

# **Evaluación de medios de cultivo para la producción de sinemas y conidios del hongo entomopatógeno *Isaria tenuipes* Peck**

Castillo, L. <sup>1</sup>, Restrepo, S. <sup>1</sup>, Sanjuan, T. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Micología y Fitopatología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes, Cra 1 N° 18A- 12, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Laboratorio de Taxonomía y Ecología de Hongos. Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín (Antioquia), Colombia.

## **RESUMEN**

*Isaria tenuipes* Peck, anamorfo de *Cordyceps takaomontana* Yakush. & Kumaz, es un hongo entomopatógeno que parasita larvas y pupas de lepidópteros. Este hongo se caracteriza por sinemas de color amarillo con numerosos conidios ubicados en el ápice que le dan un aspecto polvoroso. Estudios previos muestran que *I. tenuipes* puede ser utilizado en control biológico y con fines nutracéuticos. Por tal razón se han realizado múltiples estudios para su producción in vitro. El objetivo de este proyecto fue probar diferentes medios de cultivo para la producción de sinemas y la inducción de conidios, que puedan ser de utilidad para la industria. Agar extracto de malta, agar Czapek Dox modificado, medio de arroz integral, Agar Sabouraud dextrosa suplementado con pupa de lepidóptera y medio de arroz integral con pupa de lepidóptero fueron los sustratos utilizados para el análisis, en condiciones de fotoperiodo 12:12. Para la producción de blastosporas se utilizaron medios con sales basales y diferente concentración de glucosa y peptona con una agitación de 167 rpm. De acuerdo con el estadístico Kruskal Wallis se evidenció que el medio arroz integral fue el mejor medio para inducir la formación de sinemas y producción de conidios. Se encontró además que la manipulación de los componentes tales como las fuentes de nitrógeno y carbón pueden ser determinantes para la producción de conidios y sinemas. Los resultados de este proyecto permiten un acercamiento a su cultivo a gran escala y a su implementación en la industria farmacéutica.

**Palabras clave:** Cuerpo fructífero, lepidópteros, nutraceutico, medios de cultivo.

## INTRODUCCIÓN

*Cordyceps sensu lato* (Fr) Link (1833) comprende más de 400 especies (Kobayasi, 1982; Mains, 1950; Stensrud et al., 2005) y es considerado el género más diverso de hongos entomopatógenos en el orden Hypocreales en términos de número de especies y hospederos (Sung et al., 2007). Su distribución es cosmopolita, incluyendo todas las regiones terrestres excepto la Antártida, y por varios años ha despertado el interés de micólogos, debido a su valor potencial para el control biológico de plagas y para uso medicinal (Yun, 2005). Por tal razón, métodos científicos modernos han aumentado para estudiar la producción *in vitro* de cuerpos fructíferos, en un intento por validar lo que la ciencia oriental ha practicado durante siglos. Sin embargo, el rendimiento de la producción a gran escala de *Cordyceps s.lat* es bajo pues la formación de cuerpos fructíferos presenta varias complicaciones. Entre los principales limitantes para su uso comercial, se encuentra la dificultad de obtener formulaciones de medios de cultivo a bajo costo, que produzcan conidios con alta viabilidad y eficiencia en la inducción de sinemas en menor tiempo (Kim et al., 2010; Mascarin et al., 2010; Robl et al., 2009). Por otro lado, algunos hongos entomopatógenos necesitan requerimientos nutricionales exigentes, el crecimiento es bastante lento, o incluso, algunos necesitan aislamientos con tipo de apareamiento opuesto para la formación de cuerpos fructíferos, como es el caso de *Cordyceps militaris* (Shrestha et al., 2005)

Dentro de *Cordyceps s.lat* se destaca *Isaria tenuipes* Peck, estado conidiogénico de *Cordyceps takaomontana* Yakush. & Kumaz, que parasita larvas y pupas de lepidópteros y es conocido por sus amplias aplicaciones para control biológico y en la medicina (Dong et al., 2013; Vega-Aquino et al., 2010). Los cuerpos fructíferos de este hongo se caracterizan por ser sinemas de color amarillo y por tener numerosos conidios ubicados en la punta que le da un aspecto polvoroso (Samson, 1974). Estudios previos han reportado la presencia de compuestos farmacéuticos, como nucleósidos, carbohidratos y compuestos misceláneos, que presentan diferentes propiedades funcionales como efectos anti-cancerígenos (Zhao et al., 2014). Y en efecto, ha sido utilizado en los países del oriente asiático como medicina tradicional y como un ingrediente en alimentos para fortalecer el sistema inmune (Hong et al., 2007). Además, los conidios de este hongo pueden ser inoculados en condiciones

artificiales para producir cuerpos fructíferos tal y como ocurre naturalmente (Fukatsu et al., 1997; Yamanaka et al., 1998). Es así como en varios estudios, *I. tenuipes* se ha implementado como modelo de investigación de mecanismos para la formación de cuerpos fructíferos, con el propósito de poderlo implementar como alternativa para control biológico y para la industria nutracéutica.

En los últimos años, varios estudios han intentado encontrar cultivos artificiales con sustratos alternativos para la producción de conidios y sinemas de *I. tenuipes* (Kana-uchi and Fukatsu, 1999; Xu et al., 2003; Yamanaka et al., 1998). Se ha demostrado que la cantidad y la calidad de los propágulos producidos dependen de varios factores, tales como los nutrientes del medio de cultivo, la densidad del inóculo y condiciones ambientales (Kim et al., 2010). Por eso el objetivo de este estudio es evaluar diferentes medios de cultivo que lleven a una producción más eficiente en condiciones de fotoperiodo 12:12 para aumentar la producción de conidios y sinemas de *Isaria tenuipes*. Lo anterior fue realizado con el fin de obtener un acercamiento de su cultivo a gran escala y su implementación en la industria farmacéutica y alimentaria.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Recolección del hongo entomopatógeno**

*Isaria tenuipes* fue aislada de pupas de lepidóptera en Noviembre 19, del 2013, en un fragmento de Robledal conocido como La Merced, Municipio de Bojacá, Cundinamarca, Colombia, en la vía Bogotá – La Mesa a 2.400 msnm con una temperatura promedio de 14°C.

El aislamiento se mantuvo en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (dextrosa 20 g, extracto de papa 4g, agar 15 g en 1L de Agua destilada) y se incubó 7 días a temperatura ambiente (18°C). Este aislamiento se sembró en medios líquidos y sólidos en diferentes condiciones (Figura 1)

### **Inducción de la formación de sinemas**

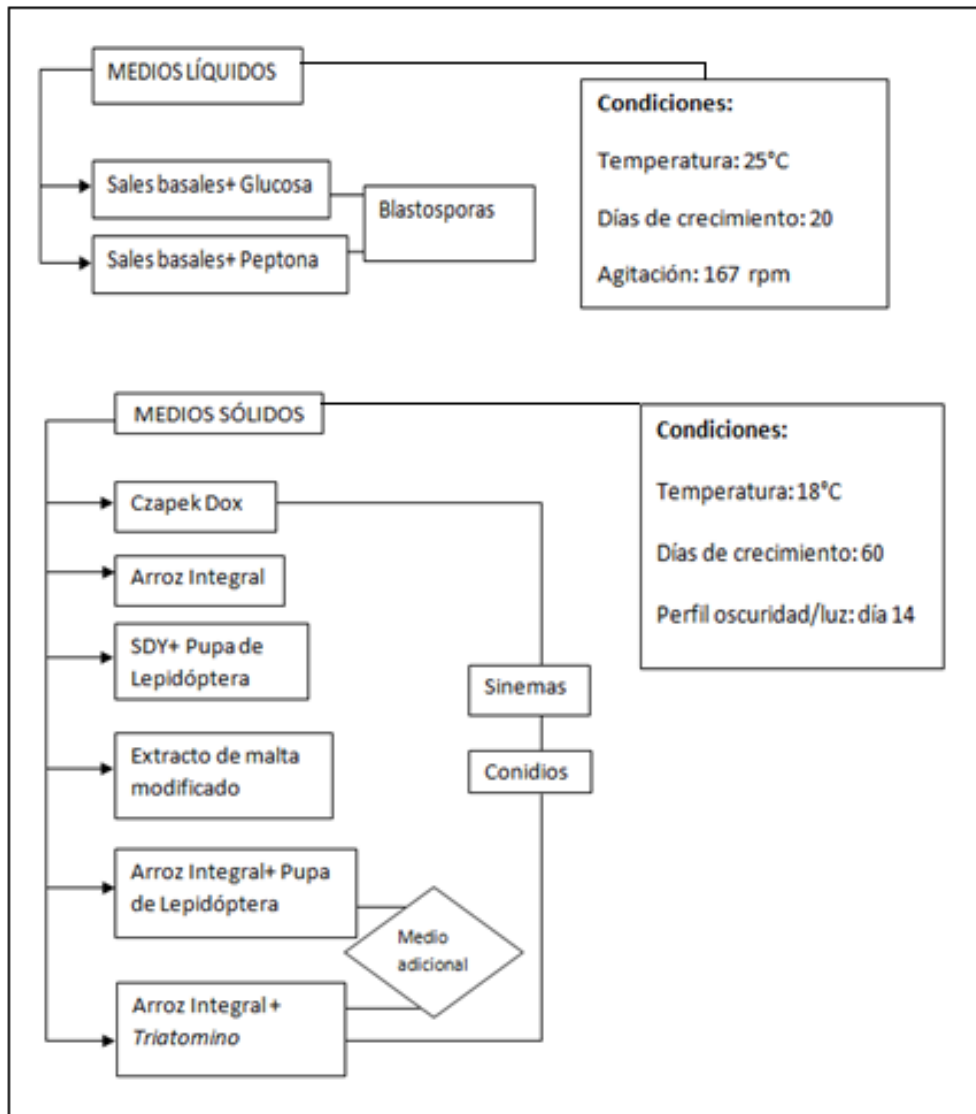
El aislamiento de *Isaria tenuipes* fue sembrado en cinco medios de cultivo diferentes y dos medios adicionales tentativos (Tabla 1). Cada medio se incubó a temperatura ambiente 18°C en un periodo de tiempo de 60 días. Los cultivos fueron precedidos por 14 días de oscuridad (Kana-uchi & Fukatsu, 1999) y a partir del día 15 se sometieron a perfiles de luz-oscuridad 12:12 a temperatura ambiente (18°C) para observar la formación de sinemas y conidios. Por cada medio de cultivo se realizaron 10 réplicas y para los medios tentativos se realizaron 6 réplicas. No se tuvieron en cuenta los medios que se contaminaban.

### **Inducción en la formación de blastosporas en medio líquido**

Se utilizó el medio mínimo de sales en estado líquido propuesto por Jackson y colaboradores (2012) para crecer a *Isaria tenuipes*, suplementado a diferentes concentraciones de glucosa y peptona (Tabla 1). Los medios se incubaron a temperatura de 25°C en un periodo de tiempo de 20 días con una agitación de 167 rpm y se realizaron 6 réplicas. No se tuvieron en cuenta los medios que se contaminaban.

### **Conteo de conidios y medición de sinemas**

Con cada medio se preparó una suspensión de conidios en agua destilada con Tween 80 al 0.1%. Se realizó sonicación durante 15 segundos y luego vortex durante 1 minuto. El conteo de conidios y blastosporas se realizó en cámara de Neubauer mediante observaciones al microscopio (40X). Para la medición de los sinemas se escogieron 10 al azar por cada medio de cultivo y se midió su longitud con regla.



**Figura 1.** Proceso general para la producción de conidios e inducción de sinemas de *I. tenuipes*

**Tabla 1.** Medios de cultivo utilizados para inducir la formación de sinemas y conidios de *I. tenuipes*. <sup>(1)</sup> Medios adicionales <sup>(2)</sup> Medios líquidos.

Medio	Arroz Integral	Pupa de lepidóptera	Integumento <i>Triatomino</i>	Extracto de malta	Glucosa	Peptona	NaNO <sub>3</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	KCl	FeSO <sub>4</sub>	Extracto levadura	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CaCl <sub>2</sub>	MgSO <sub>4</sub>	MnSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	Agar	H <sub>2</sub> O (ml)	
Medio arroz integral	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500
Medio arroz integral + Pupa <sup>1</sup>	20	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Medio arroz integral + <i>Triatomino</i> <sup>1</sup>	20	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15
Agar extracto de malta modificado	-	-	-	10	10	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	500
Medio Czapek Dox	-	-	-	-	15	-	1.5	0.5	0.25	0.25	0.005	-	-	-	-	-	-	-	7.5	500
SDY + Pupa	5	-	-	-	10	5	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	6	500
Sales basales + peptona <sup>2</sup>	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	0.6	1.2	0.09	0.01	0.004	-	-	50
Sales basales + glucosa <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	0.6	1.2	0.09	0.01	0.004	-	-	50

## Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a una prueba de chi-cuadrado para observar si el medio de cultivo influye en el crecimiento del hongo. Esta prueba se realizó para todos los medios, incluyendo los medios adicionales que únicamente tenían tres réplicas, observando simplemente si había crecimiento o no en cada medio de cultivo. Debido a que no todos los medios tenían igual cantidad de réplicas, se hizo el estadístico de prueba kruskal-wallis para los medios que tenían un número de réplicas mayor a cinco, y así observar si la producción de conidios y sinemas está determinada por la composición del medio. Por último, se realizó un análisis de correlación entre las variables conidios y longitud del sinema, utilizando el software estadístico R versión 3.0.2 (The R Foundation for Statistical computing, 2013) con  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

En cada tratamiento se observó que el medio de cultivo influyó en el crecimiento de *I. tenuipes* (Valor  $p=0.005$ ). En la figura 2 se observa que *I. tenuipes* en los medios de arroz integral suplementado con pupa de lepidóptero e integumento de *Triatomino* produjo sinemas con morfología similar. Los sinemas se caracterizaron por tener una apariencia polvorosa en el ápice, con una longitud mayor comparado con los sinemas que se produjeron en el medio agar extracto de malta y SDY + pupa, estos fueron de menor longitud y con una apariencia algodonosa.



**Figura 2.** Crecimiento de *Isaria tenuipes* en los diferentes medios de cultivo a) Czapeck Dox modificado b) Arroz integral c) Arroz integral suplementado con pupa d) Arroz integral suplementado con integumento de *Triatomino* e) Agar extracto de malta modificado f) SDY suplementado con pupa.

Los medios de cultivo con mayor longitud de sinemas fueron el medio arroz integral y agar extracto de malta modificado (Figura 3), comparado con el medio SDY+ pupa donde la media difiere de estos dos medios (Valor  $p= 0.001$ ). Respecto a la producción de conidios el mejor medio fue el de arroz integral, aunque la media del medio SDY + pupa no difiere significativamente. Mientras que el medio agar extracto de malta no produjo eficientemente conidios, y el medio de Czapek Dox el crecimiento fue restringido y no se observaron sinemas y conidios (Valor  $p= 6.38 \times 10^{-5}$ ). En cuanto a los medios arroz integral suplementado con pupa y el medio arroz integral con *Triatomino*, se observa que ayudan a la esporulación de *I. tenuipes*, pero en cuanto a la producción de sinemas el medio arroz integral con pupa no fue eficiente (Tabla 2). Además, se encontró que no existe una correlación entre la longitud del sinema y la producción de conidios (Valor  $p= 0.06$ ).

Se evidenció crecimiento micelial en todos los cultivos de *Isaria tenuipes* de los tratamientos de arroz integral y agar extracto de malta a partir del día 10. Contrario al medio SDY con pupa donde el crecimiento se observó el día 20, y al medio Czapek Dox donde el crecimiento fue al día 30 después de la inoculación. En los medios líquidos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos para la obtención de blastosporas (Valor  $p= 0.29$ ).

**Tabla 2.** Producción de conidios, longitud del sinema de *I. tenuipes* en cada medio después de 60 días a temperatura 18°C. Producción de blastosporas en medio líquido después de 20 días a temperatura 25°C. <sup>(1)</sup> Medios adicionales. a) Medias calculadas para tratamientos con réplicas mayores a 5 (b) Medias calculadas para 3 réplicas.



Medio	Conidios (10 <sup>3</sup> /ml)	Sinemas (mm)	Blastosporas (10 <sup>3</sup> /ml)
Medio arroz integral	163 (a)	19.3 (a)	-
Agar extracto de malta modificado	15 (a)	19.1 (a)	-
SDY + Pupa	100 (a)	12 (a)	-
Medio Czapek Dox	0 (a)	0 (a)	-
Medio arroz integral + Pupa <sup>1</sup>	65 (b)	7.9 (b)	-
Medio arroz integral + Triatomino <sup>1</sup>	88 (b)	11.4 (b)	-
Sales basales + Peptona	-	-	54
Sales basales + Glucosa	-	-	26



**Figura 3.** Sinemas de *Isaria tenuipes* a) medio arroz integral b) agar extracto de malta modificado (Izquierda a derecha)

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio confirman que la manipulación de los parámetros nutricionales de los medios de cultivo son un factor esencial a favor de la producción de conidios y la fructificación de sinemas. En este estudio el medio de arroz integral, con un fotoperiodo de luz/oscuridad<sup>1</sup>, es el sustrato ideal para este propósito. Por lo tanto, se puede

inferir que *Isaria tenuipes* prefiere los medios con alta proporción de carbohidratos y proteínas.

**La producción de conidios está inversamente relacionada con la longitud de los sinemas.** Tal es el caso del medio SDY + pupa, del cual se esperaba que produjera un gran número de sinemas, ya que los componentes químicos comunes en las pupas de los lepidópteros podrían inducir la formación en gran cantidad de cuerpos fructíferos de *I. tenuipes* (Yamanaka et al., 1998). En este medio se produjo mayor cantidad de conidios con sinemas de menor longitud, contrario al medio agar extracto de malta que produjo una mayor longitud de sinemas pero con una baja cantidad de conidios (Figura 2). Sin embargo, en este estudio la fuente de carbono y nitrógeno suministrada a cada medio de cultivo se esperaba que estimulara por igual proporción el crecimiento y la esporulación de *I. tenuipes*.

**En los medios de cultivo estudiados se evidenció que los distintos tipos de nutrientes afectan la esporulación y formación de sinemas diferencialmente.** Robl et al. (2009) demostró que un medio rico en nutrientes no favorecería la esporulación, contrario a un medio pobre en nutrientes que estimularía el crecimiento de cuerpos fructíferos. Esto podría explicar que en los medios de arroz integral y SDY suplementados con pupa e integumento de *Triatomino* produjeron eficientemente conidios, pero no un óptimo rendimiento en la fructificación de sinemas. Eventualmente, en estos medios la esporulación se produce probablemente con el agotamiento del nitrógeno en la presencia de carbohidratos (Robl et al., 2009). Por otro lado, la cantidad y la calidad de los propágulos producidos al depender de varios factores, como los nutrientes del medio de cultivo y la densidad del inóculo, pueden ser una de las razones por las cuales el medio Czapek Dox modificado mostró un crecimiento restringido. Al ser un medio compuesto de iones y cationes, éstos probablemente crearon inhibición del hongo (Warcup, 1950).

**La producción de blastosporas de *I. tenuipes* en medios de cultivo líquidos, no influyó la variación en la concentración de glucosa y peptona.** Esto sugiere que la fuente de carbono y nitrógeno en cada medio no fue suficiente para obtener altas concentraciones de

blastosporas, ya que estudios similares han utilizado fuentes complejas de nitrógeno y carbono, y observaron que una concentración adecuada favorece la producción de blastosporas (Eyal et al., 1994; Jackson, 2012). Sin embargo, las condiciones de cinética de crecimiento como la temperatura, el volumen del medio y la aireación también son condiciones importantes para obtener adecuadamente blastosporas en masa a bajo costo (Jackson et al., 2006, 2003, 1997). Por tal razón, controlar estas condiciones mejoraría aún más la producción de blastosporas en medio líquido.

**Los resultados de este estudio comprueban la factibilidad de producir medios de cultivo a bajo costo para la producción de cuerpos fructíferos y estructuras infectivas de *I. tenuipes*.** Los medios suplementados con pupa e integumento, como el medio SDY y arroz integral mostraron buenos resultados en cuanto a la formación de cuerpos fructíferos, esto comprueba que no se necesitan sustratos con un alto valor económico. No obstante, el rendimiento en la producción de conidios tuvo diferentes valores para cada medio de cultivo, por tal razón, se recomienda en futuros estudios ampliar este trabajo e implementar nuevas formulaciones con cereales y comprobar si estos optimizan la producción de conidios de *Isaria tenuipes*.

## CONCLUSIONES

Los componentes nutricionales de los medios de cultivo son esenciales para la producción de conidios y el desarrollo de sinemas. El medio arroz integral con perfil luz/oscuridad mostró resultados considerablemente favorables en la inducción *in vitro* de cuerpos fructíferos y la producción de conidios con respecto a los otros tratamientos. Sin embargo, se podría modificar la formulación de los medios de agar extracto de malta y de Czapeck Dox para mejorar la producción de conidios. El medio mínimo de sales en estado líquido se podría modificar con otras fuentes alternativas de carbono y nitrógeno. Los sustratos utilizados en este estudio, que mostraron óptimos resultados en la formación de cuerpos fructíferos y producción de conidios, prueban la posibilidad de implementar medios de cultivo a bajo costo como alternativa para la producción a gran escala de *Isaria tenuipes*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo contó con el apoyo del laboratorio de Micología y Fitopatología de la Universidad de los Andes. A Juan Sebastián Chiriví y a Adriana Castillo por sus consejos rutinarios en el trabajo de laboratorio.

## REFERENCIAS

- Dong, J.Z., Lei, C., Zheng, X.J., Ai, X.R., Wang, Y., Wang, Q., 2013. Light Wavelengths Regulate Growth and Active Components of *Cordyceps militaris* Fruit Bodies. *J. Food Biochem.* 37, 578–584. doi:10.1111/jfbc.12009
- Eyal, J., Walter, J.F., Osborne, L., Landa, Z., 1994. Method for production and use of pathogenic fungal preparation for pest control. US5360607 A.
- Fukatsu, T., Sato, H., Kuriyama, H., 1997. Isolation, inoculation to insect host, and molecular phylogeny of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 203–208. doi:10.1006/jipa.1997.4696
- Hong, I.-P., Nam, S.-H., Sung, G.-B., Chung, I.-M., Hur, H., Lee, M.-W., Kim, M.-K., Guo, S.-X., 2007. Chemical Components of *Paecilomyces tenuipes* (Peck) Samson. *Mycobiology* 35, 215. doi:10.4489/MYCO.2007.35.4.215
- Jackson, M.A., 2012. Dissolved oxygen levels affect dimorphic growth by the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea*. *Biocontrol Sci. Technol.* 22, 67–79. doi:10.1080/09583157.2011.642339
- Jackson, M.A., Cliquet, S., Iten, L.B., 2003. Media and Fermentation Processes for the Rapid Production of High Concentrations of Stable Blastospores of the Bioinsecticidal Fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Biocontrol Sci. Technol.* 13, 23–33. doi:10.1080/0958315021000054368
- Jackson, M.A., Erhan\*, S., Poprawski†, T.J., 2006. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) 1 1 The mention of firm names or trade products does not imply that they are endorsed or recommended by the US Department of Agriculture over other firms or similar products not mentioned. *Biocontrol Sci. Technol.* 16, 61–75. doi:10.1080/09583150500188197
- Jackson, M.A., McGuire, M.R., Lacey, L.A., Wraight, S.P., 1997. Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Mycol. Res.* 101, 35–41. doi:10.1017/S0953756296002067
- Kana-uchi, A., Fukatsu, T., 1999. Light-induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Mycoscience* 40, 349–351. doi:10.1007/BF02463879

- Kim, S.-Y., Shrestha, B., Sung, G.-H., Han, S.-K., Sung, J.-M., 2010. Optimum Conditions for Artificial Fruiting Body Formation of *Cordyceps cardinalis*. *Mycobiology* 38, 133. doi:10.4489/MYCO.2010.38.2.133
- Kobayasi, Y., 1982. Keys to the taxa of the genera *Cordyceps* and *Torrubiella*. *Trans Mycol Soc Jpn.* 23, 329–364.
- MAINS, E.B., 1950. Entomogenous species of *Akanthomyces*, *Hymenostilbe* and *Insecticola* in North America. *Mycologia* 42, 566–589 pp. doi:10.2307/3755572
- Mascarin, G.M., Alves, S.B., Lopes, R.B., 2010. Culture media selection for mass production of *Isaria fumosorosea* and *Isaria farinosa*. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53, 753–761. doi:10.1590/S1516-89132010000400002
- Robl, D., Sung, L.B., Novakovich, J.H., Marangoni, P.R.D., Zawadneak, M.A.C., Dalzoto, P.R., Gabardo, J., Pimentel, I.C., 2009. Spore production in *Paecilomyces lilacinus* (Thom.) samson strains on agro-industrial residues. *Braz. J. Microbiol.* 40, 296–300. doi:10.1590/S1517-83822009000200016
- Samson, R.A., 1974. *Paecilomyces* and Some Allied Hyphomycetes. Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Shrestha, B., Han, S.-K., Lee, W.-H., Choi, S.-K., Lee, J.-O., Sung, J.-M., 2005. Distribution and *in vitro* Fruiting of *Cordyceps militaris* in Korea. *Mycobiology* 33, 178. doi:10.4489/MYCO.2005.33.4.178
- Stensrud, O., Hywel-Jones, N.L., Schumacher, T., 2005. Towards a phylogenetic classification of *Cordyceps*: ITS nrDNA sequence data confirm divergent lineages and paraphyly. *Mycol. Res.* 109, 41–56.
- Sung, G.-H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.-M., Luangsa-ard, J.J., Shrestha, B., Spatafora, J.W., 2007. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.* 57, 5–59. doi:10.3114/sim.2007.57.01
- Vega-Aquino, P., Sanchez-Peña, S., Blanco, C.A., 2010. Activity of oil-formulated conidia of the fungal entomopathogens *Nomuraea rileyi* and *Isaria tenuipes* against lepidopterous larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 103, 145–149. doi:10.1016/j.jip.2009.12.002
- Warcup, J.H., 1950. The Soil-Plate Method for Isolation of Fungi from Soil. *Nature* 166, 117–118. doi:10.1038/166117b0
- Xu, C.-P., Kim, S.-W., Hwang, H.-J., Choi, J.-W., Yun, J.-W., 2003. Optimization of submerged culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Paecilomyces tenuipes* C240. *Process Biochem.* 38, 1025–1030. doi:10.1016/S0032-9592(02)00224-8
- Yamanaka, K., Inatomi, S., Hanaoka, M., 1998. Cultivation characteristics of *Isaria japonica*. *Mycoscience* 39, 43–48. doi:10.1007/BF02461577
- Yun, J.S., 2005. Effect of *Cordyceps*, *Paecilomyces* sp., *Cordyceps pruinosa* and *Paecilomyces japonica*, on the Development of Domestic Silkworm, *Bombyx mori*. *Entomol. Res.*
- Zhao, J., Xie, J., Wang, L.Y., Li, S.P., 2014. Advanced development in chemical analysis of *Cordyceps*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 87, 271–289. doi:10.1016/j.jpba.2013.04.025