nutrientes incluyendo el oxígeno, inclusive las hifas del centro llegan a dejar de crecer y mueren [61].

La morfología también tiene un importante impacto en el comportamiento del cultivo. Cuando el hongo se desarrolla como micelio este se dispersa, la viscosidad del cultivo incrementa a medida que el hongo crece, lo que implica mayor consumo de energía para la agitación y la reducción de la velocidad de transferencia de oxígeno conforme se incrementa la viscosidad, por lo que el oxígeno es frecuentemente limitante mientras que la agitación vigorosa rompe las células causando alta mortalidad [61,29].

Para el caso específico del control biológico, en la producción de hongos por fermentación sumergida, en determinados casos, se obtienen blastosporas, que si bien son estructuras infectivas, resultan poco resistentes a los cambios de las condiciones climáticas (temperatura, radiación, humedad, etc.), a diferencia de los conidios que se producen en las fermentaciones en fase sólida. Se caracterizan las primeras por presentar cubiertas delgadas y lisas, que influyen negativamente en cuanto a su eficiencia y persistencia después de las aplicaciones dificultando, además, la formación de epizootias [29].

En cultivo líquido *P. fumosoroseus* produce hifas y blastosporas. Existen estudios sugieren que las blastosporas de este hongo son más efectivas que las conidias aéreas para el control biológico de *B. argentifolii* (mosquita blanca de la hoja plateada) debido a su mayor velocidad de germinación sobre la cutícula del insecto [47]. La productividad volumétrica de la producción de blastosporas es mayor que la de las conidias aéreas, los rendimientos son altos, y se producen para aplicarlas

inmediatamente en el campo evitando su almacenamiento prolongado debido a su baja resistencia al secado y a que pierden viabilidad rápidamente durante el almacenamiento.

Estudios nutricionales han sido retomados para mejorar el crecimiento y esporulación de Deuteromycetes como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *P. fumosoroseus*; [23]. Las blastosporas de *Beauveria bassiana* producidas en medios con limitación de nitrógeno, contienen más carbohidratos, glicógeno y lípidos comparadas con aquéllas producidas bajo limitación de la fuente de carbono. En medios líquidos semidefinidos que contienen concentraciones y fuentes apropiadas de nitrógeno se pueden producir altos niveles de blastosporas con cierta tolerancia al secado a bajas temperaturas [46]. La Tabla 2.4 muestra las diferencias básicas entre una fermentación en estado sólido y una sumergida.

2.5 Factores abióticos que afectan la viabilidad de los hongos entomopatógenos.

Se han estudiado algunos factores abióticos dada la influencia que tienen sobre la viabilidad de los hongos entomopatógenos entre ellos tenemos la temperatura, la humedad relativa y la radiación UV.

2.5.1 Temperatura

La temperatura de crecimiento de los aislados de hongos entomopatógenos se ha utilizado como un criterio de selección para el desarrollo de agentes de control biológico en condiciones climáticas específicas [37, 17, 50, 89].

La mayoría de los hongos entomopatógenos toleran temperaturas de 0 a 40°C. La temperatura óptima de germinación y crecimiento es de 23 a 28°C. La temperatura más favorable para la infección es de 20 a 30°C [17, 50, 89]. Claire y col. [20] llevaron a cabo un estudio de 37 aislados de *Isaria fumosorosea* originarios de climas

tropicales y subtropicales, a los cuales se les midió su crecimiento en un rango de temperatura de 8 a 40°C y encontraron que el rango de temperatura óptimo de crecimiento fue de 20 a 30°C, por lo que determinaron que el hongo es mesófilo.

Tabla 2.4 Diferencias básicas en fermentación sólida y sumergida

FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO	FERMENTACIÓN SUMERGIDA
El medio no fluye libremente	El medio fluye libremente
Poca profundidad	Gran profundidad
Los granos utilizados como sustrato proveen C, N, minerales y energía.	Son suministrados varios ingredientes para proporcionar nutrimentos y energía
Los nutrientes están en el agua adsorbida de los granos	Los nutrientes están disueltos en agua
Gradientes de T, pH, concentración de nutrientes y de metabolitos	Mayor homogeneidad
Mínima cantidad de agua, menor volumen	Más agua, más volumen
Sistemas de 3 fases	Sistemas de 2 fases si el hongo crece como blastosporas o como micelio disperso
Control de T, O ₂ , humedad	Control de temperatura, oxígeno disuelto
Relación de inóculo alta	Relación de inóculo baja
Resistencia para el transporte de masa	Baja resistencia si el hongo crece como blastosporas o no forma esférulas
Adherencia y crecimiento del microorganismo al sólido.	Microrganismos distribuidos en la fase líquida
Alta concentración de producto por unidad de volumen	Baja concentración de producto por unidad de volumen

Modificado de [71]. Prabhakar y col., 2005.

En general el crecimiento de los hongos entomopatógenos disminuye rápidamente arriba de 30°C y cesa para la mayoría de los aislados a 37°C. De manera similar, la germinación de las conidias se ve adversamente afectada arriba de 30°C [54, 89, 17].

La temperatura afecta la germinación de los propágulos fúngicos. El contar con aislamientos con una rápida germinación puede garantizar una mayor probabilidad de éxito en campo, minimizando el riesgo de exposición a factores abióticos desfavorables que reducen su viabilidad [37]. Zimmermann [92] encontró que las altas temperaturas retardaron la germinación de las esporas de *Metharizium anisopliae*. El desarrollo de la micosis se ve afectado por temperaturas extremas, por ejemplo aquellas menores a 15°C y mayores de 32°C [2, 19].

2.5.2 Humedad relativa

Uno de los factores limitantes para que el hongo inicie la invasión en el insecto patógeno es la necesidad de contar con una humedad relativa alta para la germinación de las esporas y para la penetración del huésped. La infección del hongo en el huésped se llega a establecer a humedades relativas cercanas al 75 %. A contenidos de humedad relativas entre los 81 al 92 % se ha registrado un mayor porcentaje de infección [2, 89].

El tiempo de aplicación del micoinsecticida es importante ya que se deben buscar las condiciones ambientales que favorezcan la germinación de las conidias como una alta humedad relativa y una temperatura adecuada, estas condiciones se dan generalmente al finalizar la tarde o por la mañana temprano, ya que en la naturaleza, la humedad generalmente fluctúa siendo alta durante la noche y en las primeras horas de la mañana; y descendiendo al medio día [2, 89].

La capacidad de algunos hongos para controlar a los insectos plaga de condiciones de baja humedad ambiental, ha sido atribuida a la presencia de humedad en su

microhábitats, por ejemplo el microclima de la superficie de la hoja puede promover una humedad, ya que; la luz directa del sol y/o una baja humedad pueden inducir a la planta a transpirar más. La manipulación de las condiciones ambientales para alcanzar o mantener alta la humedad durante el proceso inicial de infección ha sido usada para incrementar la infección y velocidades de mortalidad. Por ejemplo cubriendo las plantas con plástico después de la aplicación del micoinsecticida por 48 h resultó una velocidad de mortalidad del 45 % y 85 % para *Bemisia tabaci* biotipo B y *Trialeurodes vaporariorum* respectivamente [54, 89].

2.5.3 Radiación solar

Los propágulos de los hongos entomopatógenos son muy susceptibles a daño por radiación solar. La radiación ultravioleta B (UVB) que corresponde a longitudes de onda de 280 a 320 nm, es la más letal; aunque la radiación UVA (320-400 nm) también es dañina. La persistencia de los propágulos del hongo sobre sustratos expuestos a radiación solar directa es relativamente reducida en relación a propágulos en sitios protegidos. En áreas sombreadas los propágulos eventualmente morirán por el reflejo de la radiación [89]. Las especies y cepas de hongos entomopatógenos difieren significativamente en su susceptibilidad a la radiación solar [27, 12].

Mientras que los componentes UV del espectro solar son perjudiciales, la luz visible puede ser benéfica al estimular un mecanismo de fotorreactivación que repara daños en el DNA [89].

Por lo expuesto para el uso de micoinsecticidas en las zonas agrícolas de noroeste de México dadas las características climáticas es importante no solo el aislamiento de cepas nativas de hongos entomopatógenos, sino también el estudiar el desempeño de los aislados en distintos sistemas de cultivo y las de resistencia de los propágulos a factores abióticos y al proceso de secado.

CAPÍTULO

3

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

El desarrollo de este proyecto consistió en la producción de conidios aéreos y propágulos sumergidos del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* en dos sistemas de cultivo (Figura 3.1).

El primero en cultivo sólido para obtener conidias aéreas y el segundo en cultivo líquido para obtener propágulos sumergidos (conidias y blastosporas), a las cuales se les evaluó el crecimiento a diferentes temperatura, el índice de sobrevivencia al secado con convección de aire e irradiación ultravioleta a 336 nm y 254 nm. Además se evaluó la virulencia por medio del bioensayo.

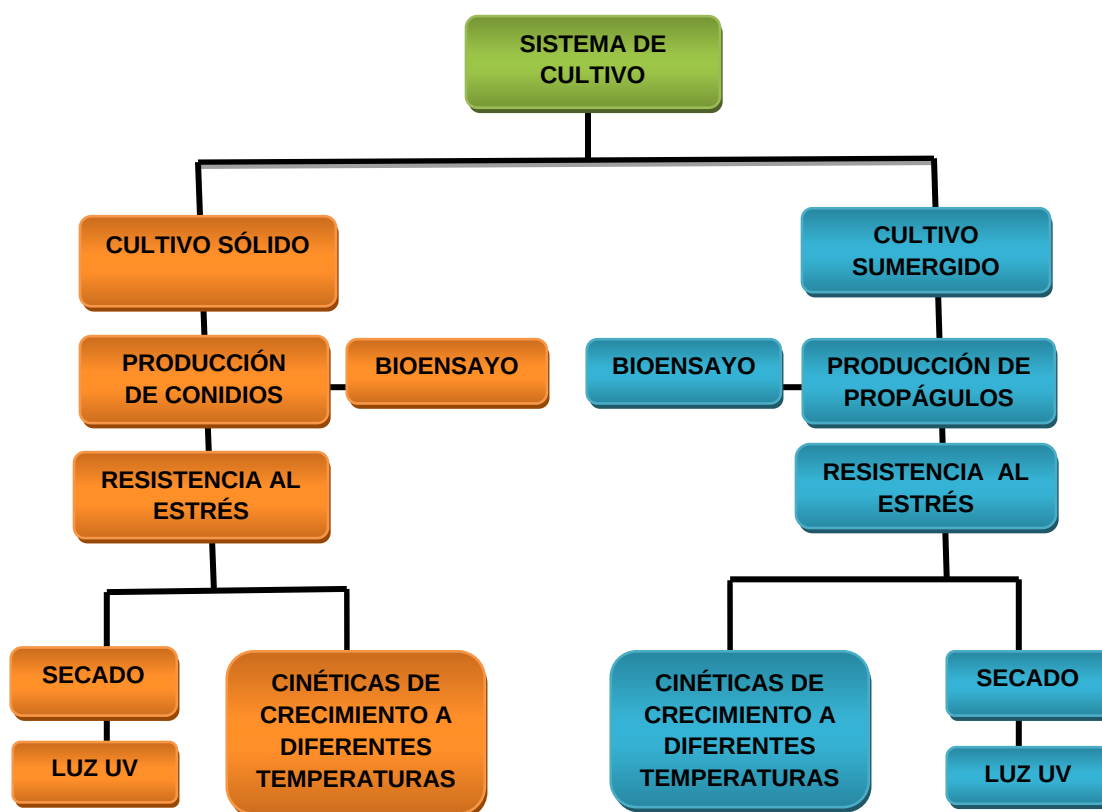


Figura 3.1 Diagrama general del proyecto de tesis.

3.1 Microorganismos

Se utilizaron dos aislados de *Isaria fumosorosea* obtenidos de la colección de cepas del laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos, dependiente del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Unidad Hermosillo, Sonora, México.

Uno de los aislados de *Isaria fumosorosea* correspondió a la cepa P43A la cual fue previamente aislada de piojo harinoso de la vid (*Planococcus ficus*) procedente de Villa Pesqueira, Sonora, México, cuyas coordenadas son 29°22'15'' - 29°22'57'' con latitud norte y 110°54'15'' - 110°53'39'' longitud oeste y a una altura sobre el nivel del mar de 634 m. El municipio de Pesqueira tiene un clima caliente semiárido con un promedio anual de precipitación de 508 mm y temperaturas hasta de 47°C en verano. El Estado de Sonora en verano tiene temperaturas promedio de 37°C y humedad relativa promedio de 48.8% (Anexo 3B y 4B), según datos del Servicio Meteorológico Nacional (<http://smn.cna.gob.mx/>).

El otro aislado correspondió a la cepa PCC, la cual fue aislada de *Diaphania* sp. (Lepidoptera:Pyralidae) procedente del Valle de Culiacán, Sinaloa, México, en cuyas coordenadas se localiza en latitud Norte 24°54'10'' - 24°27'56'' y longitud Oeste 107°21'50'' - 107°50'15'', se encuentra a una altura de 54 m sobre el nivel del mar. El Valle de Culiacán tiene un clima tropical seco con temperaturas hasta de 43°C en verano y una precipitación anual entre 600 y 800 mm. El Estado de Sinaloa en verano tiene temperaturas promedio de 35°C y humedad relativa promedio de 68% (Anexos 3A y 4A), según datos del Servicio Meteorológico Nacional (<http://smn.cna.gob.mx/>).

Se obtuvieron cultivos monospóricos de cada cepa en agar dextrosa Sabouraud suplementado con extracto de levadura (Difco), se incubaron a 28°C (Figura 4). Después que los cultivos esporularon se cortaron cilindros de 1 cm de diámetro y se preservaron en viales con glicerol al 10% a una temperatura de -20°C.

3.2 Medios de cultivo

3.2.1 Agar dextrosa Sabouraud con extracto de levadura (ADSY)

Se añadió 1% de extracto de levadura (Difco) al agar dextrosa Sabouraud (Difco), este último se preparó según instrucciones de la etiqueta y se esterilizó a 121°C por 15 minutos.

3.2.2 Caldo dextrosa Sabouraud (CDS)

Composición en g/L: 5 triptona (Difco), 5 peptona P (Bioxon), y 20 dextrosa (Fermont®). El pH del medio se ajustó a 5.7 ± 0.2 . Se esterilizó a 120°C.

3.2.3 Agar-arroz

Se utilizó arroz blanco pulido comercial, el cual se lavó con agua de la llave, se dejó escurrir en un colador y se secó a temperatura ambiente. El arroz se quebró en una licuadora, 12 g de éste se esterizaron dentro de cajas Petri de vidrio de 90 mm de diámetro a 121°C por 2 horas. Después de esterilizado al arroz se le adicionó 20 ml agar al 1.5% con extracto de levadura al 1% previamente estéril.

3.2.4 Arroz

Arroz blanco comercial se lavó con agua de la llave, se dejó escurrir y secar en un colador a temperatura ambiente. Se pesaron 160 g y se colocaron en un frasco de vidrio de 66 mm de diámetro y 175 mm de altura, se llenó aproximadamente a $\frac{1}{4}$ de capacidad y se esterilizó a 121°C por 2 horas en autoclave.

3.2.5 Medio M1

Composición (g/L): glucosa (Fermont[®]) 50, extracto de levadura (Difco) 5.0, K₂HPO₄ 0.39, MgSO₄·7H₂O 0.60, KCl 1.0, NH₄NO₃ 0.7, Na₂HPO₄·7H₂O 1.0630 (las sales minerales fueron de Spectrum Chemical Mfg. Corp.). El pH del medio fue ajustado a 5.6 antes de esterilizarlo a 120°C por 15 minutos.

3.2.6 Medio M2

Composición (g/L): glucosa (Fermont[®]) 50, NH₄NO₃, 2 KH₂PO₄ 2, KCl 2, MgSO₄·7H₂O 0.2, ZnSO₄·7H₂O 20 mg/L, FeSO₄·7H₂O 20 mg/L, CuSO₄·5H₂O 15 mg/L (Spectrum Chemical Mfg. Corp.). El pH del medio se ajustó a 5.0 antes de ser esterilizado a 120 °C por 15 minutos. Para la producción de enzima proteasa se le adicionó 1% de caseína y para lipasas 2% de aceite de olivo comercial.

3.3 Preparación de inóculos y condiciones de crecimiento.

3.3.1 Agar-arroz

Las placas con este medio se inocularon con cepas conservadas en viales a -20°C, se incubaron a 28°C en la oscuridad. Cuando el micelio cubrió las placas, se sacaron de la incubadora y se expusieron a la luz del día a 25°C hasta que esporularon en aproximadamente 15 días. Para recolectar las esporas aéreas la placa de cultivo se raspó con una espátula estéril y se añadió Tween 80 al 0.05%, se le hizo un conteo de esporas a la suspensión colectada para conocer su concentración. De este concentrado se preparó una nueva suspensión en Tween 80 al 0.05% con una concentración de 1×10^6 conidias /ml para inocular matraces o placas.

3.3.2 Arroz

El arroz estéril dentro de un frasco de vidrio fue inoculado con 30 ml de extracto de levadura al 1% el cual contenía una concentración de 1×10^6 conidios/ml y se cubrió con una tela de gasa y algodón, se mezcló manualmente para homogenizar el arroz con el inóculo. Los frascos se incubaron a 28°C en la oscuridad hasta que el arroz estuvo cubierto de micelio. Después el micelio fue expuesto a la luz del día a 25°C hasta su completa esporulación. Los frascos fueron agitados manualmente cada día para prevenir la aglomeración del arroz y airear.

3.3.3 Germinación de las conidias

El medio M1 se utilizó para germinar las conidias. Las conidias fueron inoculadas a una concentración de 1×10^6 conidios/ml en matraces Erlenmeyer de 120 ml conteniendo 20 ml de medio M1 y 25 µg/ml de gentamicina. Se inocularon dos controles uno con antibiótico y otro sin antibiótico. Los controles y muestras de prueba fueron incubados a 28°C y 180 rpm en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific CO. INC. Series 25). La germinación de propágulos sumergidos se reportó como porcentaje (%) de viabilidad. Se consideró como conidio germinado cuando el tubo germinal tiene de 2 a 3 veces el tamaño del diámetro del conidio.

3.3.4 Cultivo sumergido

Un matraz Erlenmeyer de 2 L conteniendo 1000 ml de medio M2 y 20 µg/ml de gentamicina fué inoculado con una suspensión de 1×10^6 conidios/ml. El matraz fue incubado a $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$ y 180 rpm por 5 días dentro de una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific CO. INC. Series 25). Los propágulos sumergidos se cosecharon del mosto fermentado separando el micelio, filtrando el caldo a través de un filtro de papel tipo canasta para preparar café donde se separó del medio líquido. Los propágulos fueron separados del medio líquido centrifugando a $10,864 \times g$ a 5°C por 15 minutos (Allegra™ X-22R Centrifuge Beckman Coulter). El concentrado de

propágulos fue almacenado a 5°C hasta ser utilizado para las pruebas de resistencia al secado e irradiación con luz UV, determinación de azúcares alcohol, trehalosa y extracción de melanina.

3.3.5 Efecto de la temperatura en el crecimiento de las cepas

3.3.5.1 Cultivo sólido

Se inocularon placas con ADSY (90 cm de diámetro) con 3 µl de suspensión de conidias aéreas (1×10^6 conidios/ml) en el centro de la placa. Después que el inóculo se adsorbió al medio de cultivo, se dibujaron 2 líneas perpendiculares en el revés del fondo de cada caja Petri haciendo coincidir el cruce de las dos líneas en el centro de la gota donde se colocó el inóculo. Las placas fueron incubadas a 20, 23, 25, 28, 32 y 34 °C $\pm$ 1°C. A partir de que el crecimiento fue observado, se inició la medición del diámetro de la colonia cada 12 horas en las dos líneas perpendiculares con un vernier Truper Digital Calliper (Model CALDI-6MP) [59, 26]. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue calculada en la etapa temprana de la fase exponencial de crecimiento. Los experimentos se realizaron por triplicado. Los conidios aéreos fueron producidos en agar-arroz como se describió anteriormente.

3.3.5.2 Cultivo sumergido

Se adicionó 20 ml de CDS y 20 µg/ml de gentamicina en matraces Erlenmeyer de 120 ml y se inocularon con una suspensión de conidias aéreas para tener una concentración final de 1×10^6 conidios/ml. Los matraces fueron incubados a 20, 23, 25, 28, 32 y 34 °C $\pm$ 0.5°C y 180 rpm en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific CO. INC. Series 25). Tres matraces fueron monitoreados al tiempo cero y tres más a diferentes tiempos de muestreo para hacer el análisis de biomasa por peso seco.

La velocidad específica de crecimiento se calculó de acuerdo a las ecuaciones de crecimiento 1 y 2.

$$\mu = \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

Dónde:

μ = velocidad específica de crecimiento; x = concentración de biomasa; t = tiempo

Integrando esta ecuación se tiene:

$$\ln x_t = \mu t + \ln x_0 \quad (2)$$

Se puede observar la similitud de la ecuación 2 con $y = mx + b$ la cual es la clásica relación lineal de la línea recta de la gráfica.

Dónde:

$\ln x$ = biomasa; t = tiempo; μ = velocidad específica de crecimiento, obtenida de la pendiente de la línea recta de la fase exponencial de la gráfica; $\ln x_0$ = biomasa existente en el tiempo cero [61, 64].

3.4 Actividad enzimática.

3.4.1 Cultivo sólido

Cada una de las cepas de hongo fue cultivada en los medios propuestos por Hankin y Anagnostakis [41] con sustratos para inducir la producción de enzimas lipasa, proteasa y quitinasa. A partir de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^6 conidios/ml se tomaron 3 μ L para inocular el centro de una placa de agar con sustrato inductor de enzima y se dejó secar. Se incubaron a 25°C por 5 días.

3.4.1.1 Actividad lipolítica

Se utilizó sorbitan monolaurato conocido como Tween 20 (Sigma Aldrich, Chemical Company Inc., Milwaukee USA). El medio de cultivo contiene los siguientes ingredientes en g/L: Peptona (Oxoid), 10 g; NaCl, 5 g; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 g; agar, 20 g; pH 6.0. El Tween 20 se esterilizó por separado en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión. Una vez que se enfrió la solución se adicionó 1 ml de Tween 20 a 100 ml del medio base, se homogenizó y se vació en cajas Petri.

La producción de enzima lipasa por la colonia fue observada como un precipitado visible debido a la formación de cristales de la sal de calcio del ácido láurico producto de la reacción enzimática, o como una zona clara con un precipitado alrededor de la colonia debido a la degradación completa de la sal del ácido graso.

3.4.1.2 Actividad proteolítica

Se utilizó leche descremada al 2.4% como sustrato inductor de proteasas. La leche se disolvió en la mitad del volumen total requerido para preparar el medio de cultivo, y se esterilizó por separado a 112°C por 30 minutos, posteriormente se enfrió a una temperatura de 55 a 60 °C y se mezcló con el agar nutritivo (Difco) al 2.3% más 0.4% de agar, esterilizado previamente a 120°C por 15 minutos después de ajustar el pH a 6.0. Las colonias con actividad proteolítica presentan una zona clara alrededor de la colonia.

3.4.1.3 Actividad de quitinasa

La actividad de quitinasa se determinó preparando 500 ml de medio mineral [Contenido por litro: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g; KH_2PO_4 , 4 g; Na_2HPO_4 , 6 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g; CaCl_2 , 1 mg; H_3BO_3 , 10 µg; MnSO_4 , 10 µg; ZnSO_4 , 70 µg; CuSO_4 , 50 µg; MoO_3 , 10 µg. Sales minerales de Spectrum Chemical MFG Corp. (California USA)], se ajustó el pH a 5.0, se le adicionó 0.02% de extracto de levadura (Difco), 1.5% de agar y 2.4%

de quitina purificada [Chitin from crab shells (poly-[1→4]-β-D-N-acetyl-glucosamina), Sigma chemical Co. St. Louis USA]. El medio de cultivo fue esterilizado a 120°C por 15 minutos.

Las placas de cultivo se prepararon con dos capas de agar. Primero se vació aproximadamente 10 ml de una capa de agar al 1.5% estéril y se dejó solidificar. Se vació una segunda capa con 3 ml del medio mineral con quitina estéril y se dejó solidificar. Este procedimiento se llevó a cabo para que la quitina quedara disponible en la superficie del medio de cultivo ya que esta tiende a asentarse en el fondo de la caja Petri. La degradación de la quitina se observó como una zona clara en el agar opaco alrededor de la colonia.

3.4.1.4 Índice de actividad enzimática

Después de 5 días de incubados los cultivos se midió el diámetro de los halos producidos por la enzima como efecto de degradación del sustrato y se midió el diámetro de la colonia para obtener el Índice Enzimático (IE) mediante la siguiente relación de acuerdo a [80].

$$IE = \frac{(Diámetro\ de\ la\ colonia) + (Zona\ clara\ del\ halo\ de\ actividad)}{(Diámetro\ de\ la\ colonia)} \quad (3)$$

3.4.2 Cultivo sumergido

Se depositaron 200 ml de medio M2 sin glucosa en matraces Erlenmeyer de 500 ml para inducir la producción de lipasas y proteasas. Para inducir proteasas el medio mínimo se ajustó el pH a 5.0 y se adicionó 1% de caseína después de que el medio mínimo se esterilizó y enfrió [65]. Para inducir la producción de lipasas se añadió 2% de aceite de oliva y el pH se ajustó a 5.0 [70]. Los medios fueron esterilizados a 120°C por 15 minutos y cuando estuvieron fríos se le adicionó 20 µg/ml de

gentamicina. Los matraces fueron inoculados a una concentración final de 1×10^6 conidios/ml y se incubaron a 25°C y 180 rpm en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific CO. INC. Series 25). Se tomaron 4 ml de alícuotas del cultivo al tiempo cero y cada 24 horas. Las muestras fueron centrifugadas a $10\,864 \times g$ a 5°C por 15 minutos (Allegra™ X-22R Centrifuge Beckman Coulter). Los sobrenadantes fueron almacenados a 5°C hasta el momento de su análisis.

3.4.2.1 Actividad proteolítica

La actividad de proteasas fue ensayada de acuerdo a García-Carreño y col. [33]. La actividad se estimó en una mezcla de reacción conteniendo 200 µl del sobrenadante del cultivo del hongo libre de micelio, se le añadió 300 µl de una solución amortiguadora de Tris/HCl 50 mM, pH 8.0, más 500 µl de azoca ceína 0.5% (w/v) disuelta en solución amortiguadora Tris/HCl pH 8.0 previamente acondicionada a 25°C. Se incubó inmediatamente a 25°C por 20 minutos y 22 oscilaciones por minuto en un baño termo agitado (Precisión Scientific). Después de transcurridos los 20 min se detuvo la reacción con 500 µl de ácido ticloroacético (TCA) al 10% (w/v). Después la mezcla se centrifugó por 5 minutos a 15 000 rpm en una microcentrífuga Microfuge E™ Beckman (VWR Scientific) para remover la proteína precipitada. Al sobrenadante obtenido se le midió la absorbancia a 366 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 21). Para ajustar a cero el equipo se utilizó agua destilada. Se preparó un blanco añadiendo la solución de enzima e inactivando inmediatamente la reacción adicionando 500 µl de TCA al 10%. La absorbancia del blanco se restó a la de la muestra. Una unidad de actividad de proteasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para incrementar 0.01 la D.O. a 366 nm por minuto.

3.4.2.2 Actividad lipolítica

La actividad de lipasas fue determinada colorimétricamente por el método de *p*-nitrophenyl palmitato (*p*NPP) de acuerdo a Berekaa y col., [11]. Se preparó una mezcla de reacción añadiendo 1 ml de la solución (1) gota a gota a 90 ml de solución

(2) para obtener una emulsión. La solución (1) contiene 90 mg de *p*-nitrophenylpalmitato disuelto en 30 ml de 2-propanol. La solución (2) contiene 2 g de Triton-X 100, 0.5 g de goma arábica y 207 mg de deoxicolato de sodio disuelto en 450 ml de Tris/HCl 50 mM pH 8.0.

El análisis se realizó con 900 µl de la mezcla de reacción descrita anteriormente y 100 µl de la solución de enzima, se mezcló y se incubó a 25°C por 10 minutos. La reacción se inactivó poniendo los tubos de reacción en un baño con hielo por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 15,000 rpm por 5 min en una microcentrifuga Microfuge ETM Beckman (VWR Scientific). El sobrenadante fue transferido a tubos de ensaye y se mantuvieron en un baño de hielo. El *p*-nitrofenol liberado fue medido a 410 nm, ajustando a cero con solución amortiguadora de Tris-HCl 50 mM, pH 8.0. El incremento de *p*-nitrofenol liberado fue determinado cuantitativamente con una curva estándar de *p*-nitrofenol preparada de acuerdo a Margesin y col. [56].

Una unidad de lipasa fue definida como el incremento de enzima que libera 1 µmol de *p*-nitrophenol del sustrato por minuto.

Las actividades enzimáticas totales en cultivo sumergido fueron reportadas como el área de actividad integrada desde el tiempo de detección hasta el tiempo en que la actividad máxima fue alcanzada.

3.5 Virulencia de las conidias aéreas y sumergidas en larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae).

Se utilizaron tres réplicas de 10 larvas de *Galleria mellonella* del último instar para el bioensayo. Las larvas fueron tratadas con conidios aéreos producidos en agar-arroz y propágulos sumergidos producidos en medio M2 de las cepas P43A y PCC. Las larvas fueron sumergidas en 10 ml de etanol al 70% por 10 s para su desinfección, después fueron colocadas en sanitas estériles para que se absorbiera el exceso de alcohol. Diez larvas fueron depositadas por inmersión en una suspensión de conidios

de 1×10^8 conidios/ml en Tween 80 al 0.05% por 20 s de conidios aéreos, o propágulos sumergidos. En los controles de las larvas se sumergieron en Tween 80 0.05% y en medio mineral sin conidios. Después las larvas fueron depositadas en cajas Petri estériles de 90 mm de diámetro, dentro de las cuales se depositó el alimento (una mezcla de avena, miel y vitaminas previamente estéril) y una pieza de algodón húmeda. El bioensayo fue mantenido a 25°C. Cada tratamiento fue hecho por triplicado. La mortalidad fue registrada cada 24 horas durante 12 días [82]. Se determinaron el porcentaje de mortalidad ó mortalidad acumulada, la mortalidad real y el porcentaje de mortalidad corregida; considerando la mortalidad obtenida en el control absoluto, de acuerdo a las siguientes ecuaciones [1].

$$\%Mortalidad = \frac{Insectos\ muertos}{Insectos\ totales} \times (100) \quad (4)$$

$$Mortalidad\ real = Mortalidad\ tratamiento - Mortalidad\ vehículo \quad (5)$$

$$\%Mortalidad\ corregida = \frac{Mortalidad\ tratamiento - Mortalidad\ blanco}{100 - Mortalidad\ blanco} \times (100) \quad (6)$$

Se estimó el tiempo letal (TL_{50}) por medio de un análisis probit [52].

3.6 Curvas de secado

Se pesaron de 0.5 a 1.0 g de conidios aéreos producidas en arroz o de propágulos sumergidos cultivados en el medio M2 se pesaron de 0.5 a 1.0 g y se colocaron en un plato de aluminio de 9 cm de diámetro y 2.5 cm de altura previamente a peso constante. Las esporas fueron secados en una estufa de convección de aire (VWR 1350F). Dentro de la estufa se colocó una pieza de poliestireno expandido (frigolit) de 2 cm de espesor para aislar las muestras de la superficie caliente. En el fondo de la estufa se colocó una charola con silica-gel y en otra NaOH en escamas para la absorción de la humedad del aire. Las temperaturas de secado fueron 30°C, 40°C, 50°C y 60°C. Para cada temperatura de secado se utilizaron tres réplicas. Las muestras fueron pesadas cada 2 minutos para registrar la pérdida de humedad hasta

obtener un peso de equilibrio. La pérdida de humedad durante el tiempo de secado fue obtenida por diferencia de la humedad total de la muestra menos la humedad registrada en cada tiempo de secado [78]. La viabilidad de los conidios después del tratamiento de secado se reportó como índice de sobrevivencia (I_s) ecuación 7.

3.6.1 Índice de sobrevivencia

La viabilidad de las conidias aéreas y propágulos sumergidos después del tratamiento de secado se reportó como índice de sobrevivencia y fue obtenido de la relación del porcentaje de conidias o propágulos germinados entre la germinación del control ecuación 12 (sección 3.11.2) [44].

$$I_s = \frac{\%CONIDIOS\ GERMINADOS}{\%GERMINACIÓN\ DEL\ CONTROL} \quad (7)$$

3.6.2 Coeficientes difusivos de secado

Para obtener los coeficientes difusivos durante el secado de las conidios se asumió una distribución uniforme de la humedad inicial en ausencia de resistencias externas, para lo cual se utilizó la solución analítica de la ley de Fick para una esfera expresándose en la siguiente ecuación:

$$X^* = \frac{X - X_e}{X_0 - X_e} = \frac{6}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{n^2} \text{Exp}\left(-n^2 \frac{\pi^2 Dt}{R^2}\right) \quad (8)$$

Para tiempos de secado largos y para relación de humedad adimensional $(X-X_e/X_0-X_e)$ menores que 0.6 sólo se utiliza el primer término ($n=1$) de la ecuación anterior, para estimar la velocidad de secado, deduciéndose entonces esta expresión:

$$\left(\frac{X - X_e}{X_0 - X_e} \right) = \alpha e^{(-kt)} \quad (9)$$

donde α es una constante, y k es la denominada constante de secado. De esta expresión es posible obtener el coeficiente de difusión efectiva (D_{ef}), ya que $k = D_{ef}/r^2$. La influencia de la temperatura (T) sobre este coeficiente puede establecerse mediante la ecuación de Arrhenius $D_{ef} = D_0 e^{(-E_a/RT)}$, obteniendo de aquí la correspondiente energía de activación E_a , y la constante D_0 . En las ecuaciones anteriores: X es contenido de humedad en cada momento, X_0 es el contenido inicial de humedad, X_e el contenido de humedad de equilibrio, t es el tiempo, a es constante y k es la constante de secado.

Para la estimación de la difusividad de la humedad, en un diagrama semilogaritmico, se graficó la relación de la humedad adimensional ($X - X_e / X_0 - X_e$) obtenida de los datos experimentales contra el tiempo. Esta gráfica debe ser una línea recta sobre el primer periodo de velocidad de decaimiento. La pendiente de esta línea recta es considerada igual a:

$$\left(\frac{\pi^2 D_{eff}}{R^2} \right) \quad (10)$$

de donde la difusividad efectiva ($Deff$) es determinada considerando tiempos suficientemente largos, como se muestra en la siguiente ecuación, tomando solamente el primer término de la ecuación anterior y linealizando [21].

$$\ln X^* = \ln \left(\frac{6}{\pi^2} \right) + \left(- \frac{\pi^2 Deff}{R^2} \right) t \quad (11)$$

3.7 Tolerancia a la irradiación ultravioleta

Se preparó una suspensión de conidias aéreas y/o propágulos sumergidos de 1×10^7 conidias/ml en 100 ml de agua desionizada estéril y se le añadió 3 g de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro. La suspensión fue agitada manualmente por 5 minutos. Se tomaron 10 ml de esta suspensión y se colocaron en una caja Petri de vidrio estéril y se colocaron dentro de una cámara provista de una lámpara de luz UV (Model UVGL-58 Minerallight®, Lamp Multiband UV-254/366nm 115 volts, 6 watt, 60 Hz 0.16 AMPS, San Gabriel, CA 91778 USA) a una distancia de 20 cm. Las conidias fueron irradiadas a 366 nm de 8 a 24 horas y a 254 nm durante 5 a 60 minutos [27]. La viabilidad se reportó como índice de sobrevivencia (Is) ecuación 7 (sección 3.6.1) [44].

3.8 Rompimiento de las conidias

Se pesaron 30 mg de conidios liofilizados, se depositaron en un tubo Falcon de 50 ml y se re suspendieron en 500 μ l de agua des ionizada. Las conidias se rompieron introduciendo al tubo una punta del Sonicador Branson Sonifier 250 a una profundidad de 6 ó 7 mm. Las muestras fueron sonicadas por 1, 2 y 3 minutos.

3.9 Extracción de azúcares alcohol y trehalosa

Los conidios rotos se transfirieron a un tubo de ensaye de vidrio de 13x100 mm y se colocaron en un baño de agua a ebullición por 5, 10, 20 y 30 minutos para extraer los azúcares-alcohol y trehalosa. Después las muestras fueron centrifugadas dos veces por 5 minutos a 15 000 rpm en una Microfuge (ETM Beckman Model Mico E VWR Scientific), el sobrenadante fue congelado hasta el momento de analizarse [40].

3.10 Extracción de melanina

La melanina se extrajo de acuerdo al método de Butler and Lachance [14] por análisis de digestión alcalina con NaOH con pequeñas modificaciones. Se utilizaron conidias aéreas y propágulos sumergidos secos previamente pesados a los que se les añadió 100 ml de acetona, se mezclaron y se calentaron a 50 °C por 30 minutos, después la mezcla fue centrifugada. Las conidias aéreas ó propágulos sumergidos fueron lavados con 3 volúmenes de 50 ml de agua desionizada y se centrifugaron a 5000 g por 10 minutos. El paquete de conidias o propágulos fue resuspendido con 100 ml de etanol absoluto y calentado a 85 °C por 3 horas. La preparación fue centrifugada, lavada con un volumen de 3x50 ml de agua desionizada y se resuspendió en 100 ml de HCL concentrado y se calentó a 85 °C por 18 horas. En seguida se lavó el sólido obtenido de la digestión ácida con agua desionizada utilizando agitación magnética. Se dejó reposar hasta sedimentar los sólidos, el sobrenadante fue descartado. Se hicieron diversos lavados con agua desionizada para elevar el pH a 7.0. La melanina fue filtrada sobre una membrana MF-Type (Millipore HAWG047S6) se secó a 80 °C por 2 horas y se registró el peso final.

3.11 Técnicas analíticas

3.11.1 Análisis de azúcares alcoholes y trehalosa

Se preparó una solución concentrada de cada estándar de 30 mg/ml de cada estándar (glucosa (Baker Analyzed), trehalosa (Sigma), manitol (EM Science) y glicerol (Merck)). El rango de concentraciones de la curva estándar fue de 400 a 2000 µg/ml [40].

Los azúcares alcoholes y trehalosa fueron separados en un HPLC Varian Pro Star Modelo 230, usando una columna Bio-Rad Aminex HPX-87p de 300x7.8 mm. Se utilizó una guarda columna Bio-Rad Aminex HPX-87p. La fase móvil fue agua grado HPLC filtrada a través de una membrana MF-Type (mixed cellulose esters Millipore

HAWG047S6), después fue esterilizada a 121°C por 15 minutos, enfriada y finalmente fue desgasificada por 60 minutos. Muestras de 20 µl de la solución de estándar fueron inyectadas y separadas con un flujo de 0.6 ml/minuto a 85°C por triplicado. Se utilizó un detector de Índice de Refracción Varian Star 9040 (a 35°C, tiempo de respuesta normal, rango de señal 256). Las señales fueron registradas en un programa Picolog recorder. El programa Origin Pro 8.5.1 se utilizó para graficar las señales e integrar las áreas.

3.11.2 Cuenta total de conidias aéreas y propagulos sumergidos

La cuenta de conidios aéreos y propagulos sumergidos se realizó en una cámara de Neubauer bajo la lente de 40X de un microscopio óptico Leica ATC 2000 [18]. Se consideró como conidias sumergidas aquellas células de forma cilíndrica u ovoide de no más 3-4 x 1-2 µm y como blastosporas a las células alargadas de forma cilíndrica con una ligera constricción en el centro [79]. Para la determinación del porcentaje de viabilidad además de la cuenta total de esporas se contaron las esporas germinadas y no germinadas utilizando la misma técnica de conteo. La diferencia entre una espora no germinado a la de una germinada es que estas últimos presentan el crecimiento de un tubo germinal de una longitud de aproximadamente el doble de la longitud de su tamaño original, el % de viabilidad se calculó de acuerdo a la relación de la ecuación 12 [18].

$$\% Viabilidad = \frac{CONIDIOS GERMINADOS}{CONIDIOS TOTALES} \times (100) \quad (12)$$

3.11.3 Determinación de humedad

Un gramo de arroz-conidio se secó a 100 °C por 24 horas. El contenido de humedad fue obtenido por diferencia de peso antes y después del secado y fue reportado como porcentaje de humedad (http://www.isoeh.cl/lab_amb/met_analitico/ambiente%20pdf/HUMEDAD en estufa de aire.pdf)

3.11.4 Determinación de biomasa

Todo el contenido del cultivo de un matraz se filtró a través de una membrana de filtración previamente pesada MF-Type (mixed cellulose esters Millipore HAWG047S6) con vacío y se secó a 100 °C por 2 horas. Cada medición fue hecha por triplicado.

3.11.5 Cuantificación de melanina

La melanina fue cuantificada construyendo una curva de calibración a partir de una solución stock de 2.5 mg/ml de melanina de *Sepia officinalis* (M2649-100MG SIGMA) en un rango de concentraciones de 0.1 a 0.3 mg/ml utilizando el método de digestión alcalina de Butler and Lachance (1986) por triplicado. A cada concentración se le añadió 3 ml de NaOH 0.62 N (concentración final de NaOH 0.5 N) se calentaron a 121 °C por 30 minutos en un autoclave. Las muestras fueron enfriadas y se registró la absorbancia a 540 nm (A_{540nm}) utilizando NaOH 0.5 N como referencia.

3.12 Análisis estadístico.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para examinar el efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento (μ), actividad enzimática, índice de sobrevivencia al secado, humedad e irradiación UV, coeficientes difusivos de secado, azúcares-alcohol, trehalosa, melanina, TL_{50} , $T_{empL_{50}}$, Ih_{50} y DL_{50} para cada cepa en cultivo sólido o sumergido se utilizó un diseño de bloques al azar (RCBD) para analizar el efecto de la temperatura y diferentes sustratos sobre μ , actividades enzimáticas, los índices de sobrevivencia después del secado e irradiación para los cultivos en sólido y en líquido. Se hizo la comparación de medias por el método de Tuckey-Kramer (HSD) a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Se utilizó el software SPSS 17.0 para todos los análisis estadísticos.

CAPÍTULO

4

RESULTADOS

RESULTADOS

En la Figura 4.1 se muestra la morfología colonial de los aislado P43A y PCC de *Isaria fumosorosea* en ADSY a los 15 días de incubación.

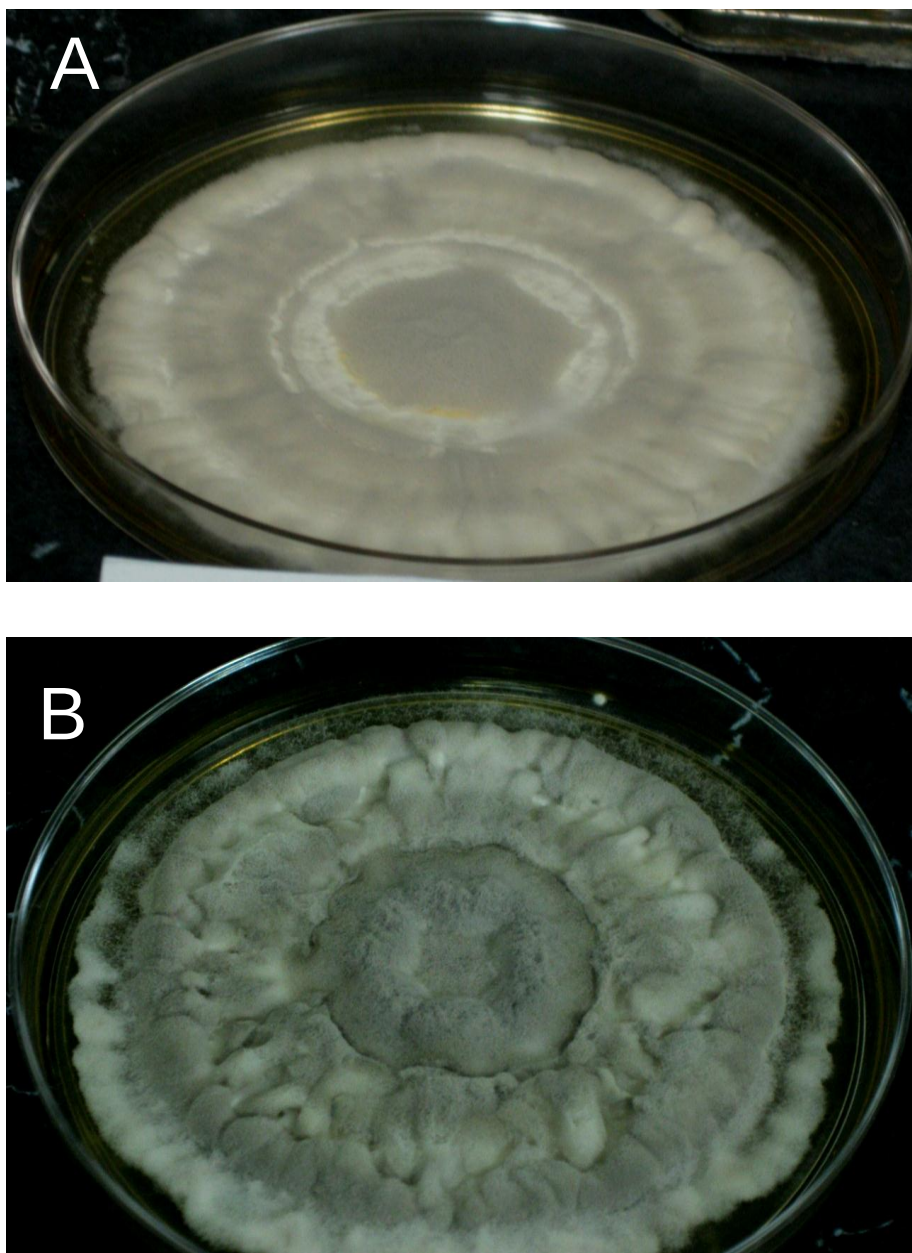


Figura 4.1 Colonias de *Isaria fumosorosea* cepas A) P43A y B) PCC cultivadas en ADSY a 28 °C por 15 días.

4.1 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento

En cultivo sólido la cepa PCC tuvo una μ más alta que la cepa P43A para temperaturas de 20 a 28 °C ($p < 0.001$), sin embargo la μ de la cepa P43A fue superada a 32 °C y fue 2 veces mayor que la de la cepa PCC ($p < 0.05$). La temperatura óptima de crecimiento fue de 25 °C para ambas cepas. La temperatura tuvo un mayor efecto sobre μ para la cepa PCC que para la cepa P43A, ya que para esta última los incrementos en la μ hasta llegar a la temperatura óptima y los decrementos de μ a temperaturas mayores fueron menores excepto a 34 °C, dado que a esta temperatura dicha cepa no creció (Figura 4.2). La μ de la cepa PCC fue 1.4 veces más alta que la cepa P43A a 20 °C ($p < 0.05$) y 1.8 veces más alta a 25 °C ($p < 0.05$).

En cultivo sumergido, ambas cepas crecieron en el rango de 20 a 34 °C y la temperatura óptima de crecimiento para ambas cepas fue de 28 °C (Figura 4.2). Aunque a esta temperatura la velocidad específica de crecimiento de la cepa P43A ($\mu = 0.3674 \text{ h}^{-1}$) fue 1.4 veces más alta que para PCC ($\mu = 0.2573 \text{ h}^{-1}$; $p < 0.001$). La μ de ambas cepas en el rango de temperaturas probadas fue más alta en cultivo sumergido que en cultivo sólido. La μ de la cepa PCC en cultivo sumergido a la temperatura óptima de crecimiento (28 °C) fue 8.8 veces más alta que la μ obtenida en medio sólido. Mientras que para la cepa P43A la μ fue de 22.3 veces más alta en medio sumergido. Ambas cepas formaron esférulas a temperaturas iguales a 30 °C o más altas en CDS. El porcentaje de propágulos sumergidos (conidias y blastosporas) fue diferente para ambas cepas cuando se cultivaron en el medio M2 a 28°C. El cultivo de PCC produjo 66.7% de conidias y 33.3% de blastosporas, mientras que el cultivo de P43A produjo 84.3% de conidias y 15.6% de blastosporas.

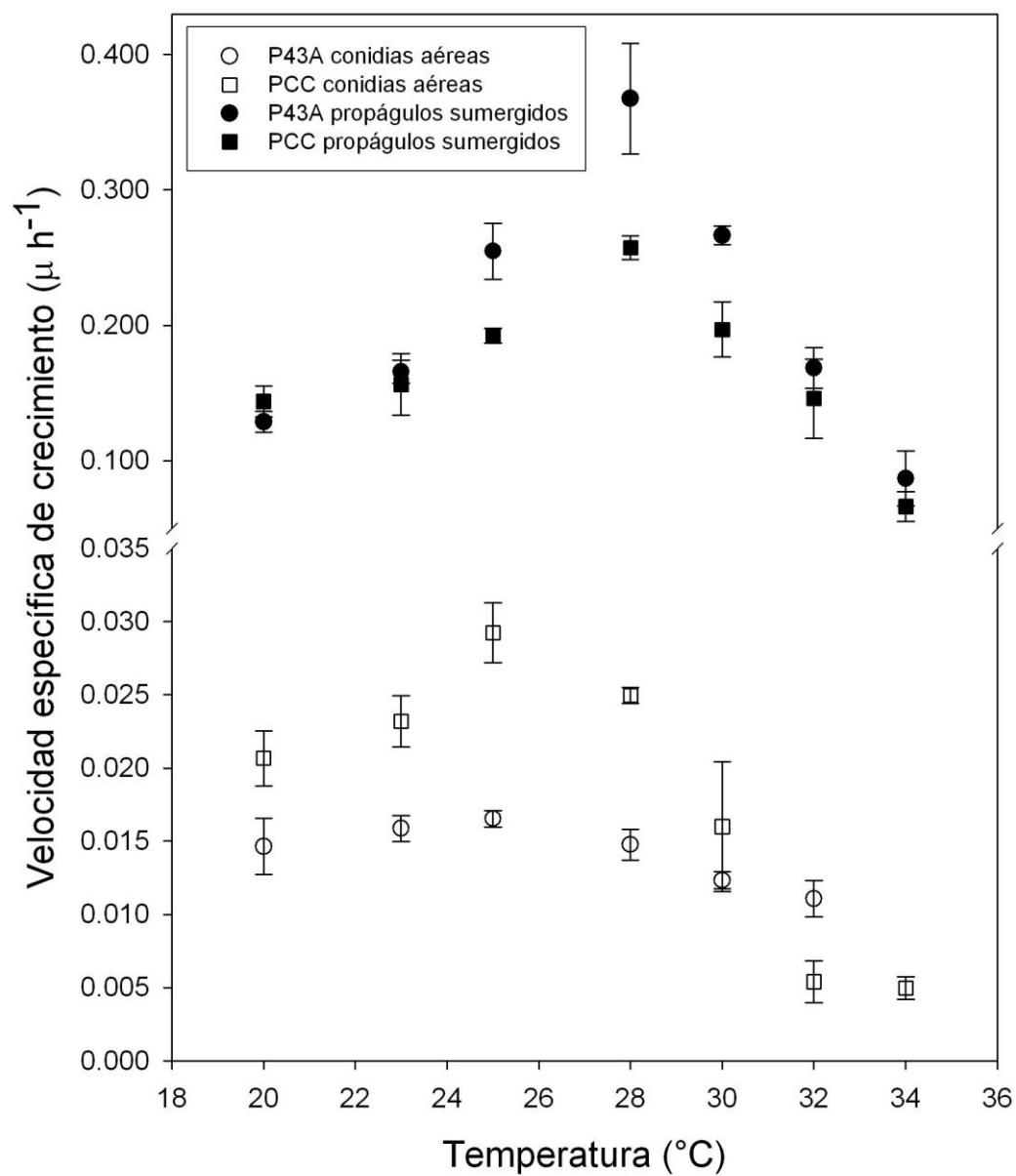


Figura 4.2 Efecto de la temperatura sobre la velocidad específica de crecimiento de *Isaria fumosorosea* cepas P43A y PCC en cultivo sólido y el cultivo sumergido.

4.2 Producción de lipasas, proteasas y quitinasas

Ambos aislados produjeron lipasas, proteasas y quitinasas en medio sólido. Los índices enzimáticos se muestran en la Tabla 4.1 y la producción de estas enzimas en medio sólido en las Figuras 4.3, 4.4 y 4.5. La cepa P43A produjo 1.51 veces más actividad de proteasas que la cepa PCC ($p < 0.001$), mientras que la actividad de lipasas y quitinasas fue similar en ambas cepas. Las cepas PCC y P43A fueron capaces de crecer en cultivo sumergido en aceite de oliva y caseína como única fuente de carbono. La actividad de proteasas fue detectada en las primeras 18 horas en la cepa PCC mientras que en la cepa P43A se detectó a las 72 horas y la actividad acumulada de proteasa en la cepa PCC fue 2 veces mayor que la actividad de la cepa P43A ($p < 0.05$). La actividad de lipasas fue detectada a las 72 horas en ambas cepas. La cepa PCC produce 1.8 veces más actividad de lipasas que la cepa P43A ($p < 0.05$). La cepa P43A produce 8.7 veces más actividad de lipasas que proteasas en cultivo sumergido ($p < 0.001$) (Figura 4.6). La μ de la cepa PCC en caseína fue de 2.4 veces más alta ($p < 0.001$) que la de la cepa P43A, pero ambas cepas tuvieron una μ baja en aceite de oliva (Figura 4.7).

Tabla 4.1 Índices enzimáticos de la producción extracelular de quitinasas, lipasas y proteasas en cultivo sólido por *Isaria fumosorosea* aislados P43A and PCC.

Aislado	Indice Enzimático (Medias $\pm$ DE)		
	Quitinasas	Lipasas	Proteasas
P43A	1.689 $\pm$ 0.059 ^b	2.202 $\pm$ 0.781 ^a	2.037 $\pm$ 0.783 ^a
PCC	1.577 $\pm$ 0.075 ^b	2.401 $\pm$ 0.154 ^a	1.345 $\pm$ 0.104 ^b

^{a,b} Medias en la misma columna con diferente superíndice son significativamente diferentes (Tukey's, $p < 0.05$)

DE: Desviación Estándar (basada en tres réplicas)

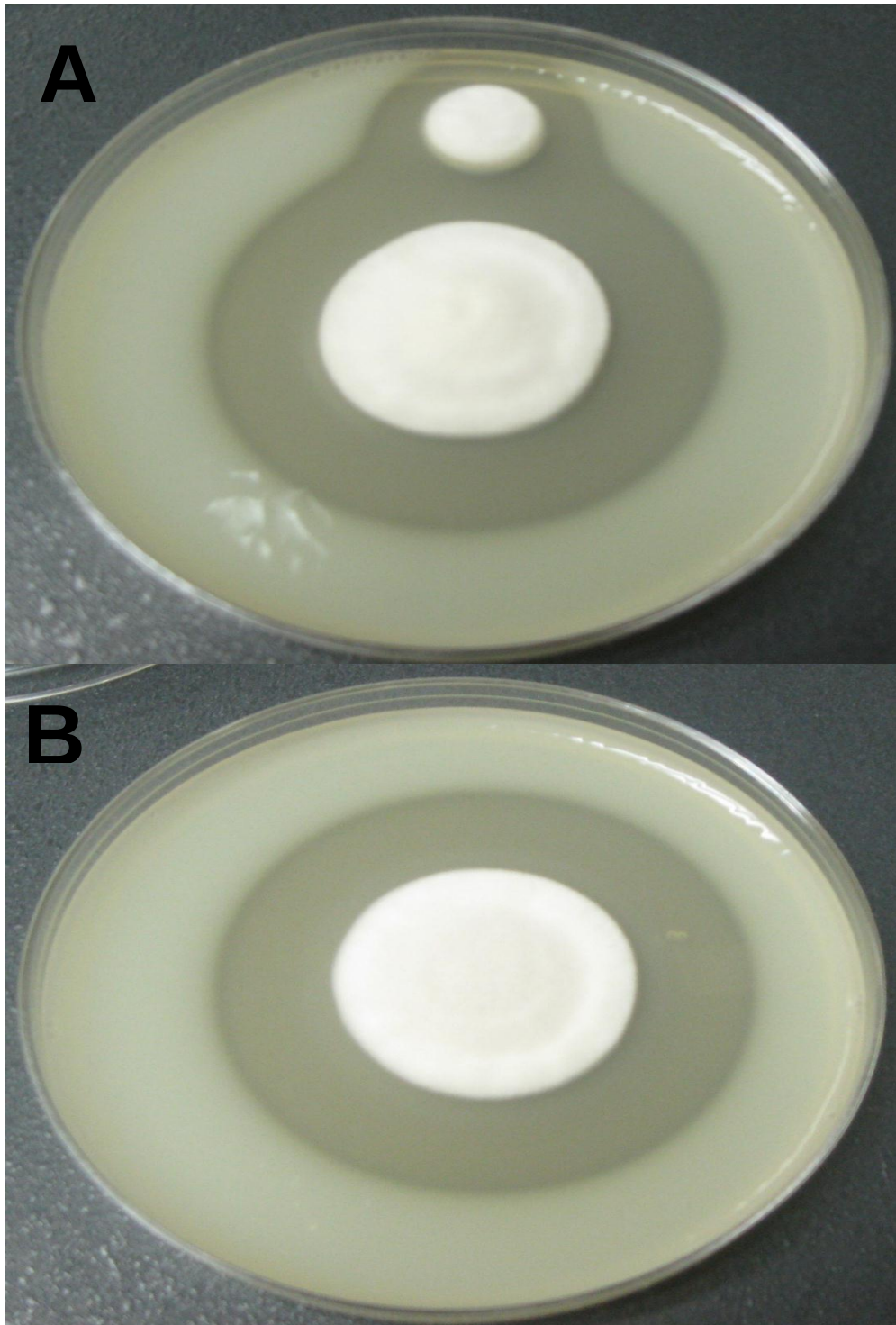


Figura 4.3. Producción de proteasas en agar nutritivo con leche descremada por los aislados de *I. fumosorosea*. A) P43A y B) PCC.

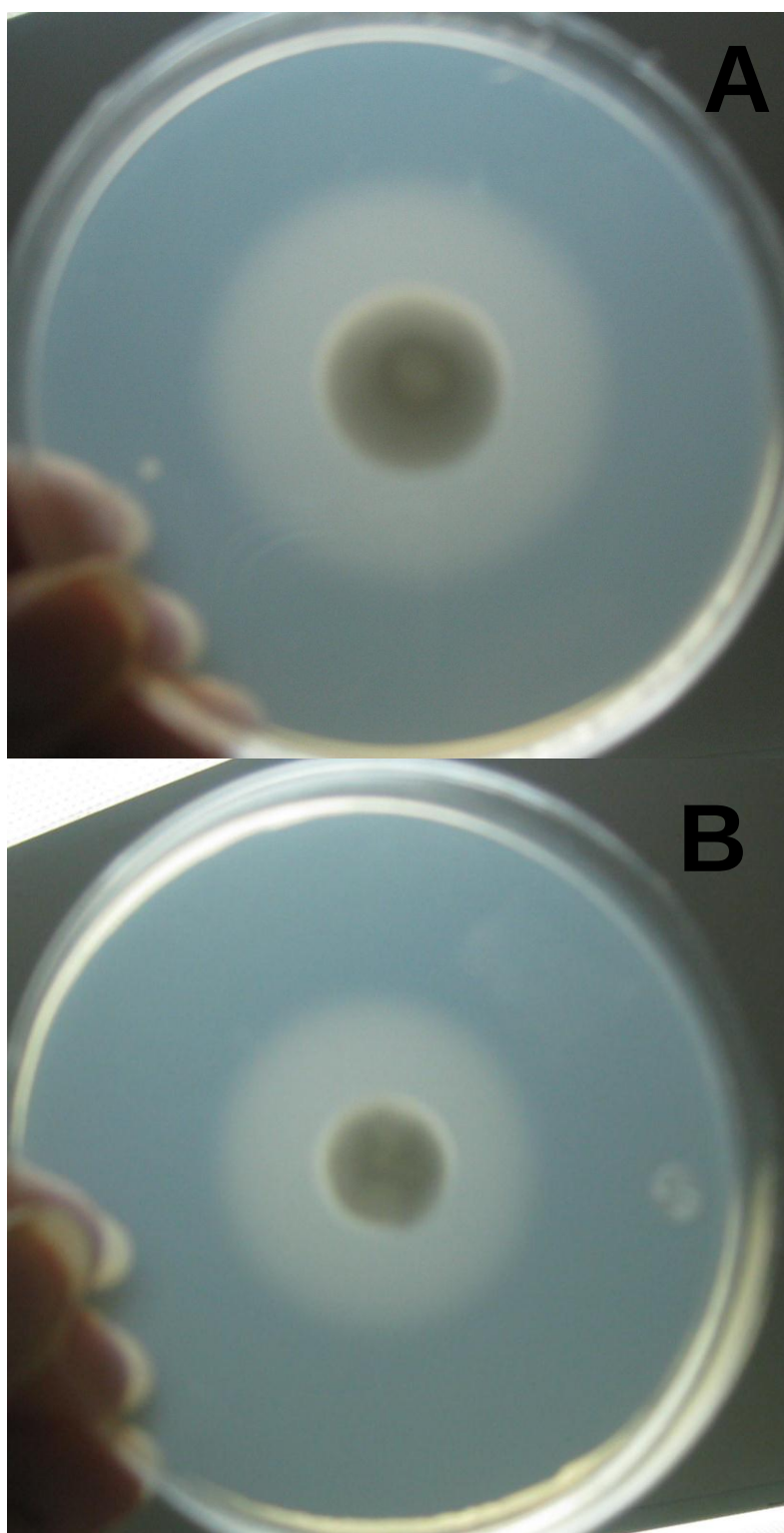


Figura 4.4 Producción de lipasas en medio mineral con Tween 20 de los aislados de *I. fumosorosea*. A) P43A y B) PCC.

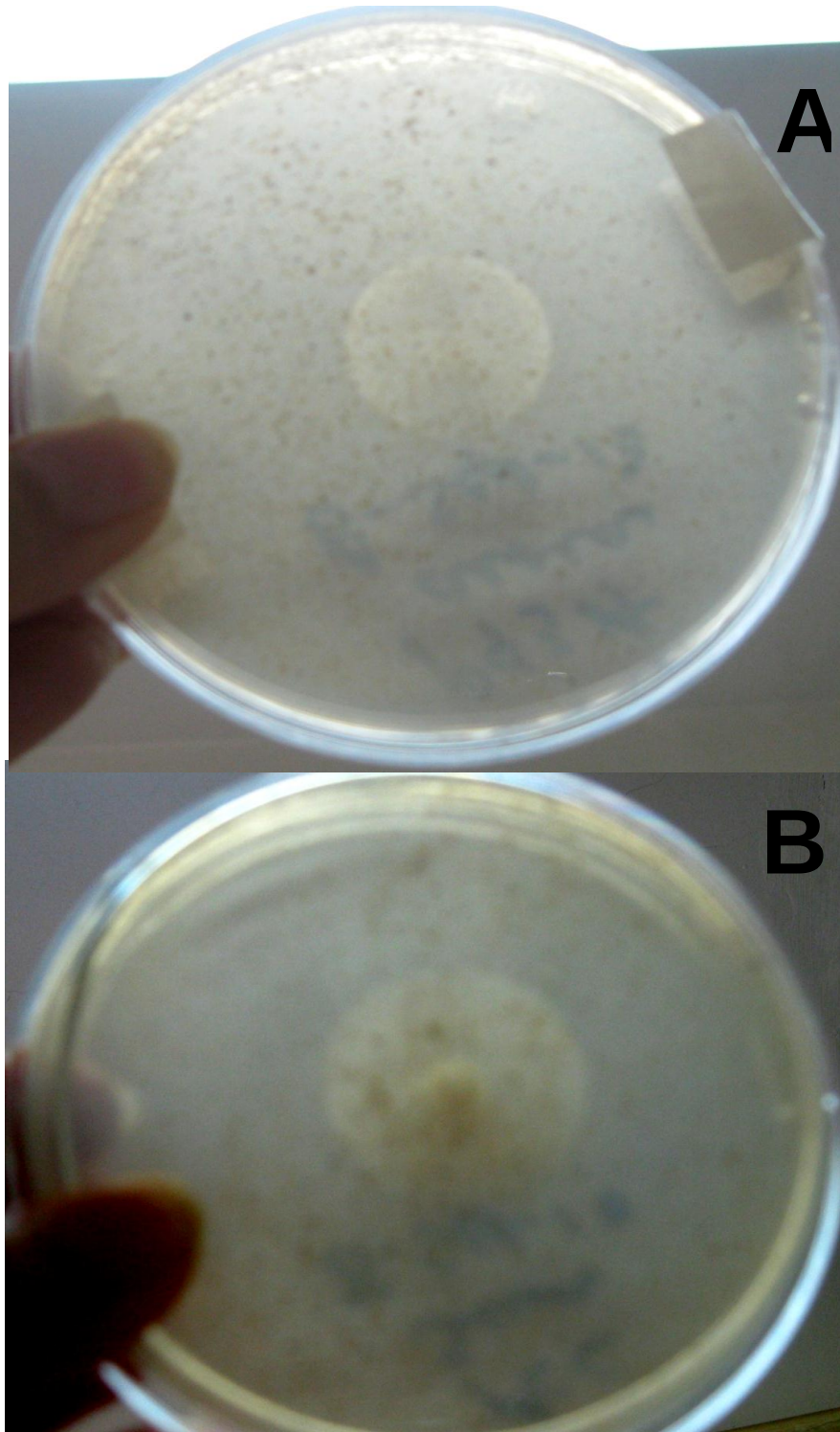


Figura 4.5 Producción de quitinasas en medio mineral con quitina por los aislados de *I. fumosorosea* A) P43A y B) PCC.

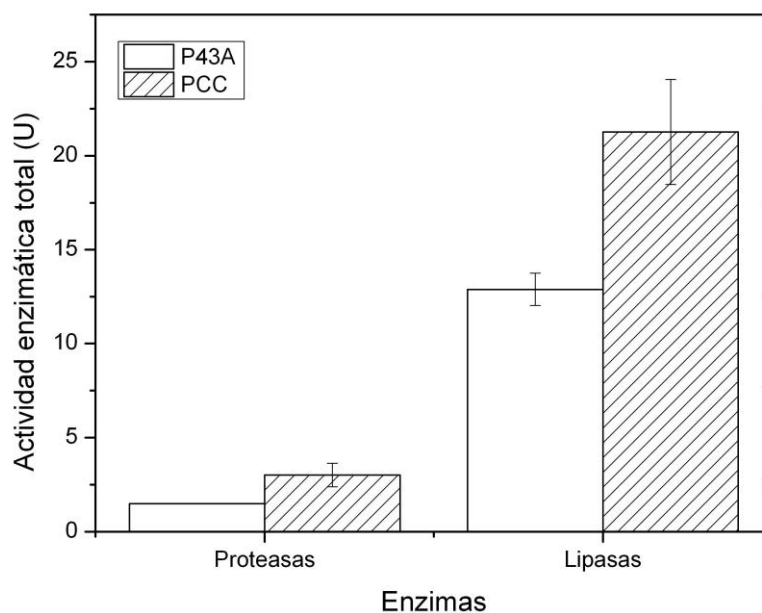


Figura 4.6 Producción de enzimas proteasas y lipasas en el cultivo sumergido de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC utilizando 1% caseína o 2% aceite de olivo como única fuente de carbono.

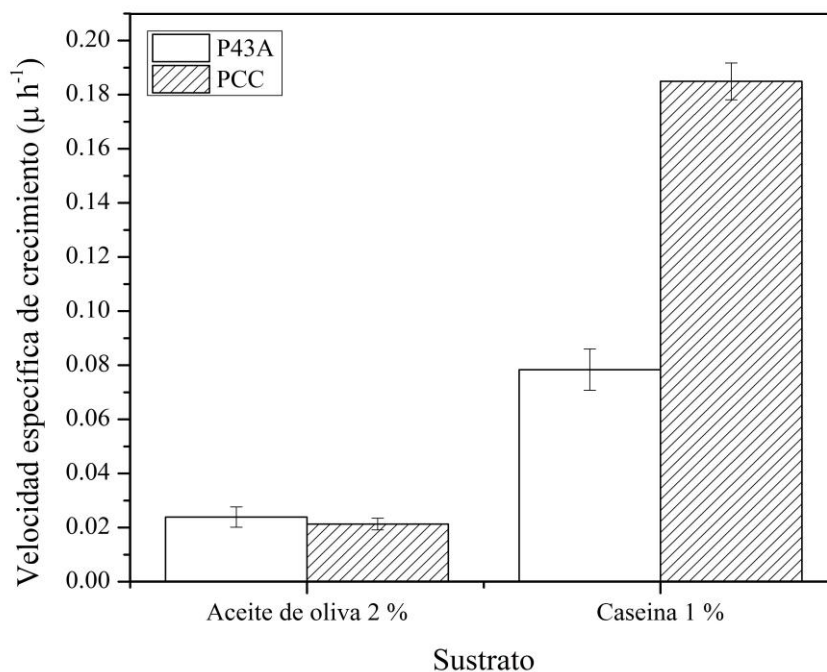


Figura 4.7 Velocidad específica de crecimiento de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC en medio M2 utilizando caseína al 1% y aceite de olivo al 2% como única fuente de carbono.

4.3 Virulencia de conidias aéreas y propágulos sumergidos de los aislados en larvas de *Galleria mellonella* (Lepidoptera:Pyralidae).

La Figura 4.8 muestra la mortalidad corregida de larvas de *Galleria mellonella* tratadas con los conidias aéreas o propágulos sumergidos (conidias y blastosporas) de las condiciones experimentales usadas los conidios aéreos de la cepa PCC fueron más letales que los de la cepa P43A ($p < 0.05$). A partir del cuarto día, una fracción de las larvas tratadas con conidios aéreos de PCC fueron cubiertos parcialmente con micelio. Cuando se usaron los propágulos sumergidos de PCC el micelio empezó a emerger a los 3 días en una fracción de larvas. Cuando las larvas fueron inoculadas con conidias aéreas de la cepa P43A, se observaron larvas micosadas a los 7 días y cuando se inocularon con propágulos sumergidos se observó micosis en las larvas a los 4 días.

La Tabla 4.2 muestra los valores del tiempo letal 50 (TL_{50}) para conidias aéreas y sumergidos de las cepas P43A y PCC.

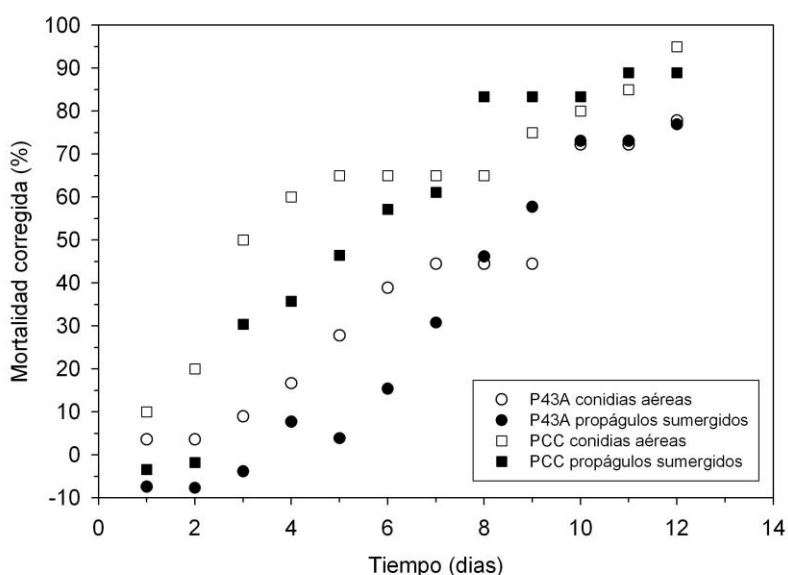


Figura 4.8 Mortalidad corregida de larvas de *Galleria mellonella* tratadas con conidias aéreas o propágulos sumergidos (conidias y blastosporas) de las cepas P43A y PCC.

Tabla 4.2 Tiempo letal 50 (TL₅₀) de conidias aéreas y sumergidas de *Isaria fumosorosea* de los aislados P43A and PCC en larvas de *G. mellonella*.

Aislado	Propágulos	TL ₅₀ días±DE
P43A	Aéreos	8.30±1.45 ^a
	Sumergidos	8.46±0.20 ^a
PCC	Aéreos	4.86±0.47 ^b
	Sumergidos	6.25±0.12 ^a

^{a-b} Medias en la columna con diferente superíndice son significativamente diferentes (Tukey's, $p < 0.05$)

TL₅₀ los valores fueron determinados usando el análisis probit ($p < 0.05$)

DE: Desviación Estándar (basada en tres réplicas)

4.4 Secado de conidias aéreas y propágulos sumergidos

4.4.1 Curvas de secado

La Figura 4.9 muestra las curvas de secado de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea*. En esta figura podemos observar que a medida que se incrementa la temperatura de secado el tiempo que se necesita para llegar a la humedad en equilibrio se reduce, que la humedad final de las esporas depende de la temperatura de secado y que las curvas de secado de las conidias aéreas de ambos aislados presentan perfiles similares, que a su vez son diferentes de los propágulos sumergidos.

En la Tabla 4.3 se muestran los contenidos de humedad y tiempos de equilibrio durante el secado de las conidias aéreas y propágulos sumergidos de las cepas en estudio.

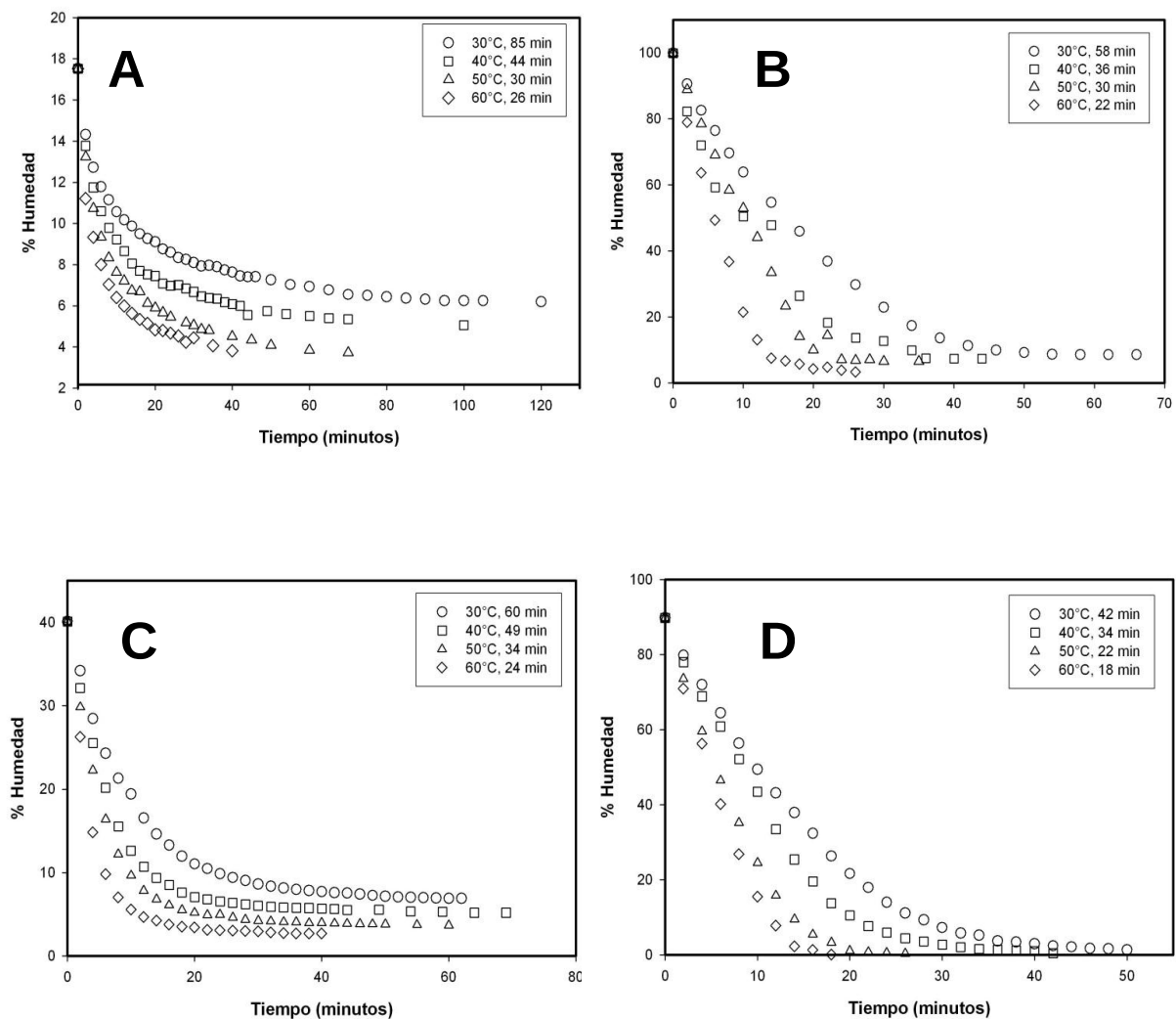


Figura 4.9 Curvas de secado con convección de aire a diferentes temperaturas de conidias aéreas y de *I. fumosorosea* de las cepas P43A y PCC: A) P43A conidias aéreas, B) P43A propágulos sumergidos, C) PCC conidias aéreas y D) PCC propágulos sumergidos.

4.4.2 Coeficientes difusivos de secado y la temperatura

La Figura 4.10 muestra los coeficientes difusivos de secado obtenidos durante el secado a las diferentes temperaturas de prueba. Las conidias aéreas presentaron menores coeficientes difusivos en relación con las cepas sumergidas en cada una de las temperaturas de secado probadas. Los coeficientes difusivos de la cepa P43A

sumergida son de 2.6 a 3.6 veces mayores que los de la cepa P43A aérea, mientras que los coeficientes difusivos de secado de las cepa PCC sumergida son de 1.45 a 2.73 veces mayores que los de la cepa PCC aérea. Los coeficientes difusivos de secado de las conidias aéreas de P43A presentaron diferencias significativas en todas las temperaturas de secado ($p<0.05$), mientras que los coeficientes difusivos de secado de los propágulos sumergidos de P43A sumergida presentaron diferencias significativas entre las temperaturas de secado de 30 y 40°C ($p<0.05$), pero entre 50 y 60°C no hubo diferencias significativas ($p>0.05$). En el caso de las conidias aéreas de la cepa PCC hubo diferencias significativas entre 60°C con las temperaturas de 30, 40, y 50°C ($p<<0.001$). Los coeficientes difusivos de secado de los propágulos sumergidos de la cepa PCC presentaron diferencias significativas entre las temperaturas de 30, 40°C con las temperaturas de 50 y 60°C ($p<<0.001$).

Tabla 4.3 Contenidos de humedad y tiempos de equilibrio durante el secado con convección de aire de conidias aéreas (CA) y propágulos sumergidos (PS) de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

Temperatura de secado °C	P43A CA		P43A PS		PCC CA		PCC PS	
	% Humedad final	Tiempo Secado minutos	% Humedad final	Tiempo Secado minutos	% Humedad final	Tiempo Secado minutos	% Humedad final	Tiempo Secado minutos
% Humedad inicial	17.52	0	99.89	0	40.12	0	89.76	0
30	6.36	87	8.55	58	6.90	60	2.42	42
40	5.55	46	7.48	36	5.57	49	1.53	34
50	5.05	30	6.59	30	4.09	34	0.78	22
60	4.53	26	4.83	22	3.09	24	0.03	18

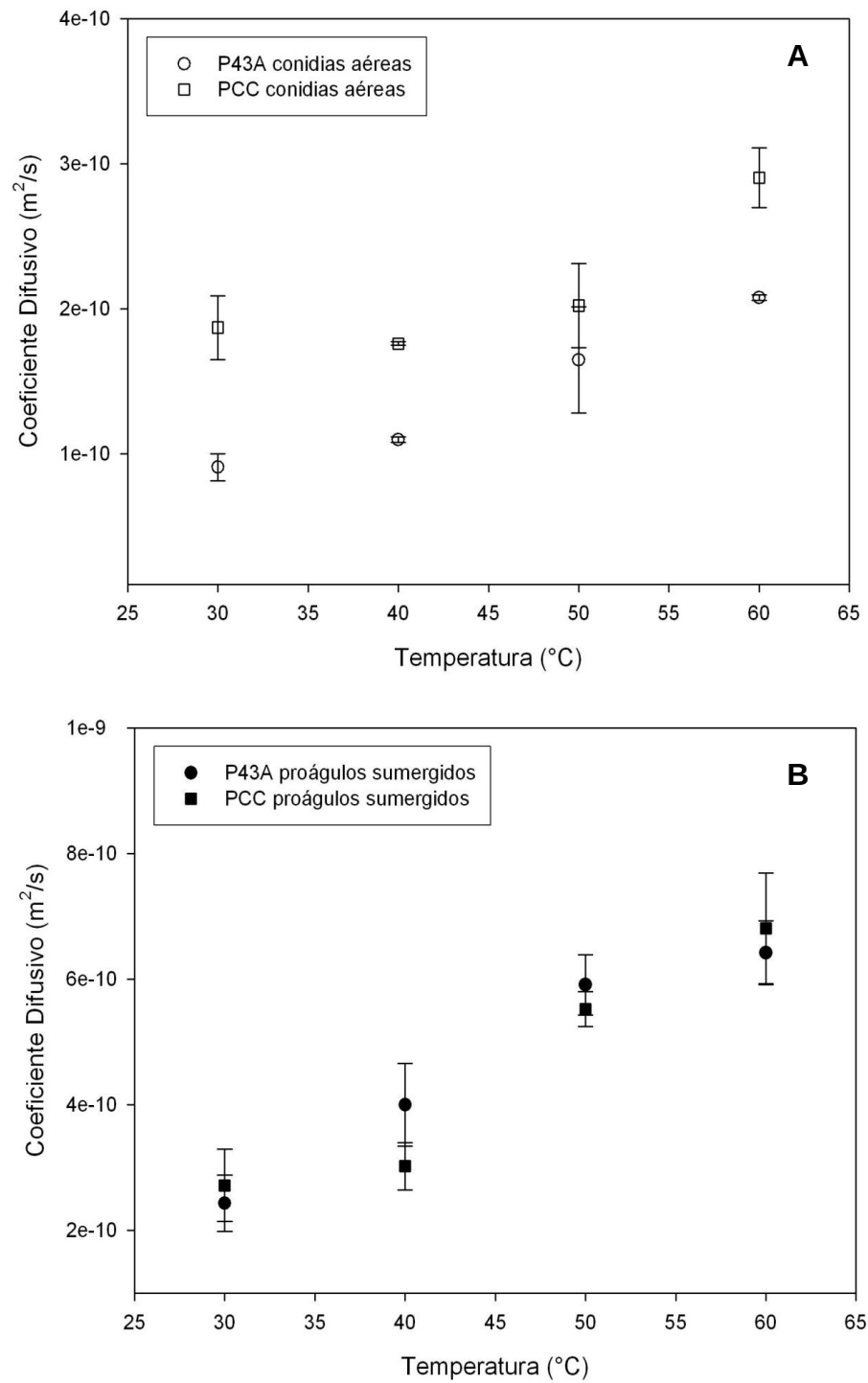


Figura 4.10 Coeficientes difusivos de secado a diferentes temperatura de A) conidias aéreas y B) propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

4.4.3 Efecto de la temperatura de secado en la sobrevivencia

La Figura 4.11 muestra el Índice de sobrevivencia al secado a distintas temperaturas para conidias aéreas y propágulos sumergidos de ambas. Ambas cepas presentaron a 30°C un mayor índice de sobrevivencia, y el menor índice a 60°C para cada una de las cepas. Las cepas P43A y PCC aéreas presentan un mayor índice de sobrevivencia que las cepas sumergidas. La cepa PCC aérea tuvo un mayor índice de sobrevivencia respecto a la cepa P43A aérea en las temperaturas de secado de 50 y 60°C.

Ambas cepas presentan diferencias significativas en cada una de las temperaturas de secado por la comparación de medias de Tukey ($p < 0.001$), pero el índice de sobrevivencia a la temperatura de 40°C no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$). Los índices de sobrevivencia para cada una de las cepas se ajustan a un modelo lineal (Figura 4.11).

4.4.4 Efecto de la temperatura de secado en la germinación

La Tabla 4.4 muestra el efecto de la temperatura de secado en la germinación, después del tratamiento de secado. Los propágulos sumergidos presentaron un menor tiempo de germinación en relación a las conidias aéreas excepto los de P43A secados a 60°C.

Los propágulos sumergidos y las conidias aéreas de PCC secados a 30 o 40°C germinaron más rápido que los de P43A, pero a 50°C y 60°C los tiempos de germinación fueron iguales para ambas cepas, excepto en el caso de los propágulos sumergidos de P43A que después del secado a 50°C tardaron 10 h en germinar.

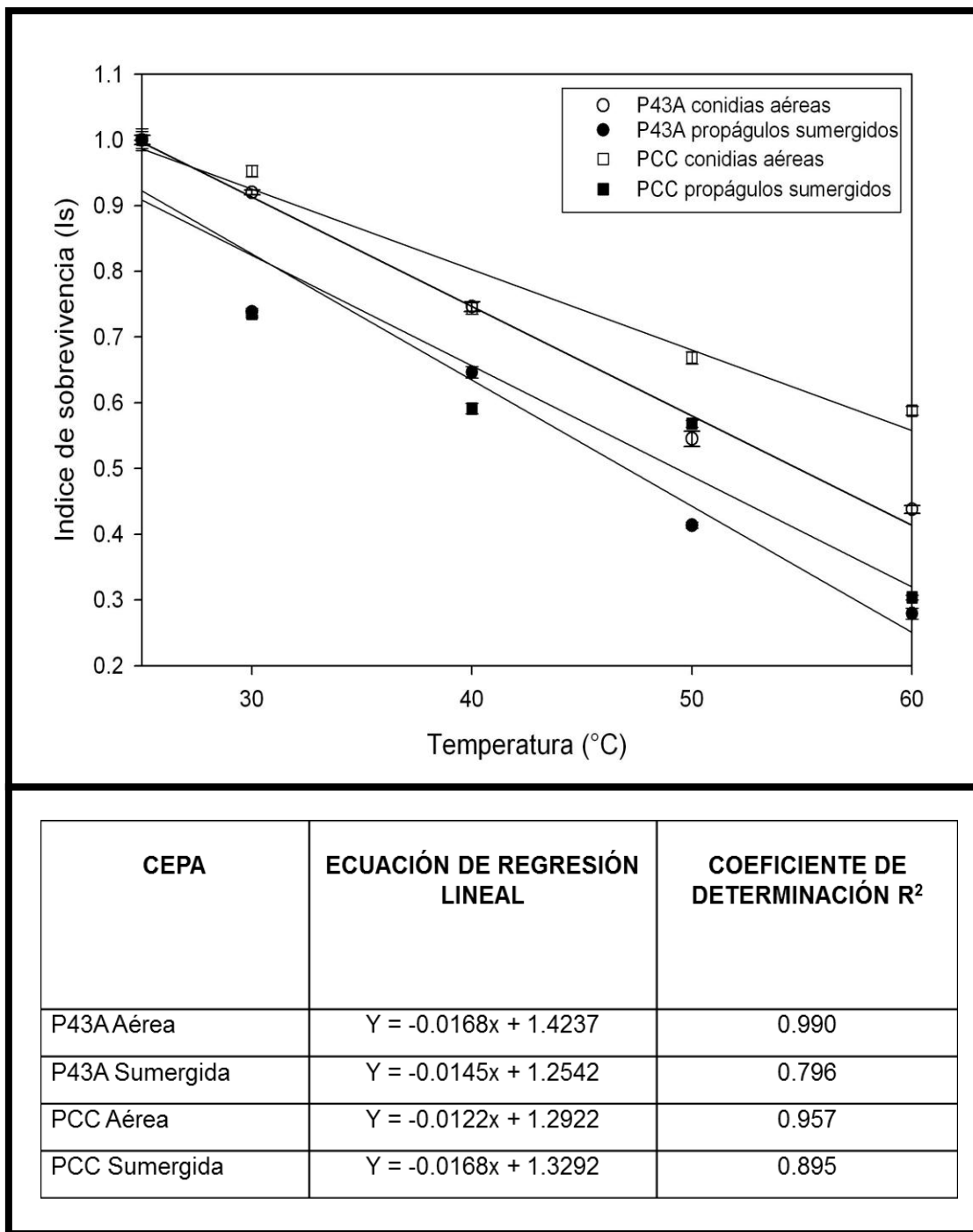


Figura 4.11 Índices de sobrevivencia a diferentes temperaturas de secado con convección de aire de esporas de *I. fumosorosea* de las cepas P43A y PCC producidas en cultivos sólido ó sumergido.

Tabla 4.4 Efecto de la temperatura de secado en el tiempo de germinación de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

CEPAS				
Temperatura °C	Tiempo de Germinación en horas			
	P43A Conidias aéreas	P43A Propágulos sumergidos	PCC Conidias aéreas	PCC Propágulos sumergidos
Control	6	4	5	3
30	6	4	5	3
40	6	4	5	3
50	5	4	5	4
60	5	10	5	4

4.4.5 Temperatura letal 50 ($T_{empL_{50}}$)

La Tabla 4.5 muestra la temperatura letal 50 ($T_{empL_{50}}$), es decir la temperatura a la que el 50% de las esporas mueren. Tanto las conidias aéreas como los propágulos sumergidos de la cepa PCC resistieron mejor el secado que los de P43A. El análisis estadístico de la comparación de medias de Tukey mostró que tanto las conidias aéreas y sumergidas de cada una de las cepas tuvieron diferencias significativas en sus $T_{empL_{50}}$ ($p < 0.001$).

4.4.6 Coeficientes difusivos de secado y el Índice de sobrevivencia al secado

La Figura 4.12 muestra la relación del índice de sobrevivencia y los coeficientes de difusión del secado a las temperaturas de 30, 40, 50 y 60°C. de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea*. En esta figura se observa que el índice de sobrevivencia es inversamente proporcional al incrementarse los coeficientes de

difusión con la temperatura de secado y que para el mismo coeficiente de difusión la sobrevivencia es similar para las conidias aéreas y los propágulos sumergidos, con la reserva de que solo se pueden comparar en un estrecho intervalo en el que los coeficientes son similares, porque los coeficientes de difusión de los propágulos sumergidos fueron mayores que los de las conidias aéreas.

Tabla 4.5 Temperatura letal 50 ($T_{empL_{50}}$) de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC secadas con aire a 30, 40, 50 y 60°C.

CEPA	$T_{empL_{50}} \pm DE^*$
P43A Conidias aérea	54.88 $\pm$ 0.4271 a
P43A Propágulos sumergidos	47.00 $\pm$ 0.0975 b
PCC Conidias aéreas	64.76 $\pm$ 0.2818 c
PCC Propágulos sumergidos	49.43 $\pm$ 0.1589 d

*Letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes $\alpha = 0.05$

4.5 Irradiación Ultravioleta

4.5.1 Efecto de la irradiación UV_{366 nm} en la sobrevivencia

La Figura 4.13 muestra el efecto de la dosis de irradiación a 366 nm sobre el índice de sobrevivencia. La irradiación a esta longitud de onda tuvo poco efecto sobre la viabilidad de las conidias aéreas y propágulos sumergidos de ambas cepas, después de una exposición por 24 horas a la una dosis máxima probada (822.88 J/cm²) el índice de sobrevivencia fue mayor a 0.9. Los tiempos de germinación después de una exposición por 24h a una dosis fueron muy similares a los del control (Tabla 4.6).

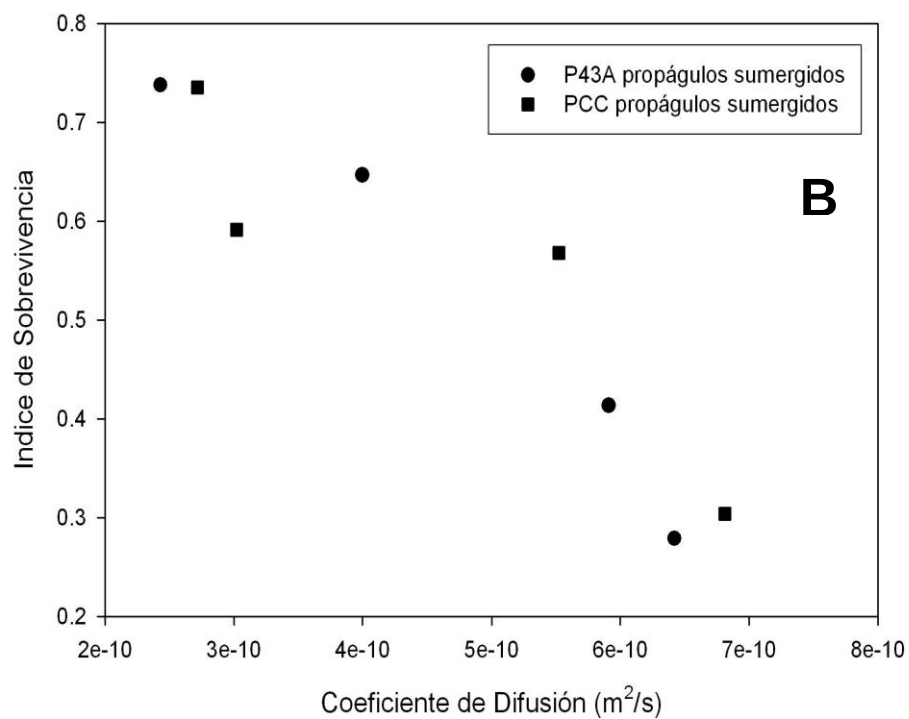
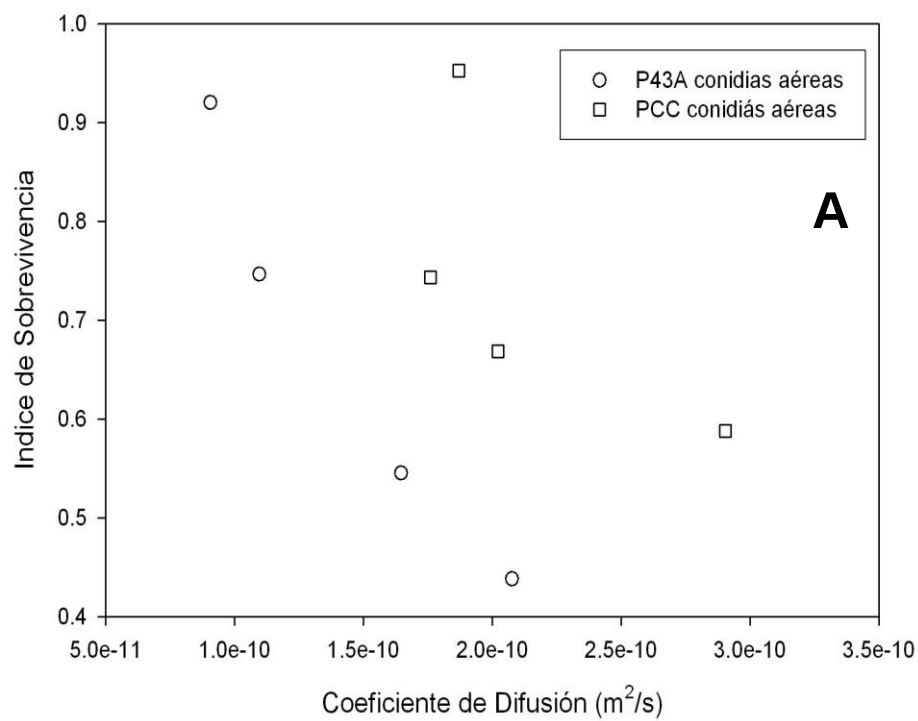


Figura 4.12 Coeficientes de difusión de secado e índice de sobrevivencia de A) conidias aéreas y B) propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

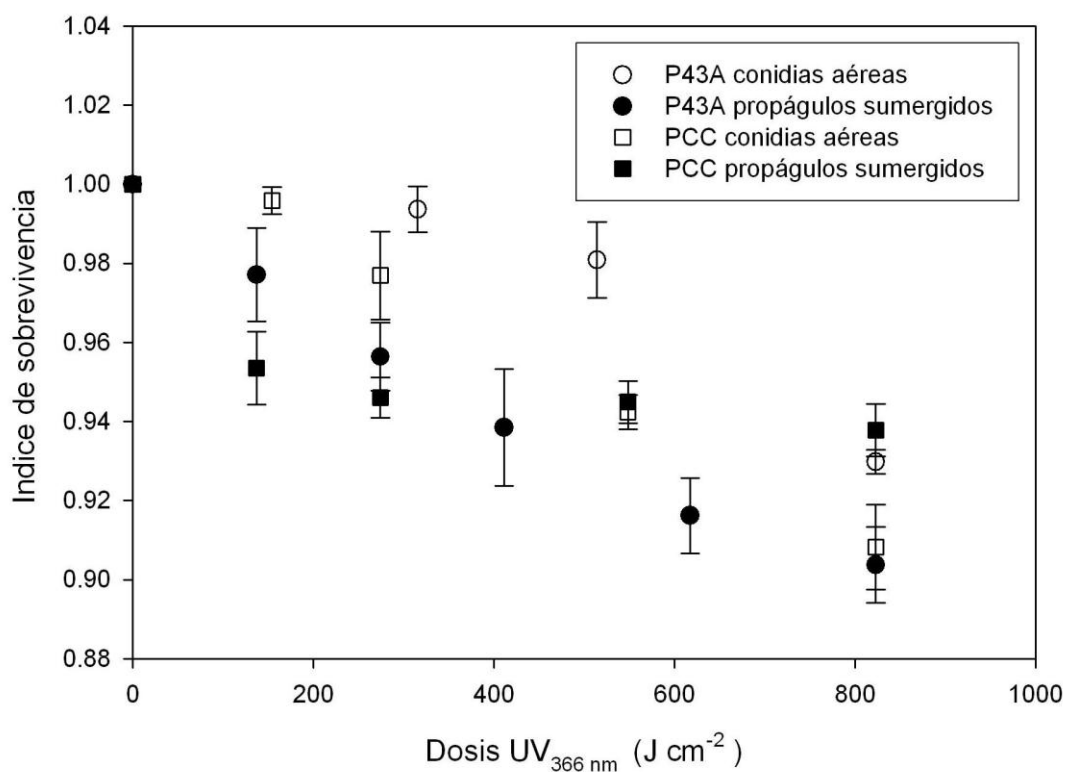


Figura 4.13 Efecto de la irradiación UV_{366 nm} en la sobrevivencia de conidias aérea y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

Tabla 4.6 Efecto de la irradiación UV_{366 nm} en el tiempo de germinación después de irradiar las conidias aéreas y los propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC por 24 h a una dosis de 822.88 J/cm².

IRRADIACIÓN UV 366 nm	P43A conidias aéreas	P43A propágulos sumergidos	PCC conidias aéreas	PCC propágulos Sumergidos
Dosis (J/cm ²)/ horas de exposición	Tiempo Germinación (h)	Tiempo Germinación (h)	Tiempo Germinación (h)	Tiempo Germinación (h)
Control (NI)	7	3	5	3
822.88 / 24	8	3	6	3

NI = No Irradiado

4.5.2 Efecto de la irradiación UV_{254 nm} en la sobrevivencia

La Figura 4.14 muestra el efecto de la irradiación ultravioleta a 254 nm sobre la viabilidad de las conidias aéreas y propágulos sumergidos de las cepas P43A y PCC. Las conidias aéreas de ambas cepas fueron más resistentes a la radiación que los propágulos sumergidos a dosis hasta 11.42 J/cm² por un tiempo de 5 a 20 minutos, a dosis mayores todas las esporas fueron muy sensibles y el índice de sobrevivencia disminuyó de menos de 0.2 hasta valores cercanos a 0.1.

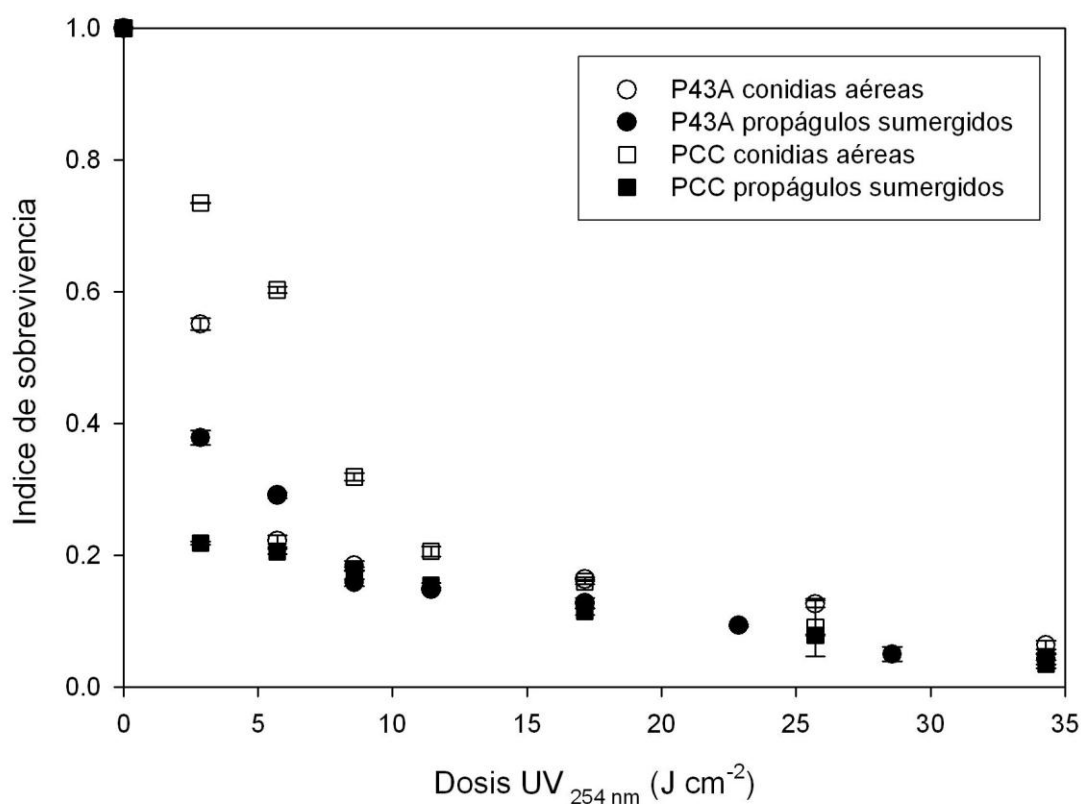


Figura 4.14 Efecto de la irradiación UV_{254 nm} en la sobrevivencia de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

4.5.3 Efecto de la irradiación UV_{254 nm} en la germinación

La radiación UV₂₅₄ tuvo un mayor efecto sobre las esporas de la cepa PCC que sobre las de la cepa P43A. En esta última cepa el tiempo de germinación fue el mismo independiente del tiempo y dosis de radiación, tanto para las conidias aéreas como para los propágulos sumergidos. Las conidias aéreas de PCC presentaron el mismo comportamiento mientras que para los propágulos sumergidos el tiempo de germinación se incrementó al incrementar la dosis de radiación (Tabla 4.7).

Tabla 4.7 Efecto de la radiación UV_{254 nm} en el tiempo de germinación de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC

IRRADIACIÓN UV 254 nm	P43A Conidias aéreas	P43A Propágulos sumergidos	PCC Conidias aéreas	PCC Propágulos sumergidos
Dosis (J/cm ²) / minutos de exposición	Tiempo germinación (h)	Tiempo germinación (h)	Tiempo germinación (h)	Tiempo germinación (h)
Control (NI)	7	4	7	4
8.57 / 15	7	18	22	9
17.14 / 30	7	18	22	9
25.71 / 45	7	18	22	20
34.28 / 60	7	18	22	20

4.5.4 Dosis letal 50 y tiempo letal 50 de la irradiación con luz UV a 254 nm

La Tabla 4.8 muestra la dosis letal 50 (DL₅₀) y el tiempo letal 50 (T_{imeL50}) al irradiar las conidias de *I. fumosorosea* con luz UV_{254 nm}. Las conidias aéreas de las cepas PCC y P43A fueron más resistentes a esta radiación que los propágulos sumergidos,

siendo más resistentes los de la cepa PCC. Sin embargo en el caso de los propágulos sumergidos, los de la cepa P43A tuvieron mayor resistencia. La diferencia de medias por la prueba de Tukey Kramer para cada tipo de esporas y para cada cepa mostró diferencias significativas entre cada una de ellas ($p < 0.05$).

Tabla 4.8 Dosis letal 50 (DL_{50}) y tiempo letal 50 ($T_{imeL_{50}}$) de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC irradiadas con luz UV de 254 nm.

CEPA/esporas	$DL_{50} (j/cm^2) \pm DE^*$	$T_{imeL_{50}} (minutos) \pm DE^*$
P43A / conidias aéreas	3.5235 ± 0.0525 a	6.1642 ± 0.0897 a
P43A /propágulos sumergidos	2.2996 ± 0.0430 b	4.0243 ± 0.0682 b
PCC/ conidias aéreas	6.7494 ± 0.0604 c	11.8045 ± 0.1067 c
PCC/ propágulos sumergidos	1.8286 ± 0.0053 d	3.1935 ± 0.0047 d

*Letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes $\alpha = 0.05$.

4.6 Factores biológicos relacionados con la resistencia a la temperatura e irradiación

4.6.1 Trehalosa

La Figura 4.15 muestra la concentración de trehalosa en las conidias aéreas y propágulos sumergidos de las cepas P43A y PCC. Los datos sugieren que las conidias aéreas de la cepa P43A tuvieron una mayor concentración de trehalosa

aunque de acuerdo a la prueba de Tukey no se hubo diferencias significativas entre el tipo de esporas ni entre las cepas, debido a la dispersión de los datos. ($p>0.05$).

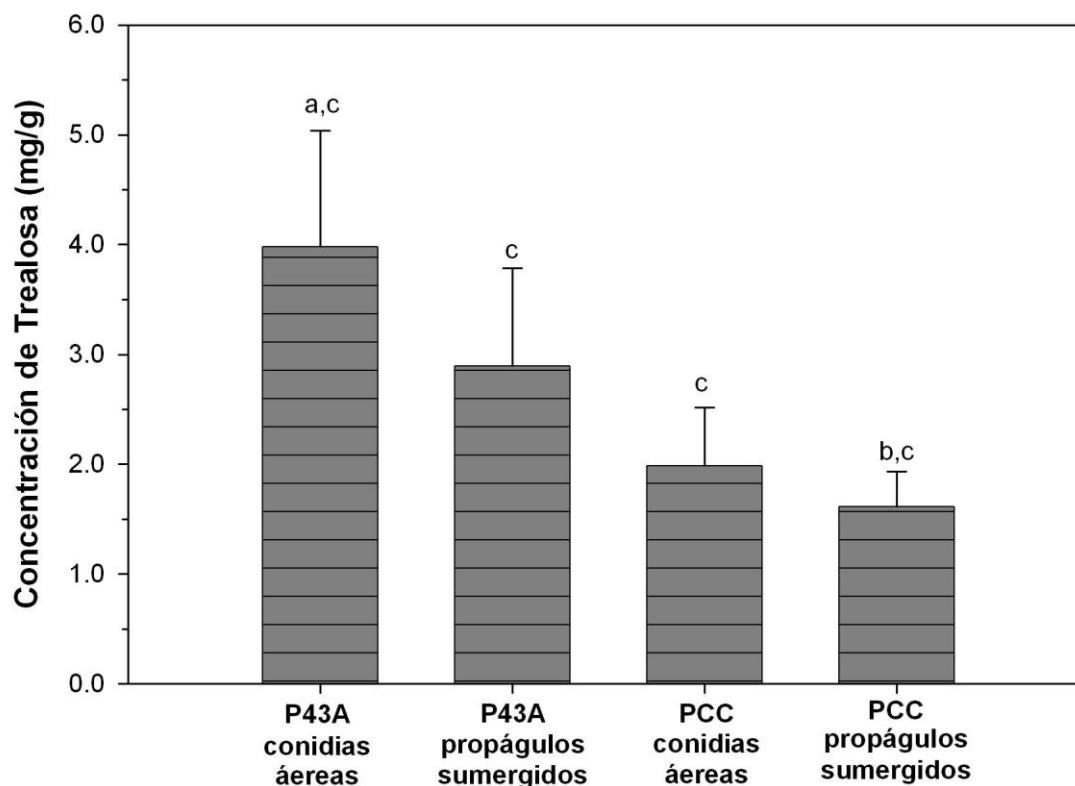


Figura 4.15 Concentración de trehalosa en conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

4.6.2 Manitol

La Figura 4.16 muestra la concentración de manitol de las conidias aéreas y propágulos sumergidos de las cepas P43A y PCC. En esta figura podemos observar que los propágulos sumergidos de la cepa PCC tuvieron la mayor concentración de manitol y que no hubo diferencia significativa en cuanto a la concentración de este compuesto entre las otras esporas ($p>0.05$).

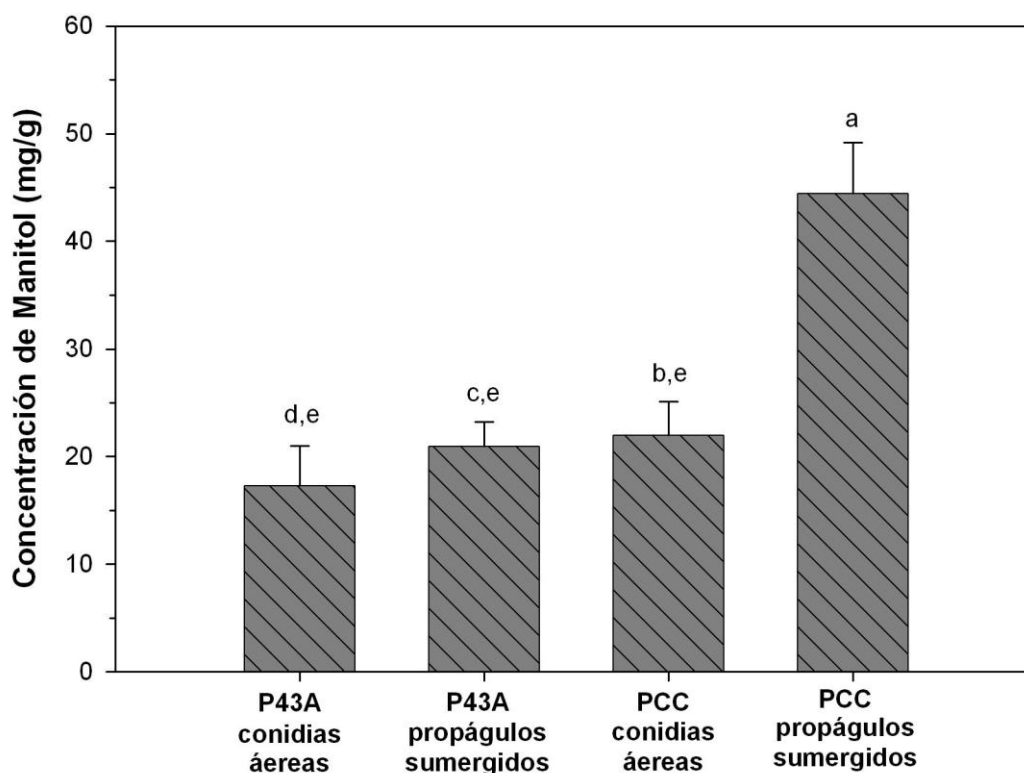


Figura 4.16 Concentración de manitol de conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

4.6.3 Glicerol

La Figura 4.17 muestra las concentraciones de glicerol de las conidias aéreas y propágulos sumergidos de las cepas P43A y PCC. La mayor concentración de glicerol se encontró en las conidias aéreas de la cepa P43A y el análisis estadístico de comparación de medias por la prueba de Tukey mostro diferencias significativas ($p < 0.001$) entre las concentraciones de glicerol de los propágulos sumergidos de la cepa P43A así como con las esporas de la cepa PCC; mientras que entre estos últimos no hubo diferencias significativas entre ellos ($p < 0.05$).

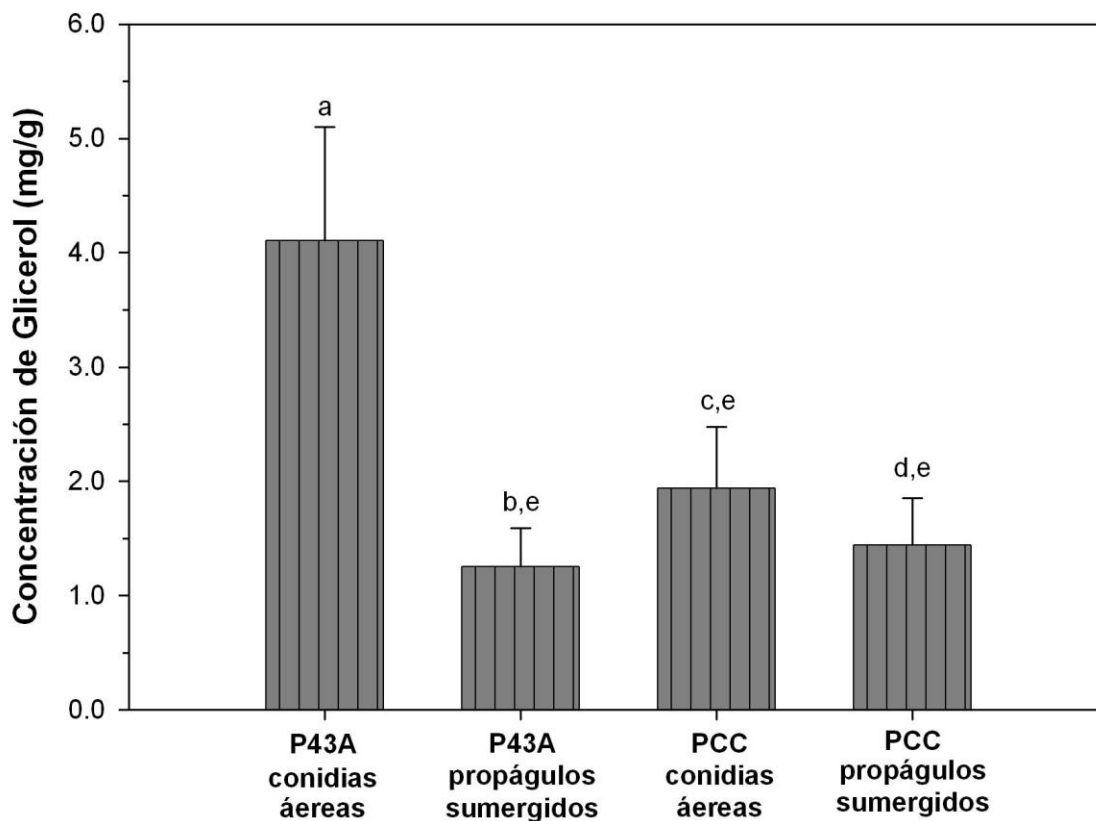


Figura 4.17 Concentración de glicerol en conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

4.6.4 Melanina

La Figura 4.18 muestra la concentración de melanina de las conidias aéreas y propágulos sumergidos de las cepas P43A y PCC. Las conidias aéreas de la cepa P43A presentaron la mayor concentración de este pigmento, seguidas por los propágulos sumergidos de la misma, mientras que las esporas de PCC tuvieron menor concentración, y al igual que en el caso de P43A la concentración fue mayor en las conidias aéreas. El análisis estadístico de diferencia de medias por Tuckey mostro diferencias significativas en la concentración de melanina en cada de cada una de las cepas ($p < 0.001$).

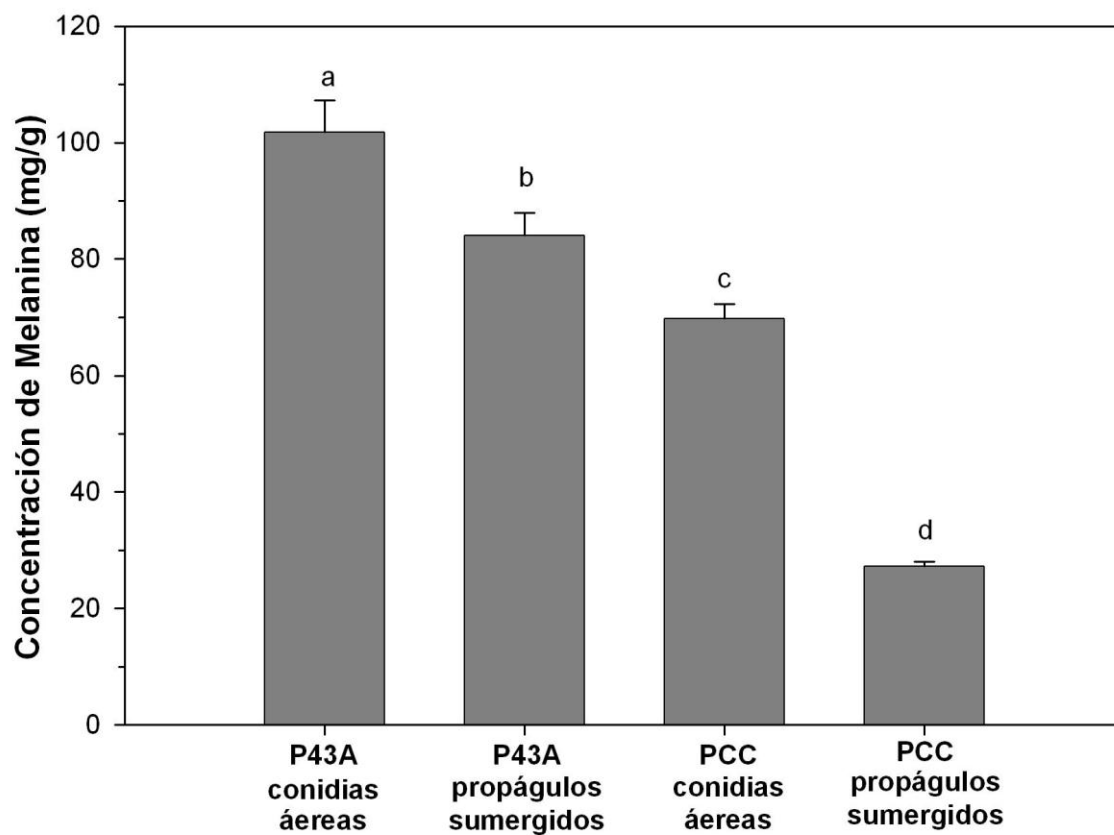


Figura 4.18 Concentración de melanina en conidias aéreas y propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* cepas P43A y PCC.

CAPÍTULO

5

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La temperatura es un importante factor abiótico que restringe el uso de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico de insectos. La tolerancia de temperatura de algunos aislados de hongos está relacionada con su origen geográfico. Aislados de hongos de climas templados de Europa mostraron una óptima velocidad de crecimiento de 20 a 25 °C, mientras que aquéllos de zonas subtropicales húmedas o secas del sur de Estados Unidos y los provenientes del trópico húmedo del oeste de Asia mostraron un óptimo crecimiento de 25 a 28 °C [90, 28, 17].

Las cepas P43A y PCC crecen más rápido en medio líquido que en medio sólido, aunque el efecto positivo de la temperatura sobre μ fue ligeramente más pronunciado para PCC que para P43A en medio sólido. En cultivo sumergido, ambos aislados tienen una temperatura óptima de crecimiento de 28 °C, la cual es similar a la de los aislados del trópico húmedo de Asia occidental [90]. Aunque ambas cepas crecen rápido en el sistema de cultivo sumergido, la cepa P43A fue la más rápida (Figura 4.2). El metabolismo del hongo cambia de acuerdo al sistema de cultivo usado y morfología de crecimiento del hongo, esférulas o micelio disperso, grado de ramificación de las hifas, longitud de las hifas, etc. Esto es debido a la difusión de sustratos y metabolitos, incluyendo la difusión de gases tales como O₂ y CO₂, dentro de la colonia formada en la superficie de un soporte sólido o los agregados en un cultivo sumergido [66, 71, 9]. En cultivo sumergido, ambos aislados crecen como micelio disperso a 20, 23, 25 y 28 °C, mientras que a 30, 32 y 34 °C, los aislados formaron esférulas cuyo tamaño incrementó con el incremento de temperatura. El micelio disperso tiene mayor área de contacto que las esférulas, lo que facilita la difusión de nutrientes, gases y metabolitos. Moura y col., [62] encontraron que *I. fumosorosea* e *I. farinosa* formaron esférulas en cultivos sumergido a 27 ± 0.5 °C después que transcurrieron 24 horas de la inoculación, y su tamaño incrementó con

la edad del cultivo. Los autores usaron como medio basal Papa Dextrosa y le adicionaron arroz, melaza y extracto de levadura.

A altas temperaturas la velocidad específica de crecimiento neta, es decir la diferencia entre la velocidad específica de crecimiento y la velocidad específica de muerte, de los microorganismos decrece como resultado de la muerte ocasionada entre otros por la desnaturalización de proteínas y otras biomoléculas, además de que la población requiere más energía para el mantenimiento [36]. También encontramos que la temperatura afecta la morfología de los aislados, los cuales forman esférulas a temperaturas más altas que la óptima de crecimiento; por lo tanto, la difusión de nutrientes, gases y metabolitos hacia el centro del agregado disminuye y esto de igual manera puede contribuir al decremento de la μ [67, 88]. Para ambos aislados, el decremento de μ al incrementar la temperatura por arriba de la óptima fue menor en cultivo sólido comparado con el cultivo sumergido, lo cual sugiere que los hongos son más sensibles a la temperatura a medida que crecen más rápido.

Es difícil contrastar nuestros resultados con otros reportes, porque en ellos se utilizaron diferentes medios de cultivo y condiciones de cultivo, así como distintas cepas de *Isaria*. Asaff y col. [9] cultivaron *I. fumosorosea* cepa Pfrd en medio mínimo suplementado con 20 g/L de glucosa y 7 g/L de glutamato mono sódico monohidratado a 27°C, en estas condiciones de cultivo, la máxima concentración de biomasa fue 3.85 g/L, mientras el rendimiento de biomasa en glucosa fue 0.19 y $\mu_{\max}=0.114\text{ h}^{-1}$. Cuando *I. fumosorosea* cepa 92117 fueron cultivada con maltosa o glucosa como única fuente de carbono se obtuvieron una $\mu_{\max}=0.017\text{ h}^{-1}$ ó $\mu_{\max}=0.265\text{ h}^{-1}$, respectivamente a 25°C [87]. La cepa P43A crece más rápido a 28°C que la cepa PCC y nuestros resultados sugieren que está mejor adaptada a crecer en cultivo sumergido.

La concentración de nitrógeno orgánico afecta la relación de blastosporas:conidias en cultivo sumergido. En un medio con 13.2 g/L de casaminoácidos y 80 g/L de glucosa, *I. fumosorosea* cepa Mycotech 612 produce una alta concentración de

biomasa y forma blastosporas predominantemente, pero cuando la concentración de casaminoácidos fue reducida diez veces, se obtiene una concentración de biomasa muy baja, predominando conidias. Estos resultados sugieren que la concentración de nitrógeno orgánico favorece la producción de blastosporas [20]. Puesto que el medio mínimo utilizado en este trabajo contienen únicamente nitrato de amonio como fuente de nitrógeno, era de esperarse que la morfología dominante fueran las conidias. La relación blastosporas:conidias fue de 1:5 para la cepa P43A y 1:2 para PCC, lo cual sugiere que esta relación depende de las características genéticas del aislado entre las especies. Se ha reportado que las conidias sumergidas son más resistentes a altas temperaturas y más resistentes a desecación que las blastosporas y que las primeras son hidrofílicas y germinan más rápido que las conidias aéreas; en consecuencia, estas conidias presentan la ventaja de poder aplicarlas en forma acuosa [48].

Las conidias aéreas y sumergidas de la cepa PCC fueron más letales para las larvas del último instar que *G. mellonella*. Múltiples autores han encontrado que la letalidad tiene correlación con la velocidad de germinación de las esporas [90]. La relación de blastosporas:conidias en el cultivo sumergido de la cepa PCC fue 1:2 comparado de 1:5 para la cepa P43A, indicando que el alto contenido de blastosporas puede contribuir a incrementar la patogenicidad de los propágulos sumergidos de la cepa PCC dado que las blastosporas germinan más rápido que las conidias [86]. Además, los propágulos sumergidos de PCC (secados con aire a 40°C) germinaron después de 3 h, mientras que los de P43A germinaron en 4 h. Las conidias aéreas de PCC fueron los más letales, que los de la cepa P43A, aunque P43A produce más proteasas en cultivo sólido que la cepa PCC y se ha reportado que estas enzimas juegan un papel importante en la penetración del huésped, ya que la composición de la cutícula del insecto está formada de 70% de proteína [4, 74]. El valor de LT_{50} fue similar para las conidias aéreas y propágulos sumergidos de la cepa P43A y para los propágulos de PCC, pero esta última produce más proteasas en cultivo sumergido. Así que nuestros resultados no muestran una correlación entre la actividad de proteasas y la letalidad de las esporas en ensayos

de laboratorio. Habría que profundizar más sobre este aspecto y realizar pruebas de campo.

Los índices de quitinasa de la cepa P43A y PCC así como el índice de proteasas en cultivo sólido (Tabla 4.1) fueron más altos que los obtenidos por St Leger y col., [80] para cepas de *V. lecanii*, *B. bassiana* y *M. anisopliae* (1.1 a 1.7 para proteasas y 1.0 a 1.2 para quitinasas). Valadares-Inglis y Azevedo [85] evaluaron la producción de proteasas en 40 segregantes de clonas recombinantes prototróficas inestables, originadas de los cruces entre las cepas E₆₋₇ (*trp⁺ met⁺ bio⁻*) y E₆₋₈ (*trp⁺ pyr⁻ lys⁻*) de *Metarhizium anisopliae* en medio sólido; obteniendo índices de proteasas similares a los de P43A y PCC. Hegedus and Khachatourians [42] reportaron una alta actividad de lipasa cuando *B. bassiana* creció con ácidos grasos palmítico, esteárico y oleico el aceite de oliva es rico en estos ácidos y por ende puede inducir la actividad de lipasa, como lo confirman nuestros resultados [42]. En los cultivos sumergidos de las cepas P43A y PCC, la actividad de proteasa inicia primero a las 18 horas y la actividad de lipasa después a las 72 horas; esta actividad secuencial fue reportada previamente por otros investigadores [42, 24]. En cultivo sólido, ambas cepas producen actividad de lipasas similares, mientras que P43A produce 1.5 veces más proteasas. En cultivo sumergido, la actividad de proteasas fue similar para ambas cepas, pero PCC produce más lipasas que P43A. Estos resultados indican que el sistema de cultivo afecta la producción de cada enzima extracelular de forma diferente. En contraste, Viniegra-González y col., [88] encontró que la producción de invertasa, pectinasa y tanasa en *Aspergillus niger* fue más alta en cultivo sólido que en cultivo sumergido. De ahí que, nosotros sugerimos que el efecto del sistema de cultivo sobre la producción de enzima es altamente dependiente de la cepa. Delgado Blandon y col. [24] han sugerido que la variabilidad en la producción enzimática está relacionada a un conjunto de diferentes causas como son la variabilidad genética, la ecología, la fisiología de los hongos y la de los insectos así como la resistencia que presenta el insecto hacia los hongos entomopatógenos. A pesar de que la cepa PCC no fue la mejor productora de las enzimas involucradas en la degradación de la cutícula y de que hubo diferencias en la producción de éstas en cultivo sólido y en

cultivo sumergido, las conidias aéreas y los propágulos sumergidos de la cepa PCC fueron más letales en las condiciones de laboratorio probadas. Por lo que la actividad enzimática *in vitro* de enzimas degradadoras de la cutícula del insecto no puede ser utilizado de manera aislada como criterio para la selección de cepas para la producción de micoinsecticidas.

Las curvas de secado obtenidas para las conidias aéreas y los propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* (Figura 4.9) siguen los patrones típicos para la deshidratación de alimentos descritas por Geankoplis [34]. La pérdida de humedad al deshidratar materiales biológicos se describe generalmente en función del tiempo en términos de un decaimiento exponencial. En estas curvas de secado se puede observar que para cada una de las cepas a las diferentes temperaturas de secado se da una primera fase correspondiente al calentamiento de la biomasa, se caracteriza por un incremento de temperatura en las capas superficiales de la biomasa con un decremento despreciable del contenido de humedad. La duración es función de la temperatura a la que es sometida la muestra. La segunda etapa se caracteriza por la disminución a velocidad constante de la humedad existente en el interior de la muestra, en este punto comienza a avanzar el frente térmico hacia el interior de la muestra. La humedad extraída en esta etapa es la humedad existente en forma de agua libre y de vapor de agua por los mecanismos de capilaridad y difusión para el agua libre ubicada en el interior de las células y en los espacios intercelulares; así como por la convección y difusión del vapor de agua ubicado en los espacios vacíos entre las células. En esta etapa se puede observar en las gráficas que al incrementarse la temperatura de secado se incrementa la pendiente de la curva de deshidratación, lo que trae como consecuencia una disminución en el tiempo de secado. En esta etapa se da una combinación de dos factores: a) El incremento de la temperatura de la biomasa y del coeficiente de difusión del agua, consiguiendo que la velocidad de secado sea apreciablemente mayor b) Al incrementarse la temperatura, la humedad relativa del aire es menor, lo que aumenta su capacidad para absorber agua, favoreciendo la remoción de la humedad. Finalmente en la tercera fase en donde en la gráfica se aprecia la disminución de la velocidad de

secado, esta fase comienza cuando toda el agua que existía en forma de agua libre y vapor de agua ha sido extraída, y corresponde a la extracción del agua ligada, que se encuentra en la célula. Esta agua es extraída mediante la difusión superficial del agua a través de sus paredes celulares [69]. En la Tabla 4.3 se registró el tiempo de equilibrio de secado para cada una de las cepas a cada temperatura de secado cuando alcanzó esta última fase de secado.

El índice de sobrevivencia (Is) disminuye al incrementarse la temperatura de secado porque la pérdida del agua unida afecta la estructura de proteínas y otras moléculas y entre más rápido sea este proceso disminuye la posibilidad de estabilizarlas para evitar la muerte de la célula (Figura 4.11). La resistencia a la deshidratación de los organismos depende, entre otros; de la presencia de moléculas que estabilizan la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas como la trehalosa y poliholes [38]. Las conidias aéreas de la cepa PCC presentaron una mayor resistencia al secado, seguidas por las de P43A y los propágulos sumergidos fueron menos resistentes.

Cabe mencionar que las temperaturas máximas promedio en verano en los estados de Sinaloa y Sonora de donde son nativas las cepas en estudio se encontró que son de 35°C para Sinaloa y de 37°C para Sonora en el período de tiempo de los años 2009 a 2012 (Anexos 3A y 3B), las cuales están muy por debajo de la T_{emL50} , reportadas en este estudio (Tabla 4.5), lo cual sugiere que estas cepas aéreas o sumergidas tendrías la posibilidad de sobrevivir a dichas temperaturas en el campo.

Las temperaturas máximas diarias que se registraron en los meses de junio a agosto van de 32 a 47 °C. A partir de las 17:00 h hasta las 20:00 h se registra la radiación más alta. Las temperaturas más altas se mantienen de las 20:00 h a 0:00 h y se registró un descenso de temperatura de las 0:00 h hasta las 2:00 AM. Siendo las horas más adecuadas para aplicar el micoinsecticida de las 2:00 a las 5:00 AM, ya que a esas horas se registraron temperaturas de 28 °C a 25 °C, lo cual le permitiría germinar a las unidades infectivas mucho antes de que se alcancen de nuevo las

temperaturas máximas, teniendo un margen de 12 a 18 horas (Servicio Meteorológico Nacional).

Es difícil contrastar nuestros resultados de sobrevivencia al secado, ya que no se encontraron reportes de cinéticas de secado con convección de aire de conidias de hongos entomopatógenos. Sin embargo Jackson y col. [46] realizaron estudios sobre el secado de blastosporas de *I. fumosorosea* producidas en un medio a base de glucosa (80 g/L) y casaminoácidos (13.2 g/L). Las blastosporas fueron secadas sobre un papel filtro toda la noche a temperatura ambiente hasta obtener de 1 a 5% de humedad en estas condiciones se obtuvo un 79% de sobrevivencia después del secado. Sandoval-Coronado y col. [75], prepararon una formulación de blastosporas producidas en medio LM1 con arcilla de caolín calcinado y fueron secadas con aire a temperatura ambiente de 26 a 28°C toda la noche, obteniéndose una sobrevivencia de 95%. En nuestro caso los propágulos sumergidos de P43A tuvieron un porcentaje de sobrevivencia mayor al 90% al ser secados a 30°C, mientras que los de PCC, que tenían un mayor porcentaje de blastosporas la sobrevivencia fue menor, sin embargo no se utilizó ningún protector por lo que es posible que la sobrevivencia se incremente aún más al utilizar un agente protector durante el secado [30, 68, 76]

Ambas cepas fueron propagadas en condiciones óptimas de cultivo para producir las esporas y cuantificar trehalosa y polialcoholes. El manitol predominó en las conidias aéreas y en los propágulos sumergidos, y es considerado como un compuesto de reserva, el cual se metaboliza durante la germinación de la espora. Hallsworth y col. [38], estudiaron el efecto de la concentración de varios carbohidratos como fuentes de carbono en el contenido de polialcoholes y trehalosa en las conidias de *Paecilomyces farinoso*, y encontraron que al incrementar la concentración de glucosa y almidón en el medio de cultivo, la producción de trehalosa y manitol en las conidias disminuía. Cuando el medio tenía 50 g/L de glucosa, se encontraron en las conidias aproximadamente 40 mg/g de manitol y menos de 5 mg/g de trehalosa y glicerol. A la misma concentración de glucosa los propágulos sumergidos de PCC tuvieron un contenido de 1.61, 2.89 y 20.95 mg/g de trehalosa, glicerol y manitol respectivamente, mientras que los de P43A tuvieron

1.25, 1.44 y 44.42 mg/g Los valores obtenidos en esta investigación son cercanos a los obtenidos por Hallsworth y col. [38], excepto por manitol obtenido en la cepa P43A sumergida que fue la mitad de lo que obtuvieron estos investigadores. Las conidias aéreas de *P. farinoso* cultivadas con concentraciones de almidón entre 50 y 142 g/L (5-14.2%) en el medio de cultivo produjeron 23 mg/g de manitol, 5 mg/g de trehalosa y 2 mg/g de glicerol [38]. Mientras que las conidias aéreas de P43A y PCC cultivadas en medio de agar arroz (con 70 a 80% de almidón) produjeron 17.28 y 21.95 mg/g de manitol, 3.97 y 1.98 mg/g de trehalosa y 4.10 y 1.93 mg/g de glicerol respectivamente (Figuras 4.15, 4.16 y 4.17). Los poliholes tienen el papel de ajustar la presión osmótica dentro de las conidias de hongos entomopatógenos y se consideran que aquellos de bajo peso molecular como glicerol y eritritol son los más efectivos en relación con los compuestos de alto peso molecular como manitol [39]. Durante el almacenamiento de conidias de *A. japonicus* por un período de 4 a 52 días, su contenido de manitol disminuyó mientras que el de trehalosa se incrementó [83, 51]. El disacárido trehalosa es considerado como un estabilizador de las membranas celulares ya que puede reemplazar agua en dichas membranas a a_w reducidos, y también es capaz de estabilizar la estructura de proteínas durante la desecación [38]. Estos compuestos han sido asociados con la resistencia a condiciones ambientales extremas, la germinación acelerada, y que incrementan la patogenicidad así como la vida de anaquel de los propágulos del hongo [39]

Dado que las esporas obtenidas en este trabajo fueron producidas en condiciones óptimas de crecimiento y que no se cuantificó en las mismas trehalosa, manitol ni glicerol después del secado, no es posible relacionar los contenidos de estos compuestos con la resistencia al secado.

La radiación UV₃₆₆ por un tiempo de 24 horas con una dosis de energía de 822.88 J/cm² no fue letal para las esporas de los aislados y tuvo muy poco efecto sobre su viabilidad (Figura 4.13) y los tiempos de germinación no se vieron afectados (Tabla 4.6). Esta radiación generalmente causa daño indirecto al DNA y se pueden desencadenar procesos oxidativos donde se generen especies reactivas del oxígeno

que pueden causar el daño a las proteínas celulares, lípidos, y carbohidratos. También pueden generarse especies reactivas de nitrógeno y este exceso de radicales libres provoca una cascada de eventos que propician un deterioro progresivo de las estructuras y funciones celulares [44, 12, 35].

Aunque la radiación ultravioleta de longitud de onda de 254 nm fue la más perjudicial, las conidias aéreas fueron las más resistentes a esta radiación que las sumergidas y la cepa PCC aérea fue la que mantuvo la mayor viabilidad. Algunos investigadores coinciden en que la exposición de las conidias de los hongos entomopatógenos a esta radiación retarda el tiempo de germinación y afecta también su sobrevivencia [94, 12, 30]. A pesar de que las conidias aéreas de cepa P43A tuvieron un menor *Is* en relación a las de la cepa PCC pero su tiempo de germinación fue el menor de todos, lo que le da más posibilidad de sobrevivencia en el campo [12]. Las conidias aéreas de cepa PCC tuvieron el tiempo más largo de germinación pero, el mayor índice de sobrevivencia (Tabla 4.7), Fargues y col. [27] al irradiar conidias aéreas (cultivadas en agar con glucosa y extracto de levadura a 25°C por 3 semanas) de *I. fumosorosea* con luz UV a longitud de onda mayor de 280 nm por 20 minutos obtuvieron una total inactivación.

La radiación UV-B actúa directamente en el DNA induciendo la formación de diversos fotoproductos. El foto producto más común es el dímero de pirimidina (ciclobutano) que se forman como resultado del rompimiento de los dobles enlaces C=C de dos bases sucesivas de pirimidinas. Estos compuestos representan alrededor de las tres cuartas partes de los fotoproductos, siendo más frecuentes los dímeros de timinas (TT), seguido los de timina-citosina (TC) y por último los de citosinas (CC). Esta clase de lesión es reparada por sistemas de escisión de nucleótidos y por las enzimas fotorreactivantes o fotoliasas, que utiliza la energía tomada de la luz para romper las uniones covalentes que conectan las pirimidinas en un dímero. La importancia relativa de estos sistemas de reparación varía considerablemente entre diferentes sistemas biológicos [12].

Las melaninas son macromoléculas de varios tipos de monómeros fenólicos, y se encuentran generalmente acomplejados con proteínas y carbohidratos y son fotoprotectores. Tanto las conidias aéreas como los propágulos sumergidos de la cepa P43A tuvieron mayor concentración de este pigmento que las de la cepa PCC, sin embargo las conidias aéreas de PCC fueron más resistentes a la irradiación UV de 254 nm. Los estudios sobre melanina se han realizado en su mayoría con hongos dermatofitos porque este pigmento los protege del sistema inmune del huésped Dong y Yao [25] reportan el rendimiento de este pigmento en *Ophiocordyceps sinensis* del cual obtuvieron 7.95% de melanina cruda, la cual es parecida a la concentración de P43A sumergida y la de P43A aérea es 1.23 veces mayor. Mientras que Asaff y col. [10] encontraron en los propágulos sumergidos de *I. fumosorosea* Pfrd, 1.1 mg/g. Esta concentración es 24.33 veces menor a la de los propágulos sumergidos de PCC que fueron los que tuvieron la mínima concentración. Dada la conocida susceptibilidad de los microorganismos y sus enzimas a los compuestos fenólicos, se ha sugerido que las reacciones de melanización tienen efectos antifúngicos [24]. Se ha reportado que este pigmento le confiere protección al hongo contra la exposición a la radiación solar y UV, ya que absorben toda la radiación del espectro visible y el UV, por lo que actúan como escudos. También se ha encontrado que protege al hongo de fungicidas, se cree que la melanina forma una malla de tamaño de poro pequeño que solo permite el paso de moléculas pequeñas como nutrientes azúcares, aminoácidos y evita el paso de moléculas de gran tamaño como estos compuestos químicos. Protección contra metales pesados, por su alta afinidad hacia ellos ya que tienen capacidad quelante la cual se le ha atribuido por la capacidad que tienen las melaninas de intercambiar iones y la particular fuerza de unión y el sitio de unión es dependiente del pH. Protección contra hidrólisis enzimática, debido a que las melaninas tienen la capacidad de unir metales pesados, estos inhiben la actividad de las enzimas líticas [15, 15, 84]. Además la melanina es producida en la pared del apresorio de los hongos entomopatógenos, y le confiere una alta fuerza mecánica para empujar y romper las estructuras del huésped y anclarse, por lo que juega un papel importante en el proceso de la infección. Esta fuerza mecánica se ha relacionado también con el

contenido de glicerol en las células del apresorio, ya que este compuesto le confiere una alta presión osmótica y la melanina actúa como una barrera impermeable que no permite escapar al glicerol a la membrana plasmática [15, 16].

CONCLUSIONES

El objetivo general de esta investigación fue comparar la resistencia al estrés abiótico de las conidias aéreas de *Isaria fumosorosea* cepa P43A y PCC producidas en medio sólido y de sus propágulos producidos en medio sumergido, por lo que las conclusiones obtenidas se presentan a continuación en base a los objetivos específicos propuestos.

1. Determinar la velocidad específica de crecimiento *Isaria fumosorosea* en cultivos sólido y sumergido a diferentes temperaturas.

La temperatura óptima de crecimiento en cultivo sólido fue a 25°C para ambas cepas y la cepa PCC fue la que tuvo la más alta velocidad específica de crecimiento en este sistema de cultivo.

La temperatura óptima de crecimiento en cultivo sumergido fue de 28°C para las dos cepas. La cepa P43A presentó la más alta velocidad específica de crecimiento en este sistema de cultivo, tolerancia al crecimiento a las temperaturas de 30 a 34°C y dado que presenta una relación más alta de conidias sumergidas, las cuales tienen un tiempo de germinación corto, podrían producirse en este sistema como micoinsecticida para aplicarse en zonas de clima caliente.

2. Evaluar la producción de enzimas proteasas, lipasas y quitinasas de *Isaria fumosorosea* en medio sólido y sumergido.

No se encontró una correlación entre la producción de enzimas extracelulares (proteasas, lipasas y quitinasas) y la virulencia de las cepas.

3. Evaluar la virulencia de las conidias aéreas y de los propágulos sumergidos por medio de bioensayos.

Las conidias aéreas de la cepa PCC fueron las más virulentas con un TL_{50} de 4.86 días.

La respuesta de cada cepa en la relación de blastoporas y conidias producidas en el cultivo sumergido fue diferente, así como los tiempos de germinación.

4. Evaluar la resistencia de las conidias aéreas producidas en cultivo sólido y los propágulos producidos en cultivo sumergido de *Isaria fumosorosea* al someterlos al secado a diferentes temperaturas e irradiación ultravioleta a dos longitudes de onda.

Cada cepa de *I. fumosorosea* se comporta de distinta manera en cultivo sólido o sumergido y las características de resistencia a la temperatura, secado e radiación UV, así como la virulencia de las esporas producidas también son diferentes.

La sobrevivencia de las conidias aéreas y propágulos sumergidos estuvo directamente relacionada a la temperatura de secado.

Las conidias aéreas presentaron mayor resistencia al secado e irradiación UV₂₅₄ nm en relación con los propágulos sumergidos.

Los propágulos sumergidos y las conidias aéreas de la cepa P43A podrían ser utilizadas como micoinsecticidas ya que tuvieron el mismo índice de sobrevivencia a las temperaturas de secado de 30 y 40°C respectivamente y podrían ser aplicadas en zonas con climas calientes con estas temperaturas.

Las conidias aéreas de la cepa PCC fueron las más resistentes al secado, a la luz UV 254 nm y fueron las más virulentas. Dado a estas características, lo más recomendable es producirla en medio sólido, para ser utilizada como micoinsecticida bajo las condiciones de temperatura e irradiación a las que fue probada, e inclusive pueden ser secadas.

5. Determinar los contenidos de compuestos osmoprotectores y melanina de las conidias producidas en cultivo sólido y de los propágulos producidos en cultivo sumergido.

Las conidias obtenidas en este trabajo fueron cultivados en condiciones óptimas de crecimiento, el contenido de trehalosa y poliholes (glicerol y manitol) obtenidos no nos mostraron evidencia del porque las conidias aéreas fueron más resistentes a las temperaturas de secado.

Las conidias aéreas y propágulos sumergidos de la cepa P43A fueron las que presentaron la mayor concentración del pigmento melanina en relación a las esporas de la cepa PCC. La cepa P43A aérea fue la que presentó la mayor concentración de este pigmento.

Cada aislado se desempeña de manera diferente en cada sistema de cultivo, por lo que el método de producción planeado debe ser tomado en cuenta como criterio de selección de hongos entomopatógenos.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda hacer estudios de vida de anaquel y formulaciones para poder preservar por más tiempo la viabilidad de las conidias y los propágulos sumergidos.
2. Se recomienda hacer pruebas de virulencia en insectos plaga reales, para medir su eficacia como micoinsecticidas.
3. Se recomienda estudiar los parámetros de producción a una mayor escala y hacer pruebas de campo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. J Econ Entomol, 18:265-267
- [2] Alatorre Rosas R (2006) Insecticidas Microbianos en el Manejo de Insectos Plaga. Taller de Hongos Entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de Calidad. Manzanillo Colima, pp 6-8, 1-19
- [3] Ali S, Huang Z, Ren S (2009) Media composition influences on growth, enzyme activity, and virulence of the entomopathogen hyphomycete *Isaria fumosoroseus*. Entomol Exp Appl, 13:30-38. doi:10.1111/j.1570-7458.2009.00833.x
- [4] Ali S, Huang Z, Ren S (2010) Production of cuticle degrading enzymes by *Isaria fumosorosea* and their evaluation as biocontrol agent against diamondback moth. J Pest Sci, 83:361-370. doi:10.1007/s10340-010-0305-6
- [5] Altre JA, Vandenberg JD, Cantone FA (1999) Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth, *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed, and attachment to cuticle. J Invertebr Pathol, 73:332-338
- [6] Amin GA, Youssef NA, Bazaid S, Saleh WD (2010) Assessment of insecticidal activity of red pigment produced by the fungus *Beauveria bassiana*. World J Microbiol Biotechnol, 26:2263-2268
- [7] Asaff Torres A, Reyes Vidal Y, López y López VE y De la Torre M (2002) Guerra de insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. Avance y Perspectiva, 21:291-295
- [8] Asaff A, Cerda-Garcia-Rojas C and de la Torre M (2005) Isolation of dipicolinic acid as insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. Appl. Microbiol Biotechnol, 68:542-547
- [9] Asaff A, Cerda-García-Rojas CM, Viniegra-González G, de la Torre M (2006) Carbon distribution and redirection of metabolism in *Paecilomyces*

fumosoroseus during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochem*, 4:1303-1310. doi:10.1016/j.procbio.2006.01.001

- [10] Asaff A, Escobar F, de la Torre M (2009) culture medium improvement for *Isaria fumosorosea* submerged conidia production. *Biochemical Engineering Journal*, 47:87-92. doi:10.1016/J.bej.2009.07.007
- [11] Berekaa MM, Zaghloul TI, Abdel-Fattah YR, Saeed HM, Sifour M (2009) Production of a novel glycerol-inducible lipase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* strain-5. *World J Microbiol Biotechnol*, 25:287-294. doi:10.1007/s11274-008-9891-3
- [12] Braga GUL, Rangel DEN, Flint SD, Miller ChD, Anderson AJ, Roberts DW (2002) Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. *Mycologia*, 94:912-920
- [13] Brand D, Soccol CR, Sabu A, Roussos S (2010) Production of fungal biological control agents through solid state fermentation: a case study on *Paecilomyces lilacinus* against root-knot nematodes. *Micol Apl Int*, 22:31-48
- [14] Butler MJ, Lachance MA (1986) Quantitative binding of azure A to melanin of the black yeast *Phaeococcomyces*. *Experimental Mycology*, 10:166-170
- [15] Butler MJ, Day AW (1998) Fungal melanins: a review. *Can J Micobiol*, 44:1115-1136
- [16] Butler MJ, Day AW, Henson JM, Money NP (2001) Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia*, 93:1-8
- [17] Cabanillas HE, Jones WA (2009) Effects of temperature and culture media on vegetative growth of an entomopathogenic fungus *Isaria sp.* (Hypocreales: Clavicipitaceae) naturally affecting the whitefly, *Bemisia tabaci* in Texas. *Mycopathologia*, 167:263-271. doi:10.1007/s11046-008-9176-2
- [18] Carmona Brito ALL (2002) Resistencia a la Temperatura de los Propágulos de *Paecilomyces fumosoroseus*. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. D.F.
- [19] Charnley AK, Collins SA (2007). Entomopathogenic Fungi and their Role in Pest Control. Chapter 10. in *Environmental and Microbial Relationships*, 2nd

Edition. The Mycota IV. Kubicek C.P. and Druzhinina I.S. (Eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. pp.159-187

- [20] Cliquet S, Jackson MA (2005) Impact of carbon and nitrogen nutrition on the quality, yield and composition of blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. J Ind Microbiol Biotechnol, 32:204-210. doi:10.1007/s10295-005-0232-3
- [21] Condorhuamán C (2008) Modelamiento del proceso de secado en lecho surtidor convencional: parte I. Rev Per Quím Ing Quím, 12:54-61
- [22] De Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. Biol Control, 43:237-256. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.08.001
- [23] De la Torre M, Cardenas-Cota HM (1996). Production of *Paecilomyces fumosoroseus* conidia in submerged culture. Entomophaga, 41:443-453
- [24] Delgado Blandon F, López Forero Y, Giraldo Cardozo EM (2001). Actividad enzimática de hongos y su patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica), 60:43-49
- [25] Dong C, Yao Y (2012) Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. Journal of Bioscience and Bioengineering, 113:474-479.
- [26] Esteves I, Peteira B, Powers S, Magan N, Kerry BR, (2009) Effects of osmotic and matric potencial on radial growth and accumulation of endogenous reserves in three isolates of *Pochonia chlamydosporia*. Biocontrol Science and Technology, 19(2):185-199.doi:10.1080/09583150802650175
- [27] Fargues J, Rougier M, Goujet R, Smits N, Coustere Ch, Itier B (1997) Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. J Invertebr Pathol, 69:70-78
- [28] Fargues J, Bon MC (2004) Influence of temperature preferences of two *Paecilomyces fumosoroseus* lineages on their co-infection pattern. J Invertebr Pathol, 87: 94-104. doi:10.1016/j.jip.2004.07.001
- [29] Fazenda MI, Seviour R, McNeil B, and Harvey LM (2008) Submerged culture fermentation of “Higher fungi”: The macrofungi. Chapter 2. pp 40-45. In

Advances in Applied Microbiology Vol. 63. First Edition. Ed. Elsiervet. Printed in USA.

- [30] Fernandes EKK, Rangel DEN, Morales AML, Bittencourt VREP, Roberts DW (2007) Variability in tolerance to UV-B radiation among *Beauveria spp.* Isolates. J Invertebr Pathol, 96:237-243.
- [31] Fernandes ÉKK, Bittencourt VREP, Roberts DW (2012) Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. Exp Parasitol 130:300-305. doi:10.1016/j.exppara.2011.11.004
- [32] Gao L, Sun MH, Liu XZ, and Che YS (2007) Effect of carbon concentration and carbon to nitrogen ratio on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. Mycological Research, 3:87-92
- [33] García-Carreño FL, Hernández-Cortés MP, Haard NF (1994) Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapod. J Agric Food Chem, 42:1456-1461. doi:10.1021/jf00043a013
- [34] Geankoplis CJ (2003) Procesos de transporte y operaciones unitarias. Capítulo 9. Secado de materiales de proceso. 3ª Edición Ed. CECSA pp 579-634
- [35] González-Púmariego M, Vernhes Tamayo M, Sánchez-Lamar A (2009) La radiación ultravioleta. su efecto dañino y consecuencias para la salud humana, Theoria, 18:60-80
- [36] Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB (2002) Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. Biochemistry- Moscow, 67:613-623
- [37] Guzmán Franco A (2006) Selección de Aislamientos. Taller de Hongos Entomopatógenos (Ascomycetes anamórficos (Deuteromycota), Entomophthorales): Control de Calidad. Manzanillo Colima, 6-8 de Noviembre. pp 37-38
- [38] Hallsworth JE, Magan N (1994) Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. Microbiology, 140:2705-2713

- [39] Hallsworth JE, Magan N (1996) Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental microbiology*, 62:2435-2442
- [40] Hallsworth JE, Magan N (1997) A rapid HPLC for detection of polyols and trehalose. *Journal of Microbiological Methods*, 29:7-13
- [41] Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67:597-607
- [42] Hegedus DD, Khachatourians GG (1988) Production of an extracellular lipase by *Beauveria bassiana*. *Biotechnol Lett*, 10:637-642
- [43] Howard AFV, N'Guessan R, Koenraadt CJM, Asidi A, Farenhorst M, Akogbéto M, Knols BGJ, Takken W.(2011) First report of the infection of insecticide-resistant malaria vector mosquitoes with an entomopathogenic fungus under field conditions. *Malaria J*, 10:1-8
- [44] Huang BF, Feng MG (2009) Comparative tolerance of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. *Mycopathology*, 168:145-152
- [45] Imoulan A, Alaoui A, El Meziane A (2011) Natural occurrence of soil-borne entomopathogenic fungi in the Moroccan Endemic forest of *Argania spinosa* and their pathogenicity to *Ceratitis capitata*. *World J Microbiol Biotechnol*, 27:2619-2628. doi:10.1007/s11274-011-0735-1
- [46] Jackson MA, Mcguire MR, Lacey LA (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol Res*, 101:35-41
- [47] Jackson MA, Cliquet S, Iten LB (2003) Media and fermentation processes for the rapid production of High concentration of stable blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Science and Technology*, 13:23-33
- [48] Jackson MA, Dunlap CA, Jaronski ST (2010) Ecological considerations in producing and formulating fungal entomopathogens for use in insect biocontrol. *Biocontrol*, 55:129-145. doi:10.1007/s10526-009-9240-y

- [49] James RR (2001). Effects of exogenous nutrients on conidial germination and virulence against the silverleaf whitefly for two hyhomycetes. J Invertebr Pathol, 77:99-107
- [50] Jaronski ST (2010) Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. Biocontrol, 55:159-185. doi:10.1007/s10526-009-9248-3
- [51] Jennings DH, Burke RM (1990) Compatible solutes – the mycological dimension and their role as physiological buffering agent. New Phytol, 116:277-283
- [52] Kalbfleisch JG (1985) Probability and statistical inference II. Springer-Verlag, New York
- [53] Khachatourians G, Qazi SS (2008).Entomopathogenic fungi: Biochemistry and Molecular Biology. Chapter 3. in Human and animal relationships, 2nd Edition. The Mycota VI. Brakhage A.A. and Zipfel P.F. (Eds.)
- [54] Lacey LA, Wraight SP, Kirk AA (2008) Entomopathogenic fungi for control of *Bemisia tabaci* biotype B: foreign exploration, research and implementation. Prog Biol Control, 4:33-69
- [55] Maranhão EAA y Maranhão EHA (2008-2009). Hongos entomopatógenos: importante herramienta para el control de “moscas blancas” (homoptera: aleyrodidae). Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica, Recife, 5 e, 6:209-242
- [56] Margesin R, Feller G, Hämmerle, Stegner U, Schinner F (2002) A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil. Biotechnology Letters, 24:27-33
- [57] Méndez A, del Pozo E y García I (2007) Producción de biomasa del aislamiento (Nr-003) de *Nomuraea rileyi* (Farlow) samson en diferentes medios de cultivo líquidos con agitación y su virulencia sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH). Rev. Protección Veg, 22:118-123
- [58] Mienda BS, Idi A, and Umar A (2011) Microbiological features of solid state fermentation and its applications. An overview. Review Article. Research in Biotechnology, 2:21-26

- [59] Miyashira CH, Tanigushi DG, Gugliotta AM, Santos DYAC (2010) Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens rubropilosa* forel in two culture media. Braz J Microbiol, 41:506-511
- [60] Monzon A (2001) Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatogenos en Nicaragua. Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica), 63:95-103
- [61] Moore D, Geoffrey D, Robson A, Trinci PJ (2011). 21st Century Guidebook to Fungi. Part II. Fungal Cell Biology. Chapter 4. Hyphal cell biology growth on solid substrates. Ed. Cambridge University Press. New York. pp.460-470
- [62] Moura Mascarín G, Batista Alves S, Biaggioni Lopes R (2010) Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. Braz Arch Biol Technol, 53:753-761
- [63] Mustafa U, Kaur G (2010) Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* Isolates. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, 6:701-713
- [64] Nielsen J (2007) Fermentation Kinetics. Chapter 3 in Fermentation Microbiology and Biotechnology. Second edition. El-Mansi E.M.T., Bryce C.F.A., Demain A.L. and Allman A.R. (Editors). CRC Press Taylor & Francis. Boca Raton FL. pp.47-98
- [65] Nieto TP, Ellis AE (1986) Characterization of extracellular metallo- and serine-proteases of *Aeromonas hydrophila* strain B₅₁. J Gen Microbiol, 132:1975-1979. doi:10.1099/00221287-132-7-1975
- [66] Papagianni M, Nokes SE, Filer K (2001) Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. Food Technol Biotech, 39:319-326
- [67] Perez-Guerra N, Torrado-Agrasar A, López Macías C, Pastrana L (2003) Main characteristics and applications of solid substrate fermentation. Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry, 2:343-350

- [68] Piao Lu Ch, Da Liu S (2009) Formulation of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. Journal of Microencapsulation, 26(5):377-384
- [69] Pineda-Castro ML, Chacón-Villalobos A, Cordero-Gamboa G (2009) Efecto de las condiciones de secado sobre la cinética de deshidratación de las hojas de morera (*Morus alba*). Agronomía mesoamericana, 20:275-283
- [70] Pogori N, Cheikhyoussef A, Xu Y, Wang D (2008) Production and biochemical characterization of an extracellular lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021. Biotechnology, 7:710-717
- [71] Prabhakar A, Krishnaiah K, Janaun J, and Bono A (2005) An overview of engineering aspects of solid state fermentation. Mal. J. Microbiol. 1:10-16
- [72] Pucheta Días M, Flores Macias A, Rodríguez Navarro S, y de la Torre M (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. INCI, 31(12): 856-860
- [73] Ribeiro Machado AC, Monteiro AC, Belasco de Almeida AM, Geraldo Martins MIE (2010) Production technology for entomopathogenic fungus using a biphasic culture system. Pesq agropec bras Brasília, 45:1157-1163
- [74] Rodríguez-Gómez OL, Saucedo-Castañeda G, Viniegra-González G (2009) Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. World J Microbiol Biotechnol, 25:513-518. doi:10.1007/s11274-008-9917-x
- [75] Sandoval Coronado CF, Luna-Olvera HA, Arévalo-Niño K, Jackson MA, Poprawski TJ, Galán-Wong LJ (2001) Drying and formulation of *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) produced in two different liquid media. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 17:423-428.
- [76] Santi L, Dedavid e Silva LA, Beys da Silva WO, Folmer Correa AP, Naretto Rangel DE, Carlini CR, Schrank A, Vainstein MH (2011) Virulence of the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* using soybean oil formulation for control of the cotton stainer bug, *Dysdercus peruvianus*. World J Microbiol Biotechnol, 27:2297-2303

- [77] Shafiro-Ilan DI, Fuxa JR, Lacey LA, Onstand DW, Kaya HK (2005) Definition of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology*, 88:1-7
- [78] Sharma SK, Mulvaney SJ (2003) *Ingeniería de Alimentos. Operaciones Unitarias y Prácticas de Laboratorio*. Ed. Limusa Wiley
- [79] Smith, P (1993) Control of *Bemisia tabaci* and the potential of *Paecilomyces fumosoroseus* as a biopesticide. *Biocontrol News and Information*, 14:71–78
- [80] St. Leger RJ, Joshi L, Roberts DW (1997) Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*, 143:1983-1992
- [81] Sun J, Fuxa JR, Henderson G (2003) Effect of virulence, sporulation, and temperature on *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* laboratory transmission in *Coptotermes formosanus*. *J Invertebr Pathol*, 84:38-36
- [82] Tefera T, Pringle KL (2003) Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *J Invertebr Pathol*, 84:90-95
- [83] Tereshina VM, Memorskaya AS, Morozova EV, Kozlov VP, Feofilova EP (2000) Alterations in the carbohydrate composition of the cytosol fungal spores caused by temperature variations and the storage process. *Microbiology*, 69:511-517
- [84] Uran ME, Cano LE (2008) Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(2):357-377
- [85] Valadares-Inglis MC, Azevedo JL (1997) Amylase and protease secretion in recombinant strains of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* following parasexual crosses. *Brazil J Genet*, 20:171-175
- [86] Vega FE, Jackson MA, Mercadier G, Poprawski TJ (2003) The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture. *World J Microbiol Biotechnol*, 19:363-368
- [87] Vidal C, Fargues J, Lacey LA, Jackson MA (1998) Effect of various liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic

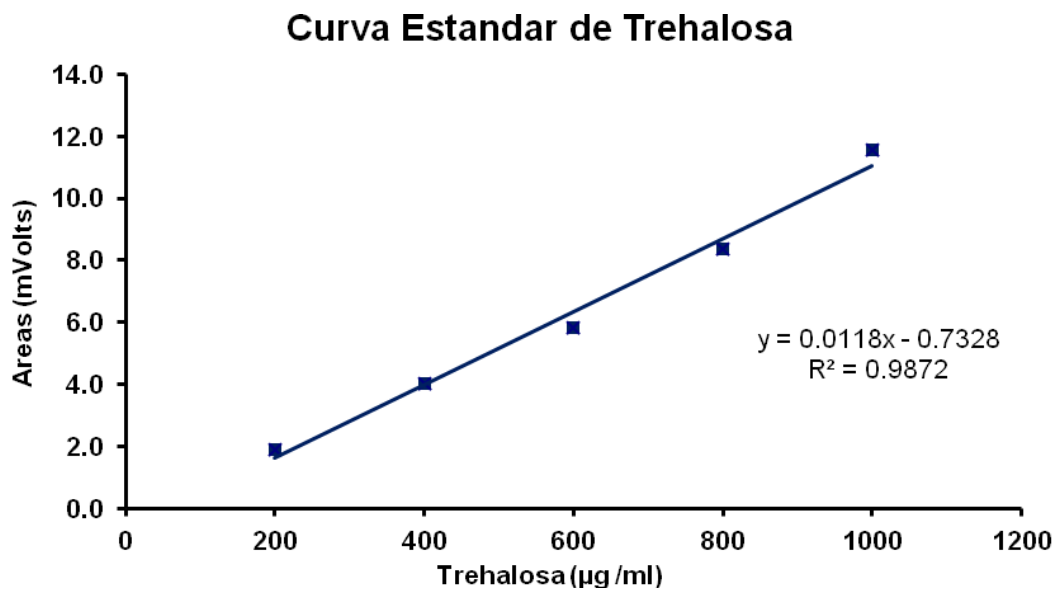
activity to *Bemisia argentifolii* of the entomopathogenic Hyphomycete, *Paecilomyces fumosoroseus*. Mycopathologia, 143:33-46

- [88] Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar CN, Romero-Gomez SJ, Díaz-Godínez G, Augur C (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochem Eng J, 13:157-167
- [89] Wraight SP, Inglis GD, Goettel MS (2007) Overview of pathogen groups: Fungi. In: Lacey LA, Kaya HK (eds) Field manual of techniques in invertebrate pathology, 2nd edn. Springer, Dordrecht, pp 223–248
- [90] Yeo H, Pell JK, Alderson PG, Clark SJ, Pye BJ (2003) Laboratory evaluation of temperature effects on the germination and growth of entomopathogenic fungi and on their pathogenicity to two aphid species. Pest Manag Sci, 59:156-165. doi:10.1002/ps.622
- [91] Zibae A, Sadeghi-Sefidmazgi A, Fazeli-Dinan M (2011) Properties of a lipase produced by *Beauveria bassiana*: purification and biochemical studies. Biocontrol Sci Techn, 2:317-331. doi:10.1080/09583157.2010.548595
- [92] Zimmermann G (1982) Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. J Invertebr Pathol, 40:36-40

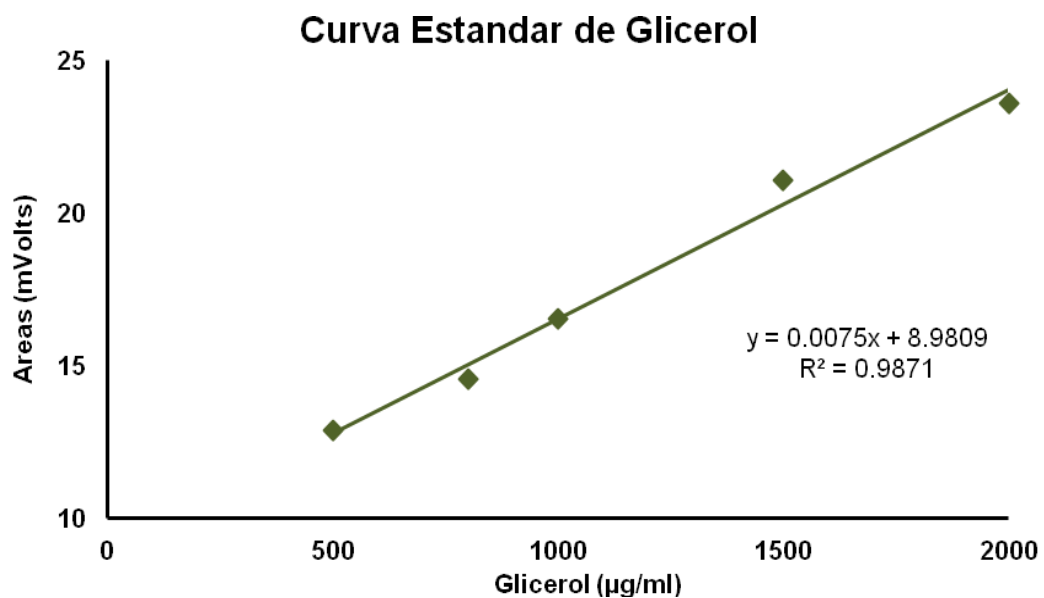
ANEXOS

Anexo 1 Curvas estándar de trehalosa, glicerol, manitol y melanina

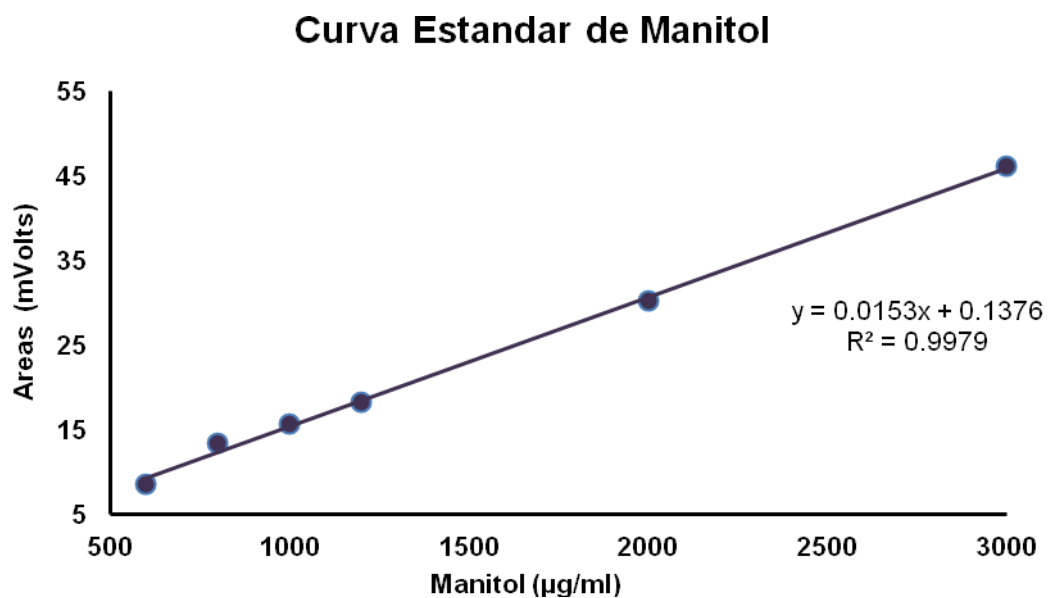
1.1 Curva estándar de trehalosa



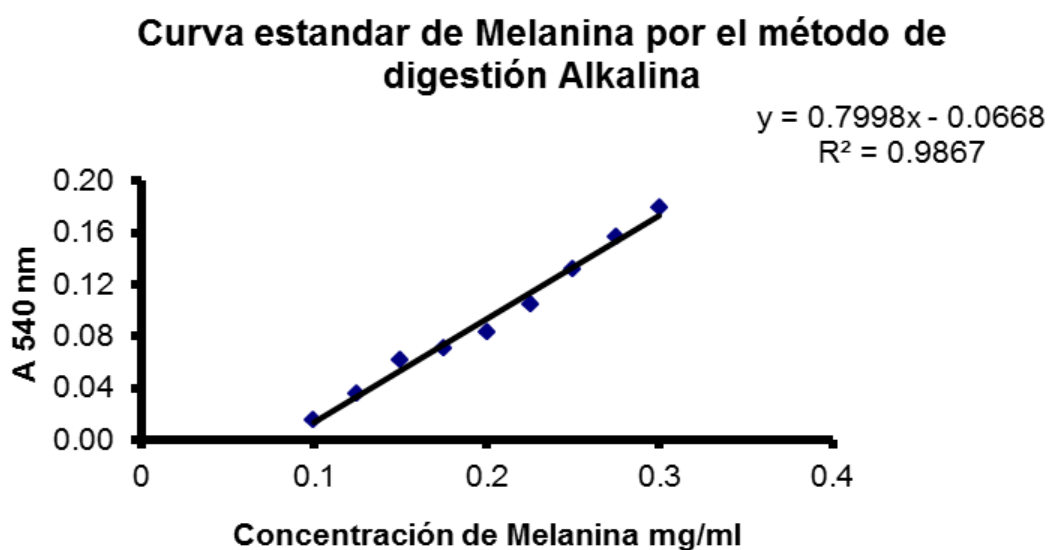
1.2 Curva estándar de glicerol



1.3 Curva estándar de manitol

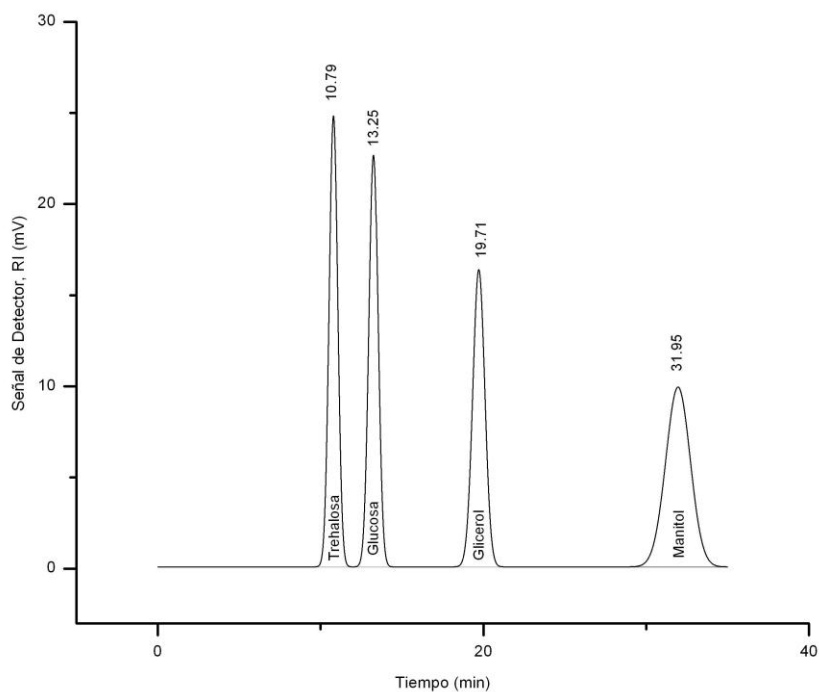


1.4 Curva estándar de melanina

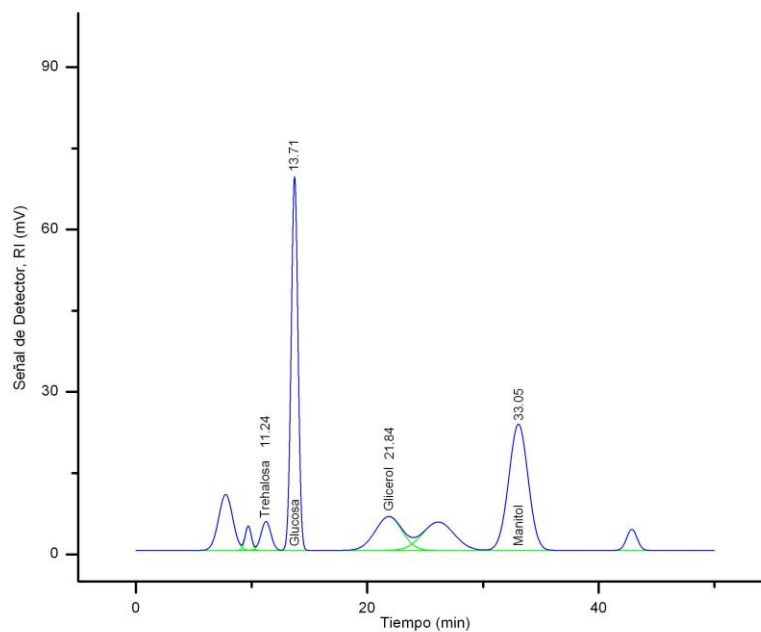


Anexo 2 Cromatogramas de estándares de trehalosa y polialcoholes por HPLC con detector de índice de refracción

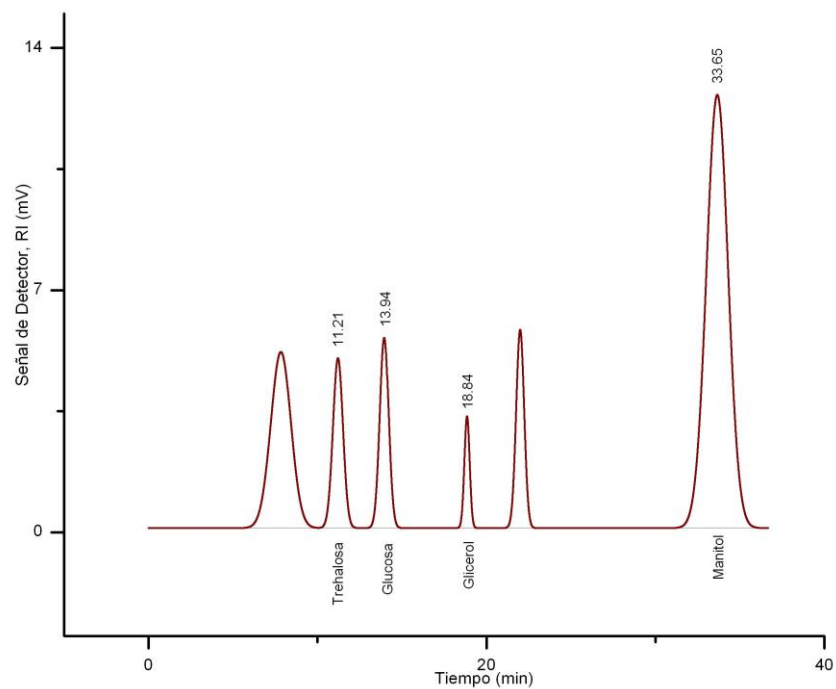
2.1. Cromatograma de estándares de azúcares y polialcoholes.



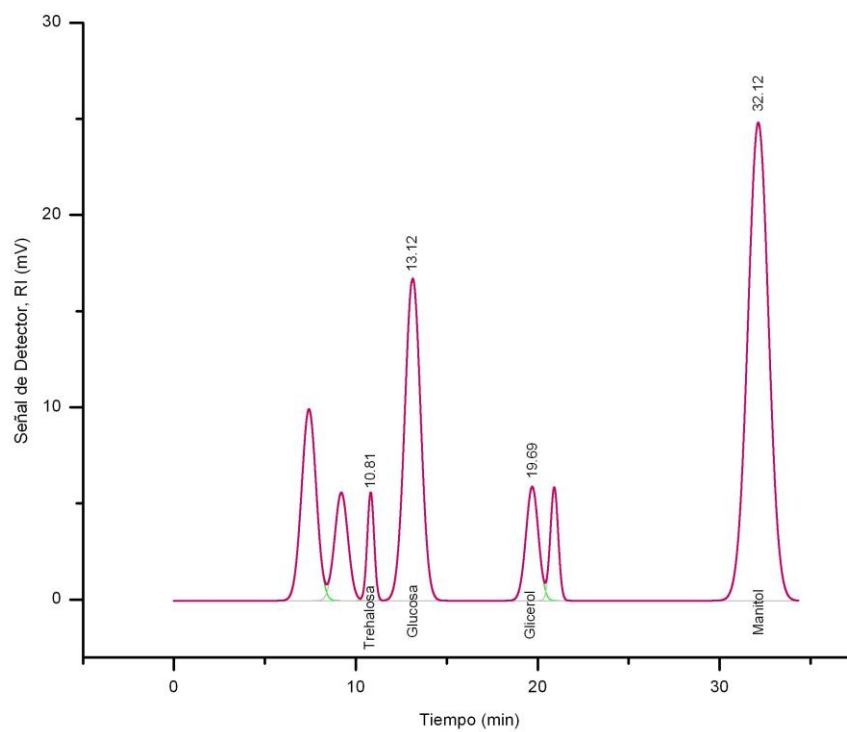
2.2 Cromatograma del análisis de azúcares y polialcoholes de las conidias aéreas de la cepa P43A.



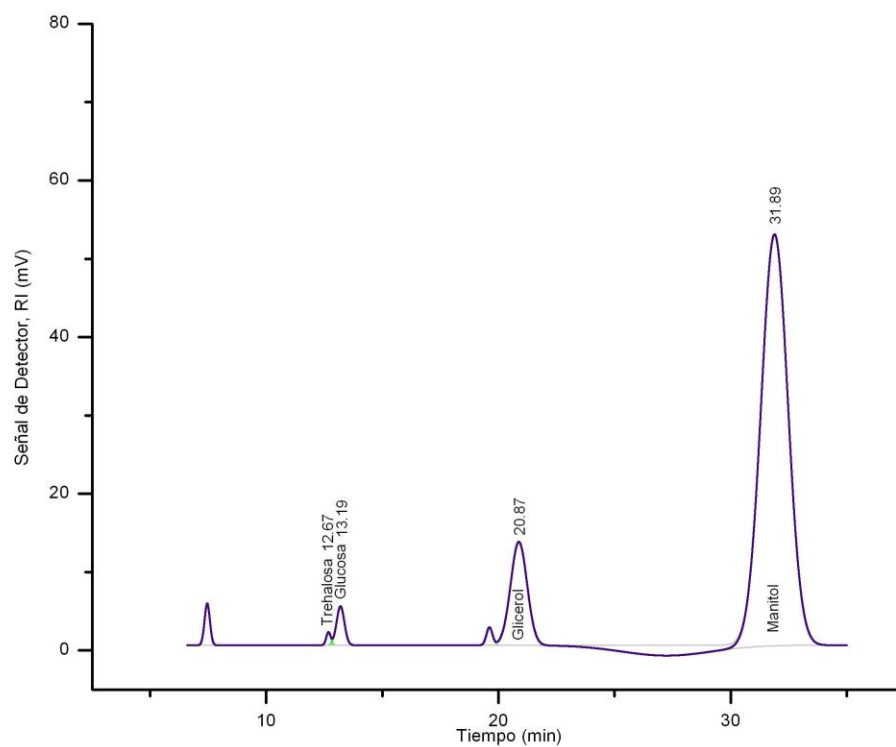
2.3 Cromatograma de azúcares y polialcoholes de los propágulos sumergidos de la cepa P43A



2.4. Cromatograma de azúcares y polialcoholes de conidias aéreas de la cepa PCC

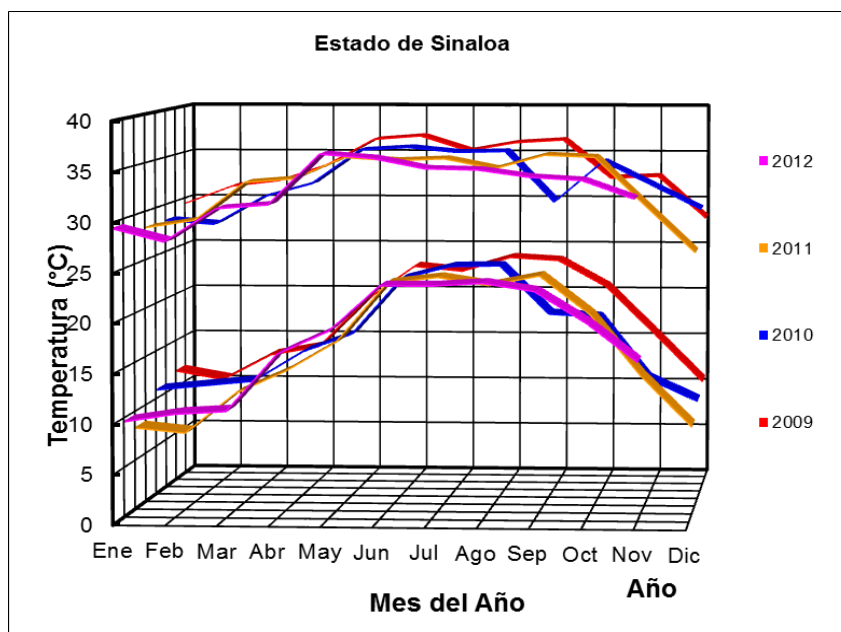


2.5 Cromatograma de azúcares y polialcoholes de propágulos sumergidos de la cepa PCC por HPLC con detector de índice de refracción

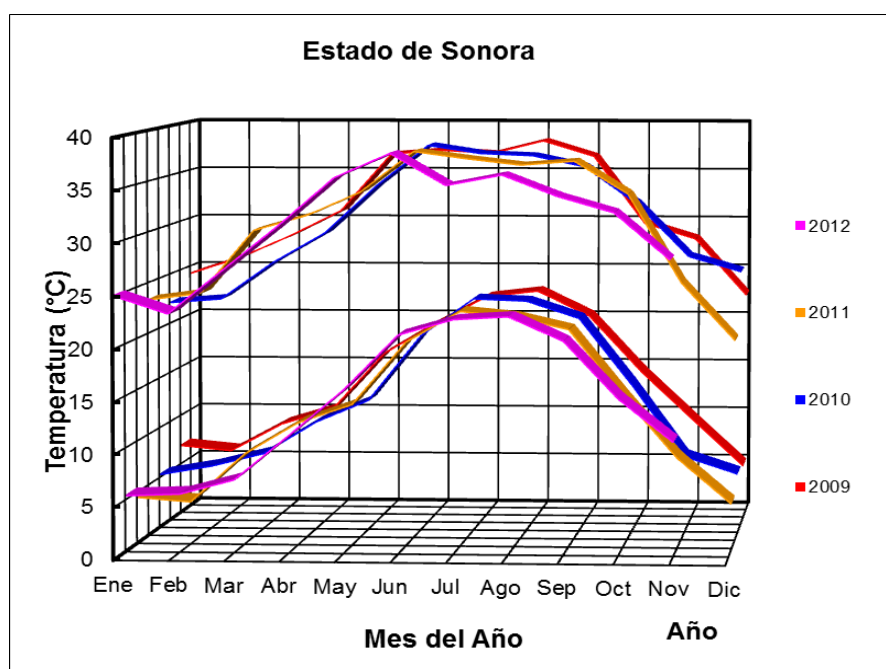


Anexo 3 Temperaturas promedio máximas y mínimas del estado de Sinaloa y Sonora durante los años 2009-2012 proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional.

3.1 Estado de Sinaloa

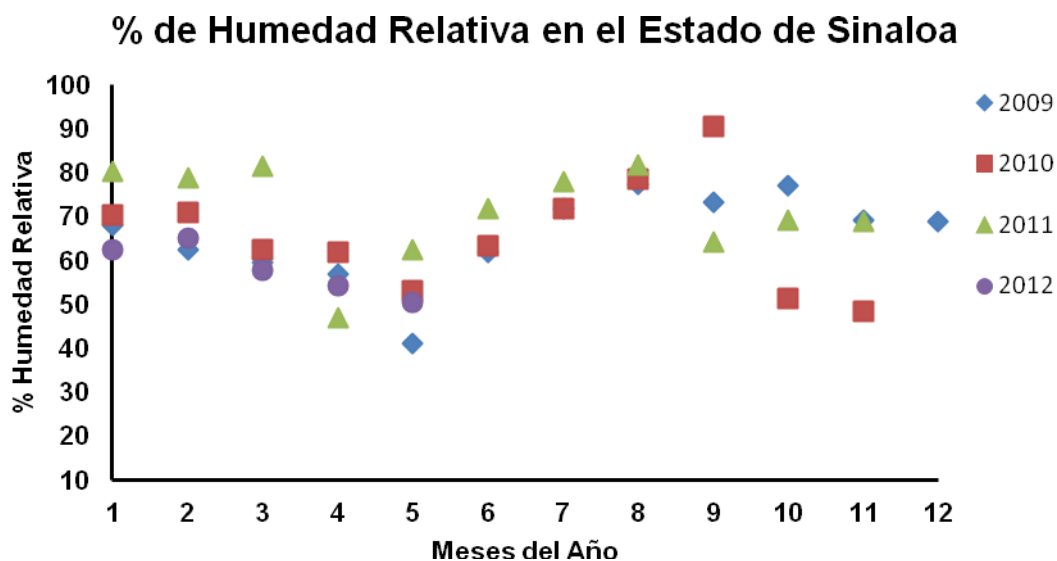


3.2. Estado de Sonora.

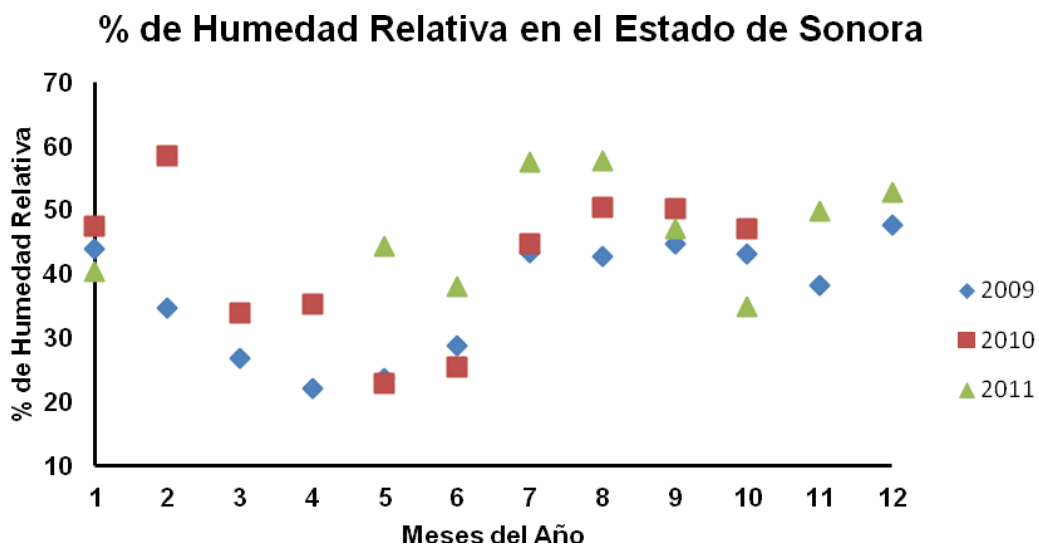


Anexo 4 Porcentaje (%) de Humedad Relativa promedios de los Estados de Sinaloa y Sonora durante los años 2009 a 2012 datos proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional.

4.1 Estado de Sinaloa

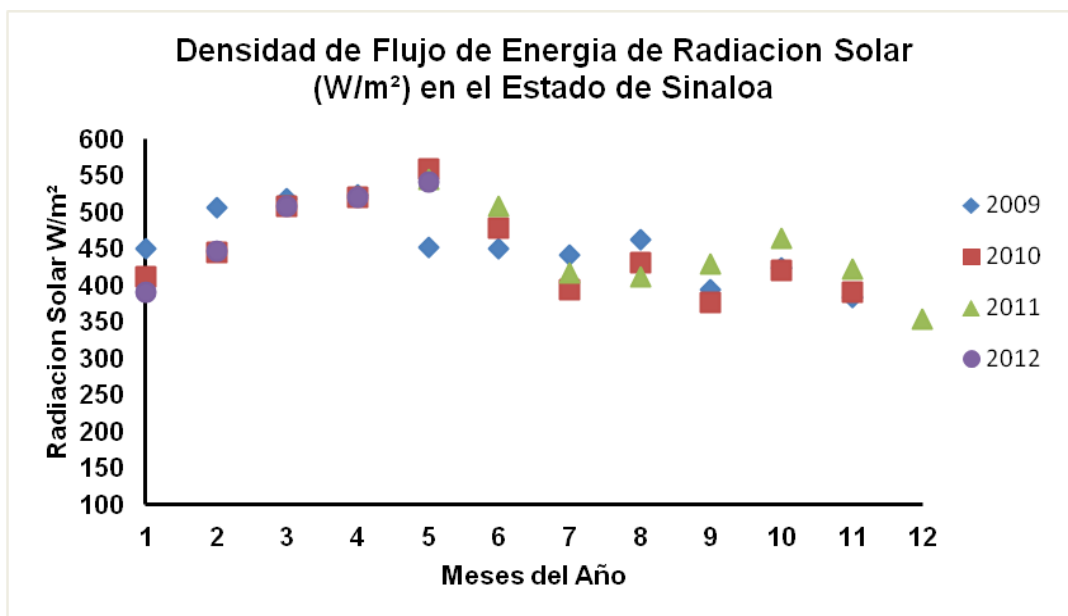


4.2 Estado de Sonora

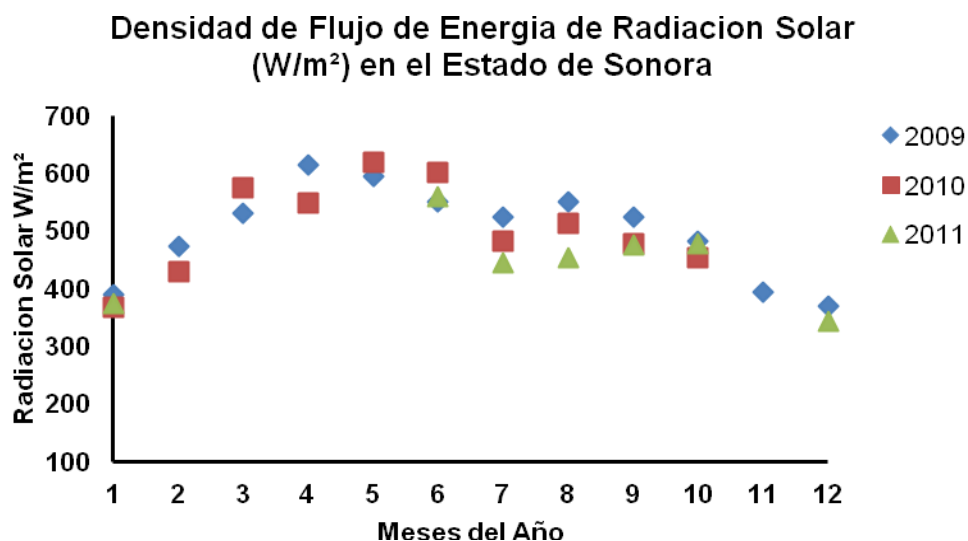


Anexo 5 Promedios de Flujo de Energía de Radiación Solar Global (W/m^2) en los Estados de Sinaloa y Sonora durante los años 2009 a 2012 proporcionados por el Servicio Meteorológico Nacional.

5.1 Estado de Sinaloa



5.2 Estado de Sonora.



Anexo 6 Publicaciones

6.1 Memorias en congresos

6.1.1



Segundo Coloquio de Postgrado 26 y 27 de Noviembre de 2007

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA

CAMPO DEL CONOCIMIENTO: QUÍMICA/ BIOINGENIERIA Y SALUD AMBIENTAL

SEGUNDO COLOQUIO DE POSTGRADO

MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERIA

PROPUESTA DE TESIS DOCTORAL

EFFECTO DE LAS CONDICIONES Y EL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA
CALIDAD DE CONIDIAS DE *Paecilomyces sp.*

PRESENTADA POR:

M. en C. ESTHER CARRILLO PÉREZ

ecarrillo@iq.uson.mx

PROCEDENCIA: Universidad de Sonora

Directora de Tesis :

Dra. Mayra de la Torre Martínez

mdelatorre@cascabel.ciad.mx

Comité Evaluador:

Dr. Benjamín Valdez Salas

Dra. Margarita Stoytcheva

Dra. Mónica Carrillo Beltrán

Hermosillo, Sonora; México a Noviembre de 2007.

6.1.2 EFECTO DE LAS CONDICIONES Y EL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA CALIDAD DE CONIDIAS DE *Paecilomyces sp.*

Carrillo Pérez Esther* y De la Torre Martínez María Mayra**

Instituto de Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

*Estudiante de Doctorado Campo del Conocimiento: Química

**Directora de Tesis

Mexicali, Baja California, México.

email: ecarrillo@iq.uson.mx *, mdelatorre@cascabel.ciad.mx **

R E S U M E N

Los hongos entomopatógenos producen propágulos infectivos (PI) usualmente conidias cuando son producidos en medio sólido y blastosporas y/o conidias sumergidas cuando son producidos en medios líquidos. Los PI son utilizados en la agricultura como bioinsecticidas para el control biológico de insectos plaga. Entre los hongos comerciales más utilizados se encuentran *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisoplae* y *Paecilomyces fumosoroseus*, de los cuales este último será el espécimen utilizado en este estudio. Dado que los PI son elementos vivos del hongo estos son susceptibles a tener pérdida de viabilidad y virulencia por efecto de factores como el tiempo de almacenamiento y condiciones ambientales como la exposición a altas temperaturas, desecación y a luz ultravioleta. La resistencia a los anteriores parámetros son los tomados en cuenta para evaluar la calidad de dichos PI. En este proyecto se tratará de hacer una comparación de la calidad de PI obtenidos a partir de medio sólido y en medio líquido a los cuales se les evaluará los parámetros de calidad antes mencionados.

Palabras Claves: Hongos entomopatógenos, control biológico, conidias, calidad.

6.1.3 Tercer Coloquio de Postgrado Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería. Noviembre de 2008.

EFFECTO DE LAS CONDICIONES Y EL SISTEMA DE CULTIVO SOBRE LA CALIDAD DE LAS CONIDIAS DE *Paecilomyces sp*: Efecto de la temperatura de secado

Carrillo Pérez Esther*, De la Torre Martínez María Mayra**.

Instituto de Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Campo del conocimiento: Química

Mexicali Baja California, México.

ecarrillo@iq.uson.mx* y mdelatorre@ciad.mx**

R E S U M E N

Los hongos entomopatógenos producen propágulos infectivos (PI), usualmente conidias aéreas en medio sólido y blastosporas y conidias en medios líquidos. Los PI son utilizados como bioinsecticidas para control de insectos plaga y pueden perder viabilidad y virulencia con el tiempo de almacenamiento, altas temperaturas, desecación y luz ultravioleta. La resistencia a los anteriores parámetros es considerada para evaluar su calidad. En este proyecto se comparará la calidad de PI obtenidos en medio sólido y líquido. La primera variable evaluada fue el efecto de la temperatura de secado sobre la viabilidad de conidias aéreas de *Paecilomyces fumosoroseus* cepas Pfrd y P13. Los primeros ensayos tuvieron una gran variabilidad, por lo que se tuvo que modificar el procedimiento de recuperación de las conidias. Los resultados sugieren que las conidias resisten temperaturas de secado desde 30 hasta 60 °C, no se encontraron diferencias significativas ($p= 0.6$ y 0.8) ni por comparación de medias al nivel de 0.05. Sin embargo, la viabilidad del control fue muy baja, cercana a 30%, debido probablemente a que la temperatura en la incubadora varió entre 28 y 33 °C. Por lo que habrá que resolver el problema hasta tener viabilidades en el control del orden de 90% y repetir los experimentos.

Palabras Claves: Hongos entomopatógenos, control biológico, propágulos infectivos, temperatura de secado.

6.1.4 Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Noviembre de 2009

Efecto de la Temperatura de Secado y la Irradiación con Luz UV sobre la Viabilidad de Conidias Aéreas de *Paecilomyces fumosoroseus* Cepa P43A.

Carrillo Pérez Esther¹, De la Torre Martínez María Mayra²

¹Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora; México, email: ecarrillo@iq.uson.mx

²Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Hermosillo, Sonora; México, email: mdelatorre@ciad.mx

RESUMEN

Los hongos entomopatógenos producen propágulos infectivos (PI), usualmente conidias aéreas en medio sólido, blastosporas y conidias en medios líquidos. Los PI son utilizados como bioinsecticidas para control de insectos plaga, debido a las condiciones de almacenamiento como altas temperaturas, desecación y luz ultravioleta pueden afectar su viabilidad y virulencia. Por lo que, la resistencia a éstos factores es considerada para evaluar la calidad de los hongos entomopatógenos. En este proyecto se comparará la calidad de PI obtenidos en medio sólido y líquido. Las primeras variables evaluadas fueron el efecto de la temperatura de secado y la exposición a la luz Ultravioleta (UV) sobre la viabilidad de conidias aéreas de *Paecilomyces fumosoroseus* cepa P43A. Se obtuvieron las isotermas de secado a 31, 40, 50 y 60 °C de las cuales la viabilidad se redujo significativamente ($p < 0.0001$, $\alpha = 0.05$) a medida que se incrementa la temperatura de secado y a medida que la humedad residual de secado es menor, donde se obtuvieron niveles de sobrevivencia del 91 % para el control y de 40 % para el secado a 60 °C con 17.52 y 4.5 % de humedad respectivamente. La exposición a la luz UV a 254 nm tuvo un efecto letal obteniéndose 11 % de germinación a 45 minutos de irradiación. Podemos concluir que el porcentaje de germinación disminuye al incrementar la temperatura de secado y al reducirse el contenido de humedad. La mayor pérdida de viabilidad se obtuvo a 254 nm.

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, secado, Irradiación UV

6.1.5 2do Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería – UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería Noviembre de 2010.

2do Congreso Nacional de Estudiantes de Posgrado del Instituto de Ingeniería, Instituto de Ingeniería – UABC, Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

ISBN:

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA VELOCIDAD ESPECIFICA DE CRECIMIENTO EN CULTIVO SÓLIDO Y LIQUIDO DE *Paecilomyces fumosoroseus* Cepas P43A y PCC

Carrillo Pérez Esther¹, De la Torre Martínez Mayra², Ruíz Manríquez Arturo³.

¹ecarrillo@iq.uson.mx, ²mdelatorre@ciad.mx, ³aruizm@guaymas.uson.mx.

ABSTRACT

The influences of the temperature in the specific growth rate (μ) of two native strains of the entomopathogenic fungi *Paecilomyces fumosoroseus* was assessed (strains P43A and PCC). Strains were cultivated in solid and submerged cultures. In solid culture, both strains had a maximal specific growth (μ) rate and minimal doubling time at 25 °C (P43A $\mu_r=0.0165 \text{ h}^{-1}$, $t_d=42\text{h}$ y PCC $\mu_r=0.0292 \text{ h}^{-1}$, $t_d= 23 \text{ h}$) in solid culture. However, in submerged culture the optimal temperature was 28 °C (P43A $\mu = 0.3467 \text{ h}^{-1}$, $t_d=1.99 \text{ h}$ y PCC $\mu = 0.2573 \text{ h}^{-1}$, $t_d= 2.69 \text{ h}$). PCC showed higher μ between 20 to 30 °C than P43A, but the last grew faster at 32 and 34 °C. On the other hand, in submerged culture both strains had similar μ between 20 and 23 °C but up 25 °C the μ of P43A were higher. Nevertheless at 32 and 34 °C the difference in the growth rates was minimal. These results suggest that P43A is more tolerant to high temperatures than PCC.

Keywords: high-temperature-stress, entomopathogenic fungi, growth rate, submerged culture, solid culture.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la influencia de la temperatura en la velocidad específica de crecimiento (μ) del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* cepas P43A y PCC (cepas nativas). Los ensayos se hicieron tanto en cultivo sólido como en cultivo sumergido. Los resultados obtenidos mostraron que para ambas cepas, en cultivo sólido, la máxima μ radial y el menor tiempo de duplicación se obtuvieron a 25 °C (P43A $\mu_r = 0.0165 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 42 \text{ h}$ y PCC $\mu_r = 0.0292 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 23 \text{ h}$); mientras que en cultivo sumergido la temperatura óptima fue 28 °C (P43A $\mu = 0.3467 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 1.99 \text{ h}$ y PCC $\mu = 0.2573 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 2.69 \text{ h}$). En cultivo sólido las μ de la cepa PCC fueron mayores que las de P43A entre 20 y 30 °C, pero a 32 y 34 °C la última cepa presentó velocidades más altas. Mientras que en cultivo sumergido ambas cepas tuvieron una μ similar entre 20 y 23 °C pero a partir de 25 °C P43A presentó velocidades de crecimiento mayores, aunque a 32 y 34 °C la diferencia entre ambas cepas fue mínima. Estos resultados sugieren que P43A presenta una mayor resistencia a la temperatura.

Palabras clave: estrés térmico, hongos entomopatógenos, velocidad de crecimiento, cultivo sumergido, cultivo sólido.

6.2 Artículo publicado

6.2.1 Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones in solid and submerged cultures and thermotolerance of their propagules

World Journal of Microbiology and Biotechnology

Online First™, 12 October 2012

DOI 10.1007/s11274-012-1184-1

<http://www.springerlink.com/content/0959-3993/>

[Performance of two isolates of *Isaria fumosorosea* from hot climate zones.pdf](#)