



Casa abierta al tiempo

**Universidad Autónoma Metropolitana**

*Unidad Iztapalapa*

---

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Departamento de Biotecnología.

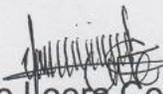
"Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en cultivos  
con concentraciones modificadas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>"

**Tesis**

Para obtener el grado de Doctor en Biotecnología

Presenta:

M. en C. Saúl Tlecuítl Beristain

  
Director: Dr. Octavio Loera Corral

Co-director: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

Octubre de 2010

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y además cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio **PFP-20-93**.

Este trabajo fue financiado por el CONACyT a través de la beca de Doctorado: Tlecuítl-Beristain 177823

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Enzimología y Biología Molecular de Hongos filamentosos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa. Así también, parte de los experimentos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Iztapalapa, D.F.01 de Octubre de 2010

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

Presentada por:

Saúl Tlecuítl Beristain

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral

Co-director: Dr. Gerardo Díaz Godínez

Asesor: Dr. Gustavo Viniegra González

## JURADO

Presidente

\_\_\_\_\_

Dra. Raquel Alatorre Rosas

Secretario

\_\_\_\_\_

Dra. Ma. Ascención Ramírez Coronel

Vocal

\_\_\_\_\_

Dr. Juan Carlos Torres Guzmán

Vocal

\_\_\_\_\_

Dr. Adrián Gómez de Jesús

## RESUMEN

El uso de control biológico para disminuir las poblaciones de insectos plaga es una técnica alternativa al uso de insecticidas sintéticos. El control biológico, específicamente el control microbiano presenta algunas ventajas sobre el uso de insecticidas químicos, resalta su alta especificidad sobre los hospederos y su baja contaminación ambiental. Sin embargo, la producción de los agentes de control biológico como *Metarhizium anisopliae*, presenta limitantes, ya que se ha documentado que cuando se logran altos rendimientos de conidios su calidad disminuye.

El objetivo de este trabajo fue conocer si las atmósferas modificadas afectaban el rendimiento y los parámetros de calidad de los conidios. Inicialmente se realizó la identificación molecular del aislamiento de *Metarhizium anisopliae* y se seleccionó un medio de cultivo para el crecimiento y producción de conidios. A partir de este medio de cultivo se evaluó el efecto de distintas concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono sobre la conidiación de *Metarhizium anisopliae*. Los conidios producidos en estas atmósferas, fueron evaluados a través de dos parámetros de calidad: la hidrofobicidad de la superficie y la viabilidad. Así también, se evaluó la infectividad de los conidios obtenidos en distintas atmósferas sobre larvas y adultos de *Tenebrio molitor*. Por otro lado, se evaluó el daño celular provocado por el estrés oxidativo ante una atmósfera oxidante enriquecida con oxígeno.

El aislamiento usado en este trabajo se identificó como *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum*. Se observó que el mejor sustrato para la producción de conidios fue la avena adicionada con peptona y que a concentraciones altas de oxígeno, se obtienen mejores rendimientos de conidios. También se observó que la infectividad y los parámetros de calidad no disminuyeron cuando los rendimientos de conidios fueron mayores. Además, la combinación de la atmósfera 21% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> durante la producción de los conidios incrementó la infectividad sobre larvas y adultos de *Tenebrio molitor*. Aunque no se observó daño celular provocado por estrés oxidativo, se sugiere que los estados oxidantes inducen la conidiación y la germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae*, puesto que altos niveles de oxígeno inducen la conidiación y el peróxido de hidrógeno inducen la germinación.

## Abstract

The biological control is an alternative for the use of synthetic insecticides. Biological control or specifically the microbial control has some advantages over the use of chemical insecticides as emphasizes the high specificity of insect hosts and their low environmental pollution. However, the production of biological control agents such as *Metarhizium anisopliae*, has limitations, because as it has been documented, when high yields of conidia are achieved its quality decreases.

The use of the biological control to reduce the population of pest of insects is a choice for not using chemical insecticides. The biocontrol can present some advantages about the use of chemical insecticides as the high specificity on the host and its low environmental risk. However, the production of the agents of biological control as *Metarhizium anisopliae* is a part of the difficulties that limit its use, because it has been documented that, when it produce a lot of conidia, its quality decreases.

The objective of this research was to know the effect of different atmospheres on the productivity and quality of conidia. Initially, we identified the isolate of *Metarhizium anisopliae* and a culture media was selected for the development and production of conidia. From this culture medium was evaluated the effect of different concentrations of carbon dioxide and oxygen on the conidiation of *M. anisopliae*. Conidia produced in these atmospheres were evaluated by two quality parameters: the surface hydrophobicity and viability. Also, we evaluated the infectivity of the conidia obtained in different atmospheres on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. Moreover, we evaluated the oxidative stress as a possible answer of enriched atmosphere with oxygen.

We identified as fungi as *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. The best substrate for the conidia production was oats with peptone. In high concentrations of oxygen we got best productions of conidia. Furthermore, we observed that the virulence and the parameters of quality do not decrease when the productions of conidia increases. Also, the combination of 21% of O<sub>2</sub> and 5% of CO<sub>2</sub> during the conidia production increased mortality on larvae and adults *Tenebrio molitor*.

Although, we did not observe oxidative stress, we suggest that the oxidative state induce the conidiation and the germination of *Metarhizium anisopliae*.

## ÍNDICE GENERAL

<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Control biológico de insectos .....</i>	1
1.2. <i>Hongos como agentes de control biológico .....</i>	1
1.2.1. <i>Metarhizium anisopliae</i> (Metsnickoff) Sorokin .....	2
1.2.2. <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin .....	2
1.2.3. <i>Lecanicillium lecani</i> (Zimmermann) Zare et W. Gams.....	3
1.3. <i>Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos.....</i>	3
1.4. <i>Mecanismos de defensa de los insectos infectados por hongos entomopatógenos .....</i>	5
1.5. <i>Conidiación .....</i>	7
1.6. <i>Control de calidad de conidios de hongos entomopatógenos .....</i>	8
1.6.1. <i>Germinación.....</i>	8
1.6.2. <i>Hidrofobicidad .....</i>	9
1.7. <i>La conidiación como respuesta al estrés oxidativo .....</i>	10
1.8. <i>Cadena respiratoria .....</i>	13
1.9. <i>Tenebrio molitor .....</i>	14
<b>2.- ANTECEDENTES.....</b>	<b>16</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>20</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
5.1. <i>Objetivo general .....</i>	21

5.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	21
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
6.1. <i>Microorganismo</i> .....	23
6.2. <i>Identificación del aislado de Metarhizium anisopliae</i> .....	23
6.3. <i>Análisis porcentual de los sustratos</i> .....	24
6.4. <i>Selección del medio de cultivo</i> .....	24
6.5. <i>Efecto del las atmósferas sobre la producción de los conidios</i> .....	25
6.5.1. <i>Cuantificación de CO<sub>2</sub> acumulado en las unidades experimentales</i> .....	26
6.5.2. <i>Determinación de biomasa</i> .....	26
6.5.3. <i>Parámetros de crecimiento</i> .....	27
6.5.4. <i>Cosecha y cuantificación de los conidios</i> .....	27
6.5.5. <i>Cálculo del rendimiento de los conidios y productividad</i> .....	27
6.6. <i>Determinación de parámetros de calidad de los conidios</i> .....	28
6.6.1. <i>Porcentaje de germinación</i> .....	28
6.6.2. <i>Hidrofobicidad relativa de la superficie de los conidios</i> .....	28
6.7. <i>Bioensayo</i> .....	29
6.8. <i>Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de los conidios</i> .....	30
6.9. <i>Obtención del extracto crudo enzimático intracelular</i> .....	31
6.10. <i>Determinación del malondialdehído como indicativo del daño celular provocado por ERO</i> .....	31
6.11. <i>Determinación de la actividad catalasa</i> .....	32
6.12. <i>Análisis estadístico</i> .....	32
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSION</b> .....	<b>33</b>

7.1. Identificación del aislado <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	33
7.2. Análisis de la composición elemental de los sustratos .....	34
7.3. Selección del medio de cultivo .....	35
7.4. Efecto de las atmósferas modificadas sobre la producción de los conidios.....	37
7.4.1. Cuantificación de CO <sub>2</sub> acumulado en las unidades experimentales .....	38
7.4.2. Producción de Biomasa.....	39
7.4.3. Producción de conidios .....	41
7.4.4. Rendimiento de los conidios respecto a la biomasa y productividad .....	43
7.5. Parámetros de calidad de los conidios.....	44
7.5.1. Porcentaje de germinación .....	44
7.5.2. Hidrofobicidad de la superficie de los conidios .....	48
7.6. Bioensayo.....	52
7.6.1. Bioensayo: infección de adultos de <i>Tenebrio molitor</i> con <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	52
7.6.2. Bioensayo: infección de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> con <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	55
7.7. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de los conidios.....	59
7.8. Determinación del malondialdehído como indicativo del estrés oxidativo.....	61
7.9. Actividad catalasa.....	62
7.10 Resumen general de resultados.....	64
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>68</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>76</b>
PUBLICACIONES .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Adhesión de un conidio de <i>B. bassiana</i> sobre la superficie de la cutícula de un artrópodo, <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae)..	4
Figura 2 A-J. Defensa de un insecto ante el ataque de un hongo entomopatógeno..	6
Figura 3 A-D. Estados morfológicos de <i>Penicillium cyclopium</i> durante la conidiación en cultivo sumergido.....	7
Figura 4 A-B. Células fialides maduras con un conidio de <i>Metarhizium flavoviride</i> var <i>flavoviride</i> de las cepas ARSEF 2025 y ARSEF 2024 respectivamente.....	8
Figura 5. Conidios germinados de <i>Metarhizium anisopliae</i> con tubo germinativo de 40-100 micras.....	9
Figura 6. Mecanismos para la producción de ERO (Aguirre <i>et al.</i> , 2005). Fit II, sistema fotosintético; COX, Citocromo oxidasa.....	11
Figura 7. Oxidación de proteínas mediada por ERO..	12
Figura 8. Reacción entre MDA y <i>N</i> -metil-2-fenilindol que puede emplearse para cuantificar lipoperoxidación.....	13
Figura 9. Transportadores de electrones en la cadena respiratoria .	14
Figura 10. Diagrama de bloques de la estrategia experimental.....	22
Figura 11. Mapa de producto de PCR en el genoma de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	33
Figura 12. Producción de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> en los medios de arroz o avena con y sin peptona.....	36
Figura 13. Acumulación de CO <sub>2</sub> cada 24 h, durante la conidiación de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> ..	39
Figura 14. Evolución de la biomasa de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> crecido en distintas atmósferas en el medio Avena-Peptona. La curva punteada indica el ajuste con la ecuación logística.....	40
Figura 15. Cinética de la producción de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> en distintas atmósferas en el medio Avena-Peptona..	42

Figura 16. Comparación del porcentaje de germinación de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> usando la técnica de agar-agua y UFC para los tratamientos normal y 26/0..	45
Figura 17. Viabilidad ( <i>v</i> ) de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> producidos en distintas atmósferas.....	46
Figura 18. Comparación de valores de hidrofobicidad de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> usando el principio de exclusión de fases con tolueno y <i>n</i> -hexadecano para los tratamientos normal y 26/0..	49
Figura 19. Hidrofobicidad ( <i>H</i> ) de la superficie de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> producidos en distintas atmósferas..	50
Figura 20. Efecto de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> producidos en diversas atmósferas sobre adultos de <i>Tenebrio molitor</i> .	53
Figura 21. Adultos de <i>Tenebrio molitor</i> antes (A) y después (B) de la infección de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> . Fotos tomadas de los bioensayos.....	54
Figura 22. Efecto de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> producidos en diversas atmósferas sobre larvas de <i>Tenebrio molitor</i> .....	56
Figura 23. Larvas de <i>Tenebrio molitor</i> antes (A) y después (B) de la infección de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> . Larva melanizada sobreviviente a la infección (C).....	58
Figura 24. Cinéticas de viabilidad de los conidios expuestos al peróxido de hidrógeno. Los conidios fueron cosechados en los distintos tratamientos..	60
Figura 25. Cuantificación de MDA como indicativo de estrés oxidativo. Tratamientos 21/0 (normal) y 26/0. .	62
Figura 26. Cinética de la actividad catalasa durante la conidiación de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> en distintas atmósferas.....	64
Figura 27. Esquema general de la diferenciación celular en <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> como respuesta a la exposición de especies reactivas de oxígeno.....	65
Figura 28. Curva de calibración para la cuantificación del bióxido de carbono (%) acumulado en las botellas serológicas.....	77

**Figura 29. Curva de calibración para la cuantificación de bióxido de carbono (mM) acumulado en las botellas serológicas..... 77**

**Figura 30. Curva de calibración para la cuantificación MDA ( $\mu\text{M}$ ) como indicativo de estrés oxidativo..... 78**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición porcentual de las atmósferas utilizadas en cada tratamiento. ....	25
Tabla 2. Composición elemental porcentual de los sustratos empleados en base seca. ....	34
Tabla 3. Relación C/N de los medios estudiados. ....	35
Tabla 4. Parámetros de crecimiento y producción de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> a las 156 h de cultivo en el medio Avena-Peptona. ....	43
Tabla 5. Resumen de los valores de los parámetros de calidad de conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> producidos en distintas atmósferas ....	51
Tabla 6. Parámetros de calidad de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> . Bioensayo sobre adultos de <i>Tenebrio molitor</i> . ....	54
Tabla 7. Parámetros de calidad de los conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>lepidiotum</i> . Bioensayo sobre larvas de <i>Tenebrio molitor</i> . ....	57
Tabla 8. Parámetros de la cinética de viabilidad de los conidios producidos en distintas atmósferas al peróxido de hidrógeno 25 mM. ....	61
Tabla 9. Diluciones de bióxido de carbono balanceado con nitrógeno. ....	76
Tabla 10. Volúmenes de dilución para la curva de calibración de MDA. ....	78

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Control biológico de insectos**

El control biológico consiste en la manipulación intencional de los enemigos naturales u organismos antagonistas de los insectos plaga, que mantienen la población por debajo de los umbrales de daño. A estos organismos se le llama agentes de control biológico y entre ellos se encuentran los depredadores, parasitoides, así como patógenos de insectos, los cuales incluyen virus, protozoarios, bacterias, hongos y nematodos (Asaff *et al.*, 2006). El interés de controlar insectos-plaga es fundamental debido a que los insectos ocupan aproximadamente el 80% de las formas de vida en nuestro planeta, y son los principales competidores de alimentos para los humanos (Rothemund *et al.*, 1999). El atractivo del control biológico como regulador de las poblaciones de insectos se debe a: i) la creciente preocupación sobre la seguridad ambiental y salud humana; ii) el incremento en la resistencia de los insectos a los plaguicidas (Samish *et al.*, 2004).

### **1.2. Hongos como agentes de control biológico**

Los hongos entomopatógenos son organismos heterótrofos, que poseen células con paredes quitinizadas, normalmente no móviles, que tienen la capacidad de provocar enfermedades en insectos (micosis). Las micosis en insectos son comunes y ampliamente distribuidas; a menudo ocasionan una reducción significativa en poblaciones de insectos en forma de epizootias espectaculares (Alatorre-Rosas, 2005). Los hongos entomopatógenos constituyen el grupo de mayor importancia en el control biológico de insectos plaga. Prácticamente todos los insectos son susceptibles a alguna de las enfermedades causadas por estos hongos. Se conocen aproximadamente 100 géneros y 700 especies de hongos entomopatógenos (Monzón, 2001). De estos, *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Ascomycota; Hypocreales) son los hongos más comúnmente usados en todo el mundo para el control de insectos plaga (Sun *et al.*, 2002), debido a que tienen la capacidad de infectar diferentes órdenes de insectos con amplia distribución geográfica (Kamp y Bidochka, 2002)

Los hongos entomopatógenos tienen ciertas ventajas para su uso como control biológico sobre virus y bacterias entomopatógenos puesto que, en su modo de acción no requieren ser ingeridos por el insecto (Jeffs y Khachatourians, 1997; Kamp y Bidochka, 2002). En general, los hongos entomopatógenos, cumplen con las siguientes características que los hacen atractivos para su uso en cultivos agrícolas: no son contaminantes para el ambiente, el riesgo para humanos es bajo y pueden persistir en el área agrícola cuando las condiciones ambientales son favorables (Rangel *et al.*, 2006) debido a la reproducción sobre los cadáveres y diseminación de conidios (Sun *et al.*, 2002). Los principales hongos empleados para el control biológico son *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Lecanicillium lecani*.

#### **1.2.1. *Metarhizium anisopliae* (Metsnickoff) Sorokin**

*M. anisopliae* es un patógeno importante de insectos que se encuentra distribuido ampliamente en el mundo. Los conidios son ovalados a cilíndricos, truncados en ambos extremos, con un tamaño que varía entre 3.5 y 9 micras de largo, predominando 5-8 micras (Guerreo *et al.*, 2000). Las colonias del hongo exhiben formas variadas y matices de color verde. *M. anisopliae* tiene un alto grado de especialización que ocurre casi enteramente en dos familias de coleópteros, *Elateridae* y *Curculionidae*. Sin embargo, se ha reportado el parasitismo de *M. anisopliae var anisopliae* también sobre otras especies, especialmente de los órdenes ortóptera, hemíptera, coleóptera (*Scarabaeidae* y *Curculionidae*) y dermáptera (Zimmermann, 1993).

#### **1.2.2. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin**

En la actualidad se usa para controlar las poblaciones del saltamontes, *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae) (Fagade *et al.*, 2005), entre muchas otras poblaciones de plaga. También se conoce la capacidad de *B. bassiana* para infectar huevos de la araña roja (*Tetranychus cinnabarinus* Koch (Acari: Tetranychidae) que ataca cultivos de frijol (Shi y Feng, 2004). *B. bassiana* presenta dos ventajas para el control de saltamontes sobre otros insecticidas biológicos: es capaz de invadir y penetrar la cutícula y matar rápidamente los insectos hospederos. En ocasiones *B. bassiana* presenta baja especificidad sobre otros

insectos, comparada con la especificidad para ortópteros (saltamontes, langostas, y grillos) (Goettel, 1992).

### **1.2.3. *Lecanicillium lecani* (Zimmermann) Zare et W. Gams**

El género *Lecanicillium* contiene un grupo heterogéneo de hongos asexuales, muchos de los cuales son de considerable importancia en la agricultura como patógenos de plantas, insectos y nematodos. La taxonomía del grupo todavía está en revisión y en muchas especies la caracterización es difícil y polémica. Hasta la fecha, las especies de *Lecanicillium* se caracterizan principalmente con base en su morfología y en su virulencia (Bidochka *et al.*, 1999). La especie más importante de este grupo de entomopatógeno es *L. lecanii* (= *Verticillium lecanii*), que ha sido aislado a partir de escamas, ácaros y arañas en climas y temperaturas tropicales, por lo que su potencial como insecticida biológico es prometedor (Gillespie y Moorhouse, 1994)

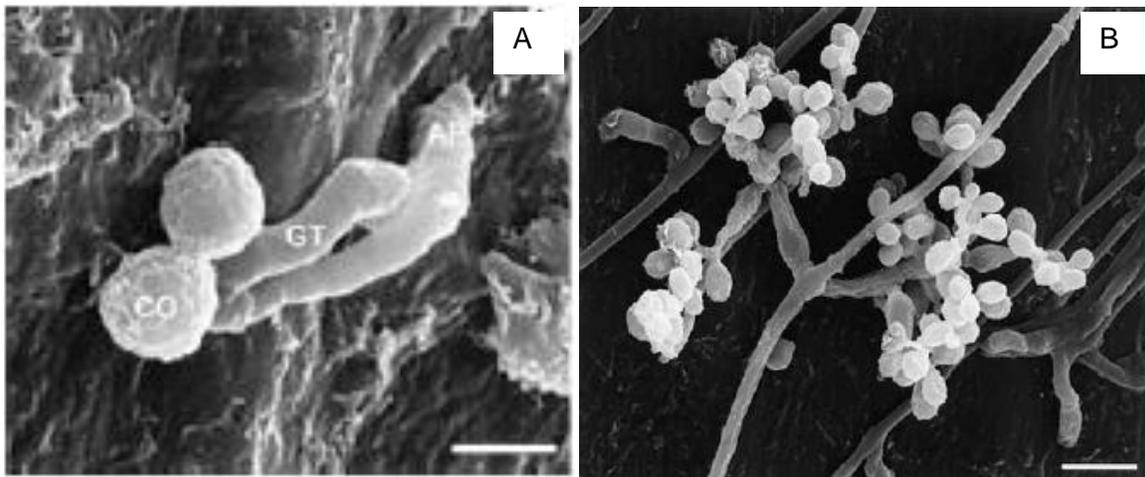
### **1.3. Ciclo de vida de los hongos entomopatógenos**

El ataque de los hongos entomopatógenos sobre insectos consiste de dos fases: la infectiva y la reproductiva. En la fase infectiva (**Figura 1A**) el conidio se adhiere a la cutícula del insecto, posteriormente germina y penetra la cutícula del insecto. La adhesión del conidio sobre la superficie de la cutícula se debe a las interacciones hidrofóbicas entre la epicutícula del insecto y la pared celular del conidio (Jeffer y Khachatourians, 1997).

Posterior a la adhesión, el hongo produce estructuras especializadas como el tubo germinativo y las hifas de penetración (Holder y Keyhani, 2005). Una vez que termina la elongación del tubo germinativo, la punta se empieza a hinchar y forma una estructura de domo altamente melanizada, excepto en el sitio de contacto llamado poro del apresorio, por donde emerge una delgada hifa que se adhiere fuertemente a la superficie de la cutícula y es el punto de concentración de la presión para formar el apresorio (citado por Rodríguez-Gómez, 2009). Durante la penetración de la cutícula el hongo utiliza un sistema enzimático de proteasas, quitinasas y lipasas (Sabbour, 2002) que degrada los principales componentes de la cutícula. Sí la infección es exitosa, el hongo prolifera en la hemolinfa (crecimiento

vegetativo) que resulta en la muerte de hospedero (Holder y Keyhani, 2005) con la formación de conidios sobre el insecto muerto (**Figura 1**).

En el proceso de la infección se produce un ataque a la capa lipídica de la epicutícula del insecto, por lo que la composición de lípidos de la cutícula determina la especificidad entre insecto-hongo (Lord, 2001). También es importante la capacidad del hongo para degradar quitina, debido a que ésta forma parte de la cutícula del insecto. En este contexto, se ha demostrado que en *Beauveria bassiana* la sobreexpresión del gen de quitinasa (*Bbchit1*) le confiere una mayor virulencia (Fang *et al.*, 2005). Además, participa una proteasa (Pr1) que degrada las proteínas presentes en la cutícula, y ésta a su vez activa un sistema fenoloxidasas en el insecto (St. Leger *et al.*, 1996). La penetración del hongo a la cutícula le permite obtener fuentes de carbono como disacáridos y azúcares fosforilados, como la glucosa 1-fosfato a partir de la hemolinfa.



**Figura 1.** Adhesión de un conidio de *B. bassiana* sobre la superficie de la cutícula de un artrópodo, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). (A) germinación, CO= conidio; GT= tubo germinativo, (B) crecimiento vegetativo y formación de conidios. Fotografías: Álvarez-Campos *et al.*, 2005.

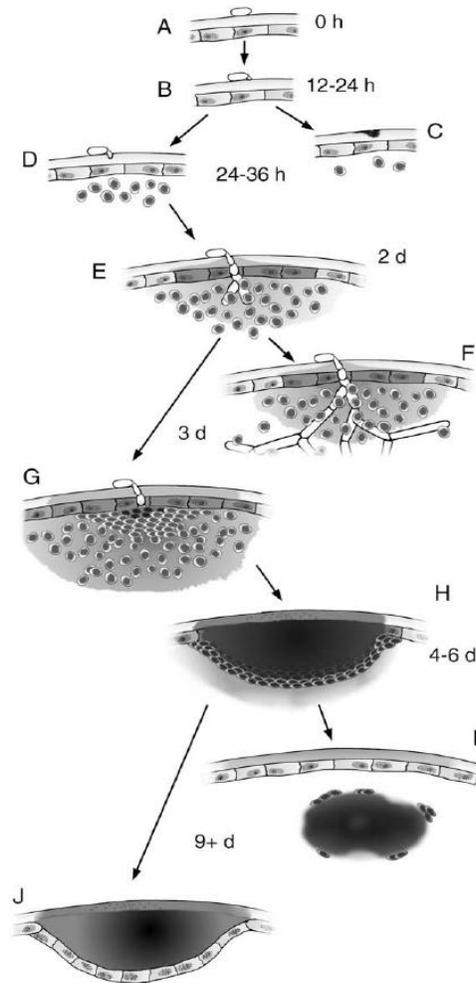
#### **1.4. Mecanismos de defensa de los insectos infectados por hongos entomopatógenos**

Como respuesta a la invasión de estos entomopatógenos, los insectos producen proteínas, incluyendo enzimas, se inicia la inmovilización de los patógenos dentro de granulomas y ocurre la encapsulación de los invasores, además de la síntesis de melaninas (para evitar que se propague la infección) y péptidos antimicrobianos (Xia *et al.*, 2000). En algunos insectos, la formación de esqueletos rígidos de color oscuro, actúa como una primera defensa física. Dicho proceso es catalizado por dos fenoloxidasas: la tirosinasa, y las lacasas. Al respecto, Arakane *et al.* (2005) reportaron la necesidad de una lacasa para la formación de fenotipos característicos en la cutícula (pigmentos y esclerosis) de un escarabajo (*Tribolium castaneum*), los pigmentos producidos en la cutícula se denominan melaninas.

Las melaninas son macromoléculas generalmente de color oscuro, compuestas de varios tipos de monómeros fenólicos o indólicos, usualmente forman complejos con proteínas y carbohidratos. Las melaninas son sintetizadas por microorganismos, animales y plantas. Los tipos de monómeros que las componen pueden variar dependiendo del organismo que las produce. Algunas de las características fisicoquímicas de las melaninas son: insolubilidad en agua, en solventes orgánicos, resistencia a la degradación por ácidos concentrados, blanqueamiento por la oxidación de agentes como el peróxido de hidrógeno, así como la solubilidad y degradación por soluciones alcalinas calientes (Butler y Day, 1998).

La principal barrera que presentan los insectos ante el ataque de un hongo entomopatógeno es la cutícula. Chouvenc *et al.*, (2009), describieron de manera detallada el proceso de defensa de la termita *Reticulitermes flavipes* ante la infección de *Metarhizium anisopliae* (**Figura 2 A-J**). Una vez que el conidio se adhiere sobre la cutícula del insecto, se inicia la germinación del conidio, puede ser durante las primeras 36 h después de la infección (A-B). Posterior a esto inicia la defensa fisicoquímica del insecto que implica una reacción de melanogénesis (C), la melanina actúa como barrera que puede impedir el avance de la infección y eliminar al patógeno. Si esto no sucede, la hifa penetra la cutícula en presencia de hemocitos que ocurren alrededor de las 48 horas (D) y una posterior aparición de melanina en los alrededores de la infección (E). Si la infección continúa, entonces el insecto muere, por lo tanto no fue exitosa la defensa (F). Sin embargo, puede suceder la encapsulación del patógeno (G-H) que, a su vez, puede quedar atrapado en una vacuola (I)

o bien en una invaginación de la cutícula incluida la melanina en un tiempo post-infección de hasta 9 días (J). Por lo tanto, la encapsulación es el último proceso de defensa que puede presentar un insecto ante el ataque de un hongo entomopatógeno después de que los anteriores mecanismos de defensa no fueron eficaces (Chouvenc *et al.*, 2009).

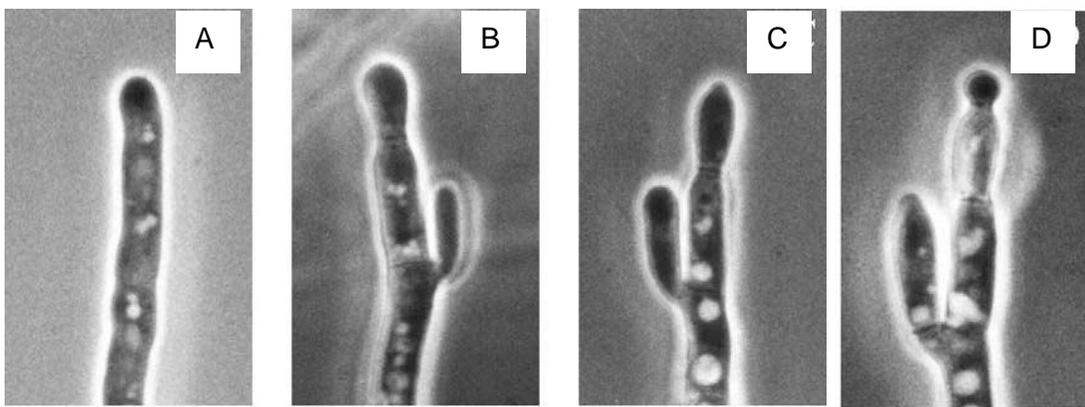


**Figura 2 A-J.** Defensa de un insecto ante el ataque de un hongo entomopatógeno. Esquema (Chouvenc *et al.*, 2009).

### 1.5. Conidiación

Los conidios ó esporas asexuales son células de dispersión producidas por un grupo de hongos filamentosos, se producen cuando las condiciones de crecimiento apical de la hifa no son las adecuadas. Los procesos de producción de conidios, la conidiación, es un tema atractivo para diversos fines, como el desarrollo de agentes de control biológico, inóculos para la producción de antibióticos y en la industria de los alimentos, entre otros (Roncal y Ugalde, 2003).

El proceso de conidiación implica la diferenciación celular dentro de un compartimento celular especializado llamado fialide. En este compartimento ocurren divisiones mitóticas sucesivas, dando como resultado células especializadas llamadas conidios (Roncal y Ugalde, 2003). En la **Figura 3A-D** se muestran los cuatro pasos que se han identificado para la conidiación de *Penicillium cyclopium* en cultivo sumergido. En el primer paso (A), se observó que se detiene el crecimiento vegetativo de la hifa, posteriormente (B), la célula apical se delimita por un septo con la concomitante formación de una ramificación subapical; durante el tercer paso (C), se da la formación y maduración de la fialide y finalmente (D), ocurre la formación del primer conidio. Después de algunas horas, nuevos conidios se producen en forma de cadenas sucesivas sobre el primer conidio formado (Roncal y Ugalde, 2003).



**Figura 3 A-D.** Estados morfológicos de *Penicillium cyclopium* durante la conidiación en cultivo sumergido. Fotografías: Roncal y Ugalde, 2003.

En la **Figura 4 A-B** se observan células de fialides maduras con conidios de dos cepas de *Metarhizium flavoviride* var *flavoviride*: ARSEF 2025 y ARSEF 2024, respectivamente. Las dimensiones de los conidios y fialides que reportan Bischoff *et al.*, (2006) son: 8.0-11 X 3.4-4.5 micras y 11.5-17.0 X 5-4.5 micras para la cepa ARSEF 2025 y 9.5-11.5 X 3.5-5.0 micras y 7.0-15.0 X 3.0-4.5 micras para la cepa ARSEF 2024.



**Figura 4 A-B.** Células fialides maduras con un conidio de *Metarhizium flavoviride* var *flavoviride* de las cepas ARSEF 2025 y ARSEF 2024 respectivamente. Fotografías: Bischoff *et al.*, 2006. Barra =10micras.

### **1.6. Control de calidad de conidios de hongos entomopatógenos**

Una vez que se obtiene un lote de conidios, es importante evaluar su calidad a través de las variables que se relacionan con el ciclo infeccioso descrito anteriormente.

#### **1.6.1. Germinación**

La germinación es la emergencia del tubo germinativo a partir de un conidio (**Figura 5**). Se considera un conidio germinado, cuando el tamaño del tubo germinativo es mayor o igual al ancho del conidio (Ibrahim *et al.*, 2002). Las condiciones nutricionales y la temperatura son factores que afectan la germinación. Al respecto, Ibrahim *et al.* (2002) observaron que los medios ricos en nutrientes, tales como agar dextrosa Sabouraud (ADS) y agar extracto de

levadura permitieron una mayor proporción de conidios germinados de *Metarhizium anisopliae* que un medio mínimo, además demostraron que los conidios obtenidos a partir de sustratos limitados en nitrógeno, germinaron 1.8 veces más rápido que los conidios obtenidos en un medio de ADS con maltosa. También se ha observado que la temperatura de germinación de los conidios de algunos hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* es de 25-30°C (Ekesi *et al.*, 1999).



**Figura 5.** Conidios germinados de *Metarhizium anisopliae* con tubo germinativo de 40-100 micras. Fotografía: (Fang y Bidoschka, 2006).

La germinación puede ser evaluada usando una suspensión de conidios asperjada sobre la superficie del agar de un medio de cultivo en cajas de Petri. Después de 18 a 24 horas se observan a través del microscopio los conidios germinados (Lord, 2009), o bien puede colocarse una gota de agar-agua (Samuels *et al.*, 1989) sobre un portaobjetos, a continuación se coloca una gota de la suspensión de conidios y se cubre con un cubreobjetos (Monzón, 2001). Después de algunas horas se observa al microscopio y se registran los conidios germinados.

### **1.6.2. Hidrofobicidad**

La hidrofobicidad de los conidios es un concepto general a nivel físico, es una propiedad de la superficie de los conidios que permite eventualmente asociar sustratos u hospederos (Jeffs *et al.*, 1999). De hecho, la hidrofobicidad de la superficie de los microorganismos es fundamental para su adhesión a las superficies con las que interactúan (Ahimou *et al.*, 2001). En el caso de los conidios, la hidrofobicidad es el producto de una capa sobre la superficie

muy bien organizada de estructuras proteicas llamadas “rodlets” (Hegedus y Khachatourians, 1995). Las principales proteínas que constituyen los “rodlets” son las hidrofobinas, éstas fueron caracterizadas durante la búsqueda de genes que se expresan durante la formación de las hifas aéreas de *Schizophyllum commune* (*Basidiomycota*) (Jeffer et al., 1999). En hongos entomopatógenos, se han identificado a los genes que codifican para estas proteínas, particularmente para *Metarhizium anisopliae* (St. Leger et al., 1992), mientras que en *Beauveria bassiana* se han identificado péptidos de 9.7 KDa con propiedades similares a las hidrofobinas (Bidochka et al., 1995).

La hidrofobicidad de hongos entomopatógenos se puede medir por distintos métodos, los más comunes son evaluando las interacciones con moléculas no polares, como la exclusión de fases, usando tolueno ó *n*-hexadecano (Shah et al., 2007). Existe otra técnica útil para determinar la hidrofobicidad, la SAS (por sus siglas en inglés, salt-mediated aggregation and sedimentation) (Jeffer et al., 1999), que consiste en la adición controlada de sales a la suspensión de conidios y se mide su velocidad de sedimentación. Los conidios más hidrofóbicos sedimentan más rápido y en soluciones con menor concentración de sal (Jeffer y Khachatourians, 1997).

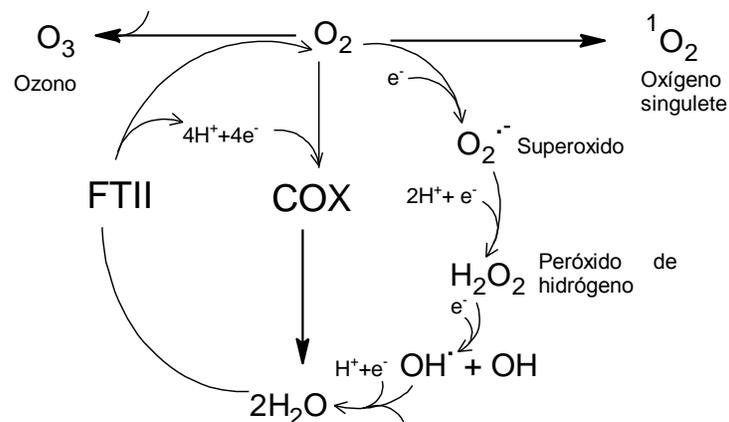
La adhesión de los conidios a los hospederos se puede dar en dos principales etapas. Durante la primera participan las propiedades físico-químicas de la superficie de los conidios (como la hidrofobicidad y las fuerzas electrostáticas), en la segunda, se secretan enzimas y mucílago que consolidan el ataque y establecen la infección (Shah et al., 2007). Se han propuesto que las enzimas que participan en la segunda etapa de la infección se encargan de hidrolizar cadenas cortas de ácidos grasos de la superficie de la cutícula, lo que permite una mejor adhesión (Segers et al., 1995).

### **1.7. La conidiación como respuesta al estrés oxidativo**

Se ha propuesto que una de la causa de la conidiación de hongos filamentosos, sucede por la estimulación en los cambios ambientales, como la aireación (Roncal y Ugalde, 2003). Al respecto se ha observado que los estados hiperoxidantes, como el dioxígeno, induce la citodiferenciación en *Neurospora crassa* (Hansberg y Aguirre, 1990). De manera habitual, el

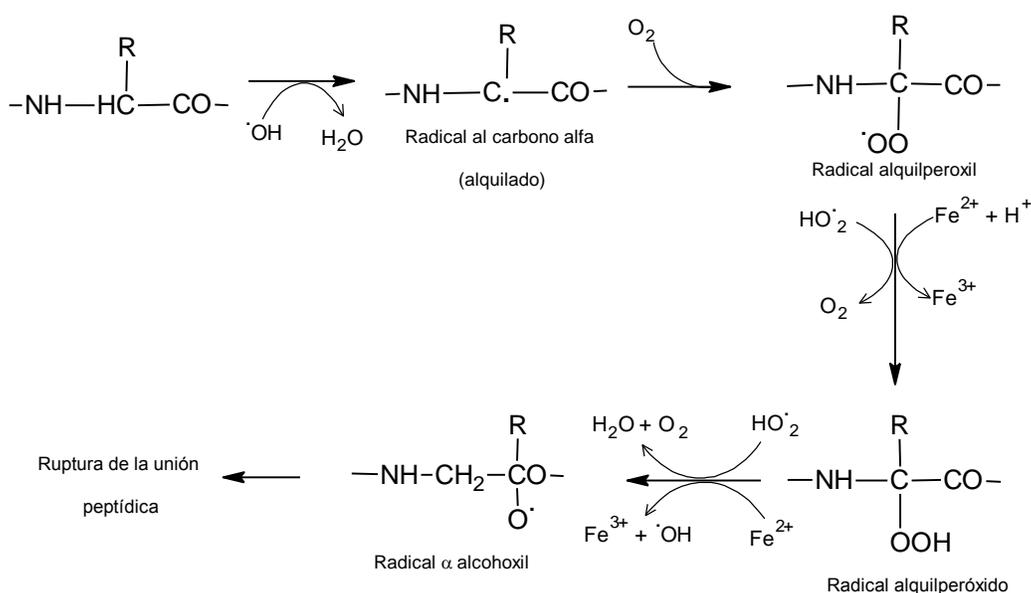
oxígeno se encuentra en su forma más estable ( $O_2$ ), así el oxígeno es poco reactivo con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica baja; sin embargo, se pueden producir (en cadena respiratoria) una serie de especies químicas que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular. Por lo anteriormente expuesto se comprende que, si bien el oxígeno, es imprescindible para el metabolismo y las funciones de los organismos aerobios, no se deben olvidar los muchos efectos tóxicos que implica (Venereo-Gutiérrez, 2002).

El estrés oxidativo es un estado provocado en las células por un desequilibrio entre agentes oxidantes y la capacidad de los organismos para eliminarlos. Una de las consecuencias del metabolismo del oxígeno es la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el oxígeno singulete ( $^1O_2$ ), radical superóxido ( $\dot{O}_2^-$ ), radical hidroxilo ( $\dot{OH}$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) (**Figura 6**). Las especies reactivas de oxígeno son generadas por la excitación de las moléculas de ozono ( $O_3$ ), oxígeno singulete y oxígeno o bien, por la reducción del radical superóxido, el  $H_2O_2$  o el radical hidroxilo. El oxígeno molecular se genera a través del sistema fotosintético II (FTII) y es reducido en la cadena respiratoria por la citocromo oxidasa (COX)(Aguirre *et al.*, 2005). Todas estas especies son muy tóxicas para las células. Casi todas las reacciones de transporte de electrones producen pequeñas cantidades de estas especies reactivas, en especial el radical superóxido. Si éste no se elimina rápidamente a través de la enzima superóxido dismutasa, causará la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Horton *et al.*, 2008).



**Figura 6.** Mecanismos para la producción de ERO (Aguirre *et al.*, 2005). FT II, sistema fotosintético; COX, Citocromo oxidasa.

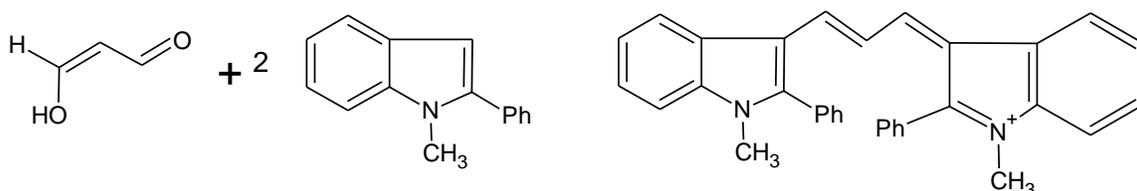
El daño a proteínas en los organismos aerobios sucede debido que la mayoría de las ERO generadas en los sistemas biológicos son deficientes de electrones (oxidantes electrofílicos), además de que tienden a reaccionar más rápido con cadenas laterales ricas en electrones como los residuos de los aminoácidos triptófano, tirosina, histidina, metionina, cisteína y fenilalanina. El ataque oxidativo al esqueleto de carbono de un polipéptido, por lo general, inicia por el ataque de un radical hidroxilo que sustrae un átomo de hidrógeno del carbono alfa de un residuo de aminoácido para formar H<sub>2</sub>O, dejando en la proteína un radical en el carbono alfa (**Figura 7**). El radical centrado recién, formado reacciona rápido con el oxígeno singulete para producir un radical alquilperoxil intermediario, el cual puede dar lugar al radical alquilperóxido, seguido de la formación de un alcoholiradical, la cual da lugar al derivado hidroxilproteína. Los pasos de esta secuencia de reacciones están significativamente mediados por interacciones con radicales hidroxilo o con peróxido de hidrógeno que previamente reaccionaron con Cu<sup>+</sup> o Fe<sup>2+</sup> (Zentella de Piña y Piña, 2008).



**Figura 7.** Oxidación de proteínas mediada por ERO. Modificado de (Zentella de Piña y Piña, 2008).

Las ERO inician el daño oxidativo en los lípidos de la membrana y los radicales libres de los lípidos resultantes propagan el proceso de peroxidación. Lo anterior permite la acumulación de hidroperóxidos, que finalmente se descomponen en una variedad de productos terminales, en donde los principales son el malondialdehído (MDA), el hexanal, y el 4-

hidroxinonenal (Zentella de Piña y Piña, 2008). La cuantificación del MDA es un indicador que permite evaluar el daño celular provocado por ERO (Esterbauer y Cheeseman, 1990). En la **Figura 8** se muestra la reacción entre *N*-metil-2-fenilindol y el MDA. El producto de la reacción tiene una absorbancia máxima a 586nm.



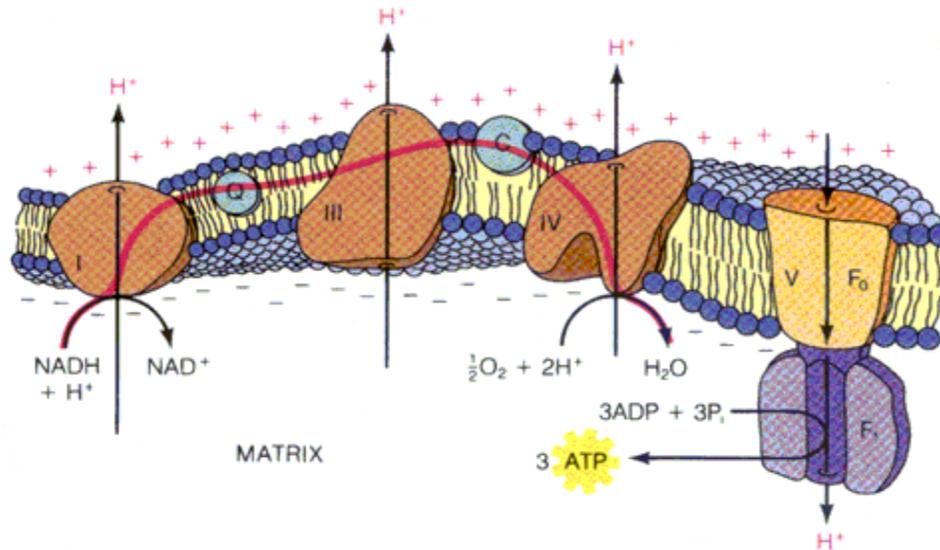
**Figura 8.** Reacción entre MDA y *N*-metil-2-fenilindol que puede emplearse para cuantificar lipoperoxidación.

### 1.8. Cadena respiratoria

La mitocondria genera la mayor parte de la energía de las células animales, así como las ERO y en consecuencia estrés oxidativo. La generación de energía ocurre, principalmente, durante la fosforilación oxidativa, un proceso en el cual los electrones pasan a través de una serie de moléculas transportadoras dispuestas en complejos enzimáticos multiproteínicos llamados cadena de transporte de electrones. La cadena de transporte de electrones está formada por cuatro complejos respiratorios (I,II,III y IV) embebidos dentro de la membrana interna mitocondrial y por dos tipos de transportadores de electrones la ubiquinona y el citocromo c (Konigsberg-Fainstein, 2008).

El Complejo I llamado NADH, ubiquinona oxidoreductasa o bien NADH deshidrogenasa, cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta la ubiquinona. La ubiquinona es soluble en la membrana interna, por lo que se considera un transportador móvil que lleva los electrones hacia el complejo III, contribuyendo a la generación del potencial electroquímico de protones para sintetizar ATP. El complejo II, denominado, succinato ubiquinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa, es otra vía de entrada de electrones hacia la cadena respiratoria, por lo que su función también es reducir a la ubiquinona para que ésta transporte electrones hasta el complejo III. En este caso, los electrones provienen de la oxidación del succinato a fumarato durante el ciclo de Krebs, puesto que la enzima succinato deshidrogenasa se comparte en cadena respiratoria y ciclo de Krebs. En este complejo no se

genera potencial electroquímico de protones. El complejo III o ubiquinona: citocromo c oxidoreductasa recibe los electrones de la ubiquinona y los transfiere al citocromo c que, a su vez, los transfiere al complejo IV; mientras tanto, los electrones se reciclan dentro de la enzima gracias a los hemo b, ayudando a generar potencial electroquímico de protones. El complejo IV es el citocromo c oxidasa, que cataliza la oxidación de moléculas del citocromo c reducido producidos en el complejo III. En las reacciones se incluye una reducción con cuatro electrones del oxígeno molecular ( $O_2$ ), para formar agua y traslocar cuatro protones a través de la membrana (Horton *et al.*, 2008, Mathews *et al.*, 2002). El potencial electroquímico generado por la traslocación de los protones, es utilizado por la enzima ATPsintaza para sintetizar ATP (**Figura 9**)



**Figura 9.** Transportadores de electrones en la cadena respiratoria (Mathews *et al.*, 2002).

### 1.9. *Tenebrio molitor*

El insecto *Tenebrio molitor* es un insecto ampliamente usado para evaluar la infectividad de algunos hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009) y *Metarhizium anisopliae* (Shah *et al.*, 2007) debido a su facilidad de cultivo en el laboratorio. Este insecto es nativo de Europa, pero actualmente se distribuye en todo el mundo. Se considera plaga de las gramíneas, cereales y productos derivados, aunque también se alimenta de carne y plumas, debido a su carácter omnívoro (Ramos-Elorduy *et*

*al.*, 2002). Puede llegar a ocasionar pérdidas económicas, puesto que ataca alfombras, pieles, y madera (Street, 1999). Es un insecto comúnmente utilizado como modelo de estudio de interacciones con hongos entomopatógenos, tanto en el estadio larval como en su estadio adulto (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2007), debido a su fácil reproducción y sobrevivencia en condiciones de laboratorio. *Tenebrio molitor* tiene cuatro estadios: huevo, larva, pupa y adulto. Los adultos son alargados (13-16 mm), de forma ovoide y ligeramente plana, color negro rojizo, la cabeza es ancha y redondeada. La larva es de color amarillo a rojizo y llegan a medir hasta 32 mm (Street, 1999). La clasificación taxonómica de *Tenebrio molitor* es la siguiente (Catalogue of life: 2009, Annual checklist):

Reino: *Animalia*

Phylum: *Artrópoda*

Clase: *Insecta*

Orden: *Coleóptera*

Familia: *Tenebrionidae*

Género: *Tenebrio*

Especie: *molitor*

## 2.- ANTECEDENTES

El hongo *Metarhizium anisopliae* es considerado como una alternativa para el control de insectos plaga en cultivos agrícolas. La mayor limitante para su uso como agente de control biológico es la producción de biomasa y conidios en sustratos artificiales a gran escala (Sun y Liu, 2006). En recientes estudios se han optimizado medios de cultivo para la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*, algunos se basa en el uso de sustratos naturales como el bagazo de caña de azúcar (Arzumanov *et al.*, 2005), arroz, sorgo y cebada (Prakash *et al.*, 2008), e incluso, en cadáveres de insectos como *Coptotermes formosanus* (Sun *et al.*, 2002). También se han probado medios de cultivos como Agar Papa Dextrosa (PDA), suplementado con extracto de levadura (Kamp y Bidochka, 2002; Shah *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2006), el medio Agar Dextrosa Sabouraud (ADS) suplementado con extracto de levadura (Sun *et al.*, 2002), y el Agar Extracto de Malta (AEM) (Kamp y Bidochka, 2002). De la misma manera, se han evaluado las condiciones de cultivo sólido, así como el contenido de humedad y el pH en los sustratos (Arzumanov *et al.*, 2005; Prakash *et al.*, 2008), además pH de cultivos líquidos para la producción de blastosporas de *Metarhizium flavoviride* (Issaly *et al.*, 2005). Con todo esto se ha logrado obtener mayor cantidad de conidios o blastosporas, pero su calidad ha sido poco estudiada.

También se ha estudiado el efecto de la aireación sobre la producción de conidios (conidios  $g^{-1}$  de sustrato) de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, observando que dicha variable no aumenta la producción de los conidios (Arzumanov *et al.*, 2005). Sin embargo, el incremento del oxígeno disuelto sobre la producción de blastosporas de *M. flavoviride* en cultivo líquido sí mostró un efecto positivo comparado con un medio no regulado (Issaly *et al.*, 2005). Los organismos aeróbicos, como *M. anisopliae*, utilizan oxígeno para la respiración y obtención de energía, teniendo que enfrentarse a la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Angelova *et al.*, 2005). Las ERO se generan bajo la influencia de factores internos y externos como: luz y temperaturas elevadas, radiación ionizante, cambios en la composición de la atmósfera y presión osmótica del medio (Belozerskaya y Gessler, 2006). Al respecto, Hansberg y Aguirre (1990), propusieron la hipótesis de que los estados hiperoxidantes inician los eventos de diferenciación celular en *Neurospora crassa*.

En sistemas de producción a mayor escala, es posible la acumulación de CO<sub>2</sub> como producto metabólico, en especial en cámaras de producción de conidios por cultivo sólido. El efecto del CO<sub>2</sub> (acumulado o inyectado) se ha estudiado de forma limitada con estos procesos, aunque sí hay reportes de cómo se potencia la velocidad de muerte sobre insectos de *Tribolium castaneum* infectados con *Beauveria bassiana*, cuando se incubaron con bajas concentraciones de oxígeno (16%) y altas concentraciones de dióxido de carbono (40%) (Lord, 2009).

Pocos trabajos han abordado el tema de estrés oxidativo en hongos entomopatógenos. A pesar de esto, Sowjanya Sree y Padmaja, (2008) relacionaron el estrés oxidativo con una mayor producción de micotoxinas de *M. anisopliae* contra larvas de *Spodoptera litura*. Por su parte, Wang *et al.* (2008) relacionaron una proteína osmosensora (que interfiere en la sensibilidad a la presión osmótica) MOS1 y el estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno. En *N. crassa*, un organismo que no es entomopatógenos, se estudió la oxidación del glutatión y NADPH observando que ocurre justo al inicio de la conidiación (Toledo *et al.*, 1995). Sin embargo, no existen trabajos que hayan relacionado el posible estrés oxidativo en una atmósfera rica en oxígeno con la conidiación de *Metarhizium anisopliae*.

Existe evidencia de que los insectos en poblaciones de alta densidad invierten más recursos inmunológicos en la resistencia a patógenos comparado con aquellas poblaciones de baja densidad. Tales aumentos en la resistencia son acompañados, a menudo, por melanización de la cutícula, que es característico en las poblaciones de alta densidad. La resistencia del insecto hacia el patógeno involucra un sistema enzimático de fenoloxidasas. En este sentido, Wilson *et al.* (2001), examinaron el papel entre la resistencia, melanización y la actividad de las fenoloxidasas en larvas del género *Spodoptera*. Los resultados mostraron una relación positiva entre la melanización y resistencia a la enfermedad y la participación de fenoloxidasas. Las enzimas fenoloxidasas juegan un papel importante en la defensa de los insectos, cuando éstos son infectados por algún microorganismo, estas enzimas oxidan sustancias como tirosina, dopa y dopamina, formando capas de melaninas en las células de los insectos rodeando a los microorganismos hasta encapsularlos y posteriormente provocar su muerte (Asano y Ashida, 2001). En el gusano de la seda, *Bombyx mori*, se ha logrado purificar dos fenoloxidasas obtenidas de extractos de cutícula y de la hemolinfa, las isoformas presentaron masas moleculares de 71 y 142 KDa y la capacidad de oxidar

compuestos como *o*-difenoles y *p*-difenoles, dichas isoformas pueden estar implicados en mecanismos de defensa (Asano y Ashida, 2001).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los hongos entomopatógenos son organismos capaces de provocar enfermedades en insectos. Esta particularidad ha permitido usar a los hongos como agentes de control biológico para disminuir poblaciones de insectos-plaga. En especial, *Metarhizium anisopliae*, tiene la característica de controlar plagas que afectan cultivos agrícolas en México.

Una de las limitaciones que presenta el control biológico de insectos-plaga con hongos entomopatógenos es la producción masiva de conidios. Además, se requiere que los conidios producidos cumplan con características que permitan una alta eficiencia en la infección lo cual están directamente relacionados con su calidad. Algunos de los criterios que se han asociado a la calidad de los conidios, son el porcentaje de germinación, la hidrofobicidad y la infectividad. Hasta el momento se han realizado trabajos donde se ha logrado incrementar el rendimiento de conidios; sin embargo, los parámetros de calidad no se han evaluado. En otros casos, se ha visto que la calidad disminuye cuando se producen conidios en medios artificiales. También se ha observado que las atmósferas modificadas permiten una producción elevada de blastosporas de *Metarhizium anisopliae* en cultivos sumergidos.

Considerando los antecedentes, en este trabajo se pretendió seleccionar un medio de cultivo que permitiera una alta producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* empleando sustratos naturales. Una vez seleccionado el medio de cultivo, se evaluó el efecto de la composición de las atmósferas gaseosas sobre la producción de conidios y su calidad. Con esto se buscó evaluar parámetros de calidad no reportados para este hongo, que durante un cultivo sólido sobre sustratos naturales, sería difícil estimar. Por otra parte, es sabido que el estrés oxidativo es uno de los factores que afecta la producción de esporas en la mayoría de los hongos, sin embargo, para hongos de interés en el control biológico está poco documentado.

#### **4. HIPÓTESIS**

La modificación de la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> en la atmósfera gaseosa de cultivos de *Metarhizium anisopliae* afectará la producción de conidios y su calidad.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. *Objetivo general*

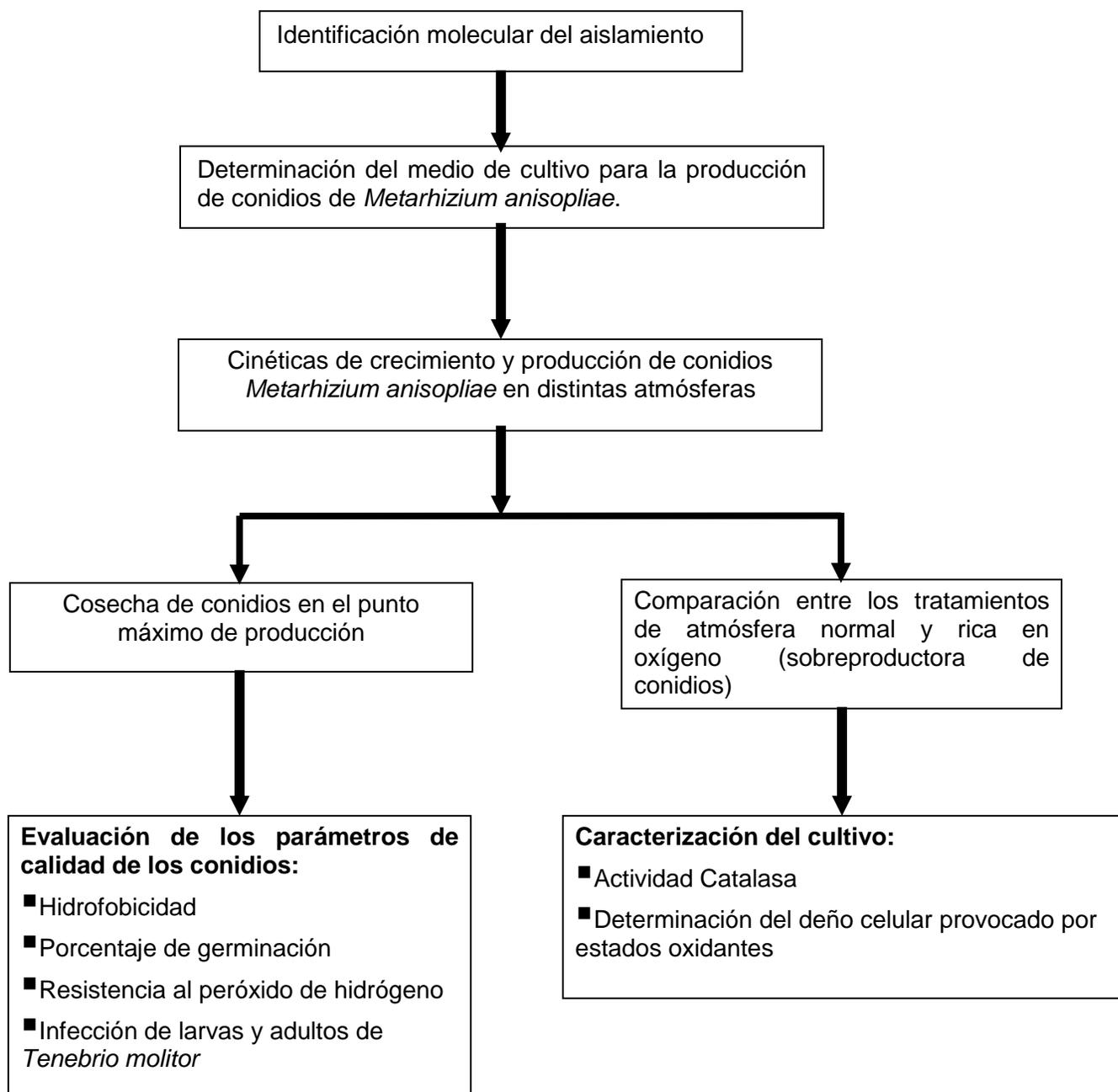
Estudiar el efecto de la composición de la atmósfera gaseosa sobre la productividad, rendimiento y calidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* cuando éstos se producen en un medio de cultivo natural previamente seleccionado.

### 5.2. *Objetivos específicos*

- Identificar el aislamiento de *Metarhizium anisopliae* a través de técnicas de biología molecular.
- Seleccionar el mejor medio de cultivo para el crecimiento y producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*.
- Evaluar el efecto de distintas concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> sobre los parámetros y rendimientos de crecimiento de *Metarhizium anisopliae* con el medio seleccionado.
- Determinar la calidad de los conidios obtenidos en los cultivos con concentraciones modificadas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.
- Determinar el daño a las membranas de *Metarhizium anisopliae* provocado por estados oxidantes.
- Evaluar la enzima catalasas en micelio y conidios de *Metarhizium anisopliae* como respuesta antioxidante provocada por la atmósfera oxidante.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

En la **Figura 10** se muestra el diagrama de flujo para la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en cultivos con concentraciones modificadas de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.



**Figura 10.** Diagrama de bloques de la estrategia experimental

### **6.1. Microorganismo.**

El aislamiento de *Metarhizium anisopliae* que se ocupó en este trabajo proviene del laboratorio de la Dra. Raquel Alatorre del Colegio de Posgraduados en Montecillo, Estado de México. El aislado ha sido probado contra chapulines, grillos y otros insectos. El hongo *Metarhizium anisopliae* se mantuvo en glicerol al 20% a -20°C. Se inoculó en un medio que contenía cutícula de chapulín según Barranco-Florido *et al.* (2005) con la intención de reactivar la cepa, posteriormente se desarrolló sobre Agar Maltosa Sabouraud (AMS) con 0.5 g l<sup>-1</sup> de desoxicolato de sodio a una temperatura de 28°C por siete días para obtener una colonia. El cultivo mono colonia de *Metarhizium anisopliae* se creció sobre Agar Papa Dextrosa (PDA) por siete días a 28° C. El inóculo se obtuvo por arrastre de los conidios de la superficie del agar con una solución Tween 80 al 0.01% y éste se usó en cada experimento.

### **6.2. Identificación del aislado de *Metarhizium anisopliae***

La identificación molecular del aislado se realizó a través de la amplificación del fragmento de DNA comprendido entre las regiones que codifican para los genes ribosomal 18S y 28S bajo la siguiente metodología. Se obtuvo micelio crecido en un medio de cultivo líquido glucosa Sabouraud al 4%. El micelio de siete días de edad se filtró a través de papel filtro Whatman No 1 y posteriormente se liofilizó. El producto liofilizado se maceró en un mortero con nitrógeno líquido durante 5 min.

La extracción del DNA genómico se realizó usando un kit de extracción (DNA Purification Kit Wizard ® Genomic Promega: num. Cat. A1120). La amplificación del fragmento de DNA se realizó a través de PCR con cebadores generales ITS5 e ITS4b, utilizando 30 ciclos de desnaturalización (94° C durante 45 s), hibridación (55° C durante 1 min) y polimerización (72° C durante 45 s). La secuencia de los cebadores generales para hongos fueron las siguientes: ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4b (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (León-Santesteban *et al.*, 2008).

### **6.3. Análisis porcentual de los sustratos**

Los sustratos empleados en este estudio (arroz, avena y peptona de carne) fueron analizados en su composición porcentual de C, N y H. La avena y el arroz fueron molidos hasta un tamaño de partícula menor a 0.25 mm, mientras que las harinas y la peptona fueron deshidratadas durante 24 h en una estufa a 60° C.

La composición elemental de los sustratos se determinó en un analizador Series II 2400 CHNS/O (Perkin Elmer, Boston, USA). Este equipo está provisto de dos columnas, la primera utilizó una temperatura de combustión de 925°C y en la segunda se usó una temperatura de reducción de 640°C. El gas acarreador fue helio y la detección de los compuestos se realizó con un detector de conductividad térmica. La calibración se realizó con un estándar de cisteína. Las muestras se pesaron (1.5-3 mg) en una microbalanza de alta precisión. Los resultados se expresaron en porcentaje (%) de cada compuesto referido a la materia seca de la muestra.

### **6.4. Selección del medio de cultivo**

Se analizaron los medios de cultivo sobre agar suplementados con harinas de arroz o avena como fuentes principales de carbono. Se evaluó el efecto de la peptona de carne (Bioxon) sobre la producción de los conidios en los medios. Los cuatro medios fue (g L<sup>-1</sup>): **(a)** arroz (33,3); **(b)** avena (33,3); **(c)** arroz (33.3) con peptona de carne (10) y **(d)** avena (33.3) con peptona de carne (10). La relación C/N teórica para cada medio fue: 20.46, 15.71, 6.85, y 5.73, respectivamente. Todos los medios contenían 15 g L<sup>-1</sup> de agar bacteriológico (Bioxon). El pH inicial fue ajustado a 7.

Las unidades experimentales fueron botellas serológicas (Wheaton) de 120 mL de capacidad, adicionadas con 10 mL de medio de cultivo e inoculadas con 1X10<sup>7</sup> conidios botella<sup>-1</sup> (6.9X10<sup>5</sup> conidios cm<sup>-2</sup>). Las unidades experimentales se incubaron a 28° C durante siete días.

Los conidios obtenidos después de siete días se cosecharon por lavado de la superficie con una solución Tween 80 al 0.01%. El conteo de los conidios se realizó en una cámara de Neubauer.

### **6.5. Efecto del las atmósferas sobre la producción de los conidios.**

Con la finalidad de evaluar el efecto de la composición de la atmósfera gaseosa sobre el rendimiento y calidad de los conidios, el hongo *Metarhizium anisopliae* fue crecido sobre el medio (d). Para lo anterior, se analizaron cuatro tratamientos con atmósferas modificadas, cuya composición, según el proveedor Praxiar (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Composición porcentual de las atmósferas utilizadas en cada tratamiento.

Tratamiento Proporción O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (%)	% de oxígeno	% de bióxido de carbono
21/0	20.9	0.05
26/0	26	0
21/ 5	21	5
16/ 5	16	5

En el primer tratamiento (normal) las botellas serológicas fueron tapadas con tapones de algodón para permitir el intercambio gaseoso desde el inicio hasta el fin de la cinética. El resto de tratamientos (26/0, 21/5 y 16/5) se iniciaron con una atmósfera normal (21/0) con tapones de algodón y a partir de las 60 h de cultivo (fase preestacionaria), se modificaron las atmósferas hasta el final del mismo. Las atmósferas se modificaron de la siguiente manera: durante la fase preestacionaria, a las botellas se le cambiaron los tapones de algodón por tapones herméticos de goma, en condiciones de esterilidad. En cada tratamiento con atmósferas modificadas se hizo pasar un flujo ( $20 \text{ cm}^3 \text{ s}^{-1}$ ) a través de la unidad experimental durante un minuto. El recambio de atmósfera se realizó cada 24 h. La toma de muestras en las cinéticas para todas las atmósferas se realizó cada 12 h hasta el final del cultivo (156 h).

Con la intención de verificar que los tratamientos no tuvieran fuga de gases, se utilizó un control que consistió en el mismo tratamiento que la atmósfera Normal y después (a las 60 h) se cambiaron los tapones de algodón por los septos de goma y cada 24 horas, se realizó el recambio de atmósfera con aire comprimido estéril.

### **6.5.1. Cuantificación de CO<sub>2</sub> acumulado en las unidades experimentales**

Se determinó la acumulación del bióxido de carbono a través de cromatografía de gases en las botellas serológicas 24 horas después de cada recambio en todos los tratamientos. La determinación se realizó en un cromatógrafo de gases (Gow Mac Instrument CO., Bethlehem, Pa, USA, Series 580) con un detector de conductividad térmica (TCD) y una columna Alltech (Packing: Carbosphere™, 80/100, 6ft X 1/8" o.d., SS) bajo las siguientes condiciones de operación:

- Gas acarreador: Helio.
- Flujo: 20 mL min<sup>-1</sup>.
- Temperatura de la columna: 140° C.
- Temperatura del detector: 190° C.
- Temperatura del inyector: 170° C.
- Presión: 40 psi.
- Polaridad: 120 mA.

Se realizó una curva de 0% a 25% de CO<sub>2</sub>. Ver anexo 1.

### **6.5.2. Determinación de biomasa**

La biomasa (**X**) se determinó por diferencia de peso seco. Posterior a la cosecha de los conidios a las botellas se le adicionaron 20 mL de agua destilada y se calentaron en un horno de microondas (Mabe, Litton) durante 30 s. Se filtró a través de papel filtro (Whatman No 1) utilizando una bomba de vacío. El sólido recuperado se lavó con 40 mL de agua en ebullición para eliminar restos de agar. El papel filtro con la biomasa se deshidrató a 60° C durante 24 h para determinar el peso seco. La biomasa se reportó como miligramos de biomasa seca por unidad de área del agar (mg X· cm<sup>-2</sup>).

### 6.5.3. Parámetros de crecimiento

La evolución del crecimiento en base seca ( $X = X(t)$ ) fue analizada a través de la ecuación logística (2) o de Velhurst-Pearl (Hardin, 1945).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[ 1 - \frac{X}{X_{\max}} \right] X \quad \dots\dots\dots (1)$$

donde,  $\mu$  es la velocidad específica máxima de crecimiento y  $X_{\max}$  es la biomasa máxima. La solución de la ecuación logística (1) es:

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + \left( \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \right) e^{-\mu t}} \quad \dots\dots\dots (2)$$

donde,  $X = X_0$ ; el valor inicial de la biomasa.

Los parámetros de la ecuación anterior se ajustaron por la minimización del error cuadrático con la herramienta "Solver" de la hoja electrónica de Excel (Microsoft).

### 6.5.4. Cosecha y cuantificación de los conidios

Los conidios (**C**) fueron considerados como la principal variable de respuesta del efecto de las distintas atmósferas analizadas. Éstos se cosecharon por lavado de la superficie con una solución Tween 80 al 0.01% y se contaron en cámara de Neubauer. Se reportaron como conidios por unidad de área de la superficie del agar (conidios  $\text{cm}^{-2}$ ).

### 6.5.5. Cálculo del rendimiento de los conidios y productividad

El rendimiento de los conidios respecto a la biomasa ( $Y_{C/X}$ ) se obtuvo graficando la relación entre **C** (conidios  $\text{cm}^{-2}$ ) y **X** ( $\text{mg cm}^{-2}$ ) contra el tiempo de cultivo. El máximo de la función obtenida, se consideró como el rendimiento en cada tratamiento. La productividad se

determinó relacionando el rendimiento con el tiempo en el cual se observó el valor máximo del rendimiento ( $P=Y_{C\%}/\text{tiempo de cultivo}$ ).

## **6.6. Determinación de parámetros de calidad de los conidios**

### **6.6.1. Porcentaje de germinación**

A los conidios cosechados en el tiempo de máxima producción (156 h) se les determinó el porcentaje de germinación (**G**). Sobre un portaobjetos se colocó, en condiciones de asepsia, una gota de la solución en ebullición de 1.5% de agar-agua (Samuels *et al.*, 1989). Se dejó enfriar por aproximadamente 5 min y se colocó 100  $\mu\text{l}$  de una suspensión de esporas, cuya concentración fue de  $1 \times 10^6$  con  $\text{mL}^{-1}$ . El portaobjetos se colocó sobre un disco de papel filtro humedecido dentro de una caja Petri y se incubó a  $28^\circ\text{C}$  durante 18 h.

Se observó al microscopio y se determinó el porcentaje de germinación. Se consideró un conidio germinado cuando el tubo germinativo fue mayor o igual al diámetro del conidio sin germinar (Safavi *et al.*, 2007).

También se evaluó, como técnica alterna, la viabilidad de los conidios. Para lo anterior, en un medio AMS con  $0.5\text{ g l}^{-1}$  de desoxicolato de sodio, se sembraron en césped 200 conidios obtenidos de cada tratamiento. Después de siete días se contaron las colonias formadas y se reportaron como el porcentaje de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

### **6.6.2. Hidrofobicidad relativa de la superficie de los conidios**

La hidrofobicidad de la superficie de los conidios (**H**) fue determinada por exclusión de fases entre la fase acuosa y un disolvente (Shah *et al.*, 2007). El disolvente orgánico usado fue el *n*-hexadecano (Sigma). Los conidios de *Metarhizium anisopliae* cosechados de cada tratamiento fueron suspendidos en una solución de  $\text{KNO}_3$  0.1M, con una concentración final de conidios de  $1 \times 10^7$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . La densidad óptica de la suspensión fue determinada a 660 nm usando un espectrofotómetro (Beckman DU-640, USA) y ésta fue referida como  $OD_{total}$ . En un tubo de ensayo se transfirieron 3 mL de la suspensión de conidios, se adicionó 1 mL de *n*-hexadecano y se agitó durante 20 s. Después de 30 min, la fase orgánica

fue removida con una pipeta Pasteur y a la fase acuosa se le determinó la densidad óptica, referida como  $OD_{ac}$ . La hidrofobicidad relativa fue calculada con la ecuación 3.

$$H = 100 \left( 1 - \frac{OD_{ac}}{OD_{total}} \right) \dots\dots\dots (3)$$

donde,  $OD_{total}$  y  $OD_{ac}$  representan los valores de las densidades ópticas de la muestra inicial y la de la fase acuosa después del tratamiento, respectivamente (Shah *et al.*, 2007).

### 6.7. Bioensayo

Los conidios obtenidos a las 156 h (producción máxima) de cultivo en cada una de las atmósferas estudiadas fueron utilizados de manera separada para infectar adultos de *Tenebrio molitor*. Los insectos fueron sumergidos durante 3 s (larvas) y 15 s (adultos) en una suspensión de conidios, cuya concentración fue de  $1 \times 10^8$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ . El control del experimento se hizo utilizando una solución al 0.01% de Tween 80.

Las unidades experimentales fueron cajas de Petri con 12 insectos, con hojuelas de avena estéril como alimento. Las cajas fueron incubadas a  $28^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 12 horas de oscuridad y 12 horas de iluminación, con una humedad relativa del 75%. El bioensayo se monitoreó durante 7 d con cuatro replicas por cada tratamiento. La mortalidad fue registrada cada 12 h y los insectos muertos se transfirieron a cámaras húmedas para observar el crecimiento del hongo sobre el cadáver y confirmar la muerte por la infección (Shah *et al.*, 2005). El tiempo letal 50 ( $TL_{50}$ ) fue estimado graficando la mortalidad acumulada contra el tiempo. Los datos fueron modelados a través de la función exponencial siguiente (4).

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S \dots\dots\dots(4)$$

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

donde  $Y$ , es el porcentaje de sobrevivencia en el tiempo  $t$ ;  $k$ , es la tasa específica de muerte ( $d^{-1}$ );  $t_0$ , es el tiempo de retardo de muerte, es decir, el tiempo en el cual la población de insectos comienza a morir después de la infección( $d$ ),  $S$ , es el nivel (%) de sobrevivencia asintótica. Este modelo corresponde a una ecuación diferencial de primer orden que indica el tiempo de retardo de muerte con la condición inicial:  $Y \rightarrow S$ ; para  $t \rightarrow \infty$  (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

### 6.8. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de los conidios

Se evaluó la resistencia de los conidios al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) con la finalidad de conocer si las atmósferas modificadas conferían distintos grados de viabilidad. Los conidios cosechados a las 156 h de cultivo de cada tratamiento (producción máxima) se incubaron en una solución de 25 mM de  $H_2O_2$  durante diversos tiempos de exposición. Se realizó previamente una curva dosis-respuesta y ésta fue la concentración adecuada. Los tiempos de exposición fueron desde 2 a 20 min. Después de la exposición al  $H_2O_2$ , 50  $\mu$ L de una suspensión de  $1.5 \times 10^3$  conidios  $mL^{-1}$  se sembraron en césped sobre una superficie de agar, con medio AMS adicionado con 0.5  $gL^{-1}$  de desoxicolato de sodio. Después de siete días de incubación a 28° C se contaron las colonias formadas. El control de cada tratamiento consistió en conidios suspendidos en agua estéril. La estimación de los parámetros de resistencia al peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad ( $v$ ) fueron estimados mediante una función definida por partes, la primera parte se ajusta a una función cuadrática en el intervalo  $0 \leq t < t_i$  y la otra parte se ajusta a una función diferencial de decaimiento de primer orden en el intervalo  $t \geq t_i$ , ecuación 5.

$$f(t) = \begin{cases} at^2 + bt + A_0, & 0 \leq t < t_i \\ Ae^{-\alpha(t)}, & t \geq t_i \end{cases} \dots\dots\dots(5)$$

donde,  $f(t)$  es el porcentaje de viabilidad de los conidios expuestos a peróxido de hidrógeno en el tiempo  $t$ ;  $a$ ,  $b$  y  $A_0$  son los coeficientes de la ecuación cuadrática,  $A$  es el porcentaje de conidios viables en el tiempo mayor que  $t_i$  (el límite por la derecha de la función cuadrática y el límite por la izquierda de la función diferencial) y  $\alpha$  es la tasa específica de decaimiento de la viabilidad de los conidios.

La interpretación de los coeficientes **a** y **b** de la ecuación cuadrática se pueden ver en términos de la primera deriva de la función,  $(2at + b, 0 \leq t < t_i)$  que representa la rapidez instantánea de inducción en la viabilidad provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM en el tiempo **t** cuando la pendiente es positiva. Cuando la pendiente toma valores negativos representa la velocidad en la pérdida de viabilidad de los conidios.

### **6.9. Obtención del extracto crudo enzimático intracelular**

Con el fin de evaluar si la atmósfera oxidante (26/0) provoca daño celular a micelio y conidios de *Metarhizium anisopliae* (específicamente a las membranas) o alguna respuesta antioxidante como enzimas catalasas, se obtuvo el extracto crudo enzimático (ECE) intracelular. Éste se consideró al producto de maceración del micelio con conidios. Para ello, en cada punto de la cinética en los tratamientos de las atmósferas normal y 26 % de oxígeno, se cortaron cuatro cilindros de agar con micelio y esporas usando un horador de 8 mm de diámetro, éstos se colocaron dentro de un Eppendorf de 2 mL con 0.3 g de perlas de vidrio (Glasperlen 31/8 B. Braum Biotech International GmbH) y 1 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.5). El tubo Eppendorf se colocó dentro del equipo de maceración de células (Mini-Beadbeater™ Biospec Products) y se inició un ciclo de 30 s a 42,000 rpm. El producto de la maceración se centrifugó a 10,000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 min. El sobrenadante se pasó a otro tubo Eppendorf y se le agregó 10 µL de una dilución 1:1000 de una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma P2714).

### **6.10. Determinación del malondialdehído como indicativo del daño celular provocado por ERO**

La determinación del MDA es una técnica empleada para evaluar el daño celular provocado por ERO como producto de la lipoperoxidación. Con el fin de relacionar la alta conidiación observada en el tratamiento 26/0 y el estrés oxidativo, se evaluó el daño celular en este tratamiento y se comparó con el tratamiento normal (21/0). Para esto, se usó el ECE y un kit comercial (*Biomol*, International Inc.). El kit se fundamenta en la reacción de un agente cromogénico, el *N*-metil-2-fenilindol, con el MDA a 45°C. Una molécula de MDA reacciona con dos de *N*-metil-2-fenilindol para formar un cromóforo estable que se cuantifica por

espectrofotometría a 586 nm (Esterbauer y Cheeseman, 1990). Se realizó una curva de calibración de concentración de MDA ( $\mu\text{M}$ ) *versus* absorbancia cuya concentración iba desde 0-5 nMoles de MDA hasta 4 nMoles. Ver anexo 2.

### **6.11. Determinación de la actividad catalasa**

Debido a que no se observó daño celular provocado por la atmósfera oxidante, se buscó una explicación a la ausencia de daño celular provocado por la atmósfera oxidante, mediante la actividad de alguna de las enzimas antioxidantes como la catalasa. Para ellos se determinó la actividad catalasa monitoreando la descomposición de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a través del espectrofotómetro a 240 nm durante la cinética de crecimiento en los tratamientos: atmósfera normal y con 26% de oxígeno. El sustrato de la reacción enzimática fue una solución de peróxido de hidrógeno al 25 mM en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.4). La mezcla de reacción contenía 900  $\mu\text{l}$  de sustrato y 100  $\mu\text{l}$  de ECE intracelular. Se obtuvo la pendiente de la descomposición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  respecto al tiempo transformando la absorbancia a micromoles de peróxido descompuesto usando el coeficiente de extinción molar  $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . El tiempo de reacción fue de un minuto con intervalos de 10 s. Una unidad catalasa se consideró como la cantidad de enzima que descompone 1  $\mu\text{mol}$  de peróxido de hidrógeno durante un minuto a  $25^\circ \text{C}$  (Nagy *et al.*, 1997).

### **6.12. Análisis estadístico**

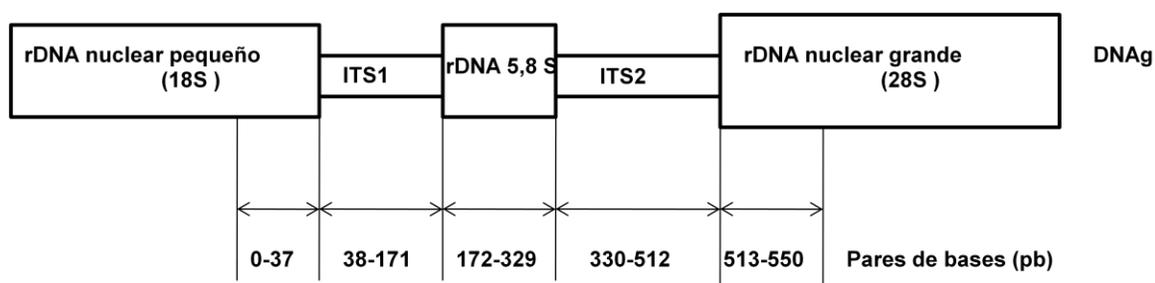
Los resultados obtenidos de cada experimento fueron analizados usando tres o cuatro repeticiones por condición. Los datos se expresaron como la media de las repeticiones con su respectiva desviación estándar ( $\pm$ .D.S). Los datos fueron analizados a través del análisis de varianza (ANOVA) usando la prueba de diferenciación de medias de Tukey con un grado de significancia de  $\alpha < 0.05$ . Se usó el programa estadístico SPSS versión 12.0.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1. Identificación del aislado *Metarhizium anisopliae*

La identificación del microorganismo usado en este estudio fue a través de la amplificación del DNA con los cebadores descritos (ver Materiales y Métodos, apartado 6.2). El producto de la amplificación del DNA fue de 550 pares de bases (pb) que comprende el genoma de *Metarhizium*: la secuencia parcial del gen 18S-rDNA, el espacio transcrito interno 1 (ITS1, por sus siglas en inglés), el gen completo de 5.8S-rDNA, el espacio transcrito interno 2 (ITS2) y la secuencia parcial del gen 28S-rDNA (**Figura 11**). El producto de PCR secuenciado fue comparado con las secuencias de hongos publicadas a través del programa de búsqueda de homología nucleótido-nucleótido BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Éste mostró una identidad con los 550 nucleótidos del 96% con *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum*. Esta secuencia se incluyó a la base de datos del National Center for Biological Information (NCBI) con el número de acceso FJ876298. La secuencia obtenida con los cebadores ITS5 e ITS4b (León-Santiesteban *et al.*, 2008) fue:

```
CAAAGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGAGATCATTATCGAGTTCTGAAAAACTCCCAACCCCT
GTGAACTATACCTGTAATTGTTGCTTCGGCGGGACTCGTGCCCGCCGGGGACCCAAACCTTCT
GAATTTTAAAGTATCTTCTGAGTGGTAAAAAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG
TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC
ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGTCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACGCCCTCAAGTCCCCCGTGGACTTGGTGTGGGGATCGGCGAGCGCTGTCTTTTCAGCAGC
CCGCCCCCGAAATTTATTGGCGGTCTCGCCGCGGCCCTCCTCTGCGCAGTAGTAAAACACTCGC
AACAGGAGCCCGGCGAGGTCCACTGCCGTA AACCCCGACTTTTTACAGTTGACCTCGAATCAG
GTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCA
```



**Figura 11.** Mapa de producto de PCR en el genoma de *Metarhizium anisopliae*.

En recientes estudios se ha tenido la necesidad de recurrir a la identificación de los microorganismos a través de técnicas de biología molecular como la comparación de los ITS. Según Bischoff *et al.* (2006), no es suficiente la caracterización taxonómica de *Metarhizium* a través de la morfología y morfometría de los conidios, pues se han observado formas similares de conidios y fialides en *Metarhizium frigidum* y *M. anisopliae*. Otro método que se ha usado para identificar hongos entomopatógenos, particularmente *M. anisopliae* var *acridum*, son los bioensayos con hospederos específicos, sin embargo, las condiciones del bioensayo, como la temperatura y la humedad, pueden alterar los resultados (citado por Entz *et al* 2005). En un estudio realizado por Driver *et al* (2000), basado en el análisis de rDNA ITS1-5.8S-ITS2, reconoce tres especies de *Metarhizium* y seis variedades distribuidas en 10 clados (unidades de clasificación taxonómica). En el clado 8 se reconoce a *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum*. Sin embargo, Bischoff *et al.* (2009), sugiere que esta cepa sea reconocida como *Metarhizium lepidiotae*, lo que implica un cambio en la especie y no en la variedad como se había sugerido anteriormente. En otro estudio realizado por Entz *et al* (2005), utilizando PCR y cebadores específicos permitieron discriminar otras variedades de la especie *anisopliae* distintas de *acridum*. Esta técnica resultó útil para identificar *M. anisopliae* var *acridum* a partir de insectos infectados y suelo debido a su alta sensibilidad (Entz *et al*, 2005).

## 7.2. Análisis de la composición elemental de los sustratos

Los sustratos empleados en este trabajo fueron analizados en su composición porcentual de los elementos C, H y N. Los resultados se muestran en la **Tabla 2** donde se observa que los sustratos tienen alrededor de 40% de C (fuente principal de C) y que la peptona de carne (fuente de N) tiene el 12 % de nitrógeno.

**Tabla 2.** Composición elemental porcentual de los sustratos empleados en base seca.

Sustrato	Carbono (%)	Hidrógeno (%)	Nitrógeno (%)	Elementos no determinados (%)
Arroz	40.58	7.28	1.56	50.58
Avena	43.24	7.23	2.08	47.45
Peptona	40.09	6.73	12.82	40.36

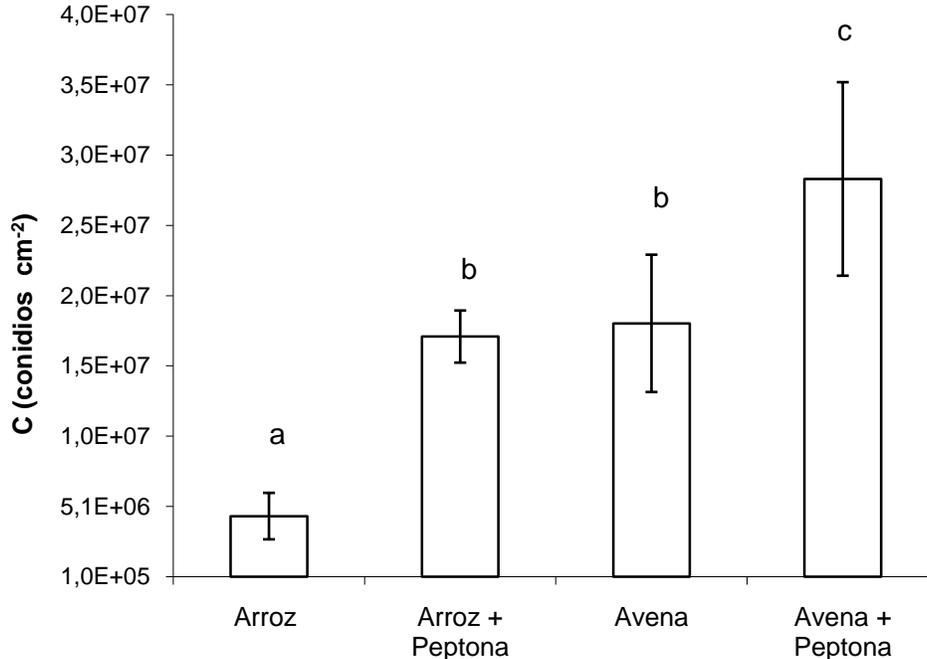
A partir de la composición elemental de los sustratos, se calculó la relación C/N para los cuatro medios estudiados. También se muestra la relación C/N teórica que se obtuvo con base en los datos proporcionados en la ficha técnica de los productos. Los resultados se muestran en la **Tabla 3**. El efecto de las distintas relaciones C/N se discutirán en el apartado siguiente.

**Tabla 3.** Relación C/N de los medios estudiados.

Medio de cultivo	Relación C/N real	Relación C/N teórica
Arroz	26.01	20.46
Avena	20.78	15.71
Arroz-Peptona	9.72	6.85
Avena-Peptona	9.32	5.73

### **7.3. Selección del medio de cultivo**

En la **Figura 12** se muestra la producción de conidios de *M. anisopliae* en función del medio de cultivo. Se observó que el tipo de sustrato es un factor determinante para la producción de conidios después de siete días de incubación, donde la **Avena** fue 3 veces mejor sustrato para la producción de los conidios, comparado con el medio con **Arroz**. También se observó que la adición de peptona, como fuente de N, en cualquiera de los sustratos favoreció la producción de los conidios. El mayor de los incrementos en la producción de conidios debido a la adición de la peptona se observó cuando se usó como sustrato la harina de arroz, observando hasta un 280% más conidios respecto al medio sin peptona, consiguiendo valores similares a los obtenidos con el medio cuya composición fue únicamente avena. La adición de peptona al medio de avena (**Avena-Peptona**) permitió un incremento del 50% con respecto al medio sólo con avena, sin embargo, éste fue el mejor medio para la producción de conidios. En este último medio de cultivo, la relación C/N fue de 9.32, valor similar al obtenido con el medio de **Arroz-Peptona** (9.72), sin embargo, la diferencia entre estos medios de cultivos en cuanto a la producción de conidios fue del 50%.



**Figura 12.** Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* en los medios de arroz o avena con y sin peptona. Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ).

En estudios similares, Prakash *et al.* (2008), evaluaron distintos sustratos como el arroz, cebada y sorgo sobre la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae*, observando que el mejor sustrato fue el arroz. En este mismo estudio observaron que con bajas concentraciones de extracto de levadura (0-0.5%), la producción de conidios fue baja, y que las concentraciones óptimas, de la fuente de nitrógeno, para la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en arroz, cebada y sorgo fue de 1.45, 2.21 y 1.54 %, respectivamente. También se ha informado que una relación C/N de 35 es óptima para la producción de conidios sobre cultivos superficiales de *Metarhizium anisopliae* de los aislados V245 y V275, éste valor es similar al medio ADS (Shah *et al.*, 2005). En contraste, Issaly *et al.* (2005), observaron que con una relación C/N de 1.6 se obtuvieron altos niveles de blastosporas de *Metarhizium anisopliae* var *acridum* Mf189 (antes *M. flavoviride*) en cultivo líquido, cuyas fuentes de carbono y nitrógeno fueron sacarosa y extracto de levadura. También se han observado altos rendimientos de conidios, cuando la relación C/N es alrededor de 10, similares a los obtenidos en nuestro trabajo, no sólo para *Metarhizium*

*anisopliae*, sino también para *Beauveria bassiana* e *Isaria fumosorosa* (= *Paecilomyces fumoso-roseus*) (citado por Shah *et al.*, 2005).

La producción de conidios en distintas especies de hongos entomopatógenos se ve afectado por diversos factores, entre ellos los nutricionales. Aunque no se muestra una respuesta clara con respecto a la relación C/N, algunos autores coinciden que los valores óptimos están alrededor de 10. Con los resultados obtenidos en este trabajo se apoya la idea de que los valores de C/N cercanos a 10 permiten obtener mejores rendimientos. Sin embargo, puede considerarse que el tipo de sustrato es el factor más importante en la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* que puede dar mejores resultados con la adición de peptona al medio de cultivo.

#### **7.4. Efecto de las atmósferas modificadas sobre la producción de los conidios.**

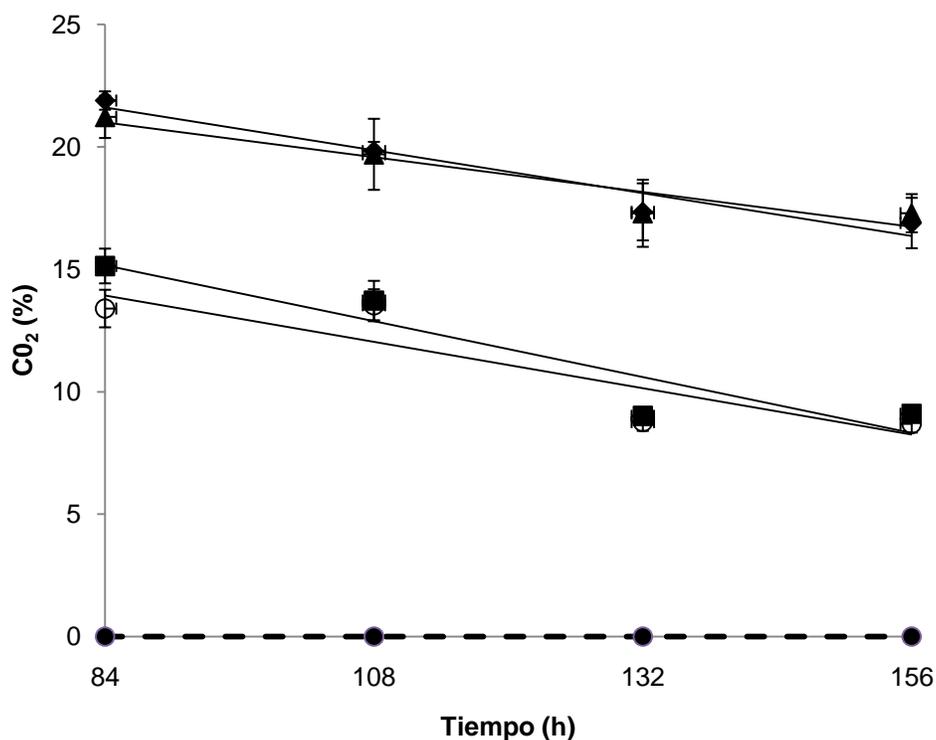
Con la intención de conocer si la concentración de O<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> afectaba la conidiación de *Metarhizium anisopliae*, se creció al hongo durante 60 horas en una atmósfera normal y, posteriormente se modificaron las atmósferas. El criterio usado para elegir el tiempo en el cual se modificarían las atmósferas (60 h), se tomó considerando que, en cinéticas previas a las 60 h, la biomasa alcanzó su máximo y se iniciaba la conidiación.

Durante las primeras horas del cultivo, las unidades experimentales se mantuvieron con una atmósfera normal, con la intención de permitir el intercambio de gases a través de los tapones de algodón. Con esto se buscó que la germinación y el crecimiento exponencial sucedieran en una atmósfera con una concentración de oxígeno alrededor de 21%. En las inmediaciones de la fase preestacionaria, justo cuando iniciaba la conidiación, se recambiaron las atmósferas con la idea de inducir la conidiación por cambios en la composición de las atmósferas. Los recambios en la composición de las atmósferas se realizaron cada 24 horas. Las muestras se colectaron antes del cambio de las atmósferas para ser analizadas a través de cromatografía. Al respecto, se evaluó la acumulación de CO<sub>2</sub> en las unidades experimentales durante 24 h, la evolución de la biomasa y la producción de conidios.

#### 7.4.1. Cuantificación de CO<sub>2</sub> acumulado en las unidades experimentales

La cuantificación del CO<sub>2</sub> en las unidades experimentales se realizó a través de cromatografía de gases con un detector de conductividad térmica (TCD). Los resultados se muestran en la **Figura 13**. En este experimento se utilizó un control que consistió en un tratamiento similar al de la atmósfera normal, con la diferencia de que éste fue tapado con septos de goma y los recambios atmosféricos se realizaron cada 24 h con aire comprimido estéril. Esto con la intención de medir la acumulación de CO<sub>2</sub> en el control y compararlo con el tratamiento normal, además de verificar que no hubiera fugas de gases en las unidades experimentales tapadas con septos de goma.

Los resultados mostraron que en el tratamiento con atmósfera normal, no hubo acumulación de CO<sub>2</sub> durante la cinética evaluada, lo que implica que los tapones de algodón permitieron la difusión del CO<sub>2</sub> generado. Las unidades experimentales control, acumularon hasta un 15% de CO<sub>2</sub> respecto a la atmósfera normal, lo que sugiere que no hubo difusión de los gases en las unidades experimentales tapadas con septos de goma, es decir se mantuvieron sellados herméticamente. En los tratamientos cuyas atmósferas contenían 5% de CO<sub>2</sub> inicial (16/5% y 21/5%), se observó que se acumuló un máximo de CO<sub>2</sub> alrededor de 21% a las 84 horas. Se observó, en todos los tratamientos analizados, una pendiente (***m***) con tendencia negativa y que no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre éstos por efecto de las concentraciones de las atmósferas modificadas. La diferencia significativa que existe entre los tratamientos fue el valor en el eje de intersección con la ordenada (***b***, de la ecuación general de la recta,  $y = mx + b$ ). Esta diferencia sucedió únicamente entre los tratamientos que inicialmente contenían 5% de CO<sub>2</sub> comparada con aquellos que no contenían CO<sub>2</sub> desde el principio.



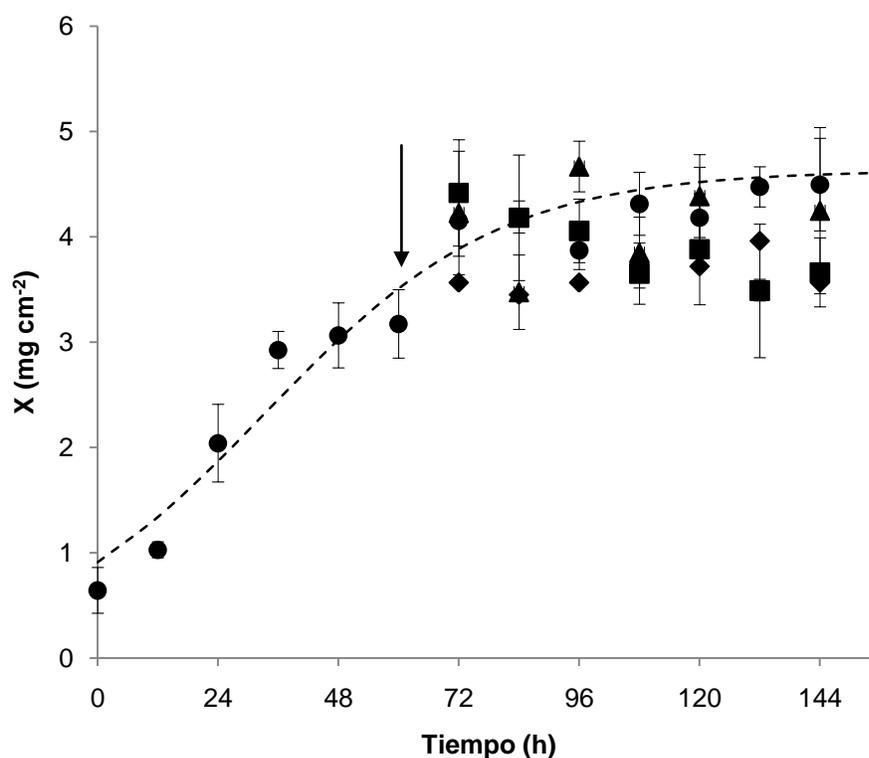
**Figura 13.** Acumulación de CO<sub>2</sub> cada 24 h, durante la conidiación de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. ( ▲ ) 16/5, ( ◆ ) 21/5, ( ● ) 21/0, ( ■ ) 26/0, Control ( ○ ).

En un estudio con *Metarhizium anisopliae* se analizó la respiración del hongo cuando creció en diferentes sustratos (Braga *et al.*, 1999). Estos autores describen que el consumo de oxígeno sucede pocas horas después de la germinación.

#### 7.4.2. Producción de Biomasa

La curva de crecimiento de *Metarhizium anisopliae* se muestra en la **Figura 14**. Se observó que para la atmósfera normal, la fase preestacionaria se presentó a las 60 h de cultivo, y fue en ese punto cuando se modificaron las atmósferas. Los ajustes de la ecuación logística (2) se analizaron únicamente para la atmósfera normal, puesto que el resto de los tratamientos se modificaron a partir de la fase pre-estacionaria de crecimiento. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) para la atmósfera normal fue de  $0.04 \text{ h}^{-1} \pm 0.00$ . Como se mencionó anteriormente, Braga *et al.* (1999) observaron que el consumo exponencial de la fuente de carbono (monosacáridos, polisacáridos, aminoácidos y proteínas) y de oxígeno sucede

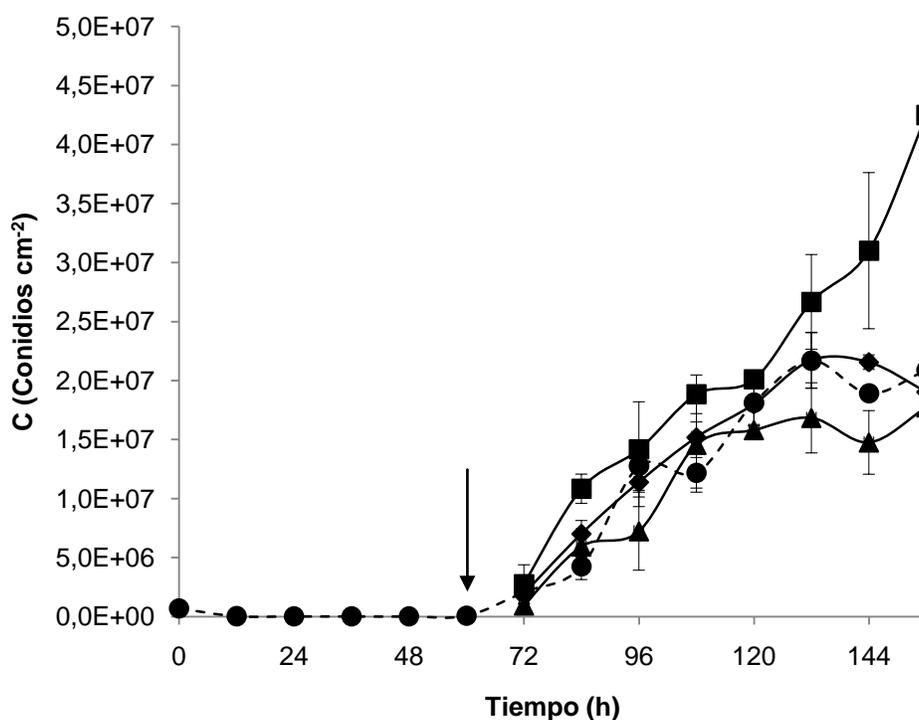
durante la germinación y en la fase exponencial de crecimiento de *Metarhizium anisopliae*. En los resultados observados en el presente trabajo, sugieren que la composición de oxígeno en la atmósfera no es una limitante para el crecimiento de hongo, puesto que en tres de los cuatro tratamientos analizados (16/5, 21/5, y 26/0) la biomasa máxima es la misma y está aparece en los mismo tiempos de cultivos. Es probable que la fase estacionaria de crecimiento suceda debido a que los nutrientes son escasos en el medio de cultivo o a la presencia de metabolitos que limiten el crecimiento del hongo. También cabe la posibilidad de que la difusión del oxígeno en el cultivo se vea limitado por la densidad micelial y no permita el crecimiento de *Metarhizium anisopliae*.



**Figura 14.** Evolución de la biomasa de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* crecido en distintas atmósferas en el medio Avena-Peptona. La curva punteada indica el ajuste con la ecuación logística. (▲) 16/5, (◆) 21/5, (●) normal, (■) 26/0. La flecha indica el momento en el que se modificaron las atmósferas.

### 7.4.3. Producción de conidios

La producción de los conidios se muestra en la **Figura 15**. Se observó que la atmósfera con 26% de oxígeno afectó a la producción de los conidios, logrando una producción máxima a las 156 h de cultivo ( $4.25 \times 10^7$  conidios  $\text{cm}^{-2}$ ), superando más de 100% comparado con la producción en atmósfera normal y el resto de tratamientos. Este valor es 10 veces más grande comparado con el medio de arroz sin peptona (**Figura 12**). Lo que sugiere que los estados oxidantes provocan que la conidiación sea mayor en *Metarhizium anisopliae* como se ha observado en otros estudios y otros organismos. En un estudio, se observó que con un incremento en el oxígeno disuelto en un cultivo sumergido, la producción de blastosporas de *Metarhizium flavoviride* se incrementó casi 21 veces (Issaly *et al.*, 2005). Sin embargo, también se ha observado que la aireación forzada no favoreció la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Arzumanov *et al.*, 2005), lo que permite suponer que el aire, cuya composición de oxígeno es alrededor de 21% (atmósfera normal), no es un factor determinante en la sobreproducción de conidios. Sin embargo, en nuestro estudio se encontró que concentraciones altas de oxígeno (26%) favorecieron la producción de los conidios en *Metarhizium anisopliae* probablemente como respuesta a una atmósfera oxidante. Al respecto, se observó que el peróxido de hidrógeno (90 mM) aumentó hasta tres veces más la conidiación del hongo nematófago *Pochonia chlamydosporia* (Xu *et al.*, 2009). También se ha observado que ciertos factores ambientales, inducen la generación especies reactivas de oxígeno, y que en micelio de *Neurospora crassa* inducen la citodiferenciación (Belozerskaya y Gessler, 2006).



**Figura 15.** Cinética de la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* en distintas atmósferas en el medio Avena-Peptona. (▲) 16/5, (◆) 21/5, (●) normal, (■) 26/0. La flecha indica cuando se modificaron las atmósferas.

El glutatión es uno de los tioles no proteínicos que juegan un papel importante en la fisiología celular. El peróxido de hidrógeno que se genera de manera endógena se reduce por el glutatión en presencia de la enzima glutatión peroxidasa. En *Neurospora crassa* se ha reportado que la oxidación del glutatión y NADPH ocurre justo al inicio de la conidiación (Toledo *et al.*, 1995). Aunado a esto, existen reportes de que enzimas como las catalasas se expresan de manera diferencial al inicio de la conidiación (Michán *et al.*, 2002). Los resultados del presente estudio apoyan la hipótesis propuesta por Hansberg y Aguirre, (1990) en el sentido de que los estados hiperoxidantes promueven la diferenciación celular no sólo en *Neurospora crassa*, sino también, puede ocurrir la conidiación en *Metarhizium anisopliae*. También se ha asociado al gen *cag8* que codifica para la proteína reguladora señal G con la conidiación de *Metarhizium anisopliae* ARSEF 2575 (Fang y Bidoschka, 2006), observando una alta expresión del gen durante la conidiación sobre cadáveres de *Galleria mellonella*. Por lo que es probable que los estados oxidantes como la atmósfera 26/0

provocaran una alta expresión de gen *cag8* lo que se manifestaría en una alta producción de conidios.

#### 7.4.4. Rendimiento de los conidios respecto a la biomasa y productividad

En la **Tabla 4** se muestran los parámetros de crecimiento de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*, la producción de conidios a las 156 h de cultivo, así como la productividad y rendimiento de los conidios referidos a biomasa.

**Tabla 4.** Parámetros de crecimiento y producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* a las 156 h de cultivo en el medio Avena-Peptona.

Tratamiento Proporción O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (%)	<b>X</b> (mg cm <sup>-2</sup> )	<b>C</b> (X10 <sup>7</sup> conidios cm <sup>-2</sup> )	<b>Y<sub>CX</sub></b> (X10 <sup>7</sup> conidios mg <sup>-1</sup> X)	<b>P</b> (X10 <sup>4</sup> conidios cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )
21/0 (normal)	4.78 <sup>b</sup> (± 0.25)	2.08 <sup>a</sup> (± 0.21)	0.48 <sup>a</sup> (± 0.05)	3.67 <sup>a</sup> (± 0.38)
16/5	3.74 <sup>a</sup> (± 0.30)	1.77 <sup>a</sup> (± 0.85)	0.48 <sup>a</sup> (± 0.06)	3.65 <sup>a</sup> (± 0.46)
21/5	3.56 <sup>a</sup> (± 0.34)	1.90 <sup>a</sup> (± 0.22)	0.60 <sup>a</sup> (± 0.05)	4.19 <sup>a</sup> (± 0.57)
26/0	3.78 <sup>a</sup> (± 0.11)	4.25 <sup>b</sup> (± 0.07)	1.12 <sup>b</sup> (± 0.01)	7.19 <sup>b</sup> (± 0.86)

Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas (p>0.05)

**X**= Biomasa seca

**C**= Producción de conidios

**Y<sub>CX</sub>**= Rendimiento de los conidios respecto a la biomasa (ver materiales y métodos apartado 6.5.5)

**P**= Productividad

La biomasa máxima se obtuvo en la atmósfera normal, mientras que la producción de conidios fue mayor en la atmósfera enriquecida con oxígeno. El rendimiento de los conidios respecto a la biomasa (**Y<sub>CX</sub>**) fue 2.6 veces mayor (1.12X10<sup>7</sup> conidios mg<sup>-1</sup> de biomasa seca) en la atmósfera con 26% de O<sub>2</sub>, en comparación a la atmósfera con 21% de O<sub>2</sub> (0.48X10<sup>7</sup> conidios mg<sup>-1</sup> de biomasa seca). El **Y<sub>CX</sub>** fue estadísticamente distinto (p<0.05) en el tratamiento 26/0 respecto al resto de los tratamientos con las atmósferas modificadas. De la misma manera, la productividad de los conidios (**P**) fue dos veces mayor en la atmósfera rica en oxígeno respecto al resto de los tratamientos. En un estudio realizado por Kamp y Bidochka, (2002) se produjeron los conidios de *Metarhizium anisopliae* sobre PDA de los

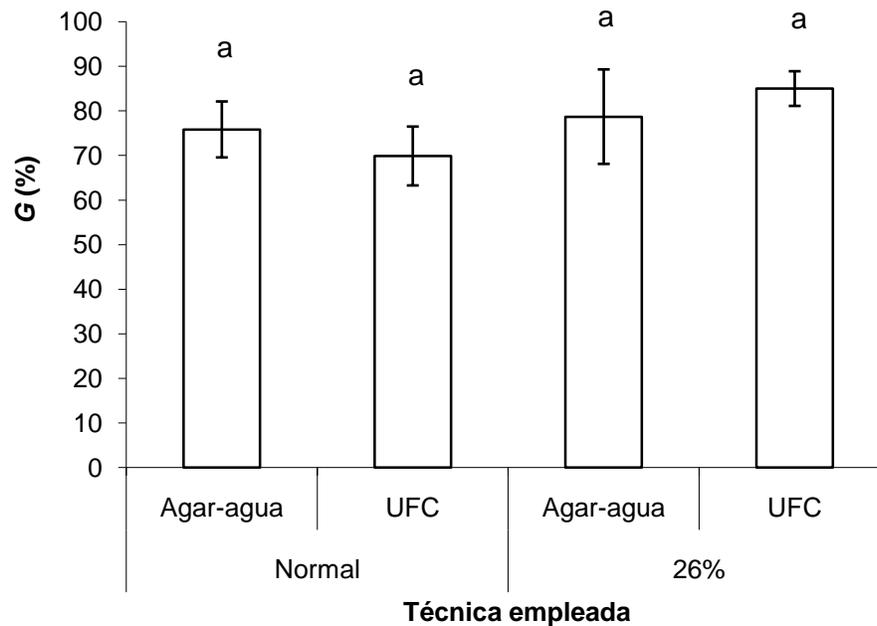
aislados 2575, 54 A-1b, MAA1-2iii y HAA2-2b, la productividad para cada aislado fue de:  $4.57 \times 10^5$ ,  $1.62 \times 10^5$ ,  $1.01 \times 10^5$  y  $0.68 \times 10^5$  (conidios  $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ), respectivamente. En nuestros resultados se obtuvieron valores comparables en el medio de avena con peptona siendo  $1.33 \times 10^5$  y  $2.72 \times 10^5$  (conidios  $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) en la atmósfera con 21% y 26% de  $\text{O}_2$ , respectivamente.

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

### **7.5.1. Porcentaje de germinación**

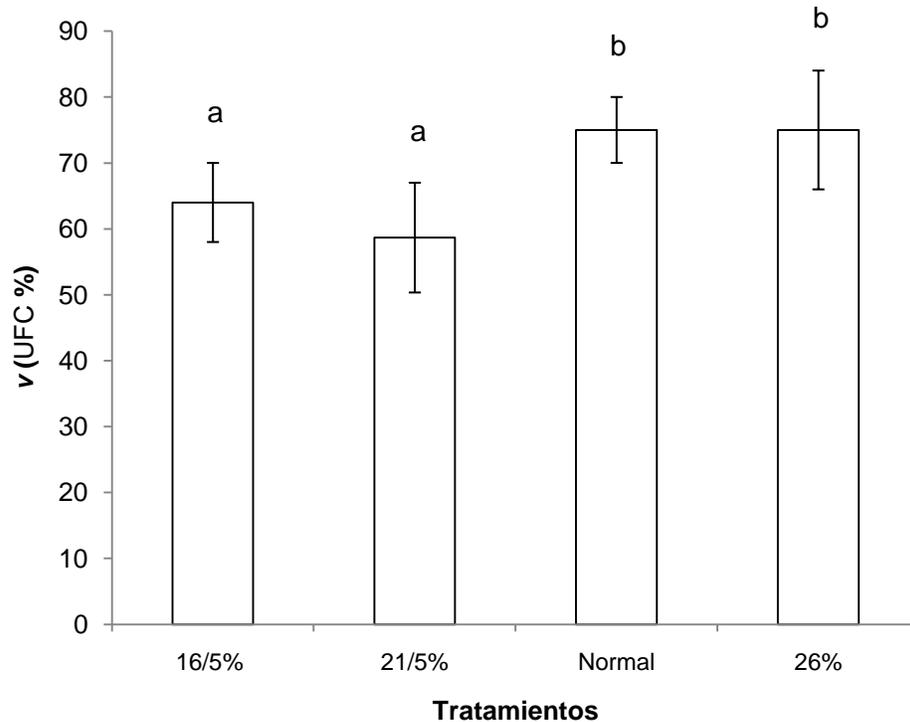
El porcentaje de germinación (**G**) de los conidios se analizó para los tratamientos con atmósfera normal y 26%  $\text{O}_2$  mediante dos técnicas: la cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y el conteo de conidios germinados sobre portaobjetos con agar-agua (**Figura 16**). Se analizaron únicamente estos dos tratamientos con la finalidad de establecer la técnica que se usaría para el resto de los tratamientos.

No se observó diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos en ninguna de las técnicas empleadas para cuantificar la germinación. Sin embargo, el conteo de conidios germinados en agar-agua sobre el portaobjetos presentó dificultad para realizar el conteo cuando el tubo germinativo era muy grande, puesto que se entrecruzan entre ellos, sobre todo cuando se evalúa después de 18 horas. Además, es probable que a las 18 horas no todos los conidios estén germinados aún cuando éstos estén viables. En las UFC's se evalúa la viabilidad de los conidios después de siete días pero presenta el inconveniente de que una colonia pueda estar formada por más de un conidio. A pesar de esa posible desventaja, se consideró esta técnica para evaluar el resto de tratamientos porque además de permitir evaluar la germinación también evalúa la viabilidad.



**Figura 16.** Comparación del porcentaje de germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* usando la técnica de agar-agua y UFC para los tratamientos normal y 26/0. Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ).

En la **Figura 17** se muestran los resultados de la viabilidad ( $v$ ) de los conidios producidos en todos los tratamientos de atmósferas modificadas. En la que se observa que los tratamientos con aire y 26% de  $O_2$  no mostraron diferencias significativas entre sí. En los tratamientos cuyas atmósferas tenían en su composición inicial 5% de  $CO_2$ , la viabilidad de los conidios se vio disminuida respecto a los tratamientos normal y 26%. Al respecto, se ha observado que los altos niveles de  $CO_2$  (40%) afectan a la germinación de *Beauveria bassiana* cuando crece sobre la superficie de ADS durante las primeras 48 horas del cultivo, posterior a ese tiempo el comportamiento es similar a los conidios incubados en atmósferas normales (Lord, 2009).



**Figura 17.** Viabilidad (v) de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* producidos en distintas atmósferas. Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ).

Algunos autores consideran que los factores nutricionales durante el crecimiento de *Metarhizium anisopliae* afectan la germinación de los conidios (Shah, *et al.*, 2005; Rangel *et al.*, 2006). Ibrahim *et al.* (2002) reportan que los medios ricos en nutrientes, tales como ADS y agar extracto de levadura permitieron una mayor germinación de los conidios de *M. anisopliae* en relación a un medio mínimo, además, mostraron que los conidios obtenidos a partir de sustratos limitados en nitrógeno, germinaron 1.8 veces más rápido que los conidios obtenidos en un medio de agar dextrosa Sabouraud con maltosa. Sin embargo, en este mismo estudio, los conidios procedentes de los medios pobres tuvieron mayor potencial de germinación cuando fueron puestos sobre cutícula de *Myzus persicae* Sulzer (Homoptera: Aphididae) y de *Meligethes aeneus* Fabricius (Coleoptera; Nitidulidae), comparados con los que se obtuvieron de los medios ricos en nutrientes.

Se ha observado para aislamientos de *M. anisopliae* (V275 y V245) que con una relación C/N de 35, la producción de los conidios fue alta, sin embargo, el porcentaje de germinación

fue bajo, alrededor del 44 y 47 %, respectivamente (Shah, *et al.*, 2005). Por su parte, Rangel *et al.*, (2006) encontraron que fuentes preferenciales de carbono, como glucosa, permiten producir niveles altos de conidios, no obstante, éstos presentaron bajo porcentaje de germinación después de ser expuestos a radiación UV-B, comparado con los conidios obtenidos en fuentes de carbono no preferenciales (fructosa, galactosa y lactosa) con rendimientos menores de conidios. Estos argumentos muestran que la producción masiva de conidios puede deteriorar la calidad de las unidades infectivas. Por su parte, Braga *et al.* (1999), encontraron que la fuente de carbono que favoreció la germinación de *Metarhizium anisopliae* CLII fue la caseína, en comparación con glucosa, quitina, hidrolizado de caseína y *N*-acetilglucosamina.

Otro factor importante que afecta la germinación, es la presión osmótica del medio en que crece el microorganismo. Wang *et al.* (2008), analizaron el gen *Mos1* que codifica para una proteína osmosensora MOS1, observando que el porcentaje de germinación fue hasta dos veces mayor en una cepa silvestres comparada con la mutante Anti-Mos1, cuando crecieron en un medio líquido Dextrosa-Sabouraud adicionado con 0.7 M de KCl, para afectar la presión osmótica.

En aislados de *Metarhizium anisopliae* se ha observado que la germinación se ve afectada dependiendo del insecto del cual se aíslan. Por ejemplo, los aislados provenientes de coleópteros presentaron mayor resistencia a la germinación en 6 desoxiglucosa, y poca germinación en glucosa, comparado con los aislados obtenidos a partir de himenópteros y lepidópteros (citado por Hegedus y Khachatourians, 1995). También se ha observado que el incremento en la respiración es uno de los cambios fisiológicos que ocurren durante la germinación (Braga *et al.*, 1999).

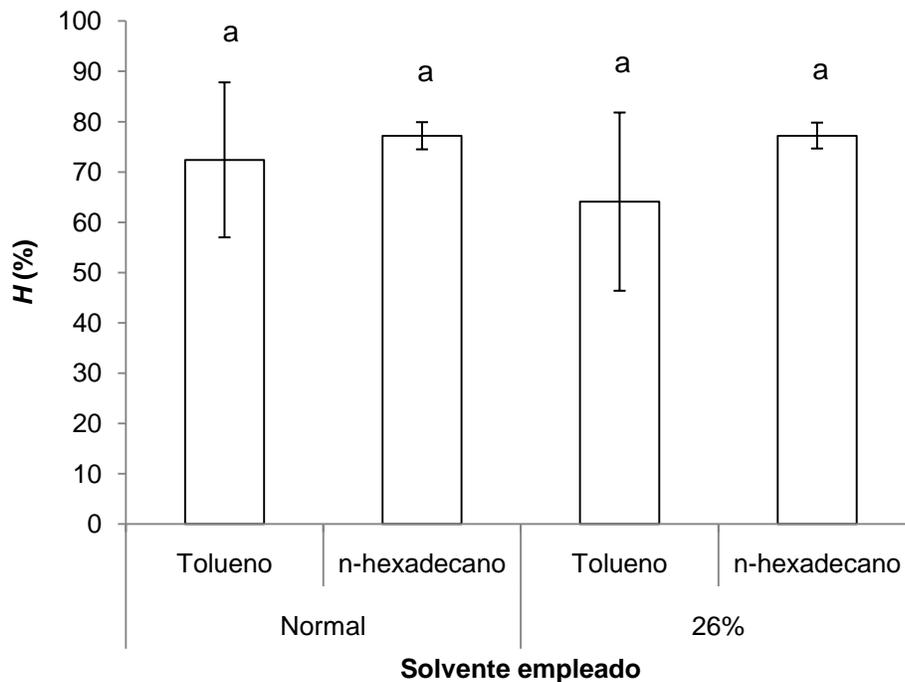
En este trabajo se logró incrementar la producción de conidios, por efecto de la composición de la atmósfera gaseosa, sin afectar el porcentaje de germinación, respecto a la atmósfera normal. Este aspecto es importante puesto que, algunos autores, consideran que la rapidez de la germinación está directamente asociada a la virulencia (Braga *et al.*, 1999). Sin embargo, el porcentaje de germinación no es garantía de que el microorganismo logre la infección, si consideramos que pueden darse las condiciones necesarias para que el conidio germine, pero no las condiciones para que el microorganismo sobreviva, lo que se confirma

con pruebas de viabilidad a través de Unidades Formadoras de Colonias. Por lo anterior, en este trabajo se propuso una técnica alternativa para evaluar la viabilidad y el porcentaje de germinación, a través de la cuantificación de UFC en placas con PDA y desoxicolato de sodio que, en principio, no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre las técnicas comparadas (**Figura 16**).

### **7.5.2. Hidrofobicidad de la superficie de los conidios**

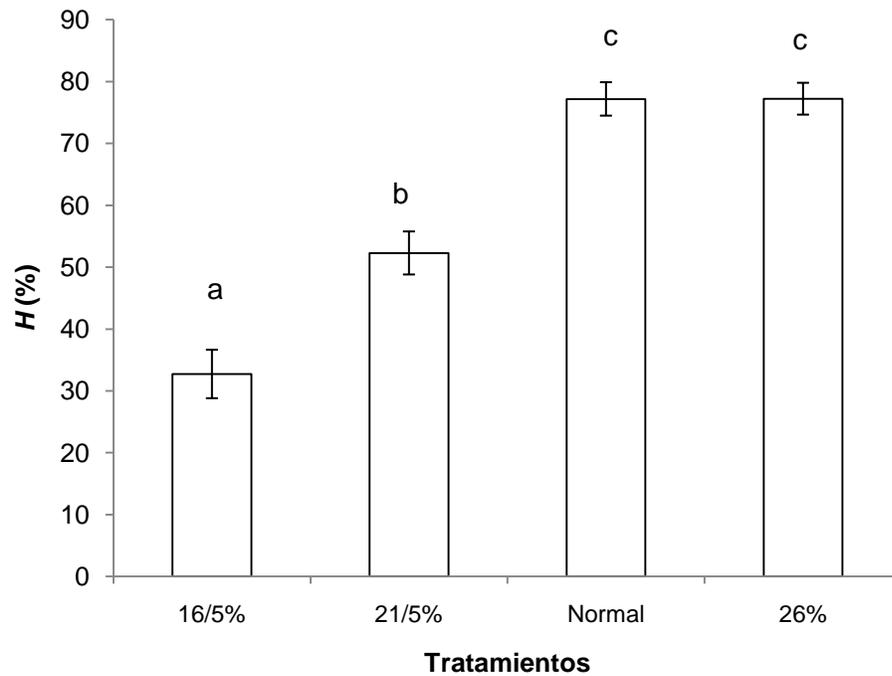
La hidrofobicidad de la superficie de los conidios se evaluó usando el principio de exclusión de fases con dos solventes orgánicos distintos: el tolueno y el *n*-hexadecano. En principio, sólo se evaluaron los tratamientos 21/0 y 26/0 para establecer la técnica que se usaría en el resto de los tratamientos. En la **Figura 18** se muestran los resultados de la hidrofobicidad de los conidios producidos en los tratamientos atmósfera normal y con 26% de oxígeno.

No se observó diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos aún, cuando se analizó la misma variable con distintos solventes. Sin embargo, la desviación estándar que se observó cuando se usó el tolueno fue mayor, respecto al *n*-hexadecano. Por esta razón, se decidió evaluar la hidrofobicidad del resto de los tratamientos con *n*-hexadecano con la posibilidad de observar diferencias entre tratamientos.



**Figura 18.** Comparación de valores de hidrofobicidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* usando el principio de exclusión de fases con tolueno y *n*-hexadecano para los tratamientos normal y 26/0. Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ).

En la **Figura 19** se muestran los resultados de hidrofobicidad de la superficie de los conidios que fueron producidos en distintas atmósferas. Se observó que los conidios que crecieron en la atmósfera normal y enriquecida con oxígeno (26%), presentaron una hidrofobicidad de alrededor del 77% y no fueron significativamente distintos ( $p > 0.05$ ).



**Figura 19.** Hidrofobicidad ( $H$ ) de la superficie de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* producidos en distintas atmósferas. Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

Mientras que en los tratamientos que contenía 5% de bióxido de carbono (16/5 y 21/5), la hidrofobicidad de los conidios fue hasta 40% menor que el control (atmósfera normal). Estos resultados sugieren que en *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*, los niveles altos de oxígeno (5% por encima de la atmósfera normal) no alteran la hidrofobicidad de los conidios, sin embargo, la presencia de  $CO_2$  disminuye la hidrofobicidad, este efecto se observó con mayor énfasis para la atmósfera con 16% de  $O_2$  5% de  $O_2$  (Tratamiento 16/5%). En la **Tabla 5** se muestra un resumen de los parámetros de calidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* producidos en distintas atmósferas, previamente descritos en los apartados 7.5. 1 y 7.5.2.

**Tabla 5.** Resumen de los valores de los parámetros de calidad de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* producidos en distintas atmósferas

Tratamiento Proporción O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (%)	<b>V</b> (%)	<b>H</b> (%)
21/0 (normal)	75.00 <sup>b</sup> (± 5.00)	77.18 <sup>c</sup> (± 2.70 )
16/5	64.00 <sup>a</sup> (± 6.00)	32.72 <sup>a</sup> (± 3.91)
21/5	58.66 <sup>a</sup> (± 8.32)	52.28 <sup>b</sup> (± 3.47)
26/0	75.00 <sup>b</sup> (± 9.01)	77.21 <sup>c</sup> (± 2.57)

Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre sí (p>0.05)

**v**= Viabilidad

**H**= Hidrofobicidad

En trabajos similares con *Metarhizium anisopliae*, se han reportado valores de hidrofobicidad que van desde 77.9 hasta 93.9 % (para los aislados V275 y V245), esta variabilidad de la hidrofobicidad, se atribuye a los subcultivos en medios artificiales (Shah, *et al.*, 2005), al respecto, es probable que los medios de cultivos afecten la expresión de proteínas implicadas en la hidrofobicidad llamadas hidrofobinas, puesto que los hongos entomopatógeno no requieren a las hidrofobinas cuando crecen en medios de cultivos artificiales (represión de genes implicados, como el *ssga*), a diferencia de cuando infectan a los insectos. Otro factor que afecta la hidrofobicidad de la superficie de los conidios es el tipo de medio de cultivo donde se producen. Pascual *et al.*, (2000) encontraron en *Penicillium oxalicum* que la mayor hidrofobicidad se observó cuando los conidios se obtuvieron en cultivos superficial, comparados con los obtenidos en cultivo sumergido. También se ha observado que el medio de cultivo afecta la capacidad de adhesión de los conidios de *Metarhizium anisopliae* a sus hospederos, porque modifica los carbohidratos de su superficie (Ibrahim *et al.*, 2002). Esta podría ser la causa de que los hongos entomopatógenos subcultivados sobre medios artificiales presenten variabilidad en la hidrofobicidad de sus conidios. Los carbohidratos que se han asociado a la hidrofobicidad son las lecitinas.

Jefferis *et al.* (1999), observaron que la hidrofobicidad está directamente relacionada con la forma de los conidios. En esta investigación observaron los conidios, a través de un microscopio electrónico, de los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Isaria* y *Lecanicillium*, registrando una mayor hidrofobicidad cuando las superficies de los conidios fueron rugosas, mientras que los conidios hidrofílicos tienen superficies lisas. Al respecto, un fenómeno

interesante se observó con *Trichoderma virens*, en el que Mendoza-Mendoza *et al.*, (2007) asocian al gen *tvk1*, que codifica la proteína quinasa activada por mitógeno (MAP, por sus siglas en inglés, Mitogen-Activated Protein), con la hidrofobicidad de los conidios aéreos, mientras que la mutante  $\Delta tvk1$  disminuyó drásticamente la hidrofobicidad, además, los conidios de la cepa silvestre mostraron rugosidad. De manera sorprendente, los conidios de la cepa mutante obtenidos por cultivo sumergido mostraron mayor hidrofobicidad y una superficie lisa. Los autores también observaron la expresión del gen *Tv-hfb1*, que codifica una hidrofobina, en la cepa mutante durante el cultivo sumergido, este gen fue el responsable de conferir mayor hidrofobicidad aún cuando la superficie de los conidios fue lisa (Mendoza-Mendoza *et al.*, 2007).

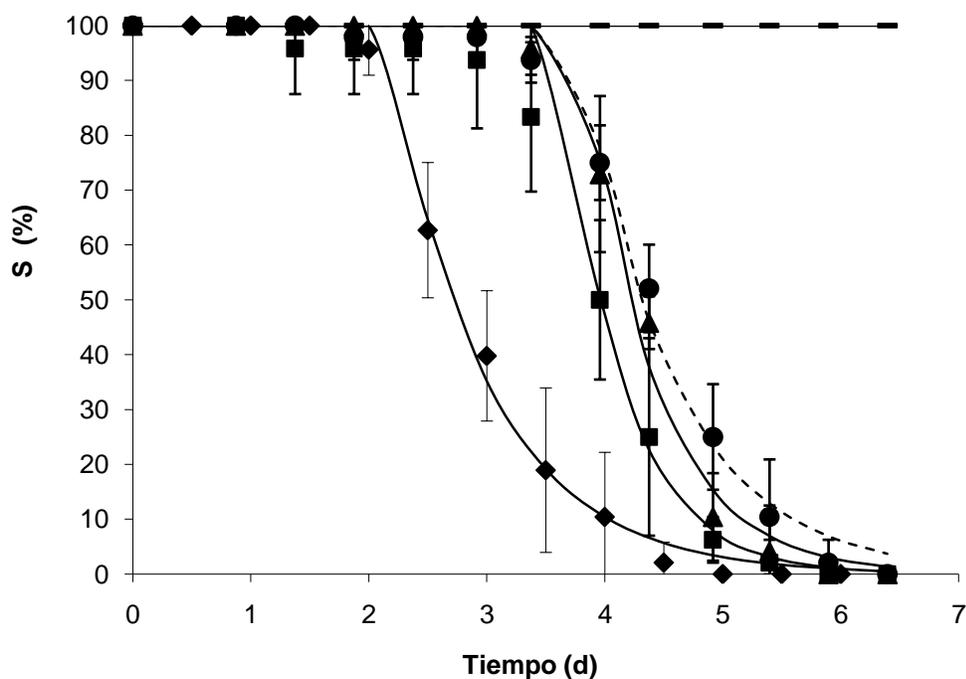
Se ha observado que los genes que codifican para las hidrofobinas, entre ellos *ssga*, de *Metarhizium anisopliae* se inducen en condiciones de inanición, y que probablemente estos genes se reprimen cuando el hongo crece sucesivamente (subcultivados) en medios ricos en nutrientes (Shah *et al* 2007). Fang y Bidochka, (2006) estudiaron la expresión del gen *ssga* de *Metarhizium anisopliae* ARSEF 2575, observando que la expresión de este gen es más alta durante la conidiogénesis, mientras que durante el crecimiento vegetativo es baja. De manera similar observaron que el gen que codifica la proteasa subtilisina Pr1 (*pr1*) también se incrementó, lo que sugiere que estos genes de manera coordinada participan en la patogenicidad.

## **7.6. Bioensayo**

### **7.6.1. Bioensayo: infección de adultos de *Tenebrio molitor* con *Metarhizium anisopliae***

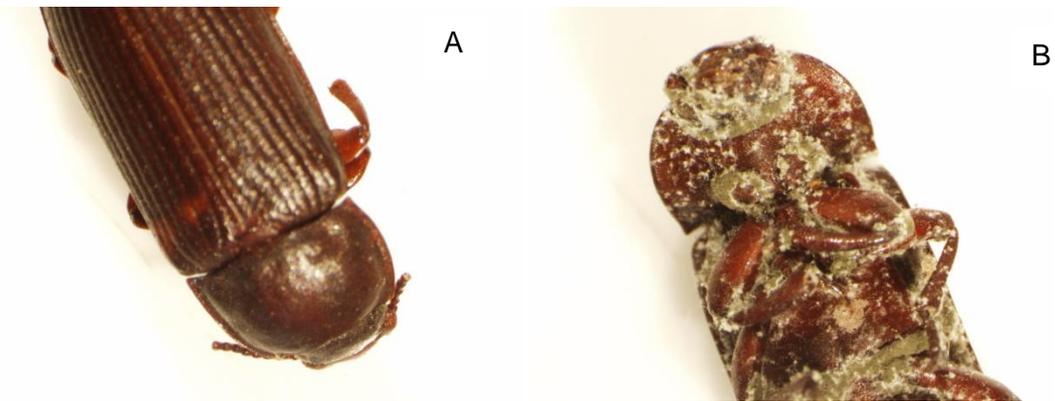
Los resultados de los bioensayos infectando adultos de *Tenebrio molitor* se muestran en la **Figura 20**. El porcentaje de sobrevivencia final ( $S_f$ ), después de seis días en todos los tratamientos fue de cero. Se observó que el tiempo de retardo de muerte, es decir, el tiempo en el que comienza a morir la población de insectos, ( $t_0$ ) para los tratamientos 16/5 %, normal y 26% no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), sin embargo, el tratamiento 21/5 mostró un  $t_0$  más corto (2.14 d), hasta en un 40% respecto al resto de los tratamientos. La tasa específica de mortalidad ( $k$ ) no mostró diferencia significativa entre tratamientos, con valores entre 1.21 y 2.2  $d^{-1}$ . El tiempo letal 50 ( $TL_{50}$ ) fue estadísticamente distinto en el

tratamiento 21/5% respecto al resto de los tratamientos (2.71 d), lo que representa una disminución del 30%.



**Figura 20.** Efecto de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* producidos en diversas atmósferas sobre adultos de *Tenebrio molitor*. (▲) 16/5, (◆) 21/5, (●) 21/0, (■) 26/0, Control (—). El control consistió en adultos sumergidos en una solución estéril de Tween 80 al 0.01%.

En la **Figura 21 A-B** se muestra al insecto, tomado del bioensayo, antes y después de la infección. Se observó (**B**) que el insecto está invadido de micelio y conidios, con esto se confirma la muerte del insecto provocada por *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*.



**Figura 21.** Adultos de *Tenebrio molitor* antes (A) y después (B) de la infección de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. Fotos tomadas de los bioensayos.

En la **Tabla 6** se muestra un resumen de los parámetros involucrados en el bioensayo de insectos adultos, los datos experimentales se ajustaron al modelo matemático (descrito en materiales y métodos como la ecuación 4), que se ajustó, mostrando un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de 0.99 en todos los tratamientos.

**Tabla 6.** Parámetros de calidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. Bioensayo sobre adultos de *Tenebrio molitor*.

Tratamiento Proporción O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (%)	$t_0$ (d)	$k$ (d <sup>-1</sup> )	$S_f$ (%)	$TL_{50}$ (Días post -inoculación)
21/0 (normal)	3.56 <sup>a</sup> (± 0.45)	1.26 <sup>a</sup> (± 0.22)	0	4.31 <sup>a</sup> (± 0.11)
16/5	3.77 <sup>a</sup> (± 0.11)	1.68 <sup>a</sup> (± 0.30)	0	4.19 <sup>a</sup> (± 0.07)
21/5	2.14 <sup>b</sup> (± 0.84)	1.21 <sup>a</sup> (± 0.53)	0	2.71 <sup>b</sup> (± 0.77)
26/0	3.75 <sup>a</sup> (± 0.07)	2.20 <sup>a</sup> (± 0.76)	0	3.90 <sup>a</sup> (± 0.35)

Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre sí (p>0.05)

$t_0$ = Tiempo de retardo de muerte

$k$ = Tasa específica de muerte

$S_f$ = Supervivencia final

$TL_{50}$ = Tiempo en alcanzar el 50% de muerte

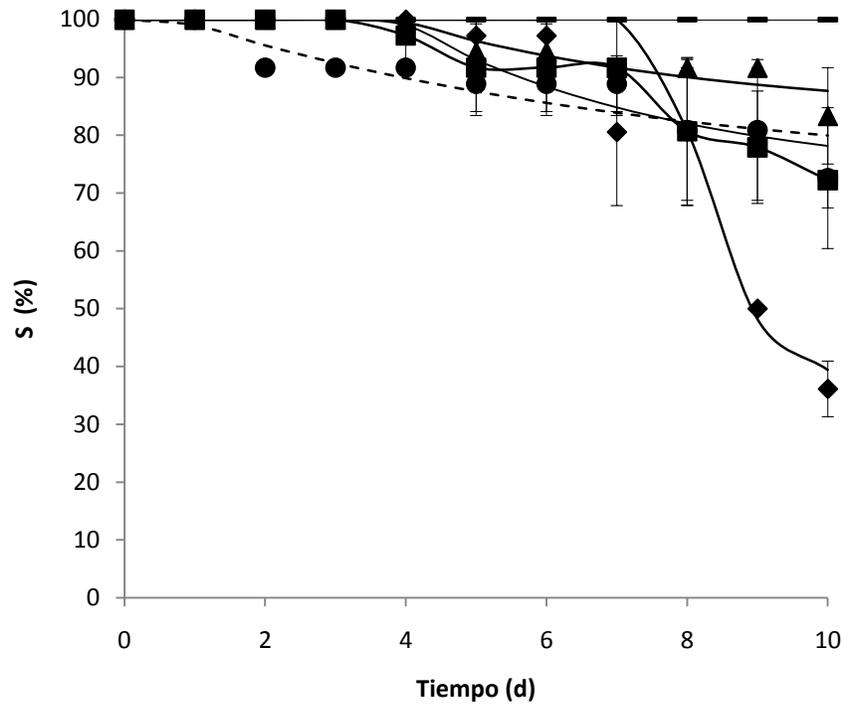
Las variables que mostraron diferencia entre los tratamientos,  $t_0$  y  $TL_{50}$ , sugieren que la probable causa de la muerte de los insectos está relacionada con la rápida adaptación de *Metarhizium* al hospedero. Aún cuando la hidrofobicidad y el porcentaje de germinación fueron menores en la atmósfera 21/5 respecto a las atmósfera normal, la mortalidad fue mayor en los conidios obtenidos de este tratamiento. Es probable que la adhesión del conidio a la cutícula del insecto sea mayor debido a la producción de mucilago por efecto de este tratamiento, lo cual no pudo ser evaluado a través de la hidrofobicidad. De esta manera se provocaría que el tiempo de retardo de muerte ( $t_0$ ) fuera corto y en consecuencia el  $TL_{50}$  también fuera menor.

En un estudio realizado por Lord (2009), observó que altos niveles de CO<sub>2</sub> (40%) durante el bioensayo, afectaron de manera importante la mortalidad de adultos de *Tribolium castaneum* durante los primeros tres días de la infección con *Beauveria bassiana*. Considerando los hallazgos de Lord (2009) y los resultados del presente trabajo, se sugiere que los conidios provenientes de cultivos con atmósferas ricas en CO<sub>2</sub> (21/5) sufren alteraciones que modifican específicamente la invasión de los insectos en etapas tempranas de la infección ya que, una vez invadidos, los insectos mueren a la misma velocidad y se alcanza el 100% de mortalidad con el resto de los tratamientos.

#### **7.6.2. Bioensayo: infección de larvas de *Tenebrio molitor* con *Metarhizium anisopliae***

En la **Figura 22** se muestran los resultados de los bioensayos infectando larvas de *Tenebrio molitor*. Se observó que en ninguno de los tratamientos se logró una sobrevivencia final menor al 36 %, aún después de diez días de infección.

En la **Tabla 7** se muestra un resumen de los parámetros de los bioensayos con larvas de *Tenebrio molitor*. Las variables que mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) fueron  $k$  y  $S_r$  y  $TL_{50}$  para los conidios producidos en una atmósfera 21/5 respecto al resto de los tratamientos. Se observó que el modelo matemático que describe la mortalidad acumulada respecto al tiempo de infección (Ecuación 4, ver materiales y métodos), se ajustó de manera distinta comparada con el ajuste con adultos. El coeficiente de correlación entre los tratamientos se encuentra entre 0.84 hasta 0.97.



**Figura 22.** Efecto de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* producidos en diversas atmósferas sobre larvas de *Tenebrio molitor*. ( ▲ ) 16/5, ( ◆ ) 21/5, ( ● ) 21/0, ( ■ ) 26/0, Control ( — ). El control consistió en sumergir a las larvas en una solución estéril de Tween 80 al 0.01%

En estudios similares al nuestro, se observó que el  $TL_{50}$  varía de 3.74 a 4.56 d. sobre larvas de *Tenebrio molitor* infectadas con *Metarhizium anisopliae* (Shah *et al.*, 2007). También se ha observado que larvas de *Capnodis tenebrionis* son susceptibles a *Metarhizium anisopliae* EAMa 01/58-Su, mostrando valores de  $TL_{50}$  de 3.62-4.78 d (Marannino *et al.*, 2008). En este trabajo, se propone que las altas concentraciones de  $CO_2$  durante la producción de conidios afectan a éstos de forma específica. Lo anterior permite que la tasa específica de muerte ( $k$ ) sea mayor cuando los conidios crecen en atmósferas ricas en  $CO_2$ . En el tiempo de retardo en que ocurre la muerte ( $t_0$ ), no se observaron diferencias entre los tratamientos, lo que sugiere que la cutícula de las larvas de *Tenebrio molitor* posee características distintas a la de los adultos y esto explica por qué en adultos,  $t_0$  es menor que cuando se infectan larvas.

**Tabla 7.** Parámetros de calidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. Bioensayo sobre larvas de *Tenebrio molitor*.

Tratamiento Proporción O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (%)	$t_0$ (d)	$k$ (d <sup>-1</sup> )	$S_f$ (%)	$TL_{50}$ (Días post - inoculación)	$R^2$
21/0 (normal)	7.5 <sup>a</sup> (± 0.73)	0.15 <sup>a</sup> (± 0.07)	72.56 <sup>a</sup> (± 12.18)	N. A.	0.84 (± 0.11)
16/5	4.51 <sup>a</sup> (± 0.14)	0.30 <sup>a</sup> (± 0.08)	83.34 <sup>a</sup> (± 8.33)	N. A.	0.94 (± 0.05)
21/5	7.67 <sup>a</sup> (± 0.30)	1.29 <sup>b</sup> (± 0.07)	36.10 <sup>b</sup> (± 0.07)	8.89 (± 0.01)	0.95 (± 0.05)
26/0	4.97 <sup>a</sup> (± 2.30)	0.52 <sup>a</sup> (± 0.39)	72.23 <sup>a</sup> (± 4.80)	N. A.	0.97 (± 0.02)

Los valores de las columnas con la misma letra no mostraron diferencias significativas entre sí ( $p > 0.05$ ).

$t_0$ = Tiempo de retardo de muerte

$k$ = Tasa específica de muerte

$S_f$ = Supervivencia final

$TL_{50}$ = Tiempo en alcanzar el 50% de muerte

$R^2$ = Coeficiente de correlación

N.A= Valores no alcanzados

La infección de hongos entomopatógenos en larvas y adultos de *Tenebrio molitor* se ha estudiado recientemente. En estudios previos se ha observado que las larvas son más resistentes al ataque de hongos entomopatógenos respecto a los adultos. Rodríguez-Gómez *et al*, (2009) realizó un estudio infectando larvas y adultos con *Beauveria bassiana* por inmersión, mostrando que la mortalidad se alcanza hasta en un 50% más rápido en adultos. Al menos dos parámetros son importantes en la resistencia de *Tenebrio molitor* ante los patógenos, la densidad de los hemocitos y la actividad fenoloxidasa. La explicación consiste en que el color de la cutícula depende de la capacidad de melanización, este proceso se lleva a cabo a través de enzimas fenoloxidasas que están presentes dentro de los hemocitos (Armitage y Siva-Jothy, 2005).

En nuestros resultados, se observó que las larvas que sobrevivieron a la infección mostraron, en el punto de infección, una mancha de color oscura que podría ser melanina. En la (**Figura 23 A-C**) se muestran larvas de insectos antes de la infección con *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* (A), después de la infección cuando el insecto no sobrevivió (B) y cuando el insecto sobrevivió (C). Por lo que la presencia de la melanina podría ser la causa de la supervivencia de las larvas ante la infección de *Metarhizium anisopliae*. Dicha melanina podría ser sintetizada en los melanocitos del insecto a partir la oxidación de tirosina a dopa,

posteriormente la formación de dopaquinona y finalmente melaninas a través de enzimas fenoloxidasas que aparecen como consecuencia de una infección (Sugumaran, 2002). Al respecto, Chouvenc *et al.*, (2009) describen cómo sucede el proceso de melanización cuando la termita *Reticulitermes flavipes* es infectada por *Metarhizium anisopliae*. Estos autores sugieren que la melanina es una barrera físico-química que impide la propagación de la infección en el interior del insecto, puesto que la melanina rodea al punto de infección.



**Figura 23.** Larvas de *Tenebrio molitor* antes (A) y después (B) de la infección de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. Larva melanizada sobreviviente a la infección (C). Fotos tomadas del bioensayo.

Muchos autores han descrito el proceso en la cascada de fenoloxidasas en los insectos después del ataque de entomopatógenos, o bien, cuando el insecto sufre una lesión física. Se ha reportado que la cascada de fenoloxidasas se inicia por la presencia de  $\beta$ -1,3-glucanos y lipopolisacáridos, presentes en la cutícula de los insectos, que actúan como señales de reconocimiento de bacterias y hongos (Asano y Ashida, 2001). Así mismo, se ha reportado la participación de enzimas como la lacasa y la tirosinasa en los procesos de melanogénesis. En un estudio realizado por Arakane *et al.* (2005), se describen a las isoformas de lacasas 2A y 2B como responsables de conferir un fenotipo albino a la cutícula de *Tribolium castaneum* en estado de larva, pupa y adulto. Estos autores identificaron al gen *TcLac2* como el responsable de codificar las isoformas lacasas implicadas en la pigmentación de la cutícula además de conferir una estructura rígida (esclerotos). De manera similar, se ha reportado que la melanización inicia a partir de la oxidación la *L*-tirosina a dopamina en presencia de la enzima tirosinasa, y posteriormente la oxidación de la dopamina a melanina (Asano y Ashida, 2001). En algunos casos, en la oxidación de la dopamina a melanina está implicada una lacasa (Williamson *et al.*, 1998). En los insectos, el

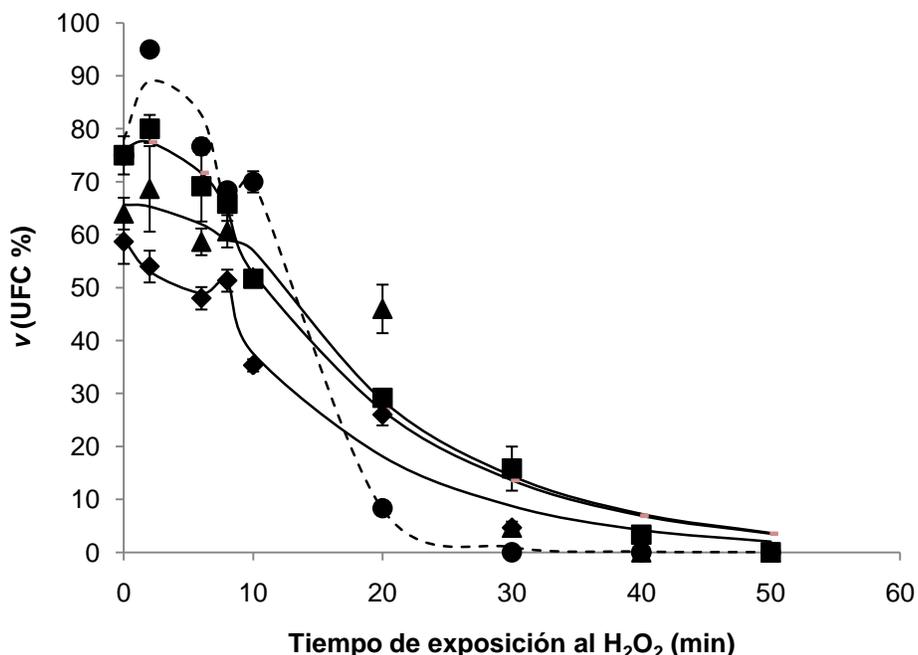
uso de dopamina es el mejor precursor de la melanina por dos razones (Sugumaran, 2002): i) los insectos almacenan grandes cantidades de catecolaminas necesarias para la esclerotización, lo que implica que los niveles de dopa sean bajos; ii) la dopamina es el mejor sustrato para las enzimas fenoloxidasas de los artrópodos.

### **7.7. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la viabilidad de los conidios**

Con la finalidad de conocer si los conidios producidos en distintas atmósferas presentarían una mayor resistencia a los agentes oxidantes como consecuencia a la exposición a atmósferas modificadas, se diseñó un experimento en el que los conidios obtenidos en las distintas atmósferas fueron incubados en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (25 mM) y posteriormente se evaluó la viabilidad de éstos. Las cinéticas de viabilidad se muestran en la **Figura 24**. Con excepción del tratamiento 21/5 %, en el resto de los tratamientos, los conidios mostraron un aumento en la viabilidad cuando se expusieron por 5 minutos al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puesto que en el tiempo  $t_i$  (tiempo=0), el porcentaje de germinación  $A_0$  fue menor que los obtenidos después de 5 min en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Posterior a este tiempo, los conidios obtenidos en cada una de las atmósferas modificadas, mostraron una disminución en el número de UFCs.

Aunque la reactividad del peróxido de hidrógeno es baja respecto a otras especies reactivas de oxígeno, su alta difusión a través de las células le permite estar en contacto con metales de transición como el Fe, provocando la denominada reacción de Fenton. Esta reacción produce radicales hidroxilo que son mucho más citotóxicos que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Li *et al.*, 2007). Esta podría ser la razón por la cual durante los primeros minutos no se observó muerte celular de *Metarhizium anisopliae*. Sin embargo, después de diez minutos de exposición al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la viabilidad disminuyó de manera exponencial. Se sugiere que la muerte celular de *Metarhizium anisopliae*, después de diez minutos de exposición al peróxido, se deba a la presencia de otra ERO como el radical hidroxilo, que se produce cuando el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> esté en contacto con algunos metales de transición. El radical hidroxilo es uno de los compuesto más reactivos que existen y su difusión es muy baja debido a que interacciona rápidamente ( $1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) con cualquier compuesto celular como las proteínas y los lípidos (Hansberg, 2008). Las ERO funcionan como señales que determinan respuestas fisiológicas de adaptación al medio ambiente y éstas son indispensables para la diferenciación celular y

para la muerte celular programada (Hansberg, 2008). Considerando lo anterior, suponemos que las especies reactivas de oxígeno son las responsables de que durante los primeros minutos de exposición al peróxido de hidrógeno, los conidios presentaran mayor cantidad de UFCs respecto al tiempo cero. También después de diez minutos de exposición, las ERO, pudieron participar como señales para la muerte celular programada.



**Figura 24.** Cinéticas de viabilidad de los conidios expuestos al peróxido de hidrógeno. Los conidios fueron cosechados en los distintos tratamientos. ( ▲ ) 16/5, ( ◆ ) 21/5, ( ● ) normal, ( ■ ) 26/0.

En la **Tabla 8** se muestran los parámetros de la cinética de viabilidad calculados a través del modelo matemático (descrito en la ecuación 5). El único tratamiento que no mostró un coeficiente **a** negativo durante los primeros minutos ( $0 \leq t < t_1$ ) de exposición al peróxido de hidrógeno fue 21/5 %. El signo negativo del coeficiente cuadrático **a**, indica que los conidios obtenidos en ese tratamiento fueron estimulados por el  $H_2O_2$  durante los primeros 5 min, a la capacidad de germinación, observado a través de la viabilidad. Se observó que la tasa específica de decaimiento en la viabilidad ( $\alpha$ ) obtenido cuando ( $t \geq t_1$ ) fue estadísticamente distinto ( $p < 0.05$ ) para el tratamiento normal, respecto al resto de los tratamientos. Estos resultados indican que los conidios obtenidos en el tratamiento normal son más sensibles a

la toxicidad del peróxido de hidrógeno (25 mM) cuando se exponen por más de 10 minutos, sin embargo, durante los primeros 5 minutos de exposición al peróxido se induce la viabilidad. En *Aspergillus oryzae* se ha identificado un gen *atfB* como el responsable de regular la tolerancia al estrés térmico y oxidativo (Sakamoto, *et al.*, 2008). En *Metarhizium anisopliae* se ha asociado al gen que codifica una proteína osmosensora *Mos1* como responsable de la sensibilidad a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 mM (Wang *et al.*, 2008). Los autores de este estudio, sugieren que dicha proteína interactúa con el desarrollo de la pared celular de los hongos y en consecuencia afecta la permeabilidad del peróxido de hidrógeno.

**Tabla 8.** Parámetros de la cinética de viabilidad de los conidios producidos en distintas atmósferas al peróxido de hidrógeno 25 mM.

Tratamiento Proporción O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> (%)	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>A</i> <sub>0</sub>	<i>α</i>	<i>R</i> <sub>1</sub> <sup>2</sup> , <i>R</i> <sub>2</sub> <sup>2</sup>
21/0 (normal)	-1.11	7.47	78.00	0.22	0.76, 0.99
16/5	-0.11	0.05	65.60	0.06	0.70, 0.82
21/5	0.33	-3.70	59.13	0.07	0.87, 0.90
26/0	-0.34	1-31	76.24	0.06	0.87, 0.95

*a* y *b*= Coeficientes de la ecuación cuadrática

*A*<sub>0</sub>= Viabilidad en *t*<sub>0</sub>

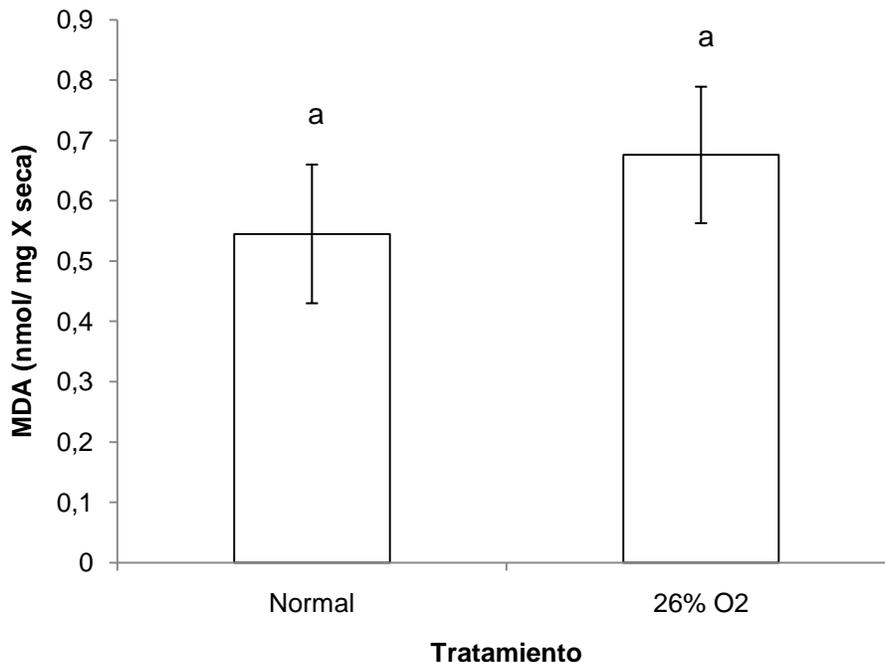
*α*= Tasa específica de muerte

*R*<sub>1</sub><sup>2</sup>, *R*<sub>2</sub><sup>2</sup>= Coeficientes de correlación, correspondientes a la función cuadrática y a la función diferencial, respectivamente

### **7.8. Determinación del malondialdehído como indicativo del estrés oxidativo**

Con el propósito de conocer si la atmósfera oxidante (26/0) produjo, en el micelio y conidios, daño celular; se comparó la concentración de MDA con la atmósfera normal. La razón por la que se compararon estos tratamientos es porque la atmósfera oxidante produjo más conidios respecto de la atmósfera normal y se buscó una explicación en términos de estrés oxidativo. Esto debido a que el estado oxidante puede causar un mayor estrés oxidativo, respecto a la atmósfera normal, lo que se manifestaría en la oxidación de lípidos en la biomasa. Los lípidos son blancos importantes para la acción de las ERO. La peroxidación es una de las principales causas del daño celular la que puede conducir a la pérdida de sus funciones y posiblemente induzcan la conidiación. Los resultados (**Figura 25**) mostraron que no existe diferencia estadística (*p*>0.05) en la concentración de MDA entre los dos tratamientos. Es

posible que los niveles de MDA, observado en el ECE intracelular de la atmósfera enriquecida con oxígeno, no mostraron diferencias significativas porque la actividad enzimática involucrada en la eliminación de especies reactivas de oxígeno, como las catalasas, estén evitando la oxidación de lípidos de las células de *Metarhizium anisopliae*. A la fecha no existen reportes de la estimación de daño celular en hongos entomopatógenos ocasionados por ERO, pero, en este trabajo se sugiere que la alta conidiación de *Metarhizium anisopliae* en la atmósfera 26/0 se deba a la presencia oxígeno como agente oxidante. A pesar del alta capacidad oxidante de la atmósfera 26/0 no se observó estrés oxidativo. Lo que sugiere que los estados oxidantes inducen la conidiación sin llegar a provocar estrés oxidativo.



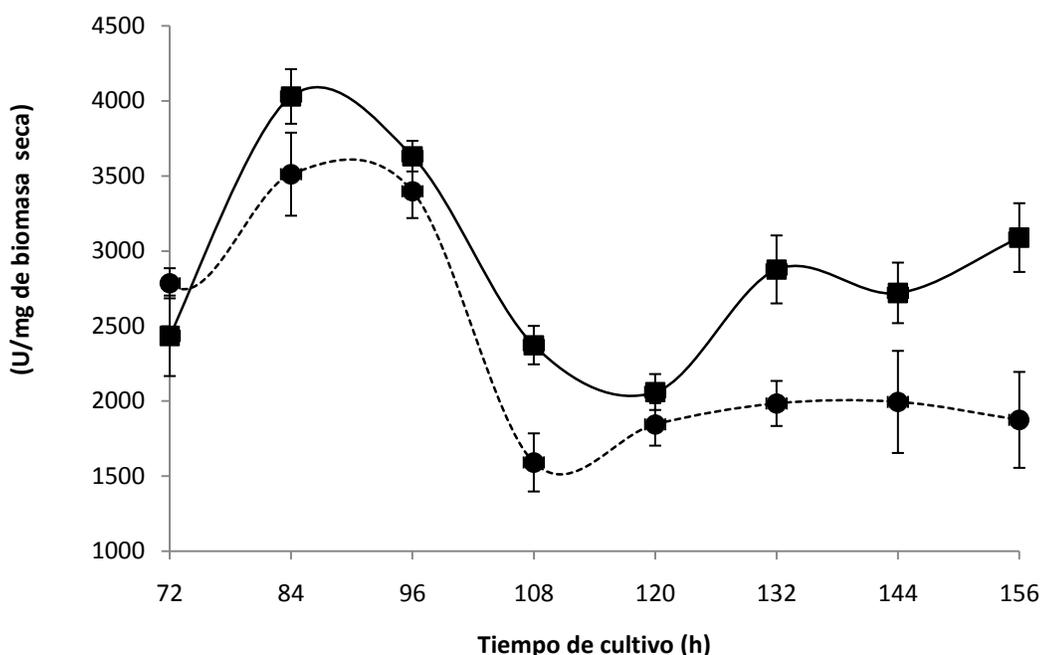
**Figura 25.** Cuantificación de MDA como indicativo de estrés oxidativo. Tratamientos 21/0 (normal) y 26/0.

### 7.9. Actividad catalasa

A partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se determinó la actividad catalasa como posible causa de la ausencia de daño celular en la biomasa, obtenida de la

atmósfera enriquecida con O<sub>2</sub>. Los resultados se muestran en la **Figura 26**, se observó que la actividad catalasa, después de 12 h a partir del punto en el que se modificó la atmósfera, tuvo valores alrededor de 2500 U/mg<sup>-1</sup> de biomasa seca. Después de ese punto se observó que la actividad total de catalasa fue mayor en la atmósfera rica en oxígeno, hasta de un 65 % en el tiempo de 156 h.

La actividad catalasa pudo provenir de los conidios o del micelio, puesto que la actividad se determinó a partir de un ECE que se obtuvo al macerar conidios y micelio (ver Materiales y Métodos). Sin embargo, las diferencias obtenidas en la viabilidad de los conidios expuestos al peróxido de hidrógeno (apartado 7.7), sugieren que parte de la actividad enzimática evaluada pueden provenir de catalasas de los conidios y otra parte, podría provenir de catalasas del micelio, puesto que, se ha reportado que las catalasas presentes en micelio pueden estar implicadas en la diferenciación celular. Al respecto, Michán *et al.* (2002) ha relacionado la actividad catalasa en los procesos de diferenciación celular en *Neurospora crassa*. Específicamente, estos autores, observaron que el gen *cat 3*, que codifica para una catalasa, se expresa durante la conidiación, cuando la actividad es mayor respecto al resto del ciclo celular. También se ha observado que el gen *atfB* en *Aspergillus oryzae* desregula al gen *catA* durante la conidiación (Sakamoto *et al.*, 2008). De manera similar, en nuestros resultados, se observó que durante el inicio de la conidiación, los valores de la actividad catalasa se incrementaron, pero la mayor actividad catalasa se observó en la biomasa del tratamiento que produjo más conidios (26% O<sub>2</sub>). Por lo que sugerimos que la actividad catalasa podría ser la responsable de la conidiación en *Metarhizium anisopliae* como sucede en otros organismos y que la activada catalasa se expresó a causa de la exposición a una atmósfera oxidante.



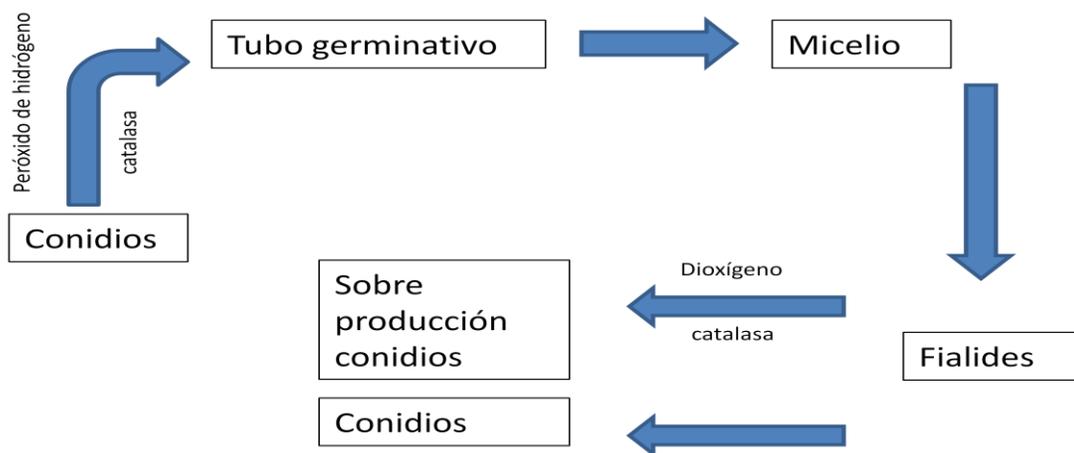
**Figura 26.** Cinética de la actividad catalasa durante la conidiación de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* en distintas atmósferas. (●) 21/0 (■) 26/0.

Partiendo de la hipótesis de Hansberg y Aguirre, (1990) en la que se describe que los estados hiperoxidantes inducen la diferenciación celular, podemos suponer que la atmósfera oxidante induce la citodiferenciación en *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*, sin provocar daño celular.

### **7.10 Resumen general de resultados.**

Se identificó el aislado de *Metarhizium anisopliae* a partir de la secuenciación de los ITS1 e ITS2, mostrando una analogía de 96% con la variedad *lepidiotum*. Se observó que el medio de cultivo es un factor importante en la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. El mejor sustrato para la producción de conidios fue la avena, y los rendimientos de conidios se pueden incrementar si se adiciona peptona como fuente adicional de nitrógeno, cuya relación C/N fue de 9.32. También se observó que una atmósfera rica en oxígeno incrementa la producción de conidios sin alterar su calidad.

Aunque no se observó daño celular provocado por ROS como indicativo de estrés oxidativo, se sugiere que la presencia del oxígeno, presente en la atmósfera 26/0, es el responsable de la inducción en la conidiación. Es probable que la ausencia de daño celular se deba a la respuesta antioxidante de la cepa como el incremento en la actividad catalasa. Así también, el peróxido de hidrógeno en tiempos cortos de exposición, podría estar implicado en la diferenciación celular, específicamente, en inducir la formación de tubos germinativos. En este sentido, se sugiere el siguiente esquema de la diferenciación celular para el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var *lepidiotum*. En el que se describe que los estados oxidantes como el peróxido de hidrógeno participa en germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae* probablemente por la inducción de la enzima catalasa como lo sugiere Michán *et al.*, (2002). Posterior a la formación del tubo germinativo, el crecimiento vegetativo del hongo, la presencia de altos niveles de oxígeno (26%) en la atmósfera induce la conidiación. Durante la conidiación en la atmósfera enriquecida con oxígeno, se observó altos niveles de la actividad catalasa, por lo que se sugiere que también está involucrada en los procesos de diferenciación celular.



**Figura 27.** Esquema general de la diferenciación celular en *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* como respuesta a la exposición de especies reactivas de oxígeno.

Este es el primer reporte que describe que, el estado oxidante causado por una atmósfera con 26% de oxígeno induce la diferenciación celular para la producción de conidios, además, un estado oxidante provocado por  $H_2O_2$  induce la germinación de estos.

Por otro lado, se evaluó la calidad de los conidios obtenidos en la atmósfera oxidante y estos no se vieron afectados en los parámetros de calidad como la hidrofobicidad y la viabilidad. De la misma manera, la infectividad de los conidios sobre adultos y larvas de *Tenebrio molitor* no se vieron afectados.

También se observó que el rendimiento de conidios en atmósferas ricas en  $CO_2$ , particularmente 21/5, no se incrementó respecto de la atmósfera normal, sin embargo, se incrementó la infectividad sobre larvas y adultos de *Tenebrio molitor*.

## 8. CONCLUSIONES

- La composición del sustrato afecta la producción de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*, además, la presencia de peptona en el medio de cultivo favorece el rendimiento de las unidades infectivas.
- Este es el primer reporte en el que se describe que una atmósfera enriquecida con oxígeno favoreció la producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*, sin afectar los parámetros de calidad como germinación e hidrofobicidad.
- Se demostró que los conidios producidos en una atmósfera oxidante no afectó la virulencia sobre adultos de *Tenebrio molitor*. Así también, observamos que una atmósfera rica en CO<sub>2</sub> incrementa la infectividad de los conidios sobre *Tenebrio molitor* adultos y larvas.
- El peróxido de hidrógeno induce la germinación de los conidios de *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*.

## 9. REFERENCIAS

1. Aguirre, J., Ríos-Momberg, M., Hewitt, D. y Hansberg, W. (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *TRENDS in Microbiology*. 13(3), 111-118.
2. Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P. y Rouxhet, P. G. (2001). Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods*. 45, 119-126.
3. Alatorre- Rosas, R. (2005) Taller, manejo y aplicación de microorganismos entomopatógenos. *Sociedad Mexicana de Control Biológico*. Curso. San Miguel de Allende Guanajuato, México.
4. Álvarez-Campos, R., Arruda, W., Tomazzoni-Bold, J., Vanusa da Silva, M., Monteiro de Barros, N., Lúcio de Azevedo, J., Schrank, A. y Henning Vainstein, M (2005). *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. *Current Microbiology*. 50, 257–261.
5. Angelova, B. M., Pashova, B. S., Spasova, K. B., Vassilev, V. S. y Slokoska, S. L. (2005). Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquant. *Mycological Research*. 109(2), 150-158.
6. Arakane, Y., Muthakrishnan, S., Beeman, W. R., Kanost, R. M y Kramer, J. K. (2005). Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. 102(32), 11337-11342.
7. Armitage y Siva-Jothy. (2005). Immune function respond to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. *Heredity*. 94, 650-656.
8. Arzumanov, T., Jenkins, N. y Roussos, S. (2005). Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochemistry*. 40, 1037-1042.
9. Asano, T. y Ashida, M. (2001). Cuticular pro-phenoloxidases of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification and demonstration of its transport from hemolymph. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(4), 11100-11112.
10. Assaf, T. A. (2006). Producción de metabolitos insecticidas por *Paecilomyces fumosoroseus* en fermentación líquida y sólida. *Tesis doctoral*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México

11. Barranco-Flrido, J. E., Alatorre-Rosas, R., Gutiérrez-Rojas, M., Viniegra-González, G. y Saucedo-Castañeda. G. (2002). Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecani* for solid state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 30, 920-915.
12. Belozerskaya, T. A. y Gessler, N. N. (2006). Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*. 75(4), 427-431.
13. Bidochka, J. M., St Leger, J. R., Stuart, A y Gowanlock, K. (1999). Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrates. *Microbiology*. 145, 955-963.
14. Bidochka, M. J., St. Leger, R. J. Joshi, L. y Roberts, D. W. (1995). The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycological Research*. 99, 403-406.
15. Bischoff, J. F., Rehner, S. A. y Humber, R. A. (2006). *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia*. 95(5), 737-745.
16. Braga, G. U. L., Destéfano R. H. R. y Messias, C. L. (1999). Oxygen consumption by *Metarhizium anisopliae* during germination and growth on different carbon sources. *Journal of Invertebrate Pathology*. 74, 112-119.
17. Butler, M. J. y Day, A.W. (1998). Fungal melaninas: a review. *Canadian Journal of Microbiology*. 44, 1115-1136.
18. Chouvinc, T., Su, N. Y. y Robert, A. (2009). Cellular encapsulation in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Isoptera), against infection by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal Invertebrate Pathology*. 101, 234-241.
19. Driver, F., Milner, R. J., y Trueman J. W. H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104(2), 134-150.
20. Ekesi, S., Maniania, K. N. y Ampong-Niarko. (1999). Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science and Technology*. 9, 177-185.

21. Entz, C. S., Johnson, L. D. y Kawchuk, M. L. (2005). Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycological Research*. 109(11), 1302-1312.
22. Esterbauer, H. y Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*. 186: 407-421.
23. Fagade, O.E., Balogun, S.A. y Lomer, C.J. (2005). Microbial control of caged population of *Zonocerus variegatus* using *Beauveria bassiana* and *Metarhizium* sp. *African Journal of Biotechnology*. 4(1), 113-116.
24. Fang, W. y Bidochka, M. J. (2006). Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* by quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research*. 110, 1165-1171.
25. Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y. y Pie, Y. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and Its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 363-370.
26. Gillespie, T. A. y Moorhouse. (1994). The use of fungi to control pests of agricultural and horticultural importante. En: Whipps, J. M. y Lunsden, R. D., eds. Biotechnology of fungi for improving plant growth. *Cambridge University Press*. Great Britain. 72.
27. Goettel, M. S. (1992). Fungal agents for biocontrol. En: Lomer, C. J.; Prior, C., eds. Biological control of locusts and grasshoppers. *Wallingford, UK: C.A.B. International*. 122–130.
28. Guerreo, J., Mera, K. M., Salvo, G. H. y Carrillo, I. R. (2000). Discriminación de cepas nativas chilenas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae* con marcadores moleculares RAPD. *Agro sur*. 28(1), 81-91.
29. Hansberg, W. (2008). El dióxígeno y sus especies reactivas. En: En: Konigsberg-Fainstein. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. *Manual moderno*. México. pp. 97-118.
30. Hansberg, W. y Aguirre, J. (1990). Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *Journal of Theoretical Biology*. 142(2), 287-293.
31. Hardin, G. (1945). A more meaningful of the logistic equation. *American Naturalist*. 79, 279-281.

32. Hegedus, D. D. y Khachatourians, G. G. (1995). The impact of biotechnology on Hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*. 13(3), 455-490.
33. Holder, J. D. y Keyhani, O. N. (2005). Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria (Cordyceps) bassiana* to substrate. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(9), 5260-5266.
34. Horton, H. R., Moran, L. A., Scrimgeour, K. G., Perry, M. D. y Rawn, J. D. (2008). Principios de bioquímica. *Prentice Hall*. México. pp. 415-444.
35. Ibrahim, L., Butt, M. T. y Jenkinson, P. (2002). Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 106 (6), 705-715.
36. 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.
37. Jeffs, L. B. y Khachatourians, G. G. (1997). Estimation of spore hydrophobicity for members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium* and *Tolypocladium* by salt-mediated aggregation and sedimentation. *Canadian Journal of Microbiology*. 43, 23-28.
38. Jeffs, L. B., Xavier, I. J., Matai, R. E. y Khachatourians, G. G. (1999). Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Verticillium*. *Canadian Journal of Microbiology*. 45, 936-948.
39. Kamp, A. M. y Bidochka, M, J. (2002). Conidium production by insect pathogenic fungi on commercial available agars. *Letters in Applied Microbiology*. 35, 74-77.
40. Konigsberg-Fainsteinm, M. (2008). Cadena respiratoria mitochondrial. En. Konigsberg-Fainsteinm. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. *Manual moderno*. México. pp. 49-58.
41. León-Santiesteban, H., Bernal, R., Fernández, F. J. y Tomasini. A. (2008). Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenol-contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83, 1894-1900.
42. Li, Q., McNeil, B. y Harvey, M. L. (2007). Adaptative response to oxidative stress in the filamentous fungus *Aspergillus niger* b1-D. *Free Radical Biology and Medicine*.

43. Lord, C. J. (2009). Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of *Tribolium castaneum* with reduced oxygen and increased carbon dioxide. *Journal of Economic Entomology*. 133, 101-107.
44. Lord, C.J. (2001). Desiccant dusts synergize the effect of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes: Moniliales) on stored-grain beetles. *Journal of Economic Entomology*. 94(2), 367-372.
45. Marannino, P., Santiago-Álvarez, C., de Lilo, E. y Quesada-Moraga, E. (2008). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok. to target larvae and adults of *Capnodis tenebrionis* (L) (Coleoptera: Buprestidae) in soil and fiber band applications. *Journal of Invertebrate Pathology*. 97, 237-244.
46. Mathews, K. C., Van Holden, E. K y Ahern, G. K. (2002). Bioquímica. *Addison Wesley*. México. pp 583-618.
47. Mendoza-Mendoza, A., Rosales-Saavedra, T., Cortés, C., Castellanos-Juárez, V., Martínez, P. y Herrera-Estrella, A. (2007). The MAP kinase TVKI regulates conidiation, hydrophobicity and the expression of genes encoding cell wall proteins in the fungus *Trichoderma virens*. *Microbiology*. 153, 2137-2147.
48. Michán, S., Lledas, F., Baldwin, J. D., Natvig, D. O. y Hansberg, W. (2002). Regulation and oxidation of the large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine*. 33 (4), 521-532.
49. Monzon, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 63, 95-103.
50. Nagy, M. J., Cass. G. E. A. y Brown, K. (1997). Purification and characterization of recombinant Catalase-Peroxidase, which confers isoniazid sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*. 272(50), 31265-31271.
51. Pascual, S., De Cal, A., Magan, N y Melgarejo, P. (2000). Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*. 89, 847-857.
52. Prakash, B. G. V. S., Padmaja, V. y Kiran, S. R. R. (2008). Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid- state fermentation. *Bioresource Technology*. 99, 1530-1537.
53. Ramos-Elorduy, J., Ávila-González, E., Rocha-Hernández, A. y Pino, M. J. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *Journal of Economic Entomology*. 95(1), 214-220.

54. 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.
55. Rodríguez-Gómez, D. (2009). Caracterización fisiológica de una cepa silvestre de *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. y su mutante resistente a 2-desoxiglucosa. *Tesis de doctorado*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México
56. Rodríguez-Gómez, D., Loera, O., Saucedo-Castañeda, G. y Viniegra-González, G. (2009) Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25, 513-518.
57. Roncal, T y Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*. 154, 539-546.
58. Rothmund, S., Liou, C. Y., Davies, L. P., Krause, E., y Sönnichsen, D. F. (1999). A new class of hexahelical insect proteins revealed as putative carriers of small hydrophobic ligands. *Structure*. 7(11), 1325-1332.
59. Sabbour, M.M, (2002) The role of chemical additives in enhancing the efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against the potato tuber moth *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera:Gelechiidae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 5(11), 1155-1159.
60. Safavi, A, S., Shah, A. F., Pakdel, K. A., Reza-Rasoulian, G., Bandani, R. A. y Butt, M. T. (2007). Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 270, 116-123.
61. Sakamoto, K., Arima, T., Iwashita, K., Yamada, O., Gomi, K. y Akita, O. (2008). *Aspergillus aryzae atfB* encodes a transcription factor required for stress tolerance in conidia. *Fungal Genetics and Biology*. 45, 922-932.
62. Samish, M., Ginsber, H. y Glazer, I. (2004). Biological control of ticks. *Parasitology*. 129, 389-403.
63. Samuels, K. D. Z., Heale, J. B. y Llewellyn, M. (1989). Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53, 25-31
64. Segers, R., Butt, T. M., Keen, J. N., Kerry, B. R. y Peberdy, J. (1995). The subtilisins of the invertebrate mycopathogens *Verticillium chlamyosporium* and *Metarhizium*

- anisopliae* are serologically in functionally related. *FEMS Microbiology Letters*. 126 227-232.
65. Shah, A. F., Allen, N., Wright, J. C. y Butt, M. T. (2007). Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 276, 60-66.
66. Shah, F. A., Wang, C. S. y Butt, T. M. (2005). Nutrition influence growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 251, 259-266.
67. Shi, W.B. y Feng, M.G. (2004). Lethal effect of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, and *Paecilomyces fumosoroseus* on the eggs of *Tetranychus cinnabarinus* (Acari: Tetranychidae) with a description of a mite egg bioassay system. *Biological Control*. 30, 165-173.
68. Sowjanya Sree, K. y Padmaja, V. (2008). Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. *Toxicon*. 51, 1140-1150
69. St. Leger, R. J., Joshi, L., Bidoschka, M, J. y Roberts, D. M. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93, 6349-6354.
70. St. Leger, R. J., Staples, R. C. y Roberts, D. W. (1992). Cloning and regulatory analysis of starvation-stress gene, *ssgA*, encoding a hidrophobin-like protein from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Gene*. 120, 119-124.
71. Street, R. 1999. *Tenebrio molitor*. (On-line), *Animal Diversity Web*. [http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Tenebrio\\_molitor.htm](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Tenebrio_molitor.htm)  
I. Revisado en Marzo 2010.
72. Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*. 15, 2-9.
73. Sun, J., Fuxa, J. R. y Henderson, G. (2002). Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and *in vitro*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 81, 78-85.

74. Sun, MH. y Liu, XZ. (2006). Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*. 161, 295-305.
75. Toledo, I., Rangel, P. y Hansberg, W. (1995). Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 319 (2), 519-524.
76. Venereo-Gutiérrez, R. J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Médica Militar*. 31(2), 126-133.
77. Wang, C., Duan, Z. y St Leger, R. J. (2008). MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect hemolymph. *Eukaryotic Cell*. 7 (2), 302-309.
78. Williamson, R. P., Wakamatsu, K. y Ito, S. (1998). Melanin biosynthesis in *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Bacteriology*. 180(6)1570-1572.
79. Wilson, K., Cotter, C. S., Reeson, F. A. y Pell, K. J. (2001). Melanism and disease resistance in insects. *Ecology Letters*. 4(6), 637-649.
80. Xia, Y., Dean, P., Judge, A. J., Gillespie, P. J., Clarkson, M. J. y Charnley, K. A. (2000). Acid phosphatases in the haemolymph of the desert locust, *Schistocerca gregaria*, infected with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Insect Physiology*. 46, 1249-1257.
81. Xu, L. L., Li, F., Xie, Y. H. y Liu, (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.
82. Zentella de Piña, M. y Piña, E. (2008). Daño a proteínas. En: Konigsberg-Fainstein. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. *Manual moderno*. México. pp. 97-118.
83. Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*. 37, 375-379.

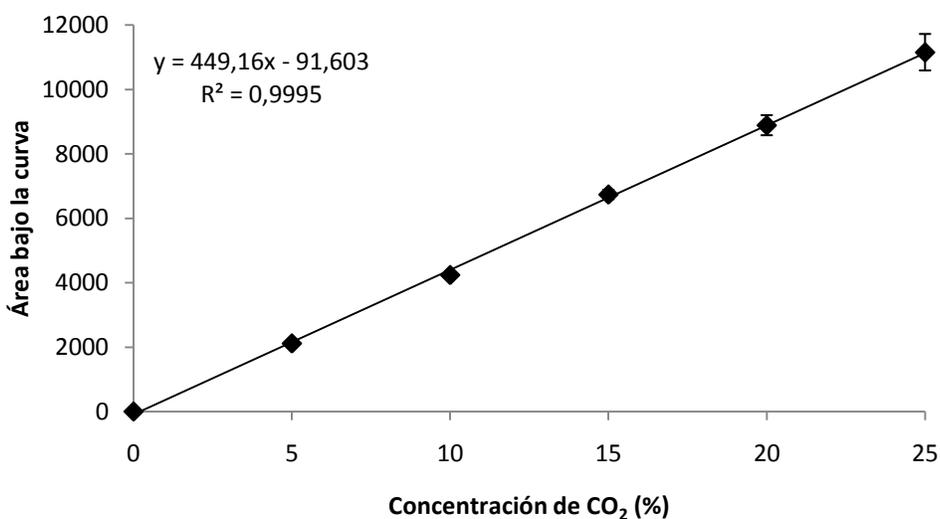
## 10. ANEXOS

### Curva de calibración de bióxido de carbono (Anexo1)

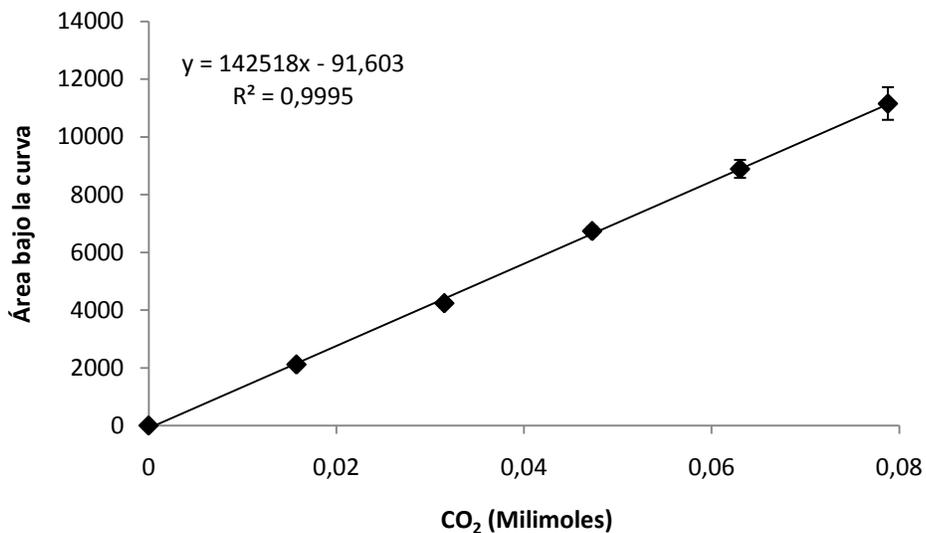
En la realización de la curva de calibración, se usaron tubos de ensayo de 15 mL con tapa rosca. Los tubos se llenaron con una solución de cloruro de sodio ( $300 \text{ g l}^{-1}$ ) pH 2.0 con un indicador ácido-base de rojo de metilo y se taparon con septos de goma. Se evitó que se quedaran burbujas de aire y se mantuvieron de forma vertical invertidos para evitar fugas. Las diluciones de bióxido de carbono en nitrógeno fueron según la **Tabla 9**. La curva se ajustó por regresión lineal.

**Tabla 9.** Diluciones de bióxido de carbono balanceado con nitrógeno.

Tubo	Porcentaje CO <sub>2</sub> (V/V)	Volumen (mL)	
		CO <sub>2</sub>	N <sub>2</sub>
1	5	0.5	9.5
2	10	1	9
3	15	1.5	8.5
4	20	2	8
5	25	2.5	7.5



**Figura 28.** Curva de calibración para la cuantificación del bióxido de carbono (%) acumulado en las botellas serológicas.



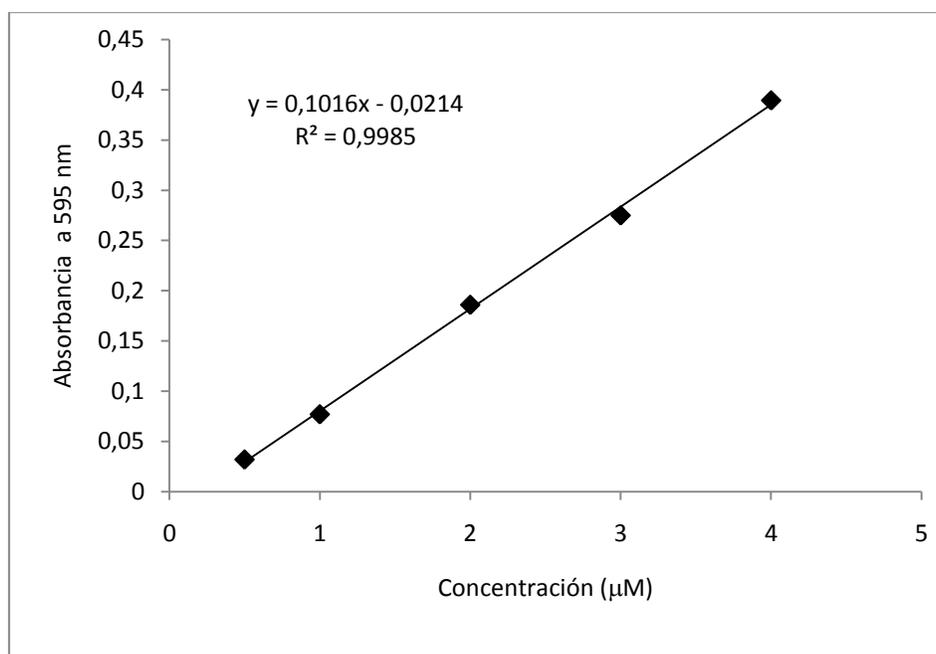
**Figura 29.** Curva de calibración para la cuantificación de bióxido de carbono (mM) acumulado en las botellas serológicas.

## Curva de calibración MDA (Anexo2)

La curva de calibración se realizó conforme a la ficha técnica del Kit (ALDetec Lipid Peroxidation Assay AK-170, *Biomol*, Intenational. Inc.). Las concentraciones de MDA se muestran en la **Tabla 10**. La curva de calibración se muestra en la **Figura 31**.

**Tabla 10.** Volúmenes de dilución para la curva de calibración de MDA.

Tubo	Concentración CO <sub>2</sub> (V/V)	Volumen (μl)	
		Estándar 20μM	Agua
1	0	0	200
2	0.5	25	175
3	1.0	50	150
4	2.0	100	100
5	3.0	150	50
6	4.0	200	0



**Figura 30.** Curva de calibración para la cuantificación MDA (μM) como indicativo de estrés oxidativo.

## PUBLICACIONES

Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, y Loera, O. (2009). Medium selection and effect of higher oxygen concentrations pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia*. *En prensa*.

Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, y Loera, O. (2009). Producción de conidio de *Metarhizium anisopliae* en distintas atmósferas. XXXII Congreso Nacional de Control Biológico. Villahermosa, Tabasco, México. 36-39.

Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, y Loera, O. (2009). Virulencia de los conidios de *Metarhizium anisopliae* producidos en distintas atmósferas sobre larvas y adultos de *Tenebrio molitor*. XXXII Congreso Nacional de Control Biológico. Villahermosa, Tabasco, México. 5-7.

Tlecuitl-Beristain, S., Viniegra-González, G., Díaz-Godínez, y Loera, O. (2008). Efecto del oxígeno sobre la producción y calidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae*. XXXI Congreso Nacional de Control Biológico. Zacatecas, Zacatecas, México. 192-195.

## Medium Selection and Effect of Higher Oxygen Concentration Pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* Conidial Production and Quality

Saul Tlecuil-Beristain · Gustavo Viniegra-González ·  
Gerardo Díaz-Godínez · Octavio Loera

Received: 31 July 2009 / Accepted: 15 December 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** Rice and oat flours were analyzed as media for the production of conidia by *M. anisopliae* var. *lepidiotum*. The presence of peptone increased conidia yield regardless of the substrate used; however, the highest yield was achieved on oat flour media. The effect of oxygen on conidia production using oat-peptone medium was also studied at two levels: Normal atmosphere (21% O<sub>2</sub>) and Oxygen-rich pulses (26% O<sub>2</sub>). Maximum conidia production ( $4.25 \times 10^7$  conidia cm<sup>-2</sup>) was achieved using 26% O<sub>2</sub> pulses after 156 h of culture, which was higher than 100% relative to conidial levels under normal atmosphere. Conidia yield per gram of biomass was 2.6 times higher with 26% O<sub>2</sub> ( $1.12 \times 10^7$  conidia mg<sup>-1</sup>). Conidia quality parameters, such as germination and hydrophobicity, did not show significant differences ( $P < 0.05$ ) between those treatments. Bioassays parameters, using *Tenebrio molitor* adults, were analyzed for conidia obtained in both atmospheres and data were fitted to an exponential model. The specific

mortality rates were 2.22 and 1.26 days<sup>-1</sup>, whereas lethal times for 50% mortality were 3.90 and 4.31 days, for 26% O<sub>2</sub> pulses and 21% O<sub>2</sub> atmosphere, respectively. These results are relevant for production processes since an oxygen increase allowed superior levels of conidia by *M. anisopliae* without altering quality parameters and virulence toward *Tenebrio molitor* adults.

**Keywords** *Metarhizium anisopliae* · Oxidative stress · Virulence · *Tenebrio molitor* · Conidial quality

### Introduction

The fungus *Metarhizium anisopliae* is considered as an alternative for agricultural pest control. One limiting factor for its use as a biocontrol agent is the production of biomass and conidia in large-scale on artificial substrates [1]. Recently, cultivation methods have been optimized for the production of *M. anisopliae* conidia on natural substrates such as sugar cane bagasse [2], rice, sorghum and barley [3], and even insect cadavers like *Coptotermes formosanus* [4]. Artificial substrates have also been used including yeast extract-enriched Potato Dextrose Agar (PDA) [5–7], yeast extract-enriched Sabouraud Dextrose Agar (SDA) [4], and Malt

---

S. Tlecuil-Beristain · G. Viniegra-González ·  
O. Loera (✉)  
Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma  
Metropolitana-Iztapalapa, CP 09340 Iztapalapa, Mexico,  
DF, Mexico  
e-mail: loera@xanum.uam.mx

G. Díaz-Godínez  
Universidad Autónoma de Tlaxcala, Center for Biological  
Science Research, Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

Extract Agar (MEA) [5]. Commonly, culture conditions such as substrate humidity and pH are manipulated for the production of conidia in solid media [2, 3]; moreover, some conditions have also been studied for the production of blastospores in liquid culture [8]. These works have contributed to obtaining greater yields of conidia and blastospores; nonetheless, parallel studies are necessary in order to determine the effect on quality parameters of those infective units.

The effect of aeration on *M. anisopliae* var. *acridum* cultures has been analyzed; nevertheless, conidia production did not show an effect as a result of the increase in aeration [2]. However, the increase in dissolved oxygen during the production of blastospores in a liquid culture resulted in a greater production level when compared to a non-regulated media [8], using a strain of *M. flavoviride* which was reassigned as *M. anisopliae* var. *acridum* as suggested previously [9]. In this context, aerobic organisms such as *M. anisopliae* use oxygen as a final electron acceptor in respiration for obtaining energy, facing the toxicity of the reactive oxygen species or ROS [10]. ROS are generated also under the influence of both internal and external factors, such as light and high temperature, ionizing radiation, changes in the environment atmospheric composition, and osmotic pressure [11].

The presence of ROS in an oxidant state has been described as a trigger of cellular differentiation and conidiation in *Neurospora crassa* [12, 13]. In the case of *M. anisopliae*, a recent report correlated oxidative stress with the production of mycotoxins against *Spodoptera litura* larvae [14]. In addition, Wang et al. [15] correlated an osmosensor with the response to oxidative stress caused by hydrogen peroxide. Nevertheless, there are no reports analyzing the effect of an oxygen-rich atmosphere on *M. anisopliae* conidiation, since this could be related to oxidative stress causing a faster cellular differentiation as mentioned earlier.

In this study, the effect of oxygen was determined on conidia production by *M. anisopliae* var. *lepidiotum*. The evaluation also comprised the quality of conidia harvested from two different atmospheres, as well as their virulence against adults of the yellow mealworm beetle *Tenebrio molitor*.

## Materials and Methods

### Microorganism

The isolate *Metarhizium anisopliae* CP-Oax belongs to the fungal collection of the *Colegio de Posgraduados* in Texcoco, Mexico. A monosporic culture was obtained on Potato Dextrose Agar (PDA) after 7 days at 28°C. PDA was used as propagation medium for obtaining inocula for all experiments.

### Molecular Identification of Strain CP-Oax

Fungal DNA was extracted according to a protocol DNA Purification Kit (Wizard® Genomic Promega: num. Cat. A1120). Polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out using ITS5 and ITS4b primers with PCR conditions reported by [16]. Primers ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') and ITS4b (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') have been designed from fungal 18S-rDNA and 28S-rDNA conserved sequences, respectively [16]. The nucleotide sequence from the amplified fragment was compared with published fungal sequences through a standard nucleotide–nucleotide BLAST homology search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), which allowed to assign this isolate as *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* strain CP-Oax (GenBank accession number is FJ876298). A recent report by Bischoff et al. [17] suggests *Metarhizium lepidiotae* as a current name for this organism.

### Culture Media

Culture media containing rice or oat flour (particle sizes under 0.25 mm) as main carbon sources were analyzed. The effect of meat peptone (Bioxon) on conidia production in these media was evaluated. The four media contained ( $\text{g l}^{-1}$ ): (a) rice flour: 33.3; (b) oat flour: 33.3; (c) rice flour: 33.3, and meat peptone: 10; and (d) oat flour: 33.3, and meat peptone: 10. The theoretic C/N ratios for each culture medium were 20.46, 15.71, 6.85, and 5.73, respectively. All these media contained bacteriological agar (Bioxon) at a final concentration of  $15 \text{ g l}^{-1}$ , and initial pH value was adjusted to seven. The experimental units were 120-ml serological bottles (Wheaton) containing

10 ml of culture medium in each bottle, which were inoculated with  $1 \times 10^7$  conidia per bottle ( $6.9 \times 10^5$  conidia  $\text{cm}^{-2}$ ). These bottles were then incubated at 28°C for 7 days and conidia were harvested using 10 ml of a Tween 80 solution (0.01%) by agitation with a magnetic stirrer. The conidia count was performed in a Neubauer chamber.

#### Effect of the Atmosphere on Conidia Production

*Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* was grown in selected culture medium based on oat flour and peptone (medium “d”). For every sampling period, three replicates were carried out for each treatment: normal atmosphere (21% O<sub>2</sub>) and oxygen-enriched (26%) pulses. The gaseous mix containing 26% O<sub>2</sub> was manufactured by the Praxair Company (Mexico). In the first treatment, the serological bottles were loosely closed with cotton caps in order to facilitate continuous gas exchange with external atmosphere. The second treatment began similarly in a normal 21% O<sub>2</sub> atmosphere (with cotton caps), and after 60 h of culture (pre-stationary phase), cotton caps were aseptically replaced for rubber hermetic seals. Then, atmosphere was periodically flushed with 26% O<sub>2</sub> pulses until the end of cultures as follows: two needles were simultaneously placed in the rubber seals, and a modified atmospheric (26% O<sub>2</sub>) flow of 20 cm<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> was passed through one needle into the experimental unit for one min; the second needle worked as a constant outlet during flushing, thus a complete atmospheric replacement was achieved. Both needles were removed after this process, and these atmospheric exchanges were repeated every 24 h for the second treatment. Samples from both treatments were taken every 12 h for biomass and conidial production estimations. Conidia were harvested by rinsing the surface with 10 ml of a 0.01% Tween 80 solution, and production was reported as conidia for unit area of agar surface (conidia  $\text{cm}^{-2}$ ).

#### Determination of Biomass

Biomass (X) was determined by dry weight measurement. Following conidia collection, 20 ml of distilled water were added to the bottles and then heated briefly in a microwave oven (Mabe, Litton) for 30 s in order to ease liquefaction of agar media,

which was filtered through a Whatman No. 1 filter paper. This harvested material was then rinsed with 40 ml of boiling water in order to eliminate agar residues. Filter paper with the biomass was dried at 60°C for 24 h in order to determine dry weight of biomass. Results show mean values for three replicas.

#### Germination

Germination percentage (G) was determined for the conidia freshly harvested at the time of maximum production (156 h). Under aseptic conditions, one drop of 1.5% water-agar solution (Bioxon) was placed on sterile slides [18]. These were allowed to cool for approximately five min, and then 100  $\mu\text{l}$  of a  $1 \times 10^6$  conidia  $\text{ml}^{-1}$  dilution was placed on the surface and a cover slip was used for every preparation. Then, slides were placed on a damp filter paper disc inside a Petri dish and incubated at 28°C for 18 h. Germination percentage was determined under the microscope, this included a count of at least fifty conidia. One conidium was considered to be germinated if germination tube was greater than diameter of the ungerminated conidia [19].

#### Conidial Hydrophobicity

Conidial surface hydrophobicity (H) was assessed using an aqueous-solvent partitioning assay with *n*-hexadecane (Sigma) as the organic phase [20]. *Metarhizium anisopliae* conidia from each treatment were suspended in 0.1 mol l<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub> solution and adjusted to a final concentration of  $1 \times 10^7$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ . Optic density (OD) of the conidial suspension, after a 30 s agitation in a vortex, was determined at 660 nm using a spectrophotometer (Beckman DU-640, USA) and this was referred to as OD<sub>total</sub>. The conidial suspension (3 ml) was then transferred to a tube containing one ml of *n*-hexadecane and agitated for 20 s. After 30 min, the organic phase was removed using a Pasteur pipette, the aqueous phase (aq) was collected, and OD was recorded after a brief agitation on a vortex as mentioned earlier since conidia tend to settle down. Relative hydrophobicity was then determined as follows:

$$\text{Hydrophobicity} = 100 \left( 1 - \frac{\text{OD}_{\text{aq}}}{\text{OD}_{\text{total}}} \right) \quad (1)$$

where:  $\text{OD}_{\text{total}}$  and  $\text{OD}_{\text{aq}}$  represent values for initial sample and post-treatment aqueous phase, respectively [20].

#### Kinetic Parameters

The evolution of dry biomass  $X = X(t)$  was followed by the Verhulst-Pearl or logistic equation

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[ 1 - \frac{X}{X_{\text{max}}} \right] X \quad (2)$$

where:  $\mu$  is the maximal specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ ) and  $X_{\text{max}}$  is the maximum (or equilibrium) biomass level, reached when  $\frac{dX}{dt} = 0$  for  $X > 0$ . The solution for Eq. 2 is the following:

$$X = \frac{X_{\text{max}}}{1 + Ce^{-\mu t}} \quad (3)$$

where:  $C = \frac{X_{\text{max}} - X_0}{X_0}$ ; and  $X_0$  is the initial biomass value.

Estimation of kinetic parameters in the previous equation was performed using a non-linear least square-fitting by the Solver routine (Excel, Microsoft). Conidia yield in terms of biomass ( $Y_{C/X}$ ) was estimated as conidia production divided by dry biomass weight. Productivity (P) was calculated dividing conidia production by harvesting time.

#### Virulence Bioassay

Conidia obtained at 156 h of culture in 21 and 26% oxygen atmospheres were assayed separately against adult *Tenebrio molitor* insects. The insects were immersed for three s in a 10-ml conidial suspension ( $1 \times 10^8$  conidia  $\text{ml}^{-1}$ ). A 0.01% Tween 80, conidia-free solution was used as a control. Experimental units consisted of Petri dishes containing 12 insects with oat flakes as food. These plates were kept at 28°C with a 12:12-h photoperiod. Bioassay was monitored for 7 days. Four replicas were made for each treatment. Mortality was recorded every 12 h, and dead insects were transferred to damp chambers in order to facilitate external sporulation and confirm death by fungal infection [6]. Time to reach 50% mortality ( $\text{LT}_{50}$ ) was estimated from plotting accumulated mortality

versus time. Data were modeled by an exponential decay function, as follows:

$$Y = (100 - S)e^{-k(t-t_0)} + S \quad (4)$$

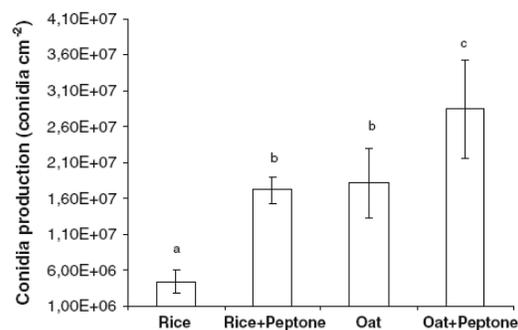
$Y = 100$ ; if  $0 \leq t \leq t_0$  where:  $Y$  is the survival percentage at time  $t$ ;  $k$  is the specific death rate ( $\text{days}^{-1}$ );  $t_0$  is the time delay for the first death to occur (d), and  $S$  is the estimated asymptotic survival level (%). This model corresponds to the solution of a first-order differential equation with the indicated time delay, the aforementioned initial condition, and the asymptotic value  $Y \rightarrow S$  for  $t \rightarrow \infty$  [21].

#### Statistical Analysis

The results obtained in this study were expressed as mean values  $\pm$  SD. Values were compared by a standard Student's test. Data for culture medium selection were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), using the Tukey least significant difference test at  $P < 0.05$ . Statistical analysis was done with the software NCSS.

## Results

Conidia production levels in different culture media are shown in Fig. 1. Production levels were different for every substrate after 7 days of incubation; however, oat flour media were the best substrates for conidia production. On the other hand, the addition of peptone as a nitrogen source favored a threefold



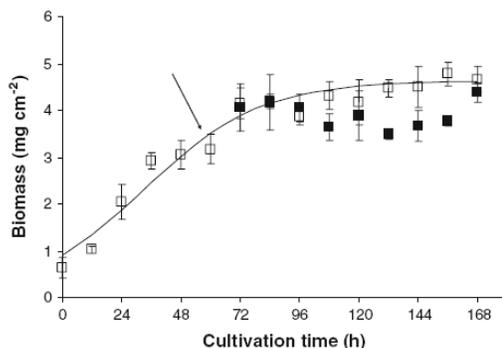
**Fig. 1** Conidia production by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* on simple rice or oat-based media and with addition of peptone. Columns with the same letter did not show significant differences ( $P < 0.05$ )

increase in conidia yield obtained on rice media; similarly, peptone enhanced 56% conidial yield on oat-based media.

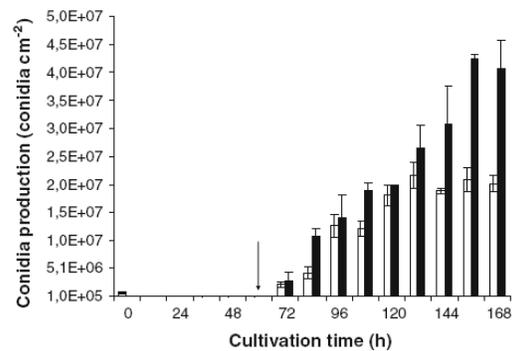
The growth profile of *M. anisopliae* var. *lepidiotum* is shown in Fig. 2. In the atmosphere containing 21% O<sub>2</sub>, the pre-stationary phase occurred after 60 h, corresponding to the point where normal atmosphere was modified in the parallel treatment, using 26% oxygen pulses. Logistical equation adjustments (2) were analyzed only for the normal atmosphere, since the 26% oxygen atmosphere was modified in the pre-stationary phase of growth (see Materials and Methods). Specific growth rate ( $\mu$ ) for the 21% O<sub>2</sub> atmosphere was  $0.04 \text{ h}^{-1} \pm 0.002$ .

Conidia production in both atmospheres is shown in Fig. 3. In the atmosphere at 26% O<sub>2</sub>, maximum production ( $4.25 \times 10^7$  conidia cm<sup>-2</sup>) was achieved after 156 h of culture, thus 96 h after oxygen pulses initiated. In terms of conidial production, this values represented a 100% increase compared to that obtained with normal atmosphere, and 10 times higher than production level achieved on rice flour medium (Fig. 1).

Table 1 shows growth parameters for *M. anisopliae* var. *lepidiotum* as well as conidia productivity at 156 h of cultivation. Maximum biomass was obtained in the normal atmosphere, while conidia production was greater as a result of oxygen-enriched pulses. Conidia yield in relation to biomass ( $Y_{C/X}$ ) was 2.6 times greater ( $1.12 \times 10^7$  conidia mg<sup>-1</sup> of dry biomass) in the 26% O<sub>2</sub> pulses, compared to the 21% O<sub>2</sub> atmosphere ( $0.43 \times 10^7$  conidia mg<sup>-1</sup> of dry



**Fig. 2** *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* biomass grown under normal atmosphere (open square) or modified atmosphere by pulses (26% O<sub>2</sub>) from the pre-stationary phase (filled square). Arrow shows initial time for atmosphere modification



**Fig. 3** *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidia production under normal (open square) or modified atmosphere by pulses (26% O<sub>2</sub>) from the pre-stationary phase (filled square). Arrow shows initial time for atmosphere modification

biomass). Similarly, conidia productivity (P) was almost double in the oxygen-rich atmosphere at the time of maximum production.

Table 2 shows conidial quality values such as germination (G) and relative hydrophobicity (H) for conidia harvested in the every atmospheric treatment. These parameters did not show significant difference ( $P < 0.05$ ) between the two atmospheres. Hydrophobicity of the conidial surface is other quality parameter linked to virulence of entomopathogenic fungi [20]. In our work, relative hydrophobicity was around 77%, independently from the atmosphere in which conidia were produced.

Bioassay parameters are also shown in Table 2, these include delay time ( $t_0$ ), specific death rate ( $k$ ), and time to reach 50% mortality (LT<sub>50</sub>). Data analysis confirmed that there were no significant differences between treatments for these parameters predicted by the model described earlier. Additionally, after 7 days of infection, a 100% mortality value ( $S = 0$ ) was obtained for *Tenebrio molitor* adults. The utility of the model presented in Eq. 4 was verified on data obtained by Wang et al. [15], even with *M. anisopliae* bioassays on *Manduca sexta* infected either by immersion or injection. These authors reported that when infected by immersion, larvae showed a LT<sub>50</sub> = 4.8 days; whereas, LT<sub>50</sub> value was 4.6 days when infection was via injection. These results were reproducible when data were adjusted using the model described, with a correlation coefficient of  $R^2 = 0.98$  (data not shown). Additionally, from the same set of data, values for  $t_0$  (4.06 and

**Table 1** Growth and conidia production parameters of *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* after 156 h of cultivation

Treatment	X (mg cm <sup>-2</sup> )	C (×10 <sup>7</sup> conidia cm <sup>-2</sup> )	Y <sub>C/X</sub> (×10 <sup>7</sup> conidia mg <sup>-1</sup> X)	P (×10 <sup>5</sup> conidia cm <sup>-2</sup> h <sup>-1</sup> )
21% oxygen	4.78* (±0.25)	2.08 (±0.21)	0.43 (±0.05)	1.33 (±0.13)
26% oxygen	3.78 (±0.18)	4.25* (±0.13)	1.12* (±0.03)	2.72* (±0.08)

Values with the asterisk mark in each column show significant differences ( $P < 0.05$ )

X = Dry biomass (mg cm<sup>-2</sup>)

C = Conidial production (conidia cm<sup>-2</sup>)

Y<sub>C/X</sub> = Conidia yield in relation to biomass (conidia mg<sup>-1</sup> X)

P = Productivity (conidia h<sup>-1</sup>)

**Table 2** Conidial quality parameters of *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum*. Bioassays were assayed on *Tenebrio molitor*

Treatment	G (%)	H (%)	t <sub>0</sub> (days)	k (days <sup>-1</sup> )	LT <sub>50</sub> (days)
21% oxygen	79.57 (±3.08)	77.18 (±2.70)	3.75 (±0.09)	1.26 (±0.22)	4.31 (±0.11)
26% oxygen	83.03 (±1.86)	77.21 (±2.57)	3.56 (±0.45)	2.20 (±0.76)	3.90 (±0.35)

Values in each column did not show significant differences ( $P < 0.05$ )

G = Germination percentage

H = Conidial surface hydrophobicity

t<sub>0</sub> = Delay time

k = Specific death rate

LT<sub>50</sub> = Time to reach 50% mortality

4.24 days) and  $k$  (0.959 and 1.59 days<sup>-1</sup>) were estimated, numbers in parenthesis represent values after infection through immersion or injection, respectively.

## Discussions

In a recent study by Prakash et al. [3], the use of yeast extract at low concentrations (0–0.5%) improved conidia production levels; however, optimal concentrations for *M. anisopliae* conidia production in different substrates such as rice, barley, and sorghum were 1.45, 2.21, and 1.54%, respectively. On the other hand, SDA (C/N = 35) was optimal for conidia production on superficial cultures of *M. anisopliae* V245 and V275 [6]. Issaly et al. [8] observed that at C/N = 1.6, high levels of *M. flavoviride* Mf189 (reassigned as *M. anisopliae* var. *acidum* as suggested previously [9]) blastospores were obtained in liquid cultures, using sucrose and yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively. In our results, conidia yields enhanced at low C/N values

after adding peptone to media based on rice and oat flour (C/N: 6.85 and 5.73, respectively), relative to the same carbon sources without peptone and higher C/N values (20.46 and 15.71, respectively).

Conidia production observed in this research agreed with a report [8], describing that in a submerged culture, the increase in dissolved oxygen caused a 20 times augment in blastospore production by *M. anisopliae* var. *acidum* (previously referred to as *M. flavoviride*). However, forced aeration did not favor *M. anisopliae* var. *acidum* conidia production [2] suggesting that air itself (21% O<sub>2</sub>) is not a determining factor in conidia overproduction. From our results, high oxygen concentrations (26%) favored conidia production in *M. anisopliae*, probably as a response to reactive oxygen species present under this atmosphere.

For *N. crassa*, it has been reported that glutathione and NADPH oxidation occur at the beginning of conidiation [13]. There are also reports showing that enzymes such as catalases occur differentially at the start of conidiation [22]. Results of the present study are in agreement with the hypothesis describing that

hyperoxidant states, such a higher oxygen concentration, stimulate cellular differentiation and conidiation in *N. crassa* [12].

In a study by Kamp and Bidochka [5], conidia production on the PDA was studied for the *M. anisopliae* isolates 2575, 54 A-1b, MAA1-2iii, and HAA2-2b. Productivities for the isolates were  $4.57 \times 10^5$ ,  $1.62 \times 10^5$ ,  $1.01 \times 10^5$ , and  $0.68 \times 10^5$  (conidia  $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ), respectively. In our results, comparable values were obtained in the oat medium containing peptone:  $1.33 \times 10^5$  and  $2.72 \times 10^5$  (conidia  $\text{cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ ) in the 21 and 26%  $\text{O}_2$  atmospheres, respectively.

Some authors show that nutritional factors affect conidia germination by *M. anisopliae* strains [6, 7]. For *M. anisopliae* grown at  $C/N = 35$ , even when high levels of conidia production are achieved, germination was lower than 47% [6]. Rangel et al. [7] found that on preferred carbon sources, high conidia levels are also achieved; however, these conidia showed low germination after being exposed to radiation by UV-B light, when compared with conidia obtained from non-preferred carbon sources, even when conidial yields were lower for the latter media. These arguments show that massive conidia production may diminish quality of infective units.

In terms of hydrophobicity, values ranging from 77.9 to 93.9% for *M. anisopliae* have been reported, although this variability was related to repeat culturing processes in artificial media [6]. Another factor affecting conidial hydrophobicity is the type of culture medium where conidia are collected from; for instance, for *Penicillium oxalicum*, the greatest hydrophobicity was observed when conidia were harvested from superficial cultures, compared to submerged cultures [23]. Culture environment affects the adhesion capacity of *M. anisopliae* conidia to their hosts, since modification of conidial carbohydrates may occur [19]. In this study, we succeeded in increasing conidia production through changes in atmosphere composition without affecting germination and hydrophobicity values in relation to the normal atmosphere.

As final remarks, the type of substrate affects conidia production, and presence of peptone in the culture media favors conidial yields. This report describes for the first time that an oxygen-enriched atmosphere enhanced conidia production by *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* with no effect on

quality parameters such as germination and hydrophobicity. Additionally, production of conidia in these 26%  $\text{O}_2$  atmosphere did not affect virulence on *Tenebrio molitor* adults.

**Acknowledgments** Tlecuitl-Beristain, S. (Reg. No. 117823) thanks the Mexican National Council for Science and Technology (CONACyT) for the scholarship. This study was financed by the Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa and Red PROMEP-Mexico. Authors wish to thank Dr. FJ. Fernández for his technical help in the molecular identification of the strain.

## References

1. Sun MH, Liu XZ. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathologia*. 2006;161:295–305.
2. Arzumanov T, Jenkins N, Roussos S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Process Biochem*. 2005;40:1037–42.
3. Prakash BGVS, Padmaja V, Kiran SRR. Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresour Technol*. 2008;99:1530–7.
4. Sun J, Fuxa JR, Henderson G. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Coptotermes formosanus* and in vitro. *J Invertebr Pathol*. 2002;81:78–85.
5. Kamp AM, Bidochka MJ. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercial available agars. *Lett Appl Microbiol*. 2002;35:74–7.
6. Shah FA, Wang CS, Butt TM. Nutrition influence growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol Lett*. 2005;251:259–66.
7. Rangel DEN, Anderson AJ, Roberts DW. Growth of *Metarhizium anisopliae* on non-preferred carbon sources yields conidia with increased UV-B tolerance. *J Invertebr Pathol*. 2006;93:127–34.
8. Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fargues J, Durand A. Influence of nutrient, pH and dissolved oxygen on the production of *Metarhizium flavoviride* Mf189 blastospores in submerged batch culture. *Process Biochem*. 2005;40:1425–31.
9. Driver F, Milner RJ, Trueman JWH. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res*. 2000;104:134–50.
10. Angelova BM, Pashova BS, Spasova KB, Vassilev VS, Slokoska SL. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycol Res*. 2005;109:150–8.
11. Belozerskaya TA, Gessler NN. Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*. 2006;75:427–31.
12. Hansberg W, Aguirre J. Hyperoxidant states cause microbial cell differentiation by cell isolation from dioxygen. *J Theor Biol*. 1990;142:287–93.

13. Toledo I, Rangel P, Hansberg W. Redox imbalance at the start of each morphogenetic step of *Neurospora crassa* conidiation. Arch Biochem Biophys. 1995;319:519–24.
14. Sowjanya Sree K, Padmaja V. Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. Toxicon. 2008;51:1140–50.
15. Wang C, Duan Z, St Leger RJ. MOS1 osmosensor of *Metarhizium anisopliae* is required for adaptation to insect hemolymph. Eukaryot Cell. 2008;7:302–9.
16. León-Santiesteban H, Bernal R, Fernández FJ, Tomasini A. Tyrosinase and peroxidase production by *Rhizopus oryzae* strain ENHE obtained from pentachlorophenol-contaminated soil. J Chem Technol Biotechnol. 2008;83:1394–400.
17. Bischoff JF, Rehner SA, Humber RA. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. Mycologia. 2009;101:512–30.
18. Samuels KDZ, Heale JB, Llewellyn M. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. J Invertebr Pathol. 1989;53:25–31.
19. Ibrahim L, Butt MT, Jenkinson P. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. Mycol Res. 2002;106:705–15.
20. Shah AF, Allen N, Wright JC, Butt MT. Repeated in vitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiol Lett. 2007;276:60–6.
21. Rodríguez-Gómez D, Loera O, Saucedo-Castañeda G, Viniegra-González G. Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. World J Microbiol Biotechnol. 2009;25:513–8.
22. Michán S, Lledas F, Baldwin JD, Natvig DO, Hansberg W. Regulation and oxidation of the large monofunctional catalases. Free Radical Bio Med. 2002;33:521–32.
23. Pascual S, De Cal A, Magan N, Melgarejo P. Surface hydrophobicity, viability and efficacy in biological control of *Penicillium oxalicum* spores produced in aerial and submerged culture. J Appl Microbiol. 2000;89:847–57.