

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**



**UNIDAD IZTAPALAPA**

**DIVISIÓN CBS**

**"Efecto del sistema de cultivo con pulsos oxidantes en la  
producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*"**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**I.B.I. DAVID GÓMEZ PRECIADO**

**Director**

**Dr. Octavio Loera Corral**

**Asesores**

**Dra. Divanery Rodríguez Gómez**

**Dr. Juan Carlos Torres Guzmán**

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT con la referencia 001466.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D. F. Se contó con el financiamiento de la UAM-Iztapalapa, el CONACyT mediante el proyecto de Ciencia Básica 001465 y la Red Promep.

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

**Efecto del sistema de cultivo con pulsos oxidantes en la producción de conidios  
de *Metarhizium anisopliae***

que presentó:

**I.B.I. DAVID GÓMEZ PRECIADO**

**Comité Tutorial:**

Director: Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora: Dra. Divanery Rodríguez Gómez

Asesor: Dr. Juan Carlos Torres Guzmán, Universidad de Guanajuato

**Jurado:**

**Presidente:** Dra. Concepción Keiko Shiraí Matsumoto \_\_\_\_\_

**Secretario:** Dra. Divanery Rodríguez Gómez \_\_\_\_\_

**Vocal:** Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez \_\_\_\_\_

**Vocal:** Dr. Paul Misael Garza López \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre por brindarme en todo momento su apoyo moral y económico.

A la Universidad Autónoma Metropolitana y al CONACYT por la beca otorgada.

Al Dr. Octavio Loera Corral por su disposición para dirigir esta tesis, por brindarme en todo momento su apoyo y confianza.

A mis asesores, Dra. Divanery Rodríguez Gómez y Dr. Juan Carlos Torres Guzmán por sus valiosos consejos, sugerencias y asesorías.

A mis compañeros y amigos del W-104, Rafael Alejandro Angel Cuapio, Nohemí a Francisco Miranda a Gerardo Cuevas, Daniel Yopez .

Muy en especial al Dr. Paul Misael Garza López y a su futura esposa.

A la Dra. Martha Dolores Bibbins por sus elegantes comentarios y sugerencias que fueron de gran ayuda de igual manera a la Dra. Divanery Rodríguez Gómez

A las observaciones del Dr. Juan Carlos Torres que fueron de gran ayuda para complementar el trabajo

Y a la máquina de café que está afuera del anexo T por su fiel compañía

Agradezco muy en especial el apoyo de la Dra. Alejandra Serrato Díaz y al laboratorio divisional de biología molecular de la UAM-I

A todos, MUCHAS GRACIAS!!!

## RESUMEN

Los plaguicidas químicos son muy eficaces en el combate de insectos plaga en el campo, y son de acción rápida así como también más fáciles de producir comparados con los bio-plaguicidas, sin embargo sus efectos en el ambiente y en la salud humana son muy perjudiciales, por ejemplo afectando la capacidad reproductiva en humanos, además de estar relacionados con ciertos tipos de cáncer y afectar la calidad del producto final. Es por ello que los bio-plaguicidas representan una alternativa no solo amigable al medio ambiente sino también de bajo riesgo a la salud humana. Los métodos de producción de los mismos no están estandarizados, por ejemplo los hongos entomopatógenos entre los que se encuentran, hongos como *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* entre otros han resultado ser muy eficaces en el control de plagas. Estos organismos pueden ser producidos por diferentes métodos, como cultivos superficiales, cultivos sólidos que pueden ser granos o residuos agroindustriales como bagazos o cáscaras, o bien soportes inertes embebidos en algún medio nutritivo, también pueden ser producidos en medios líquidos o bien en medios bifásicos.

Diversas investigaciones se han orientado al desarrollo de una gran variedad de sistemas orientados a elevar la producción de las unidades infectivas de estos hongos llamadas conidios, por medio de la modificación de los componentes en los medios de cultivo, o por modificación de las condiciones de crecimiento como estrés osmótico, estrés hídrico, la influencia de la luz, o pulsos de oxígeno.

Una parte importante para el estudio de los hongos entomopatógenos es la conservación, en este sentido se han desarrollado varios métodos para este fin, en este trabajo se evaluó la conservación en viales con agua desionizada estériles, y se encontró confiable hasta por seis meses.

En este trabajo se evaluó el efecto del arroz y la avena en la producción de conidios de *M. anisopliae*, para determinar el mejor substrato libre de aditivos, encontrando que la mezcla de granos de arroz y de avena como el mejor para la producción de conidios. Por otro lado, una vez determinado el mejor medio se evaluó el efecto de pulsos oxidantes en la producción de estos

conidios, encontrando que el efecto de estos pulsos fue benéfico para la producción de conidios en un cultivo superficial, basado en harina de arroz y avena, pero no para un cultivo sólido sobre granos de arroz y avena, con rendimientos de  $1.5 \times 10^9$  con/gssi y  $1.5 \times 10^8$  con/gssi respectivamente para las condiciones atmósfera modificada ( $O_2$  26%) y atmósfera normal  $O_2$  21%. En cuanto a la calidad de los conidios (germinación y viabilidad)....

Con la finalidad de estudiar el efecto de los pulsos oxidantes en la conidiación se evaluó la expresión de un gen asociado a la misma (*cag8*) en *M. anisopliae* en los sistemas de cultivo superficial y sólido sometidos a pulsos oxidantes, encontrando que la aplicación de dichos pulsos favoreció la expresión del gen en el sistema de cultivo superficial 24h después de la aplicación del primer pulso. En contraste, la expresión de dicho gen en el sistema de cultivo sólido fue mayor bajo condiciones de atmósfera normal, es decir sin pulsos oxidantes.

Lo anterior es importante ya que mostró que no se pueden aplicar estímulos como pulsos oxidantes a *M. anisopliae* sin tomar en cuenta al sistema de cultivo, superficial o sólido de manera indistinta, requiriendo recabar más datos para la optimización de la producción de conidios de *M. anisopliae* en un sistema de cultivo sólido con pulsos oxidantes con miras al diseño de un bio-reactor funcional en sistema sólido

## Contenido

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1	Control biológico .....	1
1.2	Hongos entomopatógenos.....	2
1.2.1	Modo de acción .....	2
1.2.2	<i>Metarhizium anisopliae</i> .....	4
1.3	Producción de conidios.....	5
1.4	Regulación de la conidiación.....	7
1.5	Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.....	9
1.6	Cultivos superficiales y Cultivos sólidos.....	11
1.7	qPCR como método para medir la expresión génica .....	11

<b>2</b>	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
5.1	Objetivo general .....	16
5.2	Objetivos particulares.....	16
<b>6</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
6.1	Estrategia experimental.....	17
6.2	Material biológico e identificación del microorganismo.....	18
6.3	Propagación de <i>M. anisopliae</i> .....	18
6.3.1	Obtención del cultivo puro .....	19
6.3.2	Propagación del cultivo monospórico.....	19
6.4	Conservación de conidios de <i>M. anisopliae</i> .....	20
6.5	Viabilidad de los conidios conservados .....	20
6.6	Cinéticas de conidiación .....	20
6.6.1	Obtención del inóculo .....	20
6.6.2	Selección del medio de cultivo .....	20
6.6.3	Evaluación de la conidiación con pulsos de O <sub>2</sub> (26%) en cultivo superficial .....	21
6.6.4	Evaluación de la conidiación con pulsos de Oxígeno (26%) en cultivo sólido.....	22
6.6.5	Pruebas de calidad: viabilidad y germinación .....	22
6.7	Evaluación del nivel de expresión del gen <i>cag8</i> por inducción con pulsos de O <sub>2</sub> (26%) .....	22
6.7.1	Diseño de cebadores y sonda .....	22
6.7.2	Extracción de RNA: pruebas de integridad y pureza .....	23
6.7.3	Síntesis de DNA complementario (cDNA) .....	23
6.7.4	Obtención de DNA total de un cultivo de <i>M. anisopliae</i> .....	23
6.7.5	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	23
6.8	Análisis estadístico.....	24
<b>7</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>24</b>
7.1	Identificación del hongo .....	24

7.2	Viabilidad de conidios conservados.....	24	
7.3	Selección de un medio de cultivo para <i>M. anisopliae</i> .....	26	
7.4	Evaluación de conidiación con pulsos de oxígeno (26%) en cultivo superficial.....	28	
7.5	Evaluación de la conidiación con pulsos de oxígeno (26%) en cultivo sólido.....	30	
7.6	Pruebas de Calidad .....	32	
	.....Evaluación del nivel de expresión del gen <i>cag8</i> por inducción con pulsos de O <sub>2</sub> (26%)		34
7.7	.....	34	
7.7.1	Expresión genética en cultivo superficial .....	34	
7.7.2	Expresión genética en cultivo sólido.....	35	
8	CONCLUSIONES.....	38	
9	PERSPECTIVAS .....	39	
10	REFERENCIAS:.....	40	
	ANEXO A .....	51	
	ANEXO B .....	53	
	ANEXO C.....	55	
	ANEXO D.....	56	
	ANEXO E.....	57	

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> (a) Conidios aéreos de <i>M. anisopliae</i> agregados en columna obtenidos medio superficial. (b) Blastosporas de <i>M. anisopliae</i> producidas en medio líquido. (Fargues <i>et al.</i> , 2002) .....	<b>6</b>
<b>Figura 2.</b> Ciclo regulatorio de la proteína G heterotrimérica (tomado: Universidad de Oulu, Finlandia).....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Sistemas de desintoxicación Redox, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). (Breyer 2011) .	<b>10</b>
<b>Figura 4</b> (a): Técnica de siembra de cultivo monoclonia de <i>M. anisopliae</i> ; (b): Colonia aislada de <i>M. anisopliae</i>	<b>19</b>
<b>Figura 5.</b> Crecimiento radial de una colonia aislada en caja de Petri con medio ADS .....	<b>19</b>
<b>Figura 6.</b> Recambio atmosférico de las unidades experimentales, nótese las agujas de entrada y de salida de flujo de aire, $20\text{ cm}^3\text{ s}^{-1}$ ( $\text{O}_2$ al 26%), durante un min. ....	<b>21</b>
<b>Figura 7.</b> Viabilidad de conidios conservados en agua desionizada .....	<b>25</b>
<b>Figura 8.</b> Ajuste de los datos de viabilidad (♦) a un modelo polinomial de tercer grado (- -) .....	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Análisis de la producción de conidios sobre tres medios de cultivo. Arroz(□), Avena (*), Arroz-Avena (*) Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).....	<b>27</b>
<b>Figura 10.</b> Producción de conidios en medio superficial, reportado como: conidios por centímetro cuadrado( $\text{con}/\text{cm}^2$ ). La línea punteada corresponde a la atmósfera modificada (26% $\text{O}_2$ - - - -). La línea continua la atmósfera normal (21% $\text{O}_2$ --♦--), la flecha indica el punto de recambio. ....	<b>29</b>

**Figura 11.** Producción de conidios en medio sólido reportado como conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gssi). La línea punteada corresponde a la atmósfera modificada (26% O<sub>2</sub> - - - -). La línea continua la atmósfera normal (21% O<sub>2</sub> - - - -), la flecha indica el punto de recambio ..... **30**

**Figura 12.** Expresión relativa del gen *cag8* en cultivo superficial. Las barras grises corresponden a la condición de 21% ■; Las barras negras corresponden a la condición de 26% ■; Las letras indican diferencia significativa (P<0.05) ..... **35**

**Figura 13.** Expresión relativa del gen *cag8* en cultivo sólido. Las barras grises corresponden a la condición de 21% ■; Las barras negras corresponden a la condición de 26% ■. .... **36**

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Clasificación de *Metarhizium anisopliae*. Catalogue of life: 2013 ..... **5**

# 1 Introducción

## 1.1 Control biológico

El control biológico se define como el uso de organismos vivos para reducir la densidad de población o impacto de un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante o menos dañino (Eilenberg *et al.*, 2001). El control biológico es un área en crecimiento la cual incluye el desarrollo científico y tecnológico de diversas disciplinas, por ejemplo participan ecólogos, entomólogos, botánicos, patólogos de plantas y microbiólogos todos contribuyendo en el tema desde diferentes ángulos. Los mayores usos de los agentes de control biológico son: (1) control biológico de plagas de invertebrados, utilizando depredadores, parasitoides y patógenos, (2) control biológico de plantas utilizando herbívoros y patógenos, y (3) control biológico de patógenos de plantas utilizando microorganismos antagonistas. El control biológico queda dentro del marco del manejo integrado de plagas (MIP). El MIP es un sistema de decisión para la selección y uso de tácticas de control de plagas, basado en un análisis costo/beneficio que toma en cuenta los intereses e impacto en los productores la sociedad y el medio ambiente. El control biológico es así utilizado junto con otras estrategias de control (Eilenberg *et al.*, 2001).

El control biológico incluye cuatro estrategias "control biológico clásico", "control biológico por inoculación", "control biológico por inundación", "control biológico por conservación". El control biológico clásico es la introducción intencional de un agente de control exótico, usualmente co-evolucionado, para su establecimiento permanente y a largo plazo para el control de una plaga. El control biológico por inoculación es la liberación intencional de un organismo vivo como un agente de control biológico con el fin de que se multiplique y controle la plaga por un periodo extenso, aunque no permanente. El control biológico por inundación es el uso de organismos vivientes para controlar una plaga, exclusivamente por la liberación de los organismos en sí. El control biológico por conservación es la modificación del ambiente o de las prácticas existentes para proteger y potenciar a los enemigos naturales o a otros organismos, para reducir el efecto de las plagas (Eilenberg *et al.*, 2001).

## 1.2 Hongos entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos son encontrados en las divisiones Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota así como en Chytridiomycota y Oomycota, las infecciones de estos hongos ocurren en artrópodos que afectan cultivos así como también en insectos y/o especies las cuales no son plagas, como por ejemplo arañas y hormigas (Shah y Pell, 2003).

Existen más de 700 especies reunidas en 100 géneros que tienen la particularidad de parasitar a diferentes tipos de artrópodos (insectos y ácaros) y de encontrarse en los hábitats más variados, y dentro de éstos, en cultivos anuales, semiperennes y perennes. Algunos géneros de estos hongos incluyen a *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* y *Lecanicillium*. Estos hongos pueden jugar un papel muy importante en la salud humana, ya que algunas especies son virulentas para moscas y mosquitos (Leucona *et al.*, 1995). El uso de los hongos entomopatógenos como agentes de control biológico reduce las poblaciones de insectos plaga. Estos hongos se presentan de manera natural como infecciones en el insecto huésped, el cual puede ser recolectado en el campo e incubado en el laboratorio para el aislamiento y la documentación del hongo. Por ejemplo *Beauveria bassiana* se ha encontrado en más de 700 especies de huéspedes (Inglis *et al.*, 2001).

### 1.2.1 Modo de acción

Los hongos entomopatógenos inician una infección cuando los conidios se ponen en contacto con el cuerpo del insecto, el conidio es entonces el propágulo infectivo que al ponerse en contacto y adherirse a la cutícula del insecto da inicio al ciclo infectivo. La adhesión a la cutícula es vía mecanismos hidrofóbicos, mediados por proteínas de la superficie de los conidios llamadas hidrofobinas, entre ellas se encuentra la codificada por el gen *srgA* en *M. anisopliae* (Bidochka *et al.*, 2001). Además de las hidrofobinas, se han identificado dos proteínas de adhesión en el género *Metarhizium* MAD1 y MAD2, codificadas por los genes *mad1* y *mad2*, en especial *mad1* se ha visto involucrado en el mecanismo de adhesión a la cutícula del insecto (Wyrebeck y Bidochka, 2013). Una vez adheridos a la superficie del insecto, los conidios desarrollan un tubo germinativo que por medio de presión mecánica y enzimas de degradación atraviesa la cutícula de la plaga e invade su interior.

Una vez atravesado el exoesqueleto comienza la invasión en el sistema circulatorio (hemolinfa) una vez allí se transforman morfológicamente en células individuales llamadas blastosporas (Franco *et al.*, 2011) que colonizan los diversos órganos, en esta etapa comienzan los mecanismos de defensa del insecto, a los cuales el hongo debe superar. Uno de los mecanismos con los que cuenta el hongo para superar estos sistemas de defensa es la síntesis de distintas moléculas, por ejemplo *Metarhizium anisopliae* produce las llamadas destruxinas (Pal *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2010); Químicamente las destruxinas son hexadepsipéptidos cíclicos, compuestos de un hidroxiaácido y cinco residuos de aminoácidos, se han aislado cinco análogos etiquetados de la A-E, cuyas formas difieren en el grupo R del residuo de hidroxiaácido. La inyección, ingestión o aplicación tópica de las destruxinas en el insecto causa parálisis tetánica. Las Destruixinas inducen despolarización de la membrana debido a la apertura de los canales de calcio y esto ha sido implicado como la causa de la parálisis tetánica (Pal *et al.*, 2007). En *Beauveria bassiana* se han descrito otras toxinas involucradas las llamadas beauvericinas (Franco *et al.*, 2011).

Otras sustancias importantes durante el proceso de invasión del hongo son las de naturaleza antibiótica, una mezcla de péptidos denominada efrapeptinas, producidas por *Tolypocladium inflatum*, y *Tolypocladium cylindrosporum* entre otros, se ha demostrado que las efrapeptinas producidas por *T. cylindrosporum* interfieren con la aglutinina en larvas de *Galleria mellonella*, lo que sugiere que dichos metabolitos pueden interferir en las interacciones ligando-receptor que ocurren en la membrana plasmática permitiendo inferir que la mayoría de las interacciones entre células y los componentes humorales del sistema inmune de los insectos están mediados por receptores (Götz *et al.*, 2002). Las hifas proliferan dentro del insecto y emergen de su interior y subsecuentemente conidian en el cadáver del insecto. Bajo condiciones favorables, los nuevos conidios producidos serán dispersados e infectarán a otros insectos (Fang *et al.*, 2007). La Fig. 1 muestra el ciclo infectivo de *M. anisopliae* sobre una garrapata.

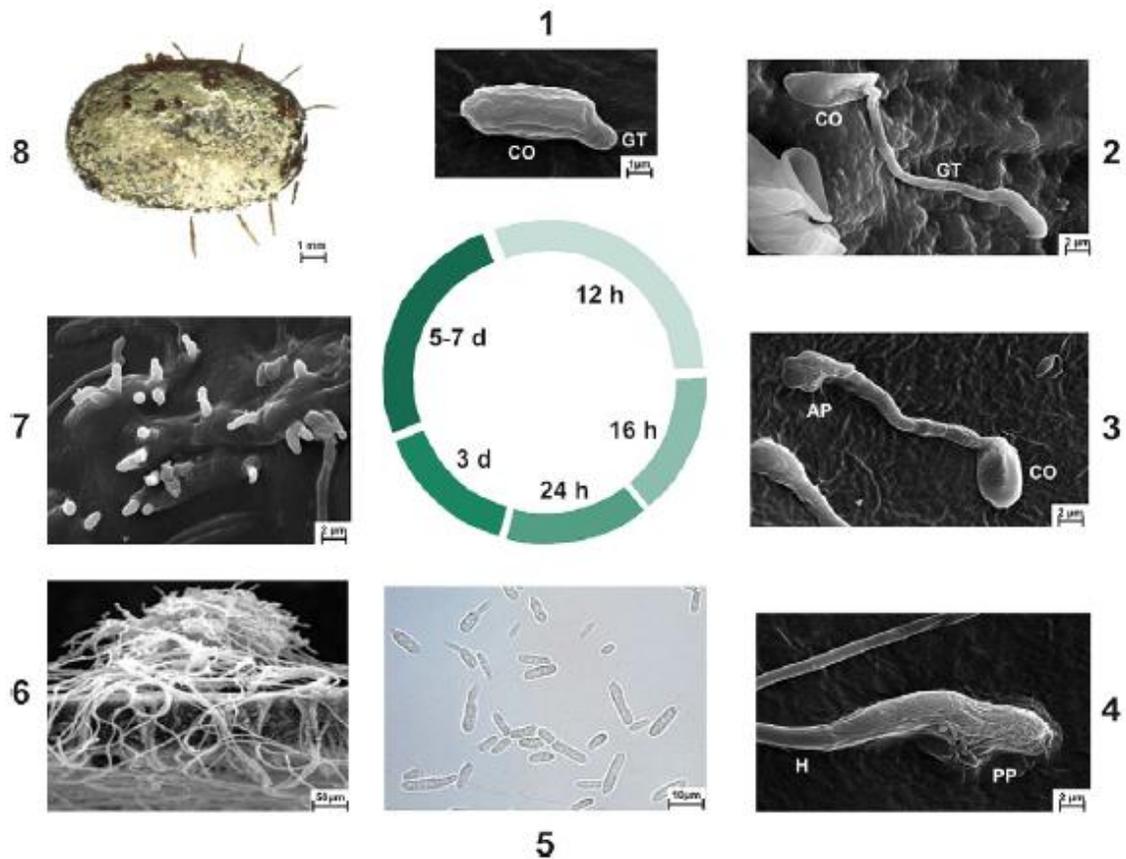


Fig. 1. Etapas de la infección de *M. anisopliae* sobre un huésped. 1. adherencia del conidio a la cutícula, 2. germinación del conidio, 3. diferenciación del tubo germinal en apresorio, 4. penetración de la cutícula, 5. microscopía óptica de la diferenciación de la hifa en blastosporas, 6. colonización del huésped, 7. extrusión hacia la superficie del cadáver del huésped, 8. producción de conidios sobre el cadáver del huésped (Schrank *et al.*, 2010)

### 1.2.2 *Metarhizium anisopliae*

Es uno de los géneros mejor conocidos de hongos entomopatógenos, comúnmente conocido como "hongo de la muscardina verde". Catalogado en Rusia como un patógeno del abejorro del trigo, *Anisoplia austriaca* (Coleoptera: Scarabaeidae), es usado para el control de insectos en muchos países incluyendo los Estados Unidos, Brasil, Australia y las Filipinas (Driver *et al.*, 1999) y México. Tiene un alto grado de especificidad (Tanada y Kaya, 1993).

Como dato histórico se sabe que durante las estaciones de verano de 1922, 1923, 1924 y 1925, en Estados Unidos de Norteamérica un gran número de gusanos de seda murieron de una afección ocasionada por un hongo. La enfermedad apareció en los meses cálidos y húmedos; de no haber sido controlada hubiera tomado proporciones epidémicas. Cuando esta afección apareció por primera vez, se asumió que era la enfermedad de la muscardina verde causada por *Metarhizium anisopliae*. En 1924 los gusanos muertos y los cultivos fueron enviados a Miss Vera Charles, micóloga en la oficina de la industria de las plantas en Washington, fue ella quien definitivamente identificó al hongo como *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin (Glasser, 1926), la clasificación actual de *Metarhizium anisopliae* aparece en la Tabla 1.

<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filo</b>	Ascomycota
<b>Clase</b>	Sordariomycetes
<b>Orden</b>	Hypocreales
<b>Familia</b>	Clavicipitaceae
<b>Género</b>	<i>Metarhizium</i>
<b>Especie</b>	<i>anisopliae</i> (Metsch)

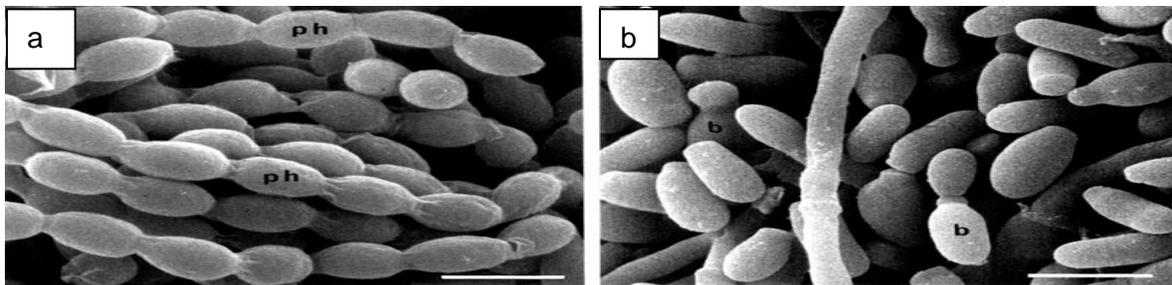
Tabla 1. Clasificación de *Metarhizium anisopliae*. Catalogue of life: 2013

### 1.3 Producción de conidios

Los hongos entomopatógenos son los candidatos ideales para el manejo integrado de plagas (MIP), los procesos de producción y formulación influyen directamente en el costo, la vida de anaquel, la virulencia y la eficacia de estos productos (Kassa *et al.*, 2008). Los procesos de producción para estos bioplaguicidas deben ser de bajo costo y producir concentraciones altas de propágulos viables, virulentos y persistentes. Las tecnologías de producción y formulación han sido desarrolladas para producir conidios aéreos o esporas sumergidas de hongos entomopatógenos. Se han probado medios líquidos, sólidos y bifásicos, el método de producción depende de la cepa usada, la plaga objetivo, el producto final deseado y el mercado (Kassa *et al.*, 2008). El método de producción utilizado tiene efecto en el desarrollo diferencial del hongo, por ejemplo cuando *M. anisopliae* y *M. flavoviride* crecen en medio sólido o superficial, producen conidios (esporas asexuales) por medio de células especializadas llamadas fiálidas. En cultivos sumergidos estos hongos usualmente forman células individuales llamadas blastosporas (células haploides), (Fargues *et al.*, 2002). Estas blastosporas son hidrofílicas y no es fácil por lo tanto su formulación en aceites (Jenkins, 1998). En la

Figura 1 (a), se puede apreciar los propágulos de *M. anisopliae* como cadenas de conidios al crecer en medio superficial y como células separadas cuando crecen en medio líquido (Figura 1 (b))

Autores como Kassa *et al.*(2008) mostraron que para la producción de conidios y esporas de *M. anisopliae* y *B. bassiana*, lo que influenció significativamente la producción fue la composición del medio, independientemente del proceso de producción utilizado (sólido, líquido y bifásico), obteniendo una producción de esporas entre  $1.3 \times 10^9$  y  $10 \times 10^{11}$  esporas/l en medio líquido.



**Figura 1.** (a) Conidios aéreos de *M. anisopliae* agregados en columna obtenidos medio superficial. (b) Blastosporas de *M. anisopliae* producidas en medio líquido. (Fargues *et al.*, 2002)

Fargues *et al.* (2002) evaluaron la producción de propágulos de *M. anisopliae* en medios líquidos de composición variada, y de manera similar a Kassa *et al.* (2008) también notan que la principal diferencia en la producción se debe al tipo de medio de cultivo, encontrando la máxima producción de propágulos con el medio Adamek (C/N:1.99; 20 g/L glucosa) que fue de  $2.4 \times 10^8$  CFU/ml. Más recientemente Jackson y Jaronski (2009), evaluaron seis medios líquidos compuestos de sales basales (Jackson *et al.*, 1997), que variaban en la composición de glucosa y caseína, para determinar el mejor para la producción de tres cepas de *M. anisopliae* var. *anisopliae*, obteniendo una máxima de producción de  $4.3 \times 10^8$  blastosporas/ml, independientemente del medio, pero dependiente de la cepa (MA1200), y mostrando al igual que Fargues *et al.* (2002) que estas variaciones en la composición del medio tienen un impacto no solo en la producción de esporas sino también en la calidad de las mismas. Las características de la cepa así como la composición del medio también son importantes en el caso de los cultivos superficiales. Palma-Guerrero *et al.* (2010) evaluaron más de 10 especies de hongos entomopatógenos encontrando que la adición de quitosán (2mg/ml) al medio superficial mejoraba de entre 5 y 60 veces la producción de conidios, comparadas con los medios sin

quitosán para todas las especies de hongos estudiadas entre ellas *M. anisopliae*. Tlecuil-Beristain *et al.* (2010) mostraron que la producción de conidios se mejora con relaciones C/N bajas (6.85 y 5.73) en un medio superficial a base de harinas de arroz y avena adicionada de peptona de carne, estos autores atribuyen la mejora en la producción a que la peptona es una fuente de nitrógeno. La producción de conidios de *M. anisopliae* es influenciada significativamente por el tipo de sustrato como lo mostraron Bharati *et al.* (2007) quienes probaron varios tipos de granos sin aditivos obteniendo las máximas producciones de conidios con mijo perla y arroz dentro de un tiempo de 14 días  $22.77 \times 10^8$  con/g y  $8.4 \times 10^8$  con/g respectivamente y la menor producción con trigo  $3.76 \times 10^8$  con/g.

Por otro lado se han probado sustratos naturales como arroz, bagazo de azúcar de caña, trigo, para la producción de hongos entomopatógenos con aditivos, Nelson *et al.* (1996) obtuvieron hasta  $4.38 \times 10^9$  con/g de arroz para *B. bassiana*, y hasta  $1.42 \times 10^9$  con/gssi para *M. anisopliae* usando como aditivo glucosa y extracto de levadura. Garza-López *et al.* (2011) obtuvieron una máxima producción de conidios de  $1.14 \times 10^9$  con/gssi usando arroz precocido, con una cepa de *Beauveria bassiana*.

De lo anterior puede concluirse que para la producción de conidios en medios superficiales y medios líquidos tiene que tomarse en consideración la composición de éstos como las relaciones C/N, la presencia de aditivos como peptonas, glucosa o extracto de levadura, contenido de sales y en el caso de granos deberá tenerse en cuenta además el contenido y tipo de azúcares. Por ejemplo Bharati *et al.* (2007) atribuyen su mejor producción de conidios al contenido de maltosa que es liberada por la acción de enzimas hidrolíticas, además de que disacáridos como la maltosa inducen la esporulación de hongos unicelulares (Crandall y Lawrence, 1980).

#### **1.4 Regulación de la conidiación**

El conidio es el propágulo infeccioso, sin embargo los procesos involucrados en la conidiación todavía no están muy bien entendidos, por lo cual es esencial un entendimiento de los procesos regulatorios involucrados en la conidiación para el desarrollo de un mejor bioinsecticida. Las rutas de los reguladores de señales de la proteína G (RGS por sus siglas en inglés) han sido implicadas en el control de diversas funciones celulares, incluyendo la conidiación en los hongos filamentosos (Fang *et al.*, 2007). Estos sistemas regulatorios están bien definidos en *Aspergillus nidulans* y

*Neurospora crassa*. En el caso de *A. nidulans* los genes *fluG*, *flb A-E* y *fadA*, activan el sistema regulatorio central de conidiación a través del gen *brlA*, que a su vez activa secuencialmente a los genes *abaA* y a *wetA*(Liu *et al.*, 2010).

La evidencia acumulada en años recientes apoya la visión de que el hongo utiliza señales de autorregulación, para la percepción de las condiciones adecuadas e iniciar el desarrollo asexual. Estas señales activan sistemas de transducción, los cuales también integran señales exógenas relacionadas a condiciones de estrés (nutricional u osmótico; Roncal y Ugalde, 2003). Por ejemplo en *Aspergillus nidulans*, la proteína FluG, se cree que está involucrada en la biosíntesis de una señal extracelular, y la eliminación del gen *fluG*, conlleva a la formación de colonias algodonosas que no esporulan (Lee y Adams, 1994). Lee y Adams (1996) mostraron la interdependencia entre los genes *fluG*, *flbA* y sus productos FluG y FlbA, los cuales se sugiere que intervienen de manera conjunta en el desarrollo del conidióforo, además de requerir al gen *brlA* alfa.

Recientemente Hegedüs *et al.* (2011) mostraron que *Penicillium chrysogenum* secreta una proteína PAF, la cual potencia la conidiación en *P. chrysogenum* modulando la expresión de *brlA*, el gen central regulatorio para el desarrollo mitospórico. *Aspergillus giganteus* expresa un homólogo de PAF, llamado AFP, y la expresión de *afp* depende de las condiciones exógenas o ambientales como el pH alcalino, el agotamiento de la fuente de carbono, choque térmico, excesos de NaCl y etanol(Meyer y Stah, 2003).

En el caso de *M. anisopliae*, el gen *cag8* está asociado a la conidiación (Fang *et al.*, 2007), cuyo producto está implicado en el sistema RGS y es ortólogo a la proteína FlbA de *A. nidulans* mencionada en los párrafos anteriores. La interrupción del gen *cag8* en *M. anisopliae*, resultó en falta de conidios en placas de agar y de insectos infectados, además de un crecimiento micelial reducido, virulencia disminuida y lisis celular. Estos resultados sugieren que el gen *cag8* está involucrado en los procesos de modulación de la conidiación, virulencia y síntesis de hidrofobinas en *M. anisopliae* (Fang *et al.*, 2007). Carneiro-Leao *et al.*, (2011) mostraron que hubo diferencia en la expresión del gen *cag8* en *M. anisopliae*, en los estadios de germinación, conidiación y patogenicidad pero que además, el nivel de expresión depende de la cepa.

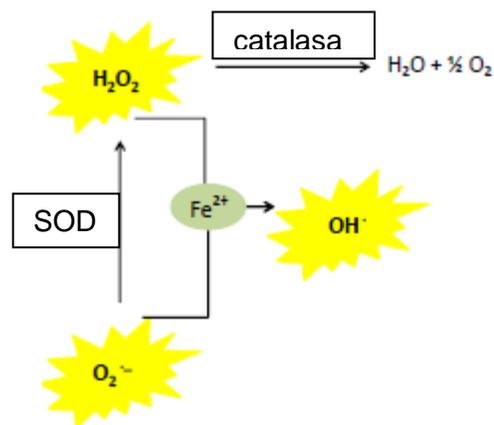
La estructura encargada de sensar las condiciones ambientales en los hongos entomopatógenos es la proteína G heterotrimérica, regulando el cambio entre el crecimiento vegetativo y la conidiación (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009); su activación implica un recambio de GDP-GTP, que se acompaña de la disociación de  $G\alpha$  de  $G\beta$ - $\gamma$ , para ello  $G\alpha$  tiene actividad de GTPasa que requiere de un regulador para su actividad; esta GTPasa de  $G\alpha$  una vez activada hidroliza al GTP. La hidrólisis de GTP implica la fase de desactivación de la proteína G ( $G\alpha\beta\gamma$ ), pues  $G\alpha$  disociada y activa provoca falta de esporulación (Chang *et al.*, 2004)

Recientemente Alspaugh *et al.* (1997) mostraron la importancia de la proteína G heterotrimérica en la percepción de señales ambientales en el hongo *Cryptococcus neoformans*, particularmente la estructura homóloga de la subunidad alfa (GPA1); la cepa mutada  $\Delta gpa1$ , fue incapaz de reaccionar ante los cambios ambientales (falta de nitrógeno, glucosa y hierro) resultando en atenuación de la virulencia. Lo anterior no solo muestra la importancia que la proteína G heterotrimérica tiene en la percepción de las condiciones ambientales sino que además da indicios de que la subunidad alfa puede jugar un papel fundamental en dichos procesos. Factores ambientales como la concentración de oxígeno y el estrés oxidativo tienen un efecto en los niveles de conidiación como lo mostraron los trabajos de Xu *et al.* (2009) y Tlecuitl-Beristain *et al.* (2010), así como también Issaly *et al.* (2005) y Garza-López *et al.* (2012).

## **1.5 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo**

Todos los sistemas biológicos que funcionan en condiciones aerobias están expuestos a oxidantes, ya sea generados intencionalmente o como bio-productos. Bajo condiciones fisiológicas normales, aproximadamente 1-5% del oxígeno consumido por la mitocondria es convertido a aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas de oxígeno (ERO o ROS por sus siglas en inglés) (Breyer, 2011). La mayoría de los ERO intracelulares son generados como bio-productos de reacciones de oxido-reducción en la cadena respiratoria de la mitocondria. Aunque el sistema de transporte de electrones en la mitocondria es muy eficiente, existe la posibilidad de que un electrón reaccione con  $O_2$  generando  $O_2^-$ , en lugar de ser transferido al siguiente acarreador en la cadena (Breyer, 2011).

Cuando se produce un incremento significativo en la cantidad de ERO o ROS dentro de la célula se genera un estado de estrés oxidativo, y es causado principalmente por un desbalance de la capacidad antioxidante o por una deficiencia en los sistemas antioxidantes que controlan los niveles de ERO o ROS (catalasa, superóxido dismutasa; Kim *et al.*, 2009). Las ERO o ROS pueden actuar como moléculas de señalización, regulando respuestas fisiológicas y procesos de desarrollo. Actuando como segundos mensajeros, incluyendo la activación del factor de transcripción NF-kB (Breyer, 2011; Kim *et al.*, 2009). Este factor de transcripción ha sido descrito como un mediador positivo del crecimiento celular (Guttridge *et al.*, 1999). Kim *et al.* (2009) describieron a la proteína TmpL como una proteína transmembrana, presente solo en hongos filamentosos, la cual es la responsable de regular los niveles intracelulares de ERO o ROS así como de la tolerancia a ERO o ROS externas. Breyer (2011) explicó como un exceso en la producción de ERO puede socavar los sistemas de defensa antioxidantes cuyas enzimas catalasa y superóxido dismutasa (Figura 2) son especialmente alteradas durante el proceso natural de envejecimiento. Tlecuítl-Beristain *et al.* (2010) mostraron que atmosferas enriquecidas de O<sub>2</sub> (26%) duplicaron la producción de conidios y sugieren que el aumento en la conidiación pudo deberse a que el estado oxidante indujo una alta expresión de un gen asociado a la conidiación en *M. anisopliae* (*cag8*).



**Figura 2.** Sistemas de desintoxicación Redox, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). (Breyer 2011)

## 1.6 Cultivos superficiales y Cultivos sólidos

Los cultivos superficiales de hongos sobre placas de agar han sido usados por más de un siglo como modelos de crecimiento de hongos filamentosos y pueden ser vistos como modelos simplificados de los cultivos en medio sólido, sin los problemas de barreras de difusión inter-partícula que afectan los sistemas en medio sólido (Ortega-Sánchez *et al.*, 2012). En los cultivos superficiales la profundidad es un factor que tiene influencia en la producción de biomasa en los medios superficiales por ejemplo Kamp y Bidochka, (2002) mostraron que para cultivos de *M. anisopliae* y *Beauveria bassiana* creciendo sobre medio PDA, la profundidad del medio afectó la producción de conidios. Lo anterior ha sido recientemente estudiado por Ortega-Sánchez *et al.* (2012), quienes además mencionaron otro factor que afecta la producción de biomasa (usando *Aspergillus niger*), este es la relación área-volumen definida como  $\alpha$ , siendo mayor la producción de biomasa a mayor valor de alfa (Ortega-Sánchez *et al.*, 2012).

Por otro lado, el cultivo en substrato sólido (CSS) de hongos filamentosos involucra el cultivo de éstos en substratos naturales sólidos, en los cuales la fuente de carbono constituye parte de su estructura. Durante el crecimiento microbiano, el hongo penetra el substrato y se une fuertemente a la partícula de substrato sólido, la cual es degradada (Lareo *et al.*, 2006). Una variante de la CSS es el uso de soportes inertes impregnados con medio líquido, las características físicas de este soporte no cambian con el tiempo a diferencia de los soportes naturales. En la FSS se deben tomar en cuenta idealmente los efectos del crecimiento, el mantenimiento y la disminución de la actividad respiratoria como función del tiempo, la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y agua (Lareo *et al.*, 2005).

La producción de conidios de hongos entomopatógenos puede ser sobre cultivos superficiales por ejemplo Kamp y Bidochka, (2002) estudiaron la producción de conidios en diferentes substratos superficiales. Sin embargo para la producción comercial, usualmente se usan substratos sólidos que pueden consistir en granos de cereal, arroz u otros substratos a base de almidón (Goettel y Roberts, 1992).

## 1.7 qPCR como método para medir la expresión génica

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, en tiempo real (qPCR) se ha convertido en la tecnología de referencia para la detección de ácidos nucleicos en áreas como la microbiología, investigación médica, biotecnología y aplicaciones forenses. A

diferencia de la PCR convencional, la cual es cualitativa y de punto-final, la qPCR permite una cuantificación precisa del DNA amplificado en tiempo real, durante la fase exponencial de la reacción. Es posible llevar a cabo una cuantificación precisa, y de significancia biológica, si se pone meticulosa atención a cada detalle de los pasos del qPCR, empezando con la selección de la muestra, su adquisición y manipulación durante todo el ensayo (Filion, 2012). El resultado de un qPCR es el gráfico de amplificación, para cuantificar la expresión del gen objetivo y brindar información clave de la calidad del qPCR. La curva de amplificación se caracteriza por una serie de fases: el ruido de fondo, previo a la señal de amplificación suficiente, es la línea base, ésta es seguida por un periodo de amplificación exponencial donde la señal de detección se correlaciona al incremento en la concentración de DNA hasta que se alcanza la fase de meseta. Todos los ensayos de qPCR se caracterizan por el ciclo de cuantificación  $C_q$  (Bustin *et al.*, 2009) también conocido como ciclo umbral ( $C_t$ ). El  $C_q$  define el número de ciclos necesarios para alcanzar un valor de señal de fluorescencia umbral al que se detecta la amplificación de un producto de qPCR por primera vez y se correlaciona inversamente al logaritmo del número de copias iniciales. Muchos sistemas usan un método umbral para definir el  $C_q$  que involucra identificar el punto de intersección entre el gráfico de amplificación y la fracción del ciclo donde los niveles de fluorescencia están significativamente por encima de la línea base, dentro de la región exponencial de la curva de amplificación. Entre menos ciclos tome llegar a un nivel de fluorescencia detectable, mayor será el número inicial de copias (Bustin *et al.*, 2009).

La popularidad del qPCR se refleja en el gran número de publicaciones reportando información de este ensayo, el cual invariablemente usa diversos reactivos, protocolos y métodos de análisis, así como formatos para reportar (Bustin *et al.*, 2009). En el área de los hongos entomopatógenos ya se han publicado diversos artículos al respecto, por ejemplo Fang y Bidochka (2006) utilizaron esta técnica para medir el nivel de expresión de diversos genes (*pr1*, *nrr1*, *ssga*, *cag8*) involucrados en la germinación, conidiogénesis y patogénesis de *M. anisopliae*, así como para medir el nivel de expresión relativa de seis genes de referencia normalizados a *gpd*, obteniendo eficiencias de PCR de arriba del 95 %. Fang *et al.* (2007) utilizaron esta técnica para determinar los niveles de expresión de *ssgA* y *pr1* en una cepa en de *M. anisopliae*, en la cual el gen *cag8* fue silenciado. Carneiro-Leao *et al.* (2011) utilizaron esta técnica para medir el nivel de expresión relativa del gen *cag8* en dos cepas de *M. anisopliae*, durante la germinación, conidiogénesis y patogénesis utilizando la información generada por Fang *et al.*(2007). Esta técnica

también puede ser de utilidad cuando se pretende identificar cepas específicas de entomopatógenos una vez que estos se liberan al campo como lo muestra el trabajo de Castrillo *et al.* (2008), quienes monitorearon un agente de control biológico (*B. bassiana* GHA) liberado en masa, con objeto de evaluar su persistencia en campo, diseñando un ensayo en el cual la sonda y los cebadores no generaban señal fluorescente para cepas diferentes a GHA.

Tal y como lo mencionaron Bustin *et al.* (2009) las metodologías empleadas por los autores antes mencionados son variadas, tanto en el diseño como en los reactivos utilizados: Castrillo *et al.* (2008) utilizaron un software (Beacon Designer 6.0) para el diseño de la sonda y cebadores, mientras que Fang y Bidochka (2006) diseñaron cebadores utilizando secuencias consenso degeneradas. Otra diferencia es que los primeros usaron sondas TaqMan y los últimos SYBR green.

## **2 Antecedentes**

Tlecuitl-Beristain *et al.* (2010) observaron que los estados oxidantes aumentaban la conidiación de *M. anisopliae* sin afectar los parámetros de calidad como la hidrofobicidad y la germinación. Miranda-Hernández (2010) también observó que en *M. anisopliae* se favoreció la producción de conidios con un estado hiperoxidante (atmósfera 26 % O<sub>2</sub>). En el caso de *B. bassiana*, se observó que la modificación atmosférica (16 % y 26 % de O<sub>2</sub>) resultó en una más rápida formación de conidios pero solo en tiempos iniciales del cultivo, observándose la mayor producción en condiciones de hipoxia (16 % de O<sub>2</sub>), además de un efecto negativo en la germinación de los conidios debido al estrés oxidativo (Garza-López *et al.*, 2012). Otros autores han reportado cambios morfológicos y daño al DNA mitocondrial al someter a *M. anisopliae* a una condición de estrés oxidativo con peróxido de hidrogeno (Li *et al.*, 2008), de hecho este último grupo de autores mencionaron que es muy importante la capacidad de recuperación del microorganismo frente a una condición de estrés oxidativo.

La proteína G es responsable de la percepción de estímulos ambientales y su estado inactivado es importante para la conidiación, el gen *cag8* codifica la proteína CAG8 que tiene efecto sobre la proteína G, favoreciendo el recambio de GTP por GDP, activando la

conidiación en *M. anisopliae* (Fang *et al.*, 2007). La expresión del gen *cag8* se reprime en la germinación y se induce durante la fase de conidiación sin embargo el nivel de expresión es diferente entre variedades de *M. anisopliae*, es decir la respuesta a un estímulo ambiental puede variar (Carneiro-Leao *et al.*, 2011).

### **3 Justificación**

Dentro de los principales factores que impactan la producción de conidios de hongos entomopatógenos a nivel laboratorio y en su producción masiva, son la composición del medio de cultivo, el tipo de sistema de producción y la oxigenación. Los factores antes mencionados repercuten tanto en la cantidad como en la calidad de los conidios producidos por estos organismos. Por lo anterior, la importancia de este trabajo radica en generar conocimiento sobre el efecto de los medios de cultivo a base de avena, arroz y la mezcla de estos cereales, así como del sistema de cultivo (sólido o superficial) y el nivel de oxigenación, en la conidiación y perfil de expresión del gen *cag8* en el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*.

Como parte de este trabajo se decidió identificar a la cepa por secuenciación de fragmentos ITS para verificar que el material biológico efectivamente correspondiera al reportado por Tlecuítl-Beristain *et al.* (2010). En cuanto a los medios de producción, estos deben de ser de bajo costo y producir propágulos viables (Kassa *et al.*, 2008), además, los medios superficiales y los líquidos requieren un balance delicado de sus componentes, así como de aditivos en el caso de medios sólidos se debe tomar en cuenta la composición y la disponibilidad de nutrientes. Por lo anterior a diferencia de todos los demás trabajos del grupo investigación (Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010; Garza-López *et al.*, 2012; Miranda-Hernández, 2010; García-Ortiz, 2012), se usó un sistema sólido o superficial sin suplementos nutricionales.

Son pocos los trabajos en los cuales se compara el nivel de conidiación y la calidad de los conidios obtenidos bajo sistemas superficial y sólido, por tanto en esta investigación se planteó cotejar la producción y la calidad de los conidios obtenidos en dichos sistemas y además bajo el efecto de pulsos de oxígeno (26% de O<sub>2</sub>). Además en este trabajo se evaluaron dos parámetros de calidad de conidios, la viabilidad y la germinación. Las pruebas de calidad son un parámetro importante ya que algunos autores han mostrado

que no necesariamente una elevada producción de conidios se relaciona con una gran calidad (Nelson *et al.*, 1996).

## **4 Hipótesis**

- 1) La conidiación de *Metarhizium anisopliae* en las diferentes concentraciones de oxígeno es independiente del sistema de cultivo (sólido y superficial)
- 2) La expresión del gen *cag8* se induce por pulsos de oxígeno de 26 %

## **5 Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

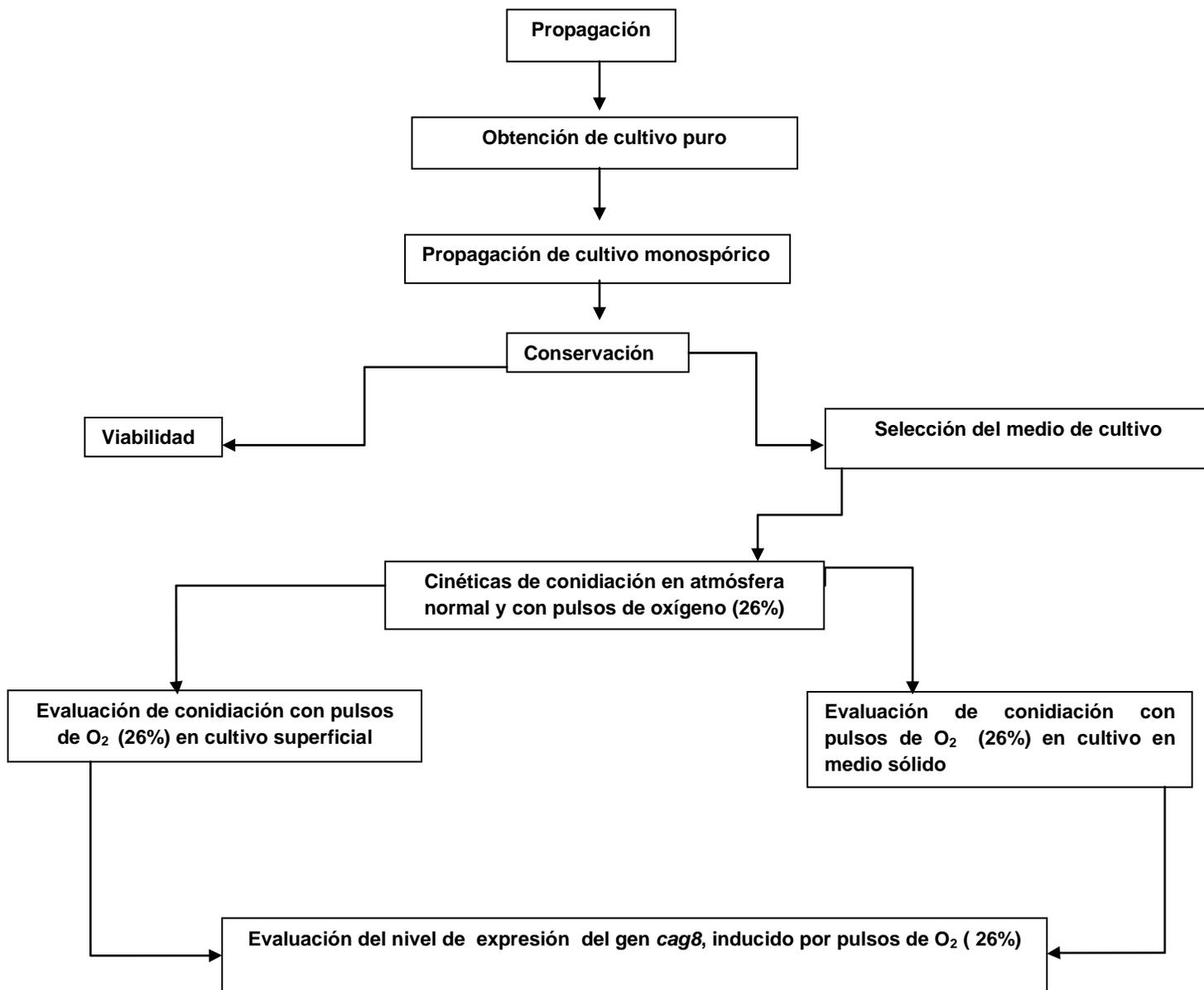
Determinar el efecto de los pulsos de oxígeno a 26% en la producción y la calidad de los conidios de *M. anisopliae* en dos sistemas: sólido y superficial, así como estudiar el efecto de estos pulsos en el nivel de expresión del gen *cag8*.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Estudiar la conservación de conidios a largo plazo en agua desionizada.
- Evaluar el efecto de tres medios de cultivo (avena, arroz y avena-arroz) en medio sólido, en la producción de conidios de *M. anisopliae*.
- Comparar los sistemas de cultivo: sólidos y superficiales, como sistemas de producción de conidios.
- Determinar el efecto de los pulsos de oxígeno en la conidiación de *M. anisopliae* y en su calidad.
- Evaluar el efecto de los pulsos de oxígeno a 26%, en la expresión del gen *cag8* de *M. anisopliae*.

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Estrategia experimental

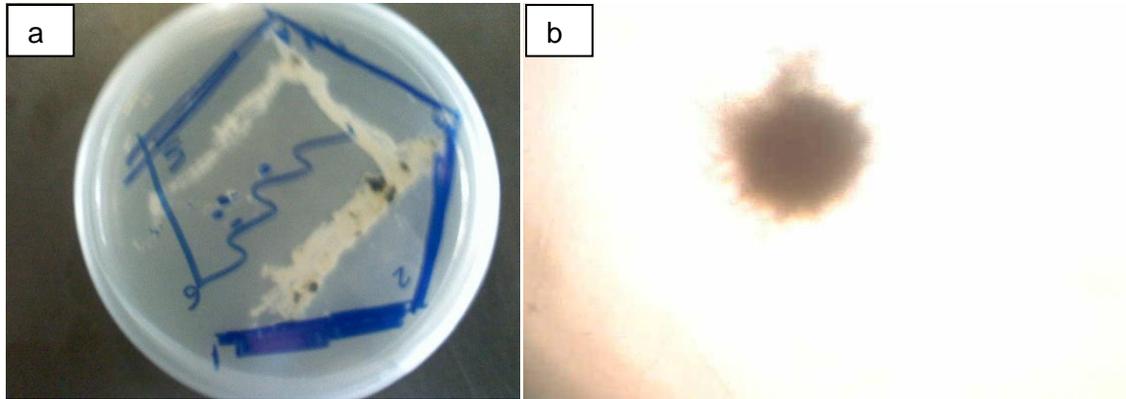


## 6.2 Material biológico e identificación del microorganismo

El hongo utilizado durante esta investigación fue *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, que pertenece a la colección de hongos del Colegio de Posgraduados en Texcoco, México. El hongo se identificó por secuenciación de las secuencias internas de transcripción (ITS), que corresponden a genes ribosomales (rDNA) ampliamente conservados entre organismos (Inglis y Tigano, 2006). Para la extracción del material genético se utilizó un kit de purificación de ADN (Wizard<sup>®</sup> Genomic) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Una vez extraído el material genético se verificó la concentración y el nivel de pureza en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific<sup>™</sup>). Para la amplificación se utilizaron los primers diseñados para amplificar los segmentos ITS3 y ITS4 (Miranda-Hernández, 2010). Posteriormente el producto de PCR se purificó utilizando un filtro Montage<sup>®</sup> PCR Centrifugal Filter Device y se siguieron las instrucciones del fabricante. Como control positivo se usó una muestra de DNA de *Isaria fumosorosea*. Los productos purificados de *M. anisopliae* y de *I. fumosorosea* se analizaron en un gel de agarosa al 1% y se secuenciaron en columnas de Sefadex, luego las secuencias se copiaron usando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y se subieron a la página del NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para hacer la comparación de secuencias en el BLAST.

## 6.3 Propagación de *M. anisopliae*

La cepa de *M. anisopliae* CP-OAX, se propagó en cajas de Petri preparadas con medio de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) estériles, usando la técnica de estría en placa. Pasados siete días se tomó una asada del cultivo y se sembró en cajas de Petri con medio ADS y desoxicolato de sodio (0.5 g/L), según la técnica para la obtención de cultivos monoclonia (Montesinos-Matías, 2008). Siete días después se revisaron las cajas y se verificaron colonias aisladas (Figura 3) como posibles colonias obtenidas a partir de un conidio aislado, los puntos se verificaron por medio de análisis en el microscopio óptico.



**Figura 3**(a): Técnica de siembra de cultivo monocolonia de *M. anisopliae*; (b): Colonia aislada de *M. anisopliae*

### 6.3.1 *Obtención del cultivo puro*

De una colonia aislada, se recortó un trozo de agar y se colocó en medio de una caja de Petri que contenía medio ADS y se incubó a  $28 \pm 1$  °C. Una vez obtenido un cultivo con crecimiento radial (Figura 4) y esporulación se propagó.



**Figura 4.**Crecimiento radial de una colonia aislada en caja de Petri con medio ADS

### 6.3.2 *Propagación del cultivo monospórico*

En condiciones estériles, se extrajo un cubo de 3mm de lado de un cultivo monospórico y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se llenó con Tween 80 al 0.05%. , Usando un vórtex se agitó para liberar los conidios. Esta suspensión de conidios se utilizó para hacer una resiembra con asa en medio de avena (33.3 g/L), agar (15 g/L) y peptona de carne (10 g/L) (Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010) para propagar el cultivo monospórico.

## **6.4 Conservación de conidios de *M. anisopliae***

Una vez que se obtuvo el cultivo monospórico, se seleccionaron dos cajas de Petri. De cada caja de Petri se cortaron con un bisturí estéril, cubos de 3 mm de lado, se agregaron tres cubos a viales de vidrio estériles con agua desionizada y tapón de rosca (López-lastra *et al.*, 2002), estos viales se almacenaron a 4 °C.

## **6.5 Viabilidad de los conidios conservados**

Cada mes se tomó un vial de vidrio, se agitó en el vórtex por 1 min y se preparó una suspensión de  $1 \times 10^4$  con/mL, se adicionaron 30  $\mu$ L (correspondiente a 300 conidios) a cada una de las cajas de Petri con agar Dextrosa Sabouraud adicionado con desoxicolato de sodio, 0.5 g/L (Montesinos-Matías, 2008; Tlecuitl-Beristain, 2010; Miranda-Hernández, 2010). Las cajas se incubaron a 28 °C por 72h. Después de este tiempo se realizó el conteo de las UFC (unidades formadoras de colonias) y el resultado se expresó como % de viabilidad.

## **6.6 Cinéticas de conidiación**

### **6.6.1 Obtención del inóculo**

Se tomó uno de los viales para conservación a largo plazo, se agitó en el vórtex por un min y se tomó de 100-150  $\mu$ L para inocular matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 mL de medio de avena (Harina de avena 33.3 g/L, agar bacteriológico 15 g/L y peptona de carne 10 g/L) previamente esterilizados a 15 psi por 15min, los cuales se incubaron a 28 +/- 1 °C durante 7 días. A estos matraces se les llamó “semilla”. Posteriormente se agregaron 20 mL de Tween 80 al 0.05% a los matraces semilla y se agitaron con un agitador magnético por 5 min, se pasó la suspensión a un tubo Falcón de 25 mL y se realizaron las diluciones pertinentes para ajustar a una concentración de  $5 \times 10^6$  con/mL, para los cultivos sólidos (Garza-López *et al.*, 2012), y  $1 \times 10^8$  con/mL para los cultivos superficiales (Miranda-Hernández, 2010).

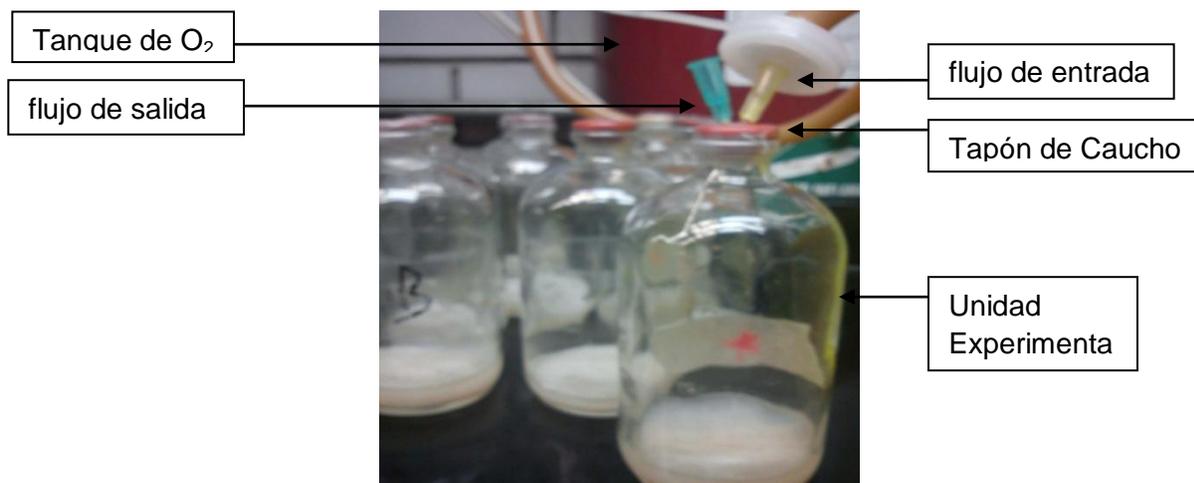
### **6.6.2 Selección del medio de cultivo**

Se prepararon botellas serológicas de 125 mL de la siguiente manera: 5 con arroz, 5 con avena, 5 con arroz-avena, en una cantidad de 5 gramos totales. Las botellas se esterilizaron a 15 psi por 30 min. Cada unidad experimental se inoculó con 1 mL ( $1 \times 10^6$  con/gssi más la cantidad de agua necesaria para ajustar el porcentaje de humedad a 40% (Garza-López *et al.*, 2012). Al cuarto día se realizó el primer conteo de conidios, agregando 20 ml de Tween 80 al 0.05 % y agitando por 10 min la suspensión de conidios

se pasó a un tubo Falcón de 25 mL, filtrando con una gasa (Angel-Cuapio, 2011) y se realizó el conteo usando la cámara de Neubauer. Realizándose un segundo conteo al séptimo día, que ha sido reportado como el día de mayor conidiación (Angel-Cuapio,2011).

### 6.6.3 Evaluación de la conidiación con pulsos de O<sub>2</sub> (26%) en cultivo superficial

Se preparó una fina harina, utilizando arroz precocido de la marca Verde Valle<sup>®</sup>, el cual se molió y se tamizó con una malla del número 60, de manera similar se molió la avena de la marca Quaker<sup>®</sup>. Así se obtuvieron las harinas que sirvieron como sustrato para mezclarlas con agar, en la siguiente proporción: 16.65 g/L de harina de arroz y 16.65 g/L de avena molida, más 15 g/L de agar bacteriológico (volumen total fue de 10 ml). Se prepararon botellas serológicas de 125 mL, con 10 mL de cultivo. Se esterilizó a 15 psi por 30 min, y se inocularon con 100 µL. de la suspensión de conidios 1x10<sup>8</sup>con/mL (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). A las 48h se realizó un conteo para verificar la formación de conidios, a las 60 h (2.5 días) se realizó un recambio atmosférico según la metodología de Tlecuitl-Beristain *et al.* (2010). Reemplazando los tapones de algodón por tapones de caucho estériles y de cierre hermético, el flujo de aire se hizo pasar a través de agujas estériles una de entrada y otra de salida (Figura 5), por 1 min, permitiendo el recambio atmosférico, la mezcla gaseosa que contenía O<sub>2</sub>(26%) fue fabricada por PRAXAIR-México. Cada 24h se realizó un recambio atmosférico, a las botellas y se contó la cantidad de conidios por triplicado a cada atmosfera 21 % y 26 %, y como controles se usaron botellas sin recambio atmosférico. Los resultados de la cinética se reportaron como conidios por cm<sup>2</sup>(con/cm<sup>2</sup>).



**Figura 5.** Recambio atmosférico de las unidades experimentales, nótese las agujas de entrada y de salida de flujo de aire, 20 cm<sup>3</sup> s<sup>-1</sup>(O<sub>2</sub> al 26%), durante un min.

#### **6.6.4 Evaluación de la conidiación con pulsos de Oxígeno (26%) en cultivo sólido**

Se prepararon botellas serológicas de 125 mL que contenían la mezcla de arroz-avena, 2.5 gramos por cada sustrato. Se esterilizó a 15 psi por 30 min, y se inoculó con 1 mL de la suspensión de  $1 \times 10^6$  con/gssi (excepto el blanco), se agregó la cantidad de agua necesaria para ajustar la humedad a 40% (Garza-López *et al.*, 2012). A las 48h se realizó un conteo para verificar la formación de conidios. A las 60 h (2.5 días) se realizó un recambio atmosférico según la metodología descrita previamente (Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). Cada 24h se realizó un recambio atmosférico a las 24 botellas y se contó la cantidad de conidios por triplicado a cada atmósfera 21 % y 26 %. Los resultados de la cinética se reportan como conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gssi).

#### **6.6.5 Pruebas de calidad: viabilidad y germinación**

Se prepararon botellas serológicas para dos cinéticas de conidiación con pulsos de oxígeno a 26% según la metodología descrita previamente. Se extrajeron conidios a las 60h, 84h y 132h. Se realizaron diluciones para obtener  $1 \times 10^4$  con/mL y  $1 \times 10^6$  con/mL para las pruebas de viabilidad y germinación respectivamente. Las pruebas de viabilidad se realizaron según la metodología descrita previamente. Para las pruebas de germinación se colocó un cuadro de 1.5% agar-agua (Samuels *et al.*, 1989), sobre la superficie de un portaobjetos en condiciones de esterilidad, y se inoculó con 100  $\mu$ L de la suspensión de conidios ( $1 \times 10^6$  con/mL). El portaobjetos se colocó sobre un papel filtro húmedo dentro de una caja de Petri y se incubaron a 28°C por 14h (Monzón, 2001). Se observó al microscopio óptico a 40x y se determinó el porcentaje de germinación contando al menos 100 conidios. Se consideró un conidio germinado si el tubo germinativo era mayor o igual al ancho de un conidio sin germinar (Safavi *et al.*, 2007).

### **6.7 Evaluación del nivel de expresión del gen *cag8* por inducción con pulsos de O<sub>2</sub> (26%)**

#### **6.7.1 Diseño de cebadores y sonda**

Se realizó una búsqueda bibliográfica del gen asociado a la conidiación (*cag8*) (Fang *et al.*, 2007; Carneiro-Leao *et al.*, 2011) encontrándose el gen *cag8* con número de acceso al GeneBank ID: DQ826044. Una vez identificado en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, se seleccionó el RNAm. Mediante el uso del software OligoArchitect™ de Sigma Aldrich se introdujo la secuencia del RNAm del gen y se pidió al programa que efectuara el diseño de los cebadores y la sonda para la detección en qPCR, el gen *cag8* y *gpd* que fue usado como gen de referencia.

### **6.7.2 Extracción de RNA: pruebas de integridad y pureza**

Se realizaron cinéticas usando la metodología descrita para obtener biomasa de los sistemas sólido y superficial. Se realizaron las extracciones a las 60h (inicio de recambio), 84h (24h después del primer recambio) y 132h (etapa de máxima producción de conidios). Para la extracción del RNA se utilizó el Kit de QIAGEN RNeasy plant mini kit y siguiendo las instrucciones del fabricante, el RNA aislado se almacenó a -80 °C para su uso posterior. Para comprobar la pureza y concentración del material aislado se utilizó un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™) y se determinó la integridad por medio de un gel electroforesis (anexo A), usando agarosa al 1 % de concentración y buffer 1x TAE (Brody *et al.*, 2004). La composición de los buffers se muestra en el anexo B.

### **6.7.3 Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

Los aislados de RNA se convirtieron a cDNA utilizando un kit comercial (QuantiTec™ Reverse Transcription Kit QIAGEN™) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 5 µL de la muestra de RNA aislada. Se verificó la concentración y pureza del cDNA en el Nanodrop 2000 (Thermo Scientific™) y una muestra se separó en un gel de electroforesis para determinar la integridad del cDNA sintetizado (anexo C), usando como referencia DNA total, aislado de un cultivo fresco de *M. anisopliae*. Las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior uso en el qPCR.

### **6.7.4 Obtención de DNA total de un cultivo de *M. anisopliae***

Con objeto de determinar la calidad e integridad del cDNA aislado se preparó un cultivo de *M. anisopliae* y transcurridos siete días se aisló el material genético utilizando un kit comercial (Wizard® Genomic, Promega) y se siguieron las instrucciones del fabricante, se determinó la concentración y pureza en el Nanodrop2000y se almacenó a -20 °C.

### **6.7.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)**

El cDNA obtenido de las muestras se cuantificó y se diluyó para ajustar a una concentración de 50 ng/µL, para tomar 1 µL y ajustar las mezclas de reacción. Se eligió al gen *gpd* como "housekeeping" o gen de referencia (Fang y Bidochka, 2006), y como controles se utilizaron: como control positivo, DNA aislado de una cepa silvestre de *M. anisopliae*, y como control negativo, una mezcla que contenía todos los componentes menos el cDNA. Las mezclas de reacción se prepararon usando un kit comercial (Rotor-Gene™ Probe PCR Kit, Qiagen™) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Para efectuar el qPCR se utilizaron los cebadores y sondas diseñados para los genes *cag8* y

*gpd*, los cuales se describen en el anexo D, el equipo utilizado fue un Rotor-Gene RG-3000 (Corbett™). Las condiciones del qPCR fueron las siguientes: activación a 95 °C por 3min, 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C y 15 segundos a 60 °C. Los datos obtenidos para los Ct se normalizaron por el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## 6.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la selección de medio de cultivo se sometieron a un análisis de varianza, se utilizó una prueba de comparaciones múltiples de Tukey utilizando el software NCSS de LCC, con un nivel de significancia de  $\alpha= 0.05$ . La variable utilizada para la producción de conidios en medio superficial fue (con/cm<sup>2</sup>) y para el medio sólido (con/gssi), ambas se analizaron con Microsoft Excel™. Los datos del porcentaje de viabilidad se analizaron con Microsoft Excel™, y se usó la función SOLVER para el ajuste de los datos. El polinomio obtenido se resolvió usando el software Mathematica versión 9.0 de Wolfram Research. Los datos de qPCR se analizaron en cuanto a su normalidad, con NCSS de LCC, y las pruebas *t* de Student se efectuaron con SPSS statistics de IBM versión 17.0.

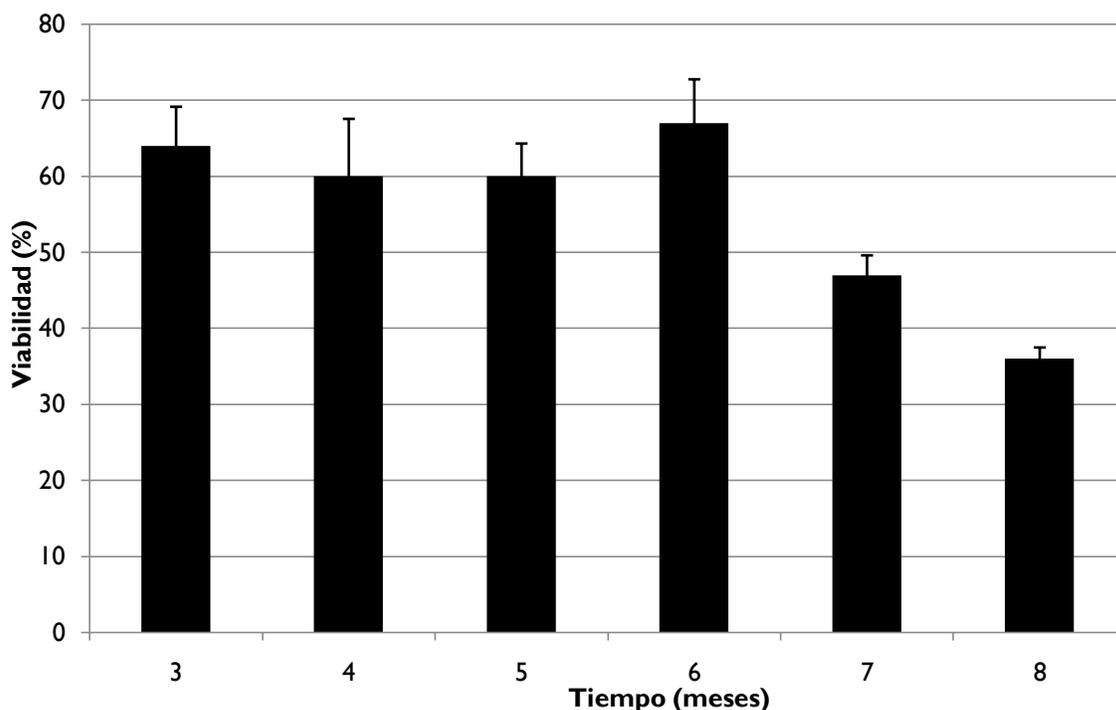
## 7 Resultados y Discusiones

### 7.1 Identificación del hongo

El hongo utilizado en el presente trabajo fue identificado genéticamente por secuenciación de las secuencias internas de transcripción (ITS), la secuencia correspondió a *Metarhizium anisopliae* CP-OAX, la cual se comparó usando la base de datos del BLAST y usando un gel de agarosa 1% tal y como lo reportó previamente Tlecuil-Beristain *et al.* (2010).

### 7.2 Viabilidad de conidios conservados

En la Figura 6 se muestra el porcentaje de viabilidad de conidios obtenido de los viales evaluados durante 8 meses de conservación de *M. anisopliae*. El sistema de conservación con agua desionizada en refrigeración mostró ser estable hasta por seis meses. La viabilidad recomendada para la utilización de hongos entomopatógenos como agentes de control biológico es del 80% (Berlanga-Padilla, 2006). Sin embargo trabajos previos (Miranda-Hernández 2010; Angel-Cuapio 2011) utilizando el mismo método para la conservación de *M. anisopliae*, obtuvieron valores similares a los presentados en este trabajo (55% de viabilidad promedio a los 6 meses).

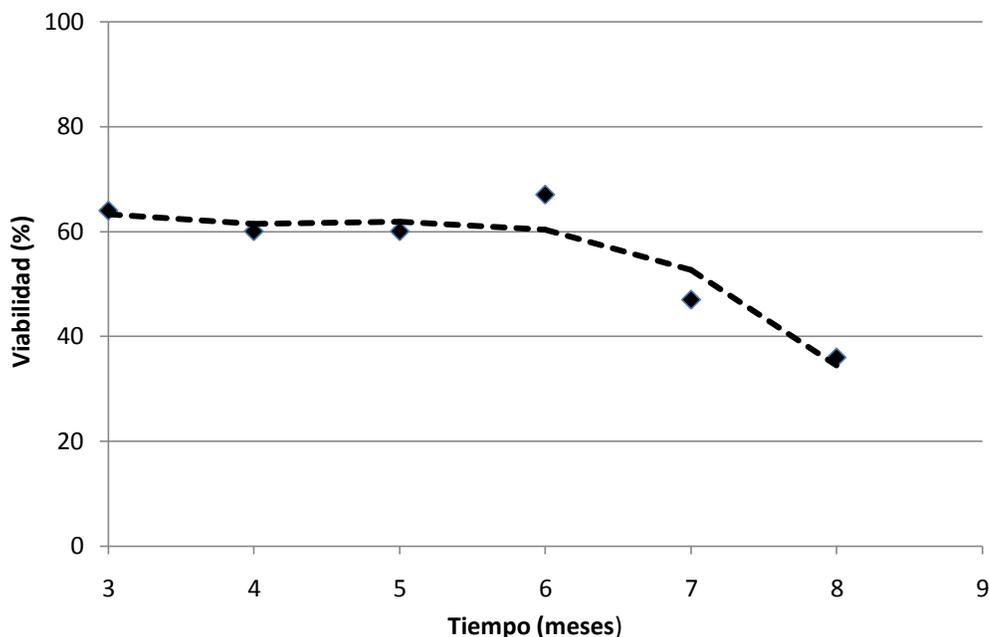


**Figura 6.** Viabilidad de conidios conservados en agua desionizada

Los datos de viabilidad se ajustaron a un modelo polinomial de grado tres (Figura 7), lo cual permitió observar que la viabilidad decayó con el tiempo; manteniéndose estable durante seis meses. Los datos de viabilidad se ajustaron al modelo polinomial  $V(t) = -0.7t^3 + 9.65t^2 - 43.14t + 124.9$ , con una  $R^2 = 0.87$  (Figura 7); usando este modelo se puede calcular el tiempo en el cual se tiene el 50% de viabilidad ( $V_{50}$ ) para *M. anisopliae*, que es de 7.5 meses. Cuevas-Hernández (2012), obtuvo una  $V_{50}$  de 7.56 con una  $R^2 = 0.97$  usando un modelo lineal, según este modelo después del octavo mes, la viabilidad será despreciable. Sin embargo, no se tienen datos acerca de parámetros de calidad de estos conservados y sería interesante realizar estos estudios comparando con al menos otras dos técnicas de conservación, como liofilización y preservación con crioprotector inmerso en nitrógeno líquido como menciona Nuñez-Gaona (2009).

Borman *et al.*, (2006) notó que la viabilidad de cepas conservadas de hongos filamentosos en agua estéril fue altamente independiente del tiempo, además observó que algunos hongos podían presentar cambios morfológicos con el tiempo, por ejemplo podían no conidiar formando solo micelio, por lo cual recomienda usar una segunda técnica de almacenamiento, además del método en agua estéril. La viabilidad de los

conservados en agua desionizada estéril mantenidos a 4 °C se ve influenciada por el tipo de microorganismo (Miranda-Hernández, 2010) y por la calidad del inóculo (Borman *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Ajuste de los datos de viabilidad (♦) a un modelo polinomial de tercer grado (---)

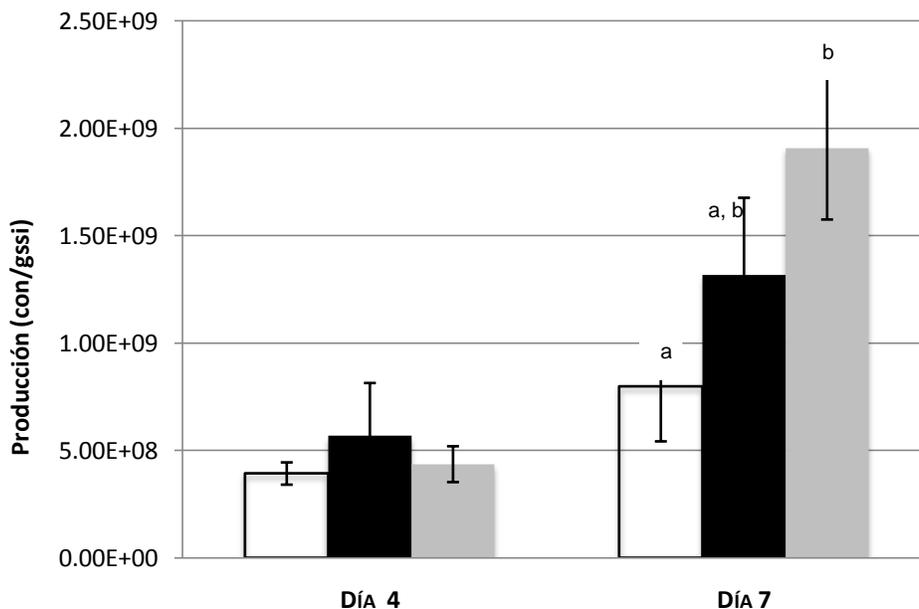
Para proponer un sistema de conservación, se debe tomar en cuenta el comportamiento del hongo, por ejemplo Angel-Cuapio (2011) obtuvo 81% de viabilidad a 6 meses con *Isaria fumosorosea* CNRCB1, mientras que con *Metarhizium anisopliae* CP-OAX obtuvo 43%. Este mismo autor recomienda para *M. anisopliae* otro método de conservación como liofilización, tal como indican los resultados del presente trabajo.

### **7.3 Selección de un medio de cultivo para *M. anisopliae***

Un factor de gran influencia en los procesos de fermentación en medio sólido, bien sea para la producción enzimática (Pandey *et al.*, 1999), o para la producción de conidios, es una adecuada selección del sustrato. Se pueden usar sustratos como cereales (Nuñez-Gaona, 2009; Dorta *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 1996; El Damir *et al.*, 2006) o bien sustratos inertes como Amberlita embebida en caldos nutritivos (Favela-Torres *et al.*, 1998). En la mayoría de los trabajos este sustrato es enriquecido con aditivos como extracto de levadura (Garza-López *et al.*, 2011); Uno de los objetivos de este trabajo fue buscar un sustrato adecuado libre de aditivos, en el cual *M. anisopliae* pudiera alcanzar

rendimientos altos de conidiación. Para tal objeto se evaluó la producción de conidios de *M. anisopliae* sobre tres substratos, avena, arroz y una mezcla arroz-avena.

Se observó diferencia significativa para la mezcla arroz-avena (Figura 8), en comparación con el arroz, alcanzando en la mezcla hasta  $1.91 \times 10^9$  con/gssi, al séptimo día. Aunque no existió diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre avena y la mezcla arroz-avena, el uso de la mezcla de ambos cereales favoreció la producción de conidios. El efecto positivo que se observó con esta mezcla de substratos en la conidiación pudo deberse al alto contenido nutricional de la avena sumada al arroz, por ejemplo el arroz contiene hasta 87% de carbohidratos y 8.8% de proteína por otro lado la avena contiene hasta 22.5% de proteína (Pino-Alea, 2009; Yoshida, 1981; Schinnick *et al.*, 2010); de hecho el crecimiento en la vasta mayoría de los hongos entomopatógenos está claramente afectada no solo por el contenido nutricional sino también por la disponibilidad de nutrientes (Humber, 2008). EL Damir *et al.* (2006) también evaluaron la producción de conidios de hongos entomopatógenos en substratos libres de aditivos obteniendo hasta  $9 \times 10^{10}$  con/g de trigo con *Metarhizium anisopliae*. Angel-Cuapio (2011) obtuvo hasta  $2.66 \times 10^8$  con/gssi para *M. anisopliae* con un tiempo de cultivo de seis días, usando como substrato solamente arroz precocido, Dorta *et al.* (1996) obtuvieron  $2.3 \times 10^{10}$  con/gr. arroz, y Nelson *et al.* (1996) hasta  $1.42 \times 10^9$  con/gr. arroz, ambos con *M. anisopliae*.



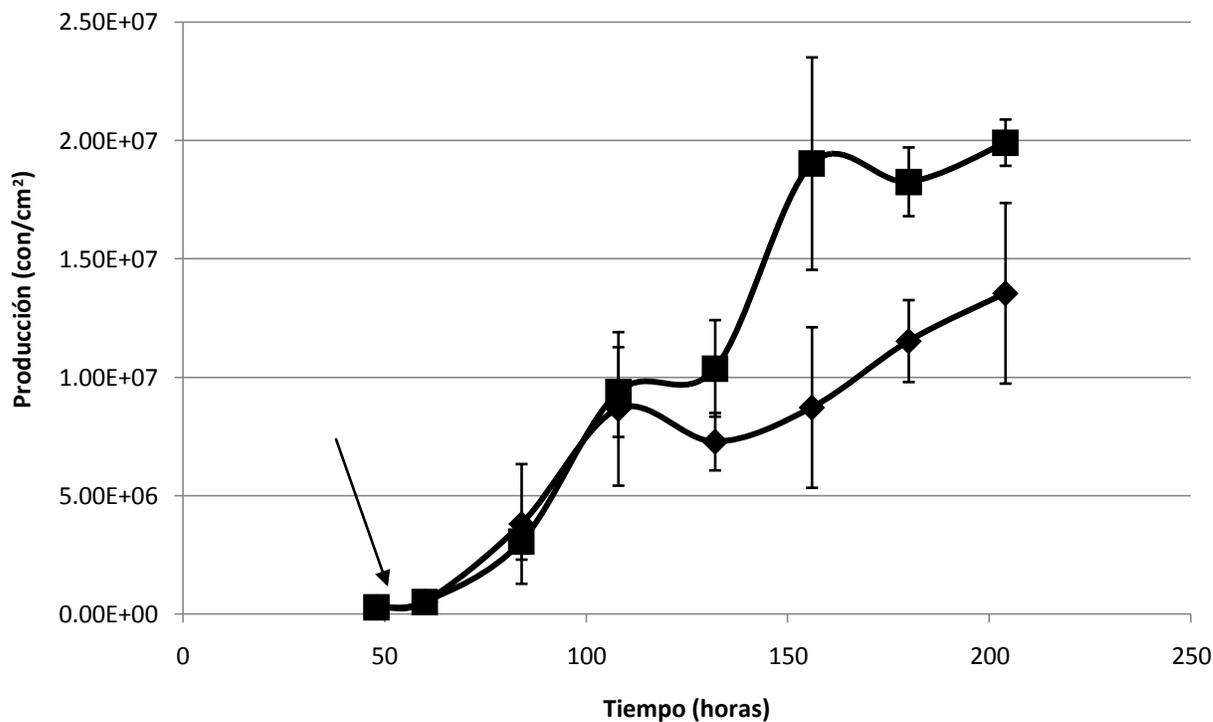
**Figura 8.** Producción de conidios sobre tres medios de cultivo. Arroz (□), Avena (■), Arroz-Avena (▒) Las letras diferentes indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

Comparado con otros trabajos (Angel-Cuapio,2011; Garza-López *et al.*, 2008), la producción de conidios obtenidos con la mezcla arroz-avena es favorable. Una vez definido un medio para el crecimiento del hongo se procedió a realizar las cinéticas para evaluar el efecto de los pulsos de O<sub>2</sub> (26%), en la conidiación de *M. anisopliae*.

#### **7.4 Evaluación de conidiación con pulsos de oxígeno (26%) en cultivo superficial**

La Figura 9 muestra la cinética de conidiación bajo dos condiciones: atmósfera normal y con pulsos de oxígeno (26%) en cultivo superficial, que consistió en una mezcla de harina de arroz y harina de avena en proporción 1:1 en botellas serológicas como unidades experimentales. El punto de recambio atmosférico fue a las 60h y se indica con la flecha.

Se puede observar que la máxima producción de conidios se obtiene a las 132h ( $1.9 \times 10^7$  con/cm<sup>2</sup>) que es menor a la reportada por Miranda-Hernández (2012) y García-Ortiz (2012) quienes obtuvieron  $6.5 \times 10^7$  con/cm<sup>2</sup> y  $5.9 \times 10^7$  con/cm<sup>2</sup> respectivamente, con la diferencia de que estos autores usaron medio superficial enriquecido con peptona de carne. Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo son interesantes pues mostraron que el efecto de los pulsos de oxígeno a una concentración de 26% tienen un efecto en la producción de conidios de *M. anisopliae*, que es independiente de la composición del medio. De hecho Tlecuitl-Beristain *et al.* (2010) menciona que el efecto favorable de los pulsos de oxígeno sobre la producción de conidios de *M. anisopliae* es probablemente en respuesta a las especies reactivas de oxígeno presentes en esta atmósfera.



**Figura 9.** Producción de conidios en medio superficial, reportado como: conidios por centímetro cuadrado ( $\text{con/cm}^2$ ). La línea con marcador de cuadros corresponde a la atmósfera modificada (26%  $\text{O}_2$ -■-). La línea con marcador de rombos corresponde a la atmósfera normal (21%  $\text{O}_2$  -◆-), la flecha indica el punto de recambio.

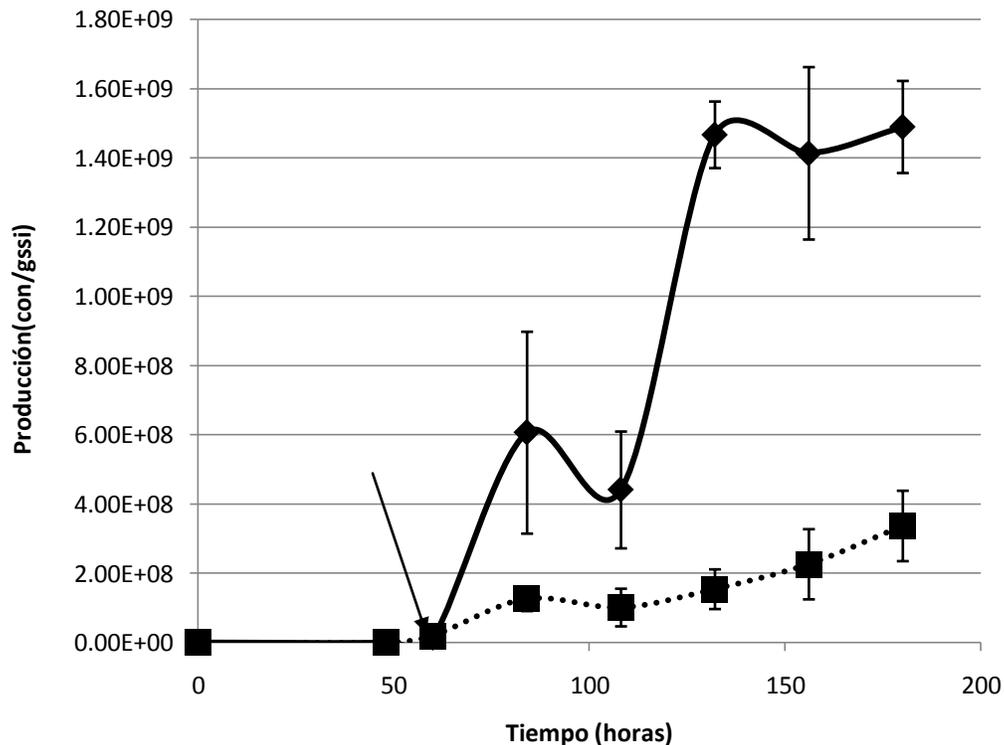
En el sistema superficial el consumo de oxígeno se ve influenciado por factores como el grosor de la capa de agar (Ortega-Sánchez *et al.*, 2012). Por otra parte se ha observado que el oxígeno en este tipo de sistema superficial no difunde a una profundidad mayor 0.1 mm en la capa de biomasa (Oostra *et al.*, 2001). El oxígeno se consume principalmente en los poros llenos de agua de la biopelícula, esta es la principal limitante a la difusión de oxígeno en un sistema superficial, donde las hifas aéreas casi no contribuyen en dicha difusión (Oostra *et al.*, 2001), por lo tanto cuando se suministra un exceso de  $\text{O}_2$  con pulsos de 26%, éste se asimila más lentamente, con la probable menor producción de  $\text{CO}_2$ . Por lo anterior éste sistema puede manejar de mejor manera un exceso de  $\text{O}_2$ , que se refleja en una mayor conidiación sin un efecto adverso al hongo debido al dióxido de carbono generado. Angel-Cuapio (2011) reportó una disminución en la conidiación de 85% por efecto de  $\text{CO}_2$ . Se ha observado que el  $\text{CO}_2$  se acumula en los cultivos con atmósfera modificada debido a la hermeticidad de la unidad experimental que no permite la libre difusión de los gases generados (Tlecuitl-Beristain, 2010). Garza-López *et al.* (2011) mencionaron, que en los procesos de producción de conidios, el  $\text{CO}_2$  puede

acumularse como producto del metabolismo, dichos autores reportaron que al incrementar la concentración de CO<sub>2</sub> la producción de conidios de *B. bassiana* disminuyó en hasta 70%, observando inhibición completa de la misma a una concentración de CO<sub>2</sub> del 5%.

### 7.5 Evaluación de la conidiación con pulsos de oxígeno (26%) en cultivo sólido

Se realizó una cinética de producción de conidios en medio sólido, la cual consistió en una mezcla de granos de arroz y avena, en una proporción 1:1. Las unidades experimentales fueron botellas serológicas y el punto de recambio atmosférico fue a las 60h el cual se indica con la flecha en la Figura 10

La máxima producción de conidios en medio sólido se obtuvo a las 132h (1.5x10<sup>9</sup> con/gssi), con una concentración de 21% de oxígeno. Se observó un efecto negativo (9.7 veces menor) en la producción de conidios con pulsos de oxígeno a 26% (1.55x10<sup>8</sup> con/gssi).



**Figura 10.** Producción de conidios en medio sólido reportado como conidios por gramo de sustrato seco inicial (con/gssi). La línea con marcador de cuadros corresponde a la atmósfera modificada (26% O<sub>2</sub> -.-). La línea con marcador de rombos corresponde a la atmósfera normal (21% O<sub>2</sub>-◆-), la flecha indica el punto de recambio

Garza-López *et al.* (2012) reportaron una máxima producción de conidios de  $1.11 \times 10^9$  con/gssi para una cepa de *Beauveria bassiana* creciendo sobre arroz con pulsos de oxígeno al 26%, aunque el substrato estaba enriquecido con extracto de levadura.

El resultado obtenido en este trabajo fue un resultado no esperado pues se pensaba que siendo la mezcla de substratos tan favorable para la producción de conidios (durante la etapa de selección de medio), la introducción de pulsos de oxígeno al 26% iba a mejorar la producción, tal como se había visto en los trabajos de Miranda-Hernández (2010) y García-Ortiz (2012) usando cultivo superficial. El efecto negativo pudo deberse a la secuencia de fenómenos que ocurren durante la fermentación en medio sólido, particularmente a la transferencia de oxígeno y la generación de  $\text{CO}_2$  (Muniswaran *et al.*, 2002). En un principio la concentración de  $\text{O}_2$  y la temperatura son uniformes en el lecho al tiempo de inoculación, con el inicio y progreso de la biorreacción el  $\text{O}_2$  se consume y  $\text{CO}_2$  y calor son producidos, el consumo de  $\text{O}_2$  en las regiones de crecimiento microbiano genera un gradiente ocasionando que el  $\text{O}_2$  del aire por encima del lecho difunda hacia su interior, así el  $\text{CO}_2$  producido viaja hacia arriba a la fase gaseosa desde el interior del lecho (Muniswaran *et al.*, 2002).

Este último autor menciona que la tasa de consumo de oxígeno depende de la tasa de biorreacción, la cual es función de las condiciones prevalentes en los sitios de reacción y que la tasa de difusión de oxígeno depende de su transferencia en el lecho. El sistema arroz-avena es un sistema poroso, que posiblemente mejoró la difusión del oxígeno, aumentando la tasa de biorreacción y posiblemente la generación de  $\text{CO}_2$  cuando se aplicaron pulsos de oxígeno a 26%. Además el crecimiento micelial cambia la porosidad del lecho y modifica la difusividad, incluso el  $\text{CO}_2$  generado viajando en dirección opuesta obstaculiza la difusión del  $\text{O}_2$  (Muniswaran *et al.*, 2002).

El  $\text{CO}_2$  en exceso tiene un efecto sobre las membranas biológicas (Dixon *et al.*, 1989). Estos cambios en la membrana celular también se han relacionado con una inhibición en la germinación de las esporas bacterianas (Enfors y Molin, 1978). Estos efectos pueden deberse a un cambio en la fluidez de los lípidos de membrana que afecta a las proteínas integrales esenciales para el inicio de la germinación (Castelli *et al.*, 1969). Otra hipótesis del efecto negativo de los pulsos de oxígeno en sistema sólido está relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). En un sistema poroso el oxígeno podría difundir mejor, probablemente generándose más ERO, por que la tasa de biorreacción pudiera ser mayor. Además Tlecuitl-Beristain *et al.* (2010) mostraron que el

CO<sub>2</sub> se acumulaba en las unidades experimentales con tapones de goma, mientras que en las unidades con tapón de algodón difundía y por lo tanto no había acumulación. En la Figura 10 se aprecia que con la atmósfera normal, 21% O<sub>2</sub>, se obtuvo una gran producción de conidios que puede asociarse con una mayor tasa de biorreacción, mayor consumo de O<sub>2</sub> y por lo tanto más producción de CO<sub>2</sub>, que en caso de las unidades experimentales con tapón de algodón pudo difundir al exterior, no así en las unidades con tapón de caucho (con recambio atmosférico) en las cuales pudo acumularse generando un efecto que se tradujo en una conidiación de un orden de magnitud menor. Tlecuítl-Beristain *et al.* (2010) reportaron que *M. anisopliae* pudo tolerar bien una acumulación de CO<sub>2</sub> de hasta 15 % usando un cultivo superficial. En el presente trabajo no se midió la producción de CO<sub>2</sub>, pero por las razones antes mencionadas podría pensarse que dada la alta tasa de biorreacción en el sistema sólido la generación de CO<sub>2</sub> pudo ser mayor del 15 % con un efecto negativo.

Como se pudo observar, los pulsos de O<sub>2</sub> produjeron una respuesta diferencial en la producción de conidios en los diferentes sistemas evaluados (sólido y superficial), lo cual puede estar relacionado con la expresión del gen asociado a la conidiación *cag8*. Por lo consiguiente, se seleccionaron tres tiempos 60h (tiempo de recambio), 84h (24h después del primer recambio) y 132h (etapa de máxima conidiación) y se tomaron muestras para las extracciones de material nucleico para realizar los estudios de expresión genética. Para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos se realizó una cinética paralela cultivo superficial y cultivo sólido siguiendo las metodologías antes descritas la cual mostró el mismo perfil, cuyo resultado se muestra en el anexo E.

## 7.6 Pruebas de Calidad

Las pruebas de calidad son importantes, ya que predicen el comportamiento del hongo entomopatógeno en el campo (Berlangua-Padilla, 2006). La viabilidad es una medida de la cantidad de conidios capaces de formar colonias, para hongos entomopatógenos se recomienda que sea mayor a 80% (Berlangua-Padilla, 2006). La viabilidad está fuertemente influenciada por el tipo de organismo así como el estado del inóculo inicial (Borman *et al.*, 2006). Nelson *et al.* (1996) observaron una relación inversa entre la cantidad de conidios producidos y la viabilidad. Otro factor que afecta la viabilidad es el tipo de método de producción utilizado (Kassa *et al.*, 2008). La prueba de viabilidad puede complementarse con la de germinación, que es la emergencia del tubo germinal a partir de un conidio (Ibrahim *et al.*, 2002). Como se describe a continuación, los resultados

obtenidos son interesantes ya que corroboran las observaciones de los autores antes mencionados.

En este trabajo la mayor viabilidad fue de 88% para *M. anisopliae* proveniente de cultivo superficial con pulsos de O<sub>2</sub> al 26% como se muestra en la

Tabla 2, el cual está dentro de los parámetros recomendados (Berlanga-Padilla, 2006); estas muestras tuvieron una germinación de 55%. La menor viabilidad se obtuvo para *M. anisopliae* en cultivo sólido, siendo el menor de 43% para el cultivo a atmosfera normal, aunque mostró la mayor producción de conidios; esto es similar a lo observado por Nelson *et al.* (1996) quienes obtuvieron menor viabilidad cuando se tuvieron las mayores cantidades de conidios. Para el sistema de cultivo sólido con 26% de O<sub>2</sub> se obtuvo una viabilidad similar a la de cultivos en atmósfera normal, aunque la germinación fue la más baja. En cultivo sólido con 26% de O<sub>2</sub> la producción de conidios fue significativamente menor con respecto a su similar de 21% de O<sub>2</sub>.

	<b>% Germinación</b>	<b>% Viabilidad</b>
<b>Superficial 21%</b>	56.8 ± 6	70 ± 7.5
<b>Superficial 26%</b>	55 ± 12	88 ± 9.6
<b>Sólido 21%</b>	53 ± 8	43 ± 9.5
<b>Sólido 26%</b>	< 20	55 ± 13

**Tabla 2.** Pruebas de Calidad de Germinación y Viabilidad para *M. anisopliae* en cultivos superficial y cultivo sólido bajo dos condiciones 21% y 26% de O<sub>2</sub>

El análisis estadístico, mostró que para el porcentaje de germinación, no hubo diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) para los tratamientos superficial a 21%, superficial a 26% y sólido a 21%, siendo diferente únicamente el tratamiento sólido a 26% respecto de los demás ( $P < 0.05$ ). En el caso de la viabilidad el análisis estadístico mostró que sí hubo diferencia significativa entre tratamientos ( $P < 0.05$ ). Siendo el tratamiento en cultivo superficial con

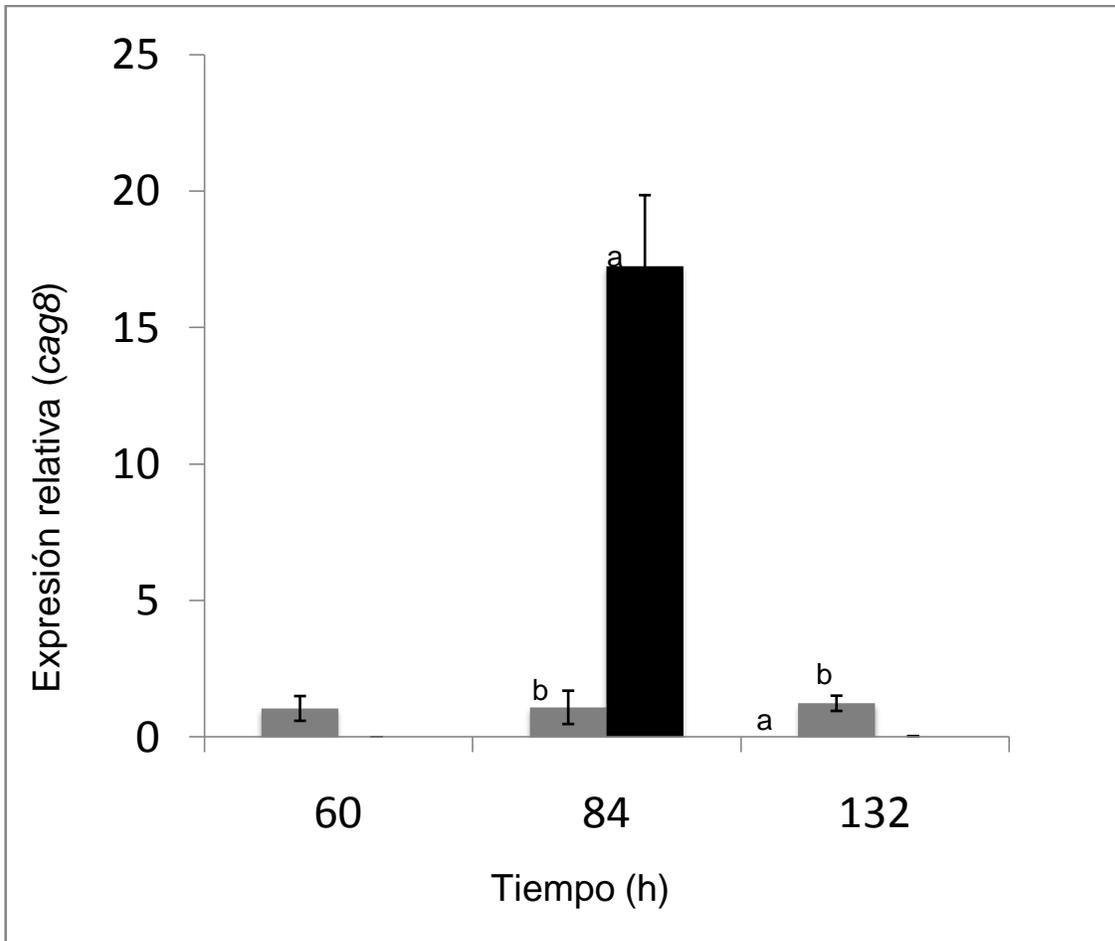
26% de O<sub>2</sub> el que presentó la mayor viabilidad de esporas con un 88% en un tiempo de 72h.

## **7.7 Evaluación del nivel de expresión del gen *cag8* por inducción con pulsos de O<sub>2</sub> (26%)**

### **7.7.1 *Expresión genética en cultivo superficial***

La expresión de un regulador de la proteína G, *cag8* se ha relacionado con la conidiación de *M. anisopliae* (Carneiro-Leao *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2007); en este trabajo se estudió la posible inducción del gen *cag8* por medio de pulsos de oxígeno a 26% en dos sistemas un cultivo superficial y un cultivo sólido.

La Figura 11 muestra la expresión relativa del gen *cag8* en el cultivo superficial. Se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para el tratamiento con O<sub>2</sub> a 26% a las 84 h con respecto al tratamiento de 21%, lo cual corresponde con el hecho de que a las 84 h se observó el incremento en los niveles de conidiación, la sobreexpresión de *cag8* en esta etapa pudo ser importante para alcanzar los niveles de conidiación obtenidos luego de las 132 h de cultivo (punto de máxima conidiación en este trabajo). No obstante el nivel de expresión de *cag8* a las 132 h fue muy bajo para sistema de 26%, probablemente a que se sobre expresó a las 84 h de cultivo (Figura 11). Para el tratamiento con atmósfera a 21% se observó un incremento en la expresión de *cag8* quizás debido a que bajo condiciones normales éste se va incrementando de manera paulatina tal y como lo reportaron Carneiro-Leao *et al.* (2011).

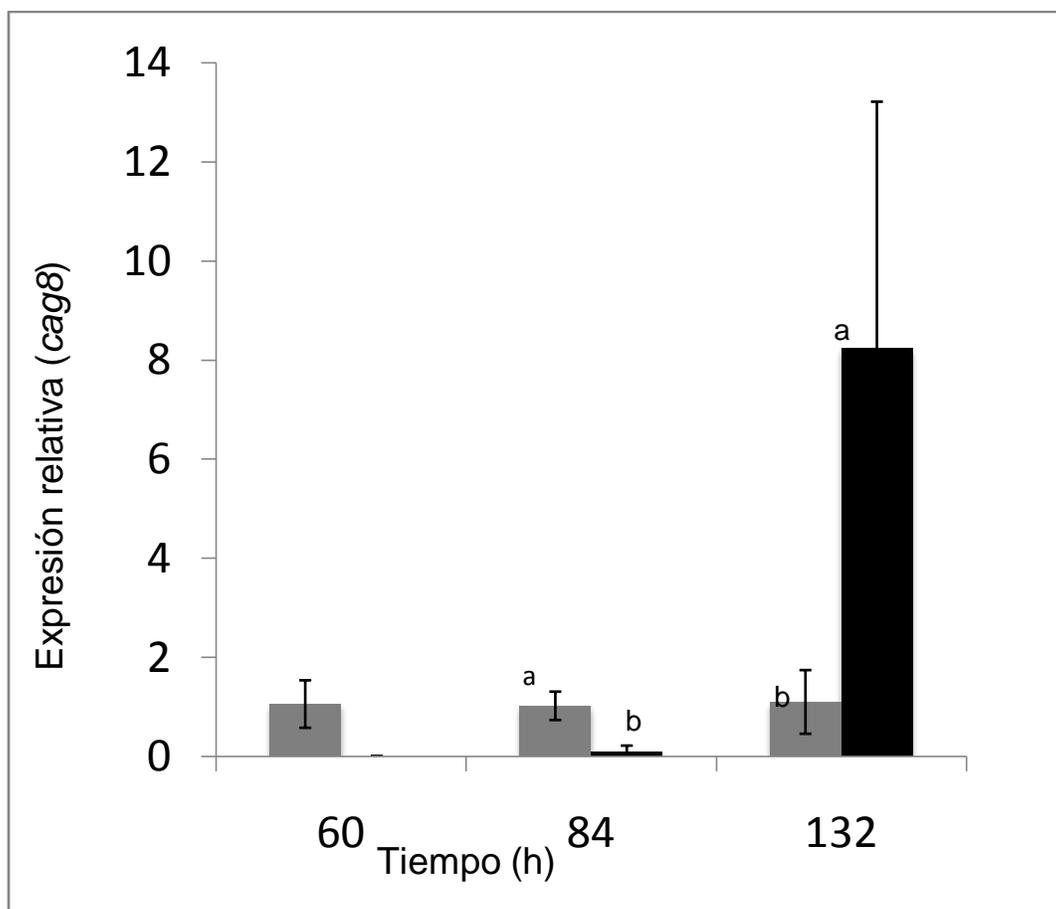


**Figura 11.** Expresión relativa del gen *cag8* en cultivo superficial. Las barras grises corresponden a la condición de 21%  $\blacksquare$ ; Las barras negras corresponden a la condición de 26%  $\blacksquare$ ; Las letras indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ )

### 7.7.2 Expresión genética en cultivo sólido

En cuanto al cultivo sólido, el análisis de la expresión del gen *cag8* mostró un aumento a las 84h en la expresión del gen para el tratamiento con 21% de oxígeno respecto al de 26% (Figura 12), lo cual corresponde con el nivel de conidiación obtenido para el cultivo sólido bajo la atmósfera normal que fue mayor al obtenido con 26% de oxígeno, observándose diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) para el nivel de expresión entre los tratamientos. Para los tratamientos a las 132 h, se observó un aumento en el nivel de expresión del gen *cag8* con 26% de  $O_2$ , pero su nivel de conidiación fue bajo, esto podría sugerir que aunque se tenga nivel de expresión del *cag8*, si las condiciones fisiológicas no son las adecuadas puede no haber un efecto sobre el nivel de conidiación.

Los pulsos de oxígeno tuvieron un efecto significativo en el nivel de expresión del gen *cag8* para el cultivo superficial, observando el mayor nivel de expresión 24h después del primer recambio atmosférico. En el caso del cultivo sólido a las 84 h de cultivo, la expresión de dicho gen fue mayor para el sistema de atmósfera normal, en comparación con los cultivos que sí se sometieron al recambio, de hecho en estos cultivos se detectó un aumento en el nivel de expresión hasta las 132 h (Fig. 12).



**Figura 12.** Expresión relativa del gen *cag8* en cultivo sólido. Las barras grises corresponden a la condición de 21%  $\square$ ; Las barras negras corresponden a la condición de 26%  $\blacksquare$ .

Los resultados obtenidos indican que los pulsos de oxígeno al 26% tienen un efecto marcado en el nivel de expresión de *cag8* cuando el cultivo es superficial, de hecho este efecto se observó desde las 24h del primer pulso. En contraste, en el cultivo sólido no se

observó efecto de estos pulsos a las 24h después del primer pulso oxidante, que se relaciona directamente con los rendimientos de conidiación alcanzados en cada sistema de cultivo.

## 8 Conclusiones

1. El sistema de conservación para *Metarhizium anisopliae*, en viales con agua desionizada estéril almacenados a 4 °C, resultó confiable hasta por siete meses. Representando un sistema simple y de bajo costo.
2. El substrato más adecuado para la producción de conidios de *M. anisopliae*, consistió en una mezcla de granos de arroz-avena, libre de suplementos, obteniendo hasta  $1.91 \times 10^9$  con/gssi al séptimo de día.
3. La calidad de los conidios obtenidos se mantiene en los sistemas y condiciones de cultivo.
4. Los pulsos oxidantes inducen la expresión del gen *cag8* eficientemente en el cultivo superficial. En el sistema sólido se observó un efecto negativo en la inducción de la conidiación por pulsos de oxígeno.
5. La respuesta de conidiación en *M. anisopliae* a los pulsos de oxígeno al 26 % fue dependiente del tipo de cultivo (superficial o sólido).

## 9 Perspectivas

A continuación se enlistan algunas posibilidades para continuar con este trabajo y dar respuesta a las interrogantes que se generaron en el mismo.

- Cuantificación de la cantidad de CO<sub>2</sub> en las unidades experimentales en el sistema sólido, para esclarecer si existe acumulación en las unidades que se someten a los pulsos oxidantes. El CO<sub>2</sub> producto del metabolismo, aunque puede ser el mismo a 21% de O<sub>2</sub> que con 26%, dadas las características de la unidad experimental puede estar acumulando en las unidades que se someten a los pulsos, ya que el cierre hermético impide la libre difusión. Se recomienda por lo tanto la cuantificación utilizando un método tal como lo reporta Tlecuil-Beristain (2010).
- Estudios de respirometría para evaluar el consumo de oxígeno y la producción de CO<sub>2</sub> en ambos sistemas, mediante un método similar al desarrollado por Angel-Cuapio (2011). Con esto se podría cuantificar el coeficiente respiratorio en cada tipo de cultivo.
- Análisis de imágenes para comparar el grosor de la capa de micelio del hongo creciendo en los sistemas superficial y sólido. Para explicar una posible diferencia en el consumo de O<sub>2</sub> en cada sistema y poder determinar posibles diferencias en la tasa metabólica y en la producción de CO<sub>2</sub>.
- Cuantificación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) por ensayo de azul de nitro-tetrazolio, por técnica espectrofotométrica o colorimétrica (Esfandiari *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008), para determinar si la inhibición de la conidiación en el sistema sólido a 26% O<sub>2</sub> se debe a una mayor producción de ROS debido a un incremento en el metabolismo aerobio. Lo anterior se podría correlacionar con la acumulación de CO<sub>2</sub> y con el coeficiente respiratorio.

## 10 REFERENCIAS:

Alspaugh, A.J., Perfect, J.R., Heitman, J. (1997). *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and? cAMP. *Genes and Development*. 11: 3206-3217

Angel-Cuapio, R. A. (2011). Producción de conidios de Hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante. México: Tesis de maestría. Posgrado en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Berlanga-Padilla, A. M. (2006). Calidad de hongos entomopatógenos. Taller: Hongos entomopatógenos: Control de calidad. Manzanillo Colima: Sociedad Mexicana de Control Biológico A.C. 42-48

Bharati, T., Kulkarni, J.H., Krishnarag, P. U., Alagawadi, Q. R. (2007). Evaluation of food grains and agro wastes for sporulation of *Metarhizium anisopliae* (Ma2). *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*.20(2): 424-425

Bidochka, M. J., De Koning, J., St Leger, R. J. (2001). Analysis of a genomic clone of hydrophobin (*ssgA*) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 105: 360-364

Blanford, S., Jenkins, N., Christian, R., Chan, B., Nardini, L., Osae, M., Koekemoer, L., Coetzee, M., Read, A., Thomas, M. (2012). Storage and persistence of a candidate fungal biopesticide for use against adult malaria vectors. *Malaria Journal*. 11: 354

Borges, D., Díaz, A., San Juan, A., Gómez, E. (2010). Metabolitos secundarios producidos por hongos entomopatógenos. *Red de revistas científicas de América latina, el Caribe, España y Portugal*. 44 (3): 49-55

Borman, A. M., Szekely, A., Campbell, C. K. and Johnson, E. M. (2006). Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*. 161:361-368

Breyer, V. (2011). Intracellular glycation of nuclear DNA, mitochondrial DNA, and cytosolic proteins triggered by endogenous oxidative stress. Alemania: Tesis de doctorado. Naturalwissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Brody, J.R., Calhoun, E.S., Gallmeier, E., Creavalle, T.D., Kern, S.E. (2004). Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molality conductive media. *BioTechniques*. 37:598-602

Brownbridge, M., Costa, S., Jaronski, S.T. (2001). Effects of in vitro passage of *Beauveria bassiana* on virulence to *Bemisia argentifolii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77: 280-283

Bustin, S., Benes, V., Garson, J., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J., Witten, C. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*: 55 (4): 611-622

Carneiro-Leao, M., Andreote, F., Araújo, W., Oliveira, N. (2011). Differential expression of genes involved in entomopathogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Clavicipitaceae). *Genetics and Molecular Research*. 10 (2): 769-778

Carrillo-Rayas, M y Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y algunos de los mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. *Acta Universitaria*. 19 (2): 40-49. Universidad de Guanajuato México

Castelli, A., Litarru, G. P., Barbaresi, G. (1969). Effect of pH and CO<sub>2</sub> concentration changes on lipids and fatty acids of *Sacharomyces cerevisiae*. *Archiv Für Mikrobiologie*. 66:34-39

Castrillo, L., Griggs, M., Vandenberg, J. (2008). Quantitative detection of *Beauveria bassiana* GHA (Ascomycota: Hypocreales), a potential microbial control agent of the emerald ash borer, by use of real-time PCR. *Biological Control*. 45: 163-169

Chang, M., Chae, K., Han, D., Jahng, K. (2004). The GanB G-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *A. nidulans*. *Genetics* 167: 1305-1315.

Crandall, M. AND Lawrence, L.J.(1980). Sporulation in *Hansenula wingei*, is induced by nitrogen starvation in maltose containing media. *Journal of Bacteriology*, 142:276-284.

Cuevas-Hernández, G. D., Saucedo-Castañeda, G., Loera-Corral, O. (2013). Conidia production of entomopathogenic fungus in solid state fermentation. XV National Congress of biotechnology and bioengineering and 12th International symposium on the genetics of industrial microorganism. Cancún, Quintana Roo, México

Dixon, N. M and Douglas, B. K. (1989). The inhibition by CO<sub>2</sub> of the growth and metabolism of microorganism. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 109-136

Dorta, B., Erlota, R. J., Arcas, J. (1996). Characterization of growth and sporulation of *M. anisopliae* in solid-substrate fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 19:434-439

Driver, F., Milner, R. J., Trueman, W. H. (1999). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104 (2): 134-150

Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biological Control*. 46 (4): 387-400

EL Damir M.(2006). Effect of growing media and water volume on conidial production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Biological Sciences*. 6(2): 269-274

Enfors, S. O. and Molin, G. (1978b). Mechanism of inhibition of spore germination by inert gases and carbon dioxide in spores VII, ed. Chambliss, G. & Vary, J. C. Washington : Society of Microbiology. 80-94

Esfandiari, N., Sharma, K.R., Thomas, A.J., Agarwal, A. (2003). Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *Journal of Andrology*. 24(6): 862-870

Fang, W., Pei, Y. and Bidochka, M.J. (2007). A Regulator of a G Protein signaling (RGS) Gene, *cag8*, from the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrophobin synthesis. *Microbiology*. 153:1017-1025

Fang, W., Bidochka, M. (2006). Expression of genes involved in germination, conidiogenesis, and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time PCR. *Mycological Research*. 1165-1171.

Fargues, J., Smits, N., Vidal, C., Vey, A., Vega, F., Mercadier, G., Quimby, P. (2002). Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the hyphomycete *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*. 154:127-138

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

Filion, M. (2012). *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*. Norfolk UK. pp. 3-27

Franco, K., Rodríguez, S., Cervantes, J., Barranco, J. (2011). Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. *Sociedades rurales, producción y medio ambiente*. 11 (22): 143-160

Freeman, T.C., Lee, K., Richardson, P.J. (1999). Analysis of gene expression in single cells. *Current Opinion in Biotechnology*. 10(6): 579-582

García-Ortiz, N. (2012). Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* en atmósferas oxidantes. México: Tesis de Maestría. Posgrado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Garza-López, P. M., Konigsberg, M., Saucedo-Castañeda, G., Loera, O. (2011). Differential profiles of *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. as a response to CO<sub>2</sub>: Production of conidia and amylases. *Agrociencia*, 45: 761-770

Garza-López, P. M., Konigsberg, M., Gómez-Quiroz, L., Loera, O. (2012). Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals(Vuill.). to Different Oxygen Concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 353-359

Glasser, R. W. (1926). The green muscardine disease in silkworms and its control. *Annals of the Entomological Society of America*. 19(12): 180-192

Goettel, M.S. and Roberts, D.W. (1992). Mass production, formulation and field application of entomopathogenic fungi. in biological control of locusts and grasshoppers ed. Lomer, C.J. and Prior, C. Wallingford, UK: CAB International. pp.230–238.

Götz, P., Matha, V., Vilcinskas, P. (2002). Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. Institute of Zoology, Free University of Berlin, Germany. [artículo en línea]: <http://www.nebi.nlm.nih.gov/sites/entre,2002>

Guttridge, D.C., Albanese, C., Reuther, J.Y., Pestell, R.G., Baldwin, A.S. (1999). NF-κB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Molecular and Cellular Biology*. 5785-5799

Hegedüs, N., Sigl, C., Zadra, I., Pócsi, I., Marx, F. (2011). The *paf* gene product modulates asexual development in *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Basic Microbiology*. 51(3): 253-262

Hölker, U. and Lenz, J. (2005). Solid-state fermentation-are there any biotechnological advantages?. *Current Opinion in Microbiology*. 8:301-306

Humber, R.A. (2008). Evolution of entomopathogenicity in fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98(3): 252-266

Ibrahim, L., Butt, T.M., Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 106:705-715

Inglis, G. D., Goettel, M. S., Burr, T. M., Strasser, H. (2001). Use of hyphomycetous fungi for managing insect pest. In: Butt, T. M., Jackson, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing. 23-69

Issaly, N., Chauveau, H., Aglevor, F., Fargues, J. y Durand, A. (2005). Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochemistry*. 40, 1425-1431.

Jackson, M., Jaronski, S. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*. 113: 842-850

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*. *Mycological Research* 101: 35–41.

Jenkins, N. E., Heviefó, G., Langewald, J., Cherry, A. J., Lomer, C. J. (1998). Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Information* 19(1): 21-23

Karlen, Y., McNair, A., Perserguers, S., Mazza, C., Mermond, N. (2007). Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*. 8, 131

Kassa, A., Brownbridge, M., Parker, B. L., Skinner, M., Gouli, V., Gouli, S., Gou, M., Lee, F., Hata, T. (2008). Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 583-591

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

Kim, K.H., Williger, S.D., Park, S.W., Puttikamonkul, S., Grahl, N., Cho, Y., Mukhopadhyay, B., Cramer, R.A., Lawrence, C.B. (2009). TmpL, a transmembrane protein required for intracellular redox homeostasis and virulence in a plant and animal fungal pathogen. *PLoS Pathogens*. 5(11): e1000653. doi: 10.1371

Lareo, C., Sposito, A. F., Bossio, L. A., Volpe, C. D. (2006). Characterization of growth and sporulation of *Mucor bacilliformis* in solid state fermentation on an inert support. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 391-399

Latch, G. C. M. (1965). *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 8: 384-396

Lee, B. and Adams, T. (1994). The *Aspergillus nidulans flugG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I. *Genes and Development*. 8: 641-651

Lee, B and Adams, T. (1996). *flugG* and *flbA* function interdependently to initiate conidiophore development in *Aspergillus nidulans* through *brlA* activation. *EMBO Journal*. 15: 299-309

Leucona, R. E. (1995). Microorganismos patógenos empleados en el control de insectos plaga. Buenos Aires, Argentina. 35-60

Li, L., Pischetsrieder, M., St Leger, R., Wang, C. (2008). Associated links among mtDNA glycation, oxidative stress and colony sectorization in *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*. 45: 1300-1306

Liu, J., Cao, Y., Xia, Y. (2010). *Mmc*, a gene involved in microcycle conidiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology. 105: 132-138

Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Methods. 25: 402-408.

López-Lastra, C.C., Hajek, A.E., Humber, R.A. (2002). Comparación de métodos de preservación de cultivos de hongo entomopatógenos. Canadian Journal of Botany. 80:1126-1130

Meyer, V., Stah, U. (2003). The influence of co-cultivation on expression of the antifungal protein in *Aspergillus giganteus*. Journal of Basic Microbiology. 43: 68–74

Meyling, N. V., Eilenberg, J. (2007). Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. Biological Control. 43: 145-155

Miranda-Hernández, J. F. (2010). Influencia del incremento de O<sub>2</sub> en la producción y calidad de conidios de hongos entomopatógenos. México: Tesis de Maestría. Posgrado en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Montesinos-Matías, R. (2008). Relación entre las variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. México: Tesis de Maestría. Posgrado en Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 63: 95-103

Muniswaran, P. K., Moorthy, S. S., Charyulu, C. L. N. (2002). Transport phenomena in solid state fermentation: Oxygen transport in state tray fermentors. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 7:362-366

Nelson, T., Low, A., Glare, T. (1996). Large scale production of New Zealand strains of *Beauveria* and *Metarhizium*. Proceedings of the NZ Plant Protection Conference. 49: 257-261

Nuñez-Gaona, O. (2009). Efecto de la actividad de agua y la modificación atmosférica gaseosa sobre la producción y calidad de conidios de *Beauveria bassiana*. México: Tesis de Doctorado. Posgrado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Ortega-Sánchez, E., Loera, O., Viniestra-González, G. (2012). The effect of the ratio between substrate concentration and specific area of the support on the biomass yield of fungal surface cultures. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 11(3): 485-491

Oostra, J., le Comte, E. P., van den Heuvel., Tramper, J., Rinzema, A. (2001). Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. Agrotechnology and food sciences department, food and bioprocess engineering group, Wageningen University. Biotechnology and Bioengineering, 75:13-24

Palma-Guerrero, J., Larriba, E., Gürri-Agulló, B., Jansson, H., Salinas, J., Lopez-Llorca, L. (2010). Chitosan increases conidiation in fungal pathogens of invertebrates. Applied Microbiology and Biotechnology. 87(6): 2237-2245

Pal, S., St Leger, R.J., Wu, L. P. (2007). Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. The Journal of Biological Chemistry. 282(12): 8969-8977

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Ningam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. Current Science. 77(1): 149-162

Pino-Alea, J.A (2009). Ciencia y tecnología de alimentos. Instituto de Investigación para la industria alimentaria. Habana Cuba, 19(2):36,38

Rangel, D. E. N., Anderson, A. J. y Roberts, D. W. (2006). Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *Journal of Invertebrate Pathology*. 93, 127-134.

Roncal, T., Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology Journal*. 154: 539-546

Safavi, S., Sha, F. A., Pakdel, A. K., Reza Rasoulia, G., Bandani, A. R., y Butt, T. M. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 270(1), 116-23

Samuels, K. D., y Llewellyn, M. (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53(1): 25-31

Shah, P. A., Pell, P. K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 61: 413-423

Schinnick, F.L., Longacre, M.L., Link, S., Marlett, J.A. (2010). Oat fiber: composition versus physiological function in rats. *Journal of Nutrition*. 118(2):144-151

Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon Journal*. 56: 1267-1274

Srivastava, C., Maurya, P., Sharma, P., Mohan, L. (2009). Prospective role of insecticides of fungal origin: Review. *Entomological Research*. 39: 341-355

Tanada, Y. and Kaya, H.K. (1993). Fungal Infections. In: *Insect Pathology*. Academic Press, San Diego. 319-366.

Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra, G., Godines, G., Loera, O. (2010). Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*. 10: 1046-1049

Wyrebek, M., Bidochka, M. J. (2013). Variability in the insect and plant adhesins, Mad1 and Mad2, within the fungal genus *Metarhizium* suggest plant adaptation as an evolutionary force. PloS ONE, 8(3)

Wyss, G.S., Charudattan, R., DeValerio, J.T. (2001). Evaluation of agar and grain media for mass production of conidia of *Dactylaria higginsii*. The American Phytopathological Society. 85 (11): 1165-1170

Xu, L., Li, F., Xie, H., Liu, X. (2009). A novel method for promoting conidial production by a nematophagous fungus, *Pochonia chlamydosporia* AS6.8. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 25: 1989-1994

Yoshida, S. (1981). Fundamentals of rice crop. The international rice research institute. Manila Philippines. 211.

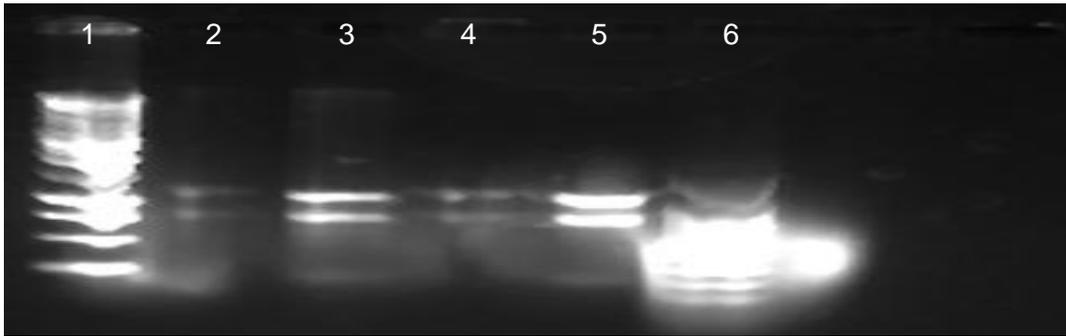
<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2013/details/species/id/8431416>

<http://herkules.oulu.fi/isbn9514270371/html/x581.html>

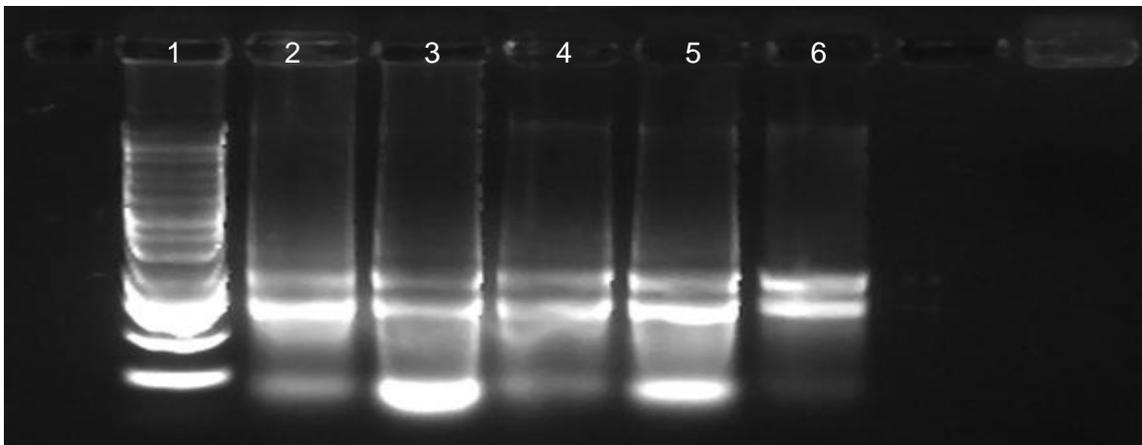
[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Brochure/fluorescent\\_dna\\_probes.P ar.0001.File.tmp/fluorescent\\_dna\\_probes.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Brochure/fluorescent_dna_probes.P ar.0001.File.tmp/fluorescent_dna_probes.pdf)

## Anexo A. Geles de agarosa de extracción de RNA

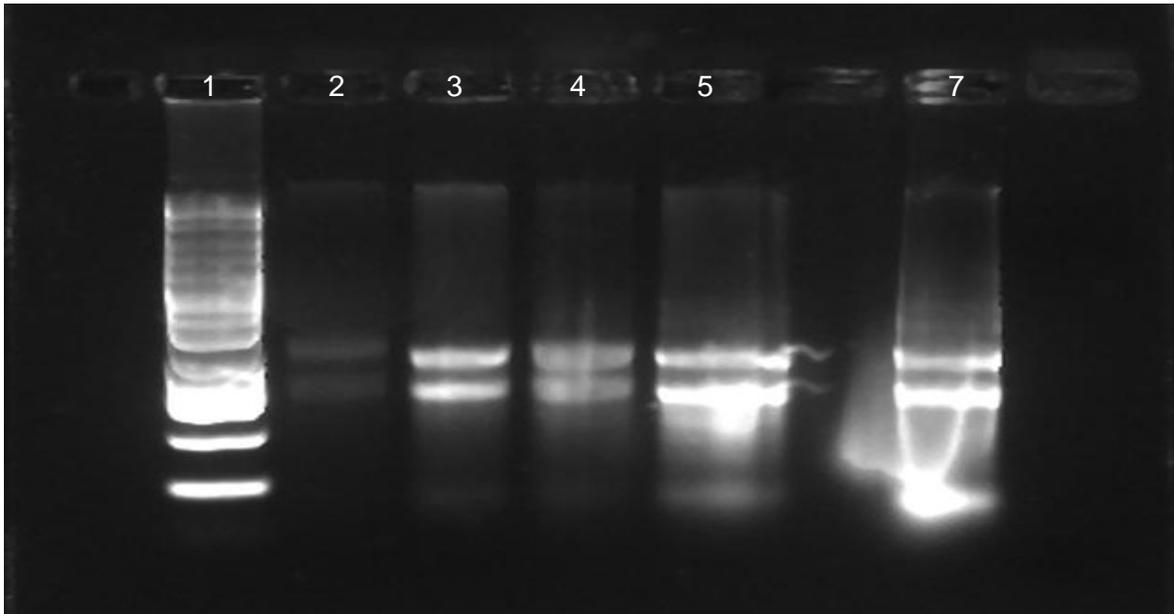
Las siguientes imágenes muestran los resultados de las extracciones de RNA en los tiempos seleccionados (Fig. A 1-3). La Fig. A-1, muestra los resultados de una electroforesis de una muestra de RNA, extraído de biomasa correspondiente a las 60h de crecimiento. La Fig. A-2 corresponde a la muestra correspondiente a las 84h y la Fig. A-3 corresponde a las 132h de crecimiento. Como controles del funcionamiento de los geles se muestran marcadores de peso molecular de DNA, aunque estos no se pueden usar como referencia para las muestras ya que estas son de RNA.



**Fig. A-1** Gel de electroforesis de extracción de RNA de *M. anisopliae*, correspondiente a las 60h de crecimiento. La distribución de los carriles es como sigue (carril:muestra): 1:marcador de peso molecular de DNA 1 kb; 2: Muestra dilución 4X; 3: Muestra dilución 1.6X; 4:Control positivo dilución 4x;5:Control positivo(RNA total de *M. anisopliae*) dilución 1.6x; 6: Marcador de peso molecular de DNA 100 bp.



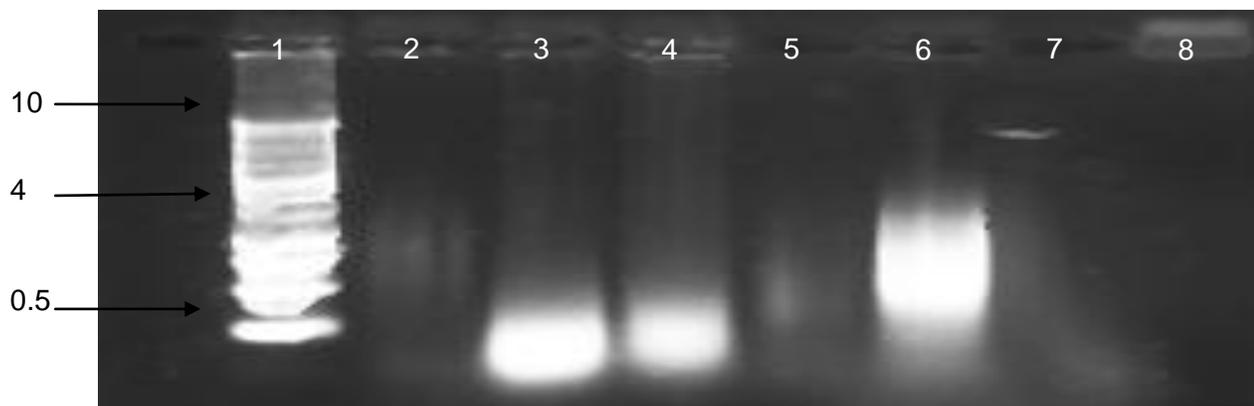
**Fig. A-2** Gel de electroforesis de extracción de RNA de *M. anisopliae*, correspondiente a las 84h. La distribución de los carriles es como sigue (carril:muestra): 1:marcador de peso molecular de DNA 1 kb;2: Muestra del cultivo con 21% O<sub>2</sub>; 3: Muestra del cultivo con 21% O<sub>2</sub>; 4: Muestra del cultivo con 26% O<sub>2</sub>; 5: Muestra del cultivo con 26% O<sub>2</sub>; 6: Control positivo(muestra de RNA de las 60h); 8: Control negativo.



**Fig. A-3** Gel de electroforesis de extracción de RNA de *M. anisopliae*, correspondiente a las 132h. La distribución de los carriles es como sigue (carril:muestra): 1: marcador de peso molecular de DNA 100 bp; 2: Muestra del cultivo con 21% O<sub>2</sub>; 3: Muestra del cultivo 21% O<sub>2</sub>; 4: Muestra del cultivo con 26% O<sub>2</sub>; 5: Muestra del cultivo con 26%; 7: Control positivo (muestra de RNA de las 84h); 8: Control negativo

## ANEXO B. Conversión a DNA complementario (cDNA) para su uso en el qPCR

Para realizar los estudios del nivel de expresión genética del gen *cag8*, inducida por pulsos de O<sub>2</sub> a 26 %, fue necesario extraer el RNA. Existen dos maneras de realizar un qPCR ó PCR en tiempo real, puede ser en un solo paso o en dos pasos (Al-Shanti *et al.*, 2009), se buscó un método que fuera altamente sensible, y que posibilitara el almacenamiento de las muestras para estudios posteriores, por ello se decidió un RT-PCR de dos pasos (Al-Shanti *et al.*, 2009). Para este fin, una vez comprobada la concentración e integridad del RNA obtenido en cada uno de los tiempos, éste fue convertido a cDNA. Se comprobó su concentración, pureza e integridad como se muestra en la Fig. B.



**Fig. B** Gel de agarosa al 1% de cDNA de *M. anisopliae*. La distribución de los carriles es como sigue (carril: muestra): 1: Marcador de peso molecular de DNA 1 kb; 2: Muestra de cultivo de 60h; 3: Muestra de cultivo de 84h, 21% O<sub>2</sub>; 4: Muestra de cultivo de 84h, 26% O<sub>2</sub>; 5: Muestra de cultivo de 132h 21% O<sub>2</sub>; 6: Muestra de cultivo de 132h 26% O<sub>2</sub>; 8: Control Negativo .

Además de la sensibilidad en una reacción de qPCR, otro factor importante es la eficiencia, Karlen *et al.* (2007) mencionan que si bien la dilución no afecta la eficiencia, sí puede modular significativamente el efecto de los cebadores y la muestra. Esto es consistente con la presencia de inhibidores en la muestra que pueden afectar la reacción de qPCR, si estos inhibidores se encuentran a altas concentraciones. Por ejemplo, el DNA genómico puede competir con el cDNA inhibiendo la interacción de los cebadores con éste. Por ello durante la conversión a cDNA se adicionó un buffer de eliminación de DNA genómico para reducir el riesgo de inhibición por DNA genómico.

Durante el progreso de una reacción de PCR la reacción va por dos fases distintas, la fase exponencial y la fase de meseta. En la fase exponencial en teoría, cada cDNA es desnaturalizado, unido a un primer y copiado por la polimerasa. El número de ciclos antes de que la reacción entre en la fase exponencial depende de la cantidad de material inicial (Freeman *et al.*, 1999). Por lo anterior se determinaron las cantidades de cDNA en el Nanodrop.

## **ANEXO C. Composición de los buffers**

### **Buffer TAE 50X (100 ml)**

24.2 g de Tris-base disueltos en 30 ml de agua destilada

5.71 ml de ácido acético glacial

10 ml de EDTA 0.5M pH 8.0

Aforar a 100 ml (45.71 ml)

EDTA 0.5M pH 8.0 (20 ml)

3.7225 g de EDTA en 20 ml de agua destilada

Agitar con mosca vigorosamente

Ajustar pH con NaOH

### **Geles de agarosa para visualización de DNA y RNA al 1%**

Agregar 500 ml de TAE 50X y aforar a 25 ml con agua destilada

Agregar 0.25 g de agarosa

#### ANEXO D. Primers y sondas utilizados para qPCR

Los primers y las sondas específicos para los genes *cag8y gpd* se diseñaron con las secuencias reportadas para *M. anisopliae* según los datos GeneBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante el programa OligoArchitect™ (Sigma-Aldrich™). Las secuencias se muestran a continuación:

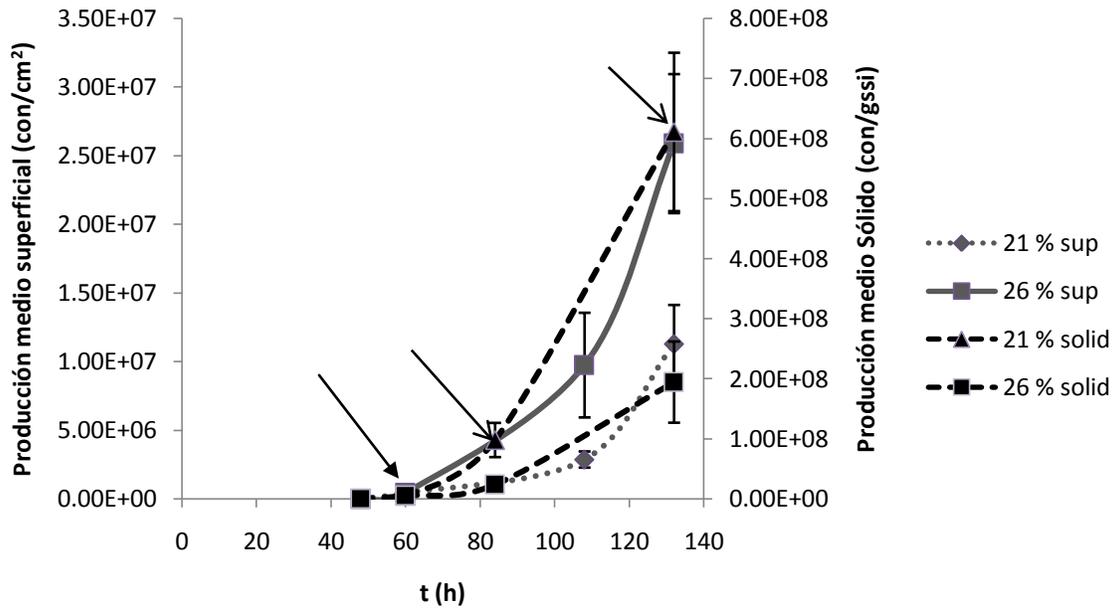
Gen	Oligo	Secuencia
<i>cag8</i>	Primer F*	5'-CCC AAA TCA AGG TAG TGT-3'
	Primer R <sup>+</sup>	5'-TTG CGA ATA AAT CTT TGA ATT-3'
	SONDA	5'-/56-FAM/ACC ATC CAC CTT CAC AGC CA/3IABkFQ/-3'
<i>gpd</i>	Primer F*	5'-ACG ACA AGT TCA CCA TTG-3'
	Primer R <sup>+</sup>	5'-CTG GGA ATG ATG TTC TGG-3'
	SONDA	5'-/56-FAM/CCACCGTCC/ZEN/ACTCCTACACC/3IABkFQ/-3'

\*Primer F : Forward

+Primer R: Reverse

## ANEXO E. Cinética de reproducibilidad cultivo superficial y cultivo sólido

Para evaluar la reproducibilidad de los experimentos anteriores se realizó una cinética en la cual se compararon los sistemas sólido y superficial, de manera paralela y partiendo de la misma fuente de conidios, respetando las mismas condiciones que en las cinéticas anteriores. El punto de recambio atmosférico fue a las 60h. Esta cinética mostró el mismo perfil que las cinéticas anteriores para los sistemas sólido y superficial Fig. E



**Fig. E** Cinética de conidiación medio sólido (con/gssi) vs. medio superficial (con/cm<sup>2</sup>). Las líneas negras indican medio sólido, con distintos niveles de O<sub>2</sub>: ▲ 21% , 26%; ■ Las líneas grises indican medio superficial, con distintos niveles de O<sub>2</sub>: ◆ 21%,26% ■



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00179

Matrícula: 2113801499

EFFECTO DEL SISTEMA DE CULTIVO CON PULSOS OXIDANTES EN LA PRODUCCION DE CONIDIOS DE *Metarhizium anisopliae*

En México, D.F., se presentaron a las 15:00 horas del día 14 del mes de marzo del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. CONCEPCION KEIKO SHIRAI MATSUMOTO  
DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ  
DRA. MARTHA DOLORES BIBBINS MARTINEZ  
DRA. DIVANERY RODRIGUEZ GOMEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA

DE: DAVID GOMEZ PRECIADO

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

*Aprobar*

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



*[Signature]*  
DAVID GOMEZ PRECIADO  
ALUMNO

REWSO

*[Signature]*  
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

*[Signature]*  
DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

*[Signature]*  
DRA. CONCEPCION KEIKO SHIRAI  
MATSUMOTO

VOCAL

*[Signature]*  
DR. PAUL MISAEL GARZA LOPEZ

VOCAL

*[Signature]*  
DRA. MARTHA DOLORES BIBBINS  
MARTINEZ

SECRETARIA

*[Signature]*  
DRA. DIVANERY RODRIGUEZ GOMEZ