



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología

**“Análisis de la relación entre el estrés oxidativo y la infectividad de
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.”**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

Presenta:

Paul Misael Garza López
Ingeniero Bioquímico Industrial y
Maestro en Biotecnología

Director:

Dr. Octavio Loera Corral

México, D. F.

Octubre de 2012

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

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México, D. F. Se contó con el financiamiento de la UAM-Iztapalapa, el CONACyT mediante el proyecto de Ciencia Básica 152420-Z y la Red Promep.

México, D. F., a 29 de Octubre de 2012

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

**Análisis de la relación entre el estrés oxidativo y la infectividad de
Beauveria bassiana (Bals.) Vuill.**

que presentó:

M. en B. Paul Misael Garza López

Comité Tutorial:

Director: Dr. Octavio Loera Corral, Universidad Autónoma Metropolitana

Asesora: Dra. Mina Konigsberg Fainstein, Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, Universidad Autónoma Metropolitana

Jurado:

Presidente: Dra. Mina Konigsberg Fainstein _____

Secretario: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz _____

Vocal: Dr. Roberto Montesinos Matías _____

Vocal: Dr. Saúl Tlecuítl Beristain _____

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana y al CONACyT por la beca otorgada (No. de Registro: 203464).

Al Dr. Octavio Loera Corral por su disposición para dirigir esta tesis, otorgándome incondicionalmente el apoyo, el estímulo y la libertad durante mi desarrollo académico.

A mis asesores, Dra. Mina Konigsberg Fainstein y Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz por sus valiosos consejos, sugerencias y asesorías. Asimismo al Dr. Roberto Montesinos Matías y al Dr. Saúl Tlecuil Beristain por sus aportaciones, recomendaciones e invaluable amistad.

A los colaboradores Dr. Wilhelm Hansberg, Dr. Pablo Rangel (IFC, UNAM); Dra. Aida Hamdan, Dr. Lino Mayorga, M. en C. Eva Calderón (UAM Xochimilco); Dra. Keiko Shirai, Dr. Alberto López (UAM Iztapalapa) por su disposición y asesoría.

A mis padres, Yolanda y Raúl por concederme la vida, por su constante y certera guía durante mi vida, por creer y confiar en mí, por su amor y por todo el apoyo que me han dado.

A toda mi familia por apoyarme y alentarme siempre.

A Josefa, que aunque ha sido breve la convivencia y compañía, me ha otorgado su amor, cariño, apoyo y serenidad.

A mis grandes amigos Jesús, Ismael, Teresa, Armando, Karina y Mónica por aconsejarme y por permitirme compartir innumerables experiencias.

A mis compañeros del posgrado Jazmín, Nohemí, Isadora, Alejandro, Francisco, Oscar, David, Eric, Ricardo y Ruth por su amistad, apoyo e incontables momentos memorables.

A todas las personas que han sido parte importante en mi vida y que han creído en mí.

A todos, MUCHAS GRACIAS!!!

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

RESUMEN

Los bioinsecticidas basados en hongos entomopatógenos (HE), como *Beauveria bassiana* han adquirido mayor importancia debido a los riesgos inherentes de los insecticidas convencionales. Asimismo, los bioinsecticidas pueden utilizarse dentro del Manejo Integrado de Plagas (MIP).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de pulsos de diferentes composiciones atmosféricas sobre la producción de conidios y parámetros de calidad e infectividad (hidrofobicidad, germinación, tiempo letal 50) de la cepa Bb 882.5 de *B. bassiana*. Una vez obtenidos dichos parámetros, se cuantificó la respuesta enzimática antioxidante (superóxido dismutasas, SOD; catalasas, Cat y peroxidasas, POX), así como la oxidación de biomoléculas (proteínas y lípidos). Asimismo, se determinó la concentración de solutos compatibles (trehalosa y manitol) y la expresión de los genes *mpd* y *mtd* que codifican para enzimas involucradas en la síntesis de manitol.

Se observó que bajo condiciones de hipoxia (16% O₂) la producción de conidios se incrementó 33% respecto a la atmósfera AN. Por otra parte, al modificar la atmósfera, todos los parámetros de calidad e infectividad de los conidios obtenidos disminuyeron, siendo más notable con las atmósferas enriquecidas con CO₂. Respecto a la respuesta enzimática antioxidante, se observó que la modificación de la concentración de O₂ provocó respuesta diferencial en la actividad de SOD, Cat y POX, mostrando los máximos de actividad de todas las enzimas entre los días 6 y 7 del cultivo y posteriormente la actividad decreció. Asimismo, la modificación atmosférica produjo mayor oxidación de lípidos, lo cual coincidió con el decremento de la actividad enzimática antioxidante. Lo anterior conlleva a establecer que los pulsos con 16% y 26% O₂ provocaron estrés oxidativo en *B. bassiana*, lo cual se reflejó en la calidad e infectividad de los conidios obtenidos con dichas atmósferas.

Con respecto a los solutos compatibles, la concentración de trehalosa disminuyó al menos 75% al modificar la concentración de O₂ con respecto a la atmósfera AN, mientras que la concentración de manitol se incrementó por lo menos al doble bajo las mismas condiciones. Adicionalmente, se observó que el incremento en la expresión del gen *mpd* debido a la modificación de la atmósfera está relacionado directamente con el aumento en la síntesis de manitol, ya que ambos parámetros aumentaron significativamente con respecto a AN.

Los resultados de este trabajo describen el efecto de la composición atmosférica sobre parámetros de calidad e infectividad, así como la respuesta antioxidante, el daño provocado en algunas biomoléculas y la respuesta en la biosíntesis de algunos solutos compatibles, complementado con la expresión diferencial del gen *mpd*, lo cual no se había descrito previamente para el HE *Beauveria bassiana*.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Control biológico	1
1.2. Hongos Entomopatógenos	3
1.2.1. Producción de Hongos Entomopatógenos	4
1.2.2. Ciclo Infeccioso de los Hongos Entomopatógenos	6
1.2.3. Descripción y Taxonomía de <i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo-Crivelli) Vuillemin	9
1.3. El Oxígeno y sus Efectos en los Hongos Filamentosos	11
1.3.1. Estrés Oxidativo	13
1.3.2. Solutos Compatibles	14
1.4. Cuantificación de la Expresión Diferencial de Genes	17
2. ANTECEDENTES	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2. Objetivos Particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Microorganismo	24
6.2. Cultivo en Medio Sólido (CMS)	24
6.3. Modificación Atmosférica	25
6.4. Obtención de Muestras	26
6.5. Producción de Conidios	26
6.6. Determinación de Parámetros de Calidad	26
6.6.1. Hidrofobicidad y Germinación	26
6.6.2. Bioensayo	28
6.7. Determinación de Estrés Oxidativo	30
6.7.1. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)	30

6.7.2. Actividad Catalasa (Cat)	30
6.7.3. Actividad Peroxidasa Total (POX)	31
6.7.4. Oxidación de Proteínas	32
6.7.5. Lipoperoxidación	32
6.7.6. Determinación Concentración de Trehalosa y Manitol	33
6.8. Análisis de la Expresión Diferencial de los Genes <i>mpd</i> y <i>mtd</i>	34
6.8.1. Aislamiento de RNA mensajero (mRNA)	35
6.8.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	35
6.8.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)	35
6.9. Análisis Estadístico	37
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1. Producción de Conidios	38
7.2. Parámetros de Calidad	43
7.2.1. Hidrofobicidad y Germinación	43
7.2.2. Bioensayo	45
7.3. Actividades Enzimáticas Antioxidantes	50
7.3.1. Actividad SOD	50
7.3.2. Actividad Cat	52
7.3.3. Actividad POX	54
7.4. Oxidación de Biomoléculas	57
7.4.1. Oxidación de Proteínas	57
7.4.2. Lipoperoxidación	59
7.5. Concentración de Trehalosa y Manitol	62
7.6. Expresión Diferencial de los Genes <i>mpd</i> y <i>mtd</i>	66
8. CONCLUSIONES	69
9. PERSPECTIVAS	70
10. BIBLIOGRAFÍA	71

ANEXOS	83
Anexo A. Curva Estándar para la determinación de Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)	83
Anexo B. Determinación de Concentración mediante la Ley de Beer-Lambert	85
Anexo C. Curva Estándar para la determinación Proteínas Oxidadas	86
Anexo D. Solución Reactiva para la determinación de Lipoperoxidación	88
Anexo E. Curva Estándar para la determinación de concentración de Trehalosa	89
Anexo F. Curva Estándar para la determinación de concentración de Manitol	91
Anexo G. Primers y Sondas utilizadas para qPCR	93
Anexo H. Normalización de los Valores de C_T mediante el Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura y composición de la cutícula de insectos y proceso infectivo de los hongos entomopatógenos.	8
Figura 1.2. Representación metabólica de las ROS.	12
Figura 1.3. Estructura de la trehalosa.	15
Figura 1.4. Ruta biosintética de la trehalosa (vía TPS/TPP).	15
Figura 1.5. A) Estructura del D-manitol; B) Rutas biosintéticas del manitol.	16
Figura 1.6. Principio de la sonda TaqMan TM .	18
Figura 6.1. A) Larva de <i>Tenebrio molitor</i> , B) Adulto de <i>Tenebrio molitor</i> , C) Cámara húmeda utilizada en bioensayo.	29
Figura 7.1. Cinéticas de producción de conidios de la cepa Bb 882.5 a diferentes atmósferas.	39
Figura 7.10. Concentración de manitol de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas.	64
Figura 7.11. A) Expresión relativa normalizada del gen <i>mpd</i> de la cepa Bb. 882.5. B) Concentración normalizada de manitol de la cepa Bb. 882.5.	67
Figura 7.2. Perfiles de sobrevivencia de adultos de <i>Tenebrio molitor</i> infectados con conidios de la cepa Bb 882.5 obtenidos a distintas atmósferas.	46
Figura 7.3. Perfiles de sobrevivencia de larvas de <i>Tenebrio molitor</i> infectados con conidios de la cepa Bb 882.5.	46
Figura 7.4. Actividad SOD de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas.	51
Figura 7.5. Actividad Cat de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas.	53
Figura 7.6. Actividad POX de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas.	55
Figura 7.7. Perfiles de oxidación de proteínas de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas.	58
Figura 7.8. Perfiles de oxidación de lípidos de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas.	60
Figura 7.9. Concentración de trehalosa de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas.	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Clasificación de algunos géneros de hongos entomopatógenos.	4
Tabla 1.2. Ejemplos de formulados comerciales de hongos entomopatógenos distribuidos en México.	6
Tabla 1.3. Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> según el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012).	10
Tabla 6.1. Mezclas gaseosas utilizadas para la modificación atmosférica.	25
Tabla 6.2. Volúmenes de los componentes de reacción de PCR.	36
Tabla 7.1. Rendimiento de conidios al octavo día de cultivo obtenidos bajo diferentes atmósferas.	40
Tabla 7.2. Porcentajes de hidrofobicidad y germinación de la cepa Bb 882.5 obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas.	44
Tabla 7.3. Parámetros de calidad de conidios de <i>B. bassiana</i> obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas.	47

LISTA DE ABREVIATURAS

16: Atmósfera con 16% O₂
16-5: Atmósfera con 16% O₂ y 5% CO₂
21-5: Atmósfera con 21% O₂ y 5% CO₂
26: Atmósfera con 26% O₂
26-5: Atmósfera con 26% O₂ y 5% CO₂
AN: Atmósfera Normal
ANOVA: Análisis de Varianza
Cat: Catalasas
CB: Control Biológico
cDNA: DNA complementario
CL: Cultivo Líquido
CMS: Cultivo en Medio Sólido
CO₂: Dióxido de Carbono
con/mL: Conidios por Mililitro
con/gssi: Conidios por g de Sustrato Sólido Inicial
C_T: Ciclo Umbral
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DNPH: 2-4-dinitrofenilhidrazina
DO_{ac}: Densidad Óptica de la Fase Acuosa
DO_{total}: Densidad Óptica Total
F-6-P: Fructosa-6-fosfato
FPP: Fructosa-6-fosfato Fosfatasa
Fig: Figura
G-6-P: Glucosa-6-fosfato
gpd: Gen que codifica para la enzima GPD
GPD: Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa
Gpx: Glutación Peroxidasa
H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno
HCl: Ácido Clorhídrico
HE: Hongos Entomopatógenos

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

IR: Índice de Refracción

ITS: Espaciadores Internos Transcritos

k: Velocidad Específica de Mortalidad de Insectos (d^{-1})

M-1-P: Manitol-1-fosfato

MDA: Malondialdehído

MIP: Manejo Integrado de Plagas

mpd: Gen que codifica para la enzima MPD

MPD: Manitol-1-fosfato Deshidrogenasa

MPP: Manitol-1-fosfato Fosfatasa

mRNA: RNA mensajero

mtd: Gen que codifica para la enzima MTD

MTD: Manitol Deshidrogenasa

μ g: Microgramos

μ M: Micromolar

na O: Nanoátomo de Oxígeno

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: Nanogramos

nm: Nanómetros

nmol: Nanomoles

nRIU: Nano-unidades de Índice de Refracción

O₂: Oxígeno Molecular

O₂⁻: Radical Anión Superóxido

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

POX: Peroxidasas Totales

PUF: Espuma de Poliuretano

qPCR: PCR cuantitativo o PCR en Tiempo Real

RNA: Ácido Ribonucleico

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

S: Porcentaje de Supervivencia de Insectos al final del Bioensayo (%)

SDA: Agar Sabouraud Dextrosa

SMA: Agar Sabouraud Maltosa al 2% modificado

SOD: Superóxido Dismutasas

SSU-rRNA: Subunidades pequeñas de RNA ribosomal

T-6-P: Trehalosa-6-fosfato

t_0 : Tiempo de Retardo de Inicio de Muerte de Insectos (d)

TBA: Ácido Tiobarbitúrico

TCA: Ácido Tricloroacético

tef: Gen que codifica para el factor Tef

Tef: Factor de elongación de traducción 1- α

TL₅₀: Tiempo en el que se alcanza 50% de mortalidad de Insectos

TPP: Trehalosa Fosfato Fosfatasa

TPS: Trehalosa Fosfato Sintasa

try: Gen que codifica para la enzima TRY

TRY: Enzima de Biosíntesis de Triptófano

U: Unidades Enzimáticas

UI: Unidades Enzimáticas Internacionales

Y: Porcentaje de Supervivencia de Insectos al tiempo t (%)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Control biológico

En los últimos años, se ha observado que los organismos nocivos para cultivos agrícolas de relevancia económica, tales como insectos y hongos, han adquirido resistencia a plaguicidas convencionales (Whalon *et al.*, 2008). Actualmente se tienen identificados alrededor de 10,000 especies de insectos que son plagas o patógenos de cultivos agrícolas (Whalon *et al.*, 2008). Sin embargo, la búsqueda de alternativas al uso de insecticidas se ha incrementado, debido a problemas de contaminación del medio ambiente y salud humana.

Una alternativa es el control biológico (CB), el cual se define como la utilización de parasitoides, depredadores y patógenos para mantener baja la densidad de organismos nocivos (Eilenberg *et al.*, 2001; Greathead y Waage, 1983). Existen alrededor de 2,000 especies de microorganismos entomopatógenos, entre los que se encuentran 750 especies de hongos, 100 especies de bacterias, 300 especies de protozoos y 1,000 virus (Candas y Bulla, 2003). La mayoría de estas especies son específicas para insectos y no causan daño colateral en organismos distintos. Asimismo, los casos de resistencia son raros y se pueden usar como parte del manejo integrado de plagas (MIP) (Barrera, 2007). El MIP se define como el uso de sistemas de control cuidadoso de plagas mediante enemigos naturales, combinados con diversas prácticas de producción de cultivos (Whipps y Lumsden, 2001).

Actualmente se utilizan dos estrategias de MIP:

- a) Utilizar los bioinsecticidas como productos que reemplazarán a los insecticidas químicos convencionales.
- b) Utilizar los bioinsecticidas elaborados con organismos endémicos de una zona en particular como parte de una estrategia ecológica de aumento de control natural de plagas en esa misma zona.

Una de las dificultades actuales que tiene el desarrollo de bioinsecticidas es la expectativa general de estos productos, ya que se considera que al sustituir un insecticida organosintético por un bioinsecticida, su función y aplicación debería ser similar. Sin embargo, debido a que los bioinsecticidas están formulados con organismos vivos, cada uno tiene propiedades que determinan la producción, formulación y uso potencial (Alatorre-Rosas, 2007; Barrera, 2007).

Adicionalmente, los procesos y las leyes de regulación en México afectan el desarrollo de dichos productos. Por una parte, en 2004 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el reglamento para obtener una certificación para el manejo, producción y comercialización de plaguicidas, incluyendo los bioinsecticidas. Posteriormente, en el 2005 y 2008 se publicaron la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y el Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, respectivamente, en los cuales se regula la liberación de este tipo de organismos. Lo anterior ha provocado el encarecimiento del registro de cepas microbianas y su posterior comercialización.

1.2. Hongos Entomopatógenos

Los hongos entomopatógenos (HE) son organismos heterótrofos, eucariontes, unicelulares o hifales, generalmente no móviles. Su reproducción es sexual y/o asexual (Alatorre-Rosas, 2007; Wraight *et al.*, 2007). Algunas especies de HE pueden ser específicas, sin embargo existen especies de amplio espectro. Las diferencias en la virulencia y patogenicidad entre especies y cepas de los HE se deben a muchos factores tales como la adherencia de las unidades infectivas a la cutícula de los insectos, la secreción de enzimas hidrolíticas, entre otros (Alatorre-Rosas, 2007; Zimmermann, 2007). Adicionalmente, el rango del hospedero es determinado por adaptaciones coevolutivas y afinidades entre un organismo patógeno y el hospedero (Fargues y Remaudiere, 1977).

La utilización de HE como compuestos activos de los bioinsecticidas presenta diversas ventajas, entre las que destacan que no son nocivos al ambiente, lo que evita daños colaterales, el control de plagas puede ser a largo plazo, tiene una relación beneficio/costo favorable, evita plagas secundarias, sustituye sustancialmente el uso de insecticidas químicos, entre otras (Barrera, 2007).

Dentro de los HE utilizados ampliamente a nivel comercial se encuentran *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill., *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin, *Isaria fumosorosea* (Wize) A.H.S. Br. & G. Sm., *Nomuraea rileyi* (Farl.) Samson, *Conidiobolus thromboides* (Drechsler), *Lecanicillium muscarium* (Petch) Zare & W. Gams, entre otros (Faria y Wraight, 2007). La mayoría de las especies de HE se encuentran clasificadas en las divisiones *Zygomycota* y *Ascomycota* del reino *Fungi* (Tabla 1.1) (Roy *et al.*, 2006).

Tabla 1.1. Clasificación de algunos géneros de hongos entomopatógenos.

División	Clase	Orden	Familia	Género
<i>Zygomycota</i>	<i>Zygomycetes</i>	<i>Entomophthorales</i>	<i>Entomophthoraceae</i>	<i>Entomophaga</i> <i>Entomophthora</i> <i>Erinia</i> <i>Eryniopsis</i> <i>Furia</i> <i>Massospora</i> <i>Strongwellsea</i> <i>Pandora</i> <i>Tarichium</i> <i>Zoophthora</i> <i>Neozygites</i>
<i>Ascomycota</i>	<i>Sordariomycetes</i>	<i>Hypocreales</i>	<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Beauveria</i> * <i>Cordyceps</i> <i>Cordycepioideus</i> <i>Lecanicillium</i> * <i>Metarhizium</i> * <i>Nomuraea</i>

Tomado de Roy *et al.* (2006). **Beauveria* y *Metarhizium*: Clavicipitaceae anamórfico con conexiones teleomórficas a *Cordyceps*; *Lecanicillium*: Clavicipitaceae anamórfico con conexiones teleomórfica a *Torrubiella*.

1.2.1. Producción de Hongos Entomopatógenos

El principal método utilizado para la producción de hongos filamentosos, incluidos los entomopatógenos, es el cultivo en medio sólido (CMS), que consiste en la utilización de un soporte sólido que funcione asimismo como sustrato (Feng *et al.*, 1994; Nuñez-Gaona *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2006). Sin embargo, es posible utilizar soportes inertes, como la espuma de poliuretano (PUF, por sus siglas en inglés), en los cuales el medio de cultivo líquido se halle embebido (Díaz-Godínez *et al.*, 2001; Montiel-González *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 1994).

El CMS presenta diversas ventajas para la producción HE. Primeramente, este tipo de cultivo asemeja las condiciones de crecimiento natural de los HE. Además, es posible controlar factores abióticos (temperatura, pH, entre otros) que favorezcan la

producción de dichos microorganismos. Asimismo, la actividad de agua (a_w) es menor, respecto al cultivo líquido (CL), lo que reduce el riesgo de contaminación. Finalmente en el CMS se obtiene mayor producción enzimática que en el CL (Pandey, 2003; Viniegra-González *et al.*, 2003).

En la producción de conidios de HE, los cuales son las principales unidades infectivas, deben ser considerados algunos factores importantes como la transferencia de calor en el sustrato, el intercambio gaseoso, las necesidades nutricionales de cada hongo, los factores abióticos y el tamaño de partícula del sustrato (Alatorre-Rosas, 2007; Saucedo-Castañeda *et al.*, 1990). En lo que respecta a los sustratos, es posible emplear sustratos naturales agrícolas o residuos agroindustriales. En este sentido, se ha desarrollado un sistema para la producción de conidios de *B. bassiana* a nivel de planta piloto utilizando arroz como soporte y sustrato (Ye *et al.*, 2006). Por otra parte, se han utilizado diversos subproductos como cascarilla de arroz, bagazo de caña y residuos de papa, o combinaciones de los mismos, para la producción de *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Arzumanov *et al.*, 2005; Dalla-Santa *et al.*, 2004, 2005; Kang *et al.*, 2005). De igual manera, se ha utilizado arroz pre-cocido para la producción de los mismos hongos (Garza-López, 2008; Neves y Alves, 2000). Recientemente, se realizó un estudio para la producción de *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* utilizando arroz pre-cocido en combinación con lirio acuático, el cual se empleó como texturizante (Angel-Cuapio, 2011).

Los formulados que contienen HE como compuesto activo comercializados en México, son fabricados por diversas empresas, tanto nacionales como extranjeras, así como por organismos o centros de investigación dependientes de los gobiernos estatales o federal (Tabla 1.2). Estas formulaciones se fabrican a base de conidios de los hongos, cada una se recomienda para hospederos específicos y deben ser asperjados para su aplicación (Tamez-Guerra *et al.*, 2001).

Tabla 1.2. Ejemplos de formulados comerciales de hongos entomopatógenos distribuidos en México.

Entomopatógeno	Producto
<i>B. bassiana</i>	Bea-Sin BotaniGard 22 WP BotaniGard ES Mycotrol-WP Mycotrol-O Mycotrol-ES Beuverina-CP Naturalis-L Fitosan-M
<i>M. anisopliae</i>	Bio-Fung Bio-Blast Meta-Sin
<i>I. fumosorosea</i>	Pea-Sin <i>P. fumosoroseus</i> PFR-97

Tomado de Faria y Wraight (2007) y Tamez-Guerra *et al.* (2001).

1.2.2. Ciclo Infeccioso de los Hongos Entomopatógenos

El ciclo infeccioso de los HE, pertenecientes a la división *Ascomycota*, se divide en una serie de eventos físicos y bioquímicos que determinan el éxito de la infección. La infección se puede dar a través de los sitios donde se encuentren condiciones de humedad alta de los hospederos (partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos), lo que promueve la germinación de las unidades infecciosas permitiendo la penetración de las hifas (Alatorre-Rosas, 2007; Roy *et al.*, 2006).

Los conidios son las unidades infecciosas más importantes en el ciclo infeccioso de los HE, por lo que el evento inicial es la unión de éstos a la cutícula de los insectos, mediante interacciones hidrofóbicas no específicas (Wösten, 2001). Dichas interacciones son atribuidas a la presencia de proteínas tipo hidrofobinas en la

superficie de los conidios (Boucias y Pendland, 1998; Jeffs et al., 1999), confiriéndole resistencia contra la deshidratación y facilitando su dispersión (Boucias *et al.*, 1988). Del mismo modo, la unión de los conidios puede lograrse mediante interacciones específicas debido a reconocimiento de moléculas como hemaglutininas, glucosa y N-acetilglucosamina (Hegedus y Khachatourians, 1995). Una vez establecida la unión de los conidios (bajo condiciones de humedad, temperatura y nutrición específicas), se comienzan a producir tubos germinativos los cuales se deslizan sobre la cutícula con la finalidad de localizar sitios receptores donde la hifa pueda penetrar al insecto (Fig 1.1). Asimismo, se forman apresorios que sirven de anclaje y además ejercen presión física sobre el exoesqueleto (Riquelme *et al.*, 1998; Wessel, 1999). Paralelamente, los HE producen enzimas que hidrolizan la cutícula, entre las que destacan proteasas (endoproteasas, aminopeptidasas, carboxipeptidasas, entre otras), quitinasas (endoquitinasas y exoquitinasas), lipasas, lipooxigenasas y esterases (Alatorre-Rosas, 2007; Charnley, 2003; Pucheta-Díaz *et al.*, 2006). Esta etapa está acompañada por diversas respuestas inmunes del hospedero tales como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (Zimmermann, 2007).

Posteriormente, el hongo prolifera hacia el interior del insecto formando cuerpos hifales secundarios, los cuales se ramifican penetrando en la procutícula y la capa epidérmica, hasta llegar al hemocele en donde se forman blastosporas, cuerpos hifales o protoplastos, lo que facilita la invasión de todas las estructuras del insecto (Deshpande, 1999; Pucheta-Díaz *et al.*, 2006, Zimmermann, 2007). Adicionalmente, algunos géneros de HE como *Beauveria*, *Metarhizium* e *Isaria*, producen toxinas dentro de la hemolinfa, tales como oosporeína, bassianina, tenellina, beauverina, destruxinas y ácido oxálico, lo que contribuye al debilitamiento de los insectos (Alatorre-Rosas, 2007; Khachatourians y Qazi, 2008; Zimmermann, 2007) (Fig. 1.1).

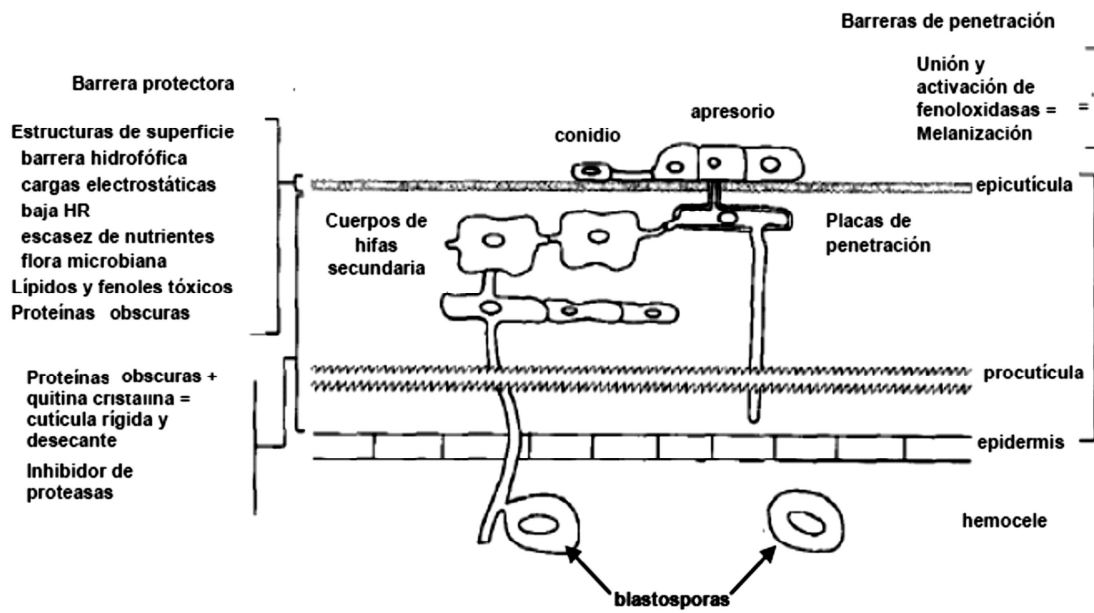


Figura 1.1. Estructura y composición de la cutícula de insectos y proceso infeccioso de los hongos entomopatógenos (modificado de Hajek y St Leger, 1994).

En esta etapa de la infección los individuos infectados presentan síntomas como falta de alimentación, debilidad, desorientación y cambio de color. Posteriormente, el hospedero muere debido a la combinación de diversos factores como la acción de las toxinas del hongo, obstrucción de la circulación de la hemolinfa, privación de nutrientes e invasión de órganos (Goettel y Inglis, 1997). Una vez que el insecto ha muerto, comienza la proliferación del hongo hacia el exterior a través de los segmentos más blandos de la cutícula hasta cubrir al insecto con una capa de micelio que produce conidios, facilitando su dispersión a través del aire o de forma pasiva por contacto con otros individuos, lo que constituye un nuevo foco de infección para la población. Los insectos enfermos o muertos se encuentran generalmente en el suelo (Butt y Goettel, 2000; Tefera y Pringue, 2003).

1.2.3. Descripción y Taxonomía de *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin

El HE *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin es un hongo filamentoso que produce micelio blanco o ligeramente amarillento (dependiendo de las condiciones del cultivo). Presenta hifas septadas de las cuales se ramifican los conidióforos (estructuras reproductivas), sobre los que se desarrollan los conidios que son unicelulares y transparentes (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999; Rehner, 2005; Romero-Machado, 1996).

Este microorganismo fue descrito por primera vez en 1835. Posteriormente en 1912 Vuillemin describió el género *Botrytis* asignándole el nombre de *Botrytis bassiana*. Dos años más tarde se modificó el nombre a *Beauveria bassiana* en honor a Jean-Jules Beauverie y Agostino Bassi, quienes estudiaron y describieron la enfermedad de la muscardina blanca (Vega y Blackwell, 2005). Asimismo, se ha reportado que este hongo tiene un amplio rango de insectos hospederos (alrededor de 700 especies), pertenecientes a los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Diptera, Hemiptera, Orthoptera, Siphonaptera, Isoptera, Thysanoptera, Mantodea, Neuroptera, Dermaptera, Blattariae y Embioptera (Zimmermann, 2007). Este hongo se encuentra distribuido ampliamente en todo el mundo y puede ser aislado de insectos y del suelo, ya que es parte de la microbiota (Boucias y Pendland, 1988). Adicionalmente es capaz de producir epizootias de manera natural en algunas poblaciones de insectos (Zimmermann, 2007).

Por otra parte, en términos de relación patógeno-hospedero, *Beauveria bassiana* es clasificado como patógeno facultativo, ya que es capaz de colonizar hospederos saludables y es capaz de sobrevivir fuera de éstos. Los microorganismos considerados como patógenos facultativos deben mostrar diversas características como virulencia débil, producción sencilla masiva *in vitro*, amplio rango de hospederos saludables, producir un solo tipo de conidios, tener capacidad de

colonizar el hemocele mediante blastosporas o hifas filamentosas, entre otras (Butt y Goettel, 2000).

Debido a que la reproducción de las especies de *Beauveria* es por medio de conidios, se han clasificado tradicionalmente como hongos hifomicetes asexuales u hongos imperfectos (Deuteromycetes). Sin embargo, estudios moleculares filogenéticos han relacionado a *Beauveria* con el género teleomorfo *Cordyceps* (Ascomycota: Hypocreales: Clavicipiteaceae) basado en el estudio de los espaciadores internos transcritos (ITS) (Huang *et al.*, 2002). Adicionalmente, la conexión anamorfo-teleomorfo se ha corroborado mediante análisis moleculares de pequeñas subunidades de RNA ribosomal (SSU-rRNA) (Rehner, 2005).

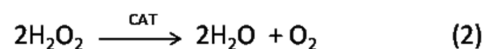
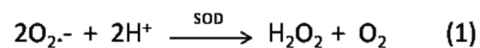
Tabla 1.3. Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana* según el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012).

Nombre	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.-Criv.) Vuill. 1912
Reino	Fungi
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Subphylum	<i>Pezizomycotina</i>
Clase	<i>Sordariomycetes</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Cordycipitaceae</i>
Género	<i>Beauveria</i> (<i>Cordyceps</i>)
Especie	<i>bassiana</i>

1.3. El Oxígeno y sus Efectos en los Hongos Filamentosos

Los microorganismos, tanto procarióticos como eucarióticos aerobios (dentro de los que se encuentra *Beauveria bassiana*), deben enfrentar los efectos tóxicos del oxígeno (O₂), ya que en ocasiones se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) debido al metabolismo celular, generados principalmente por fuga de electrones en la cadena respiratoria (complejos I y III), por acción de las NADPH oxidasas, entre otros (Konigsberg, 2008). Las ROS, tales como anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo, son altamente dañinos para los constituyentes celulares como DNA, lípidos y proteínas. Sin embargo, se ha encontrado evidencia de que estados oxidantes inducidos favorecen la citodiferenciación en *Neurospora crassa* (Aguirre *et al.*, 2005; Belozerskaya y Gessler, 2006) y en algunas especies de los géneros *Metarhizum*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Abrashev *et al.*, 2008; Gocheva *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2004).

Las células poseen mecanismos de defensa, tanto enzimáticos como no enzimáticos, para contrarrestar los posibles daños provocados por ROS. Dentro de los mecanismos enzimáticos se encuentran las superóxido dismutasas (SOD) y las catalasas (Cat) (Fig. 1.2) (Aguirre *et al.*, 2005; Fridovich, 1998). Primero el radical anión superóxido (O₂⁻) es convertido a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por acción de las SOD (reacción 1), posteriormente las Cat descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (reacción 2) como se muestra en el siguiente diagrama:



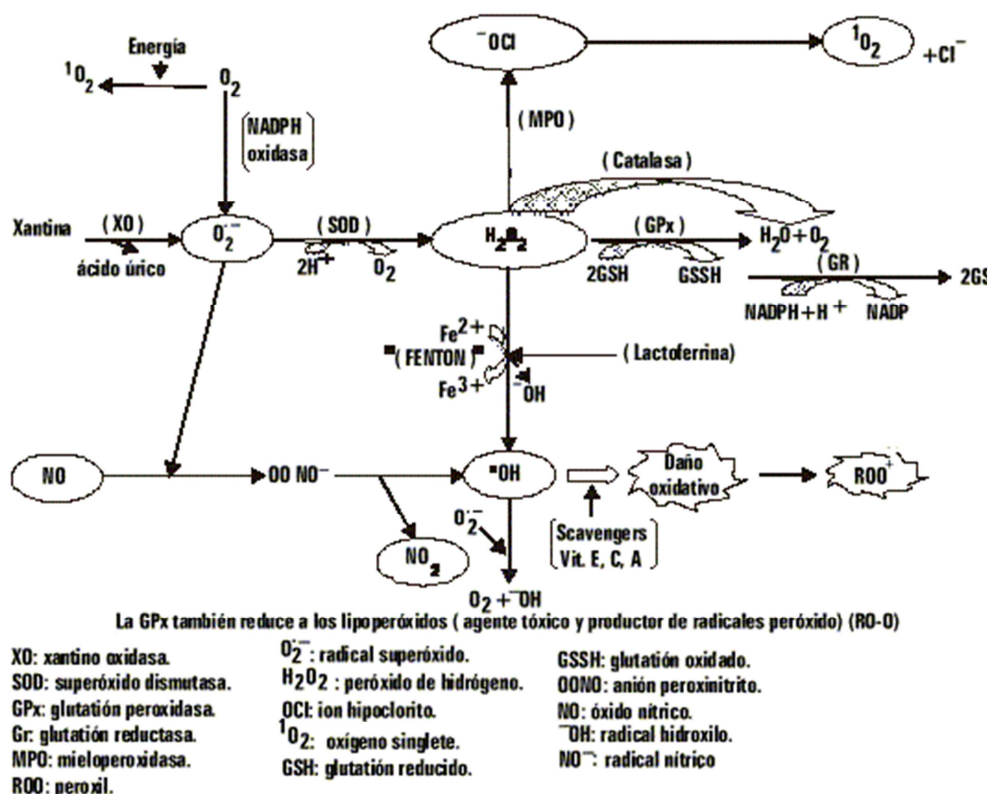


Figura 1.2. Representación metabólica de las ROS (tomado de Pérez-Gastel y Pérez de Alejo, 2000).

Asimismo, existen peroxidasas (POX) que utilizan diferentes moléculas como agentes reductores para descomponer el peróxido de hidrógeno, tales como las glutatión peroxidasas, L-ascorbato peroxidasas y peroxirredoxinas, entre otras (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2008; Peraza-Reyes, 2008).

Adicionalmente, se ha observado la expresión diferencial de varias isoenzimas de catalasas que se expresan en diferentes tiempos, compartimientos celulares y tipos de células en *N. crassa* y *Aspergillus nidulans*, siendo algunas inducidas mientras que otras se expresan de manera constitutiva (Aguirre *et al.*, 2005; Kawasaki y Aguirre, 2001).

En lo que respecta a los antioxidantes no enzimáticos, existen moléculas que secuestran a las ROS y así evitan posibles daños. Dentro de los principales antioxidantes se encuentran algunos carotenoides (β -caroteno, licopeno), el ácido ascórbico (vitamina C) (Machado de Almeida-Siqueira y Fernandes-Arruda, 2008 a y b), el α -tocoferol (vitamina A) (Saldaña-Balmori, 2008), los flavonoides (Díaz-Sobac, 2008) y algunos polioles (manitol, sorbitol, eritritol) (Hallsworth y Magan 1996; Smirnof y Cumbes, 1989).

Por otra parte, se sabe que el disacárido trehalosa protege algunas biomoléculas, como proteínas y lípidos, a diferentes tipos estrés (nutricional, térmico, oxidativo, entre otros). La función de la trehalosa es conferir estabilidad a dichas moléculas para prevenir su desnaturalización (Crowe *et al.*, 1984; Hallsworth y Magan, 1994, 1996; Singer y Lindquist, 1998).

1.3.1. Estrés Oxidativo

El estrés oxidativo se define como una situación de desequilibrio debido al aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes (Boveris *et al.*, 2008; Sies 1997). Este concepto implica hipotéticamente que el equilibrio debería ser estático; sin embargo, los oxidantes son producidos de manera continua como productos de la respiración y del metabolismo oxidativo, de hecho los antioxidantes se encuentran estrechamente relacionados con ellos. Asimismo, se ha demostrado que la respuesta antioxidante es adaptativa. A pesar de lo anterior, el concepto de estrés oxidativo ha sido aceptado para definir un desbalance que favorece el estado oxidado (Boveris *et al.*, 2008). Existen varias técnicas para determinar el estrés oxidativo en sistemas biológicos, ya sea midiendo los niveles de agentes oxidantes, intermediarios de las reacciones de oxidación, antioxidantes o productos de oxidación. En este sentido, para establecer la presencia de estrés, se recomienda comparar algunos de los parámetros mencionados (Boveris *et al.*, 2008; Pérez-Gastel y Pérez de Alejo, 2000).

Recientemente, se ha estudiado la respuesta al estrés oxidativo inducido por paraquat y H₂O₂ en algunos hongos filamentosos, y se observó que la producción de biomasa disminuyó debido a la presencia de los compuestos mencionados anteriormente; sin embargo, si se adicionaban SOD o Cat comerciales, la resistencia al estrés oxidativo aumentaba (Angelova *et al.*, 2005).

1.3.2. Solutos Compatibles

Los solutos compatibles son moléculas de bajo peso molecular que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular. Sin embargo, se ha demostrado que dichas moléculas son capaces de proteger a las células de diferentes tipos de estrés (incluido el oxidativo) (Crowe *et al.*, 1984; Smirnov y Cumbes, 1989). Los solutos compatibles están presentes en algunos hongos filamentosos como *Aspergillus nidulans* y en los entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* (Hallsworth y Magan, 1996; Ruijter *et al.*, 2003). La naturaleza de los solutos compatibles es muy variada ya que pueden ser azúcares como la trehalosa o polioles como el manitol.

La trehalosa es un disacárido no reductor de glucosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) (Fig. 1.3) presente tanto en procariontes como eucariontes. Inicialmente se consideraba como carbohidrato de reserva; sin embargo, dicha molécula puede funcionar como osmoprotector para proteínas y lípidos (Elbein *et al.*, 2003; Mascorro-Gallardo, 2005). De manera similar, se ha determinado que la trehalosa evita que las proteínas se desnaturalicen bajo condiciones de estrés térmico y oxidativo (Benaroudj *et al.*, 2001, Elbein *et al.*, 2003). El mecanismo de protección se logra mediante el reemplazo de las moléculas de agua debido la formación de puentes de hidrógeno con proteínas formando una cápsula, mientras que en el caso de los lípidos, el reemplazo del agua favorece la permanencia de la fluidez, evitando su fusión y el rompimiento de las membranas (Crowe *et al.*, 1984; Elbein *et al.*, 2003).

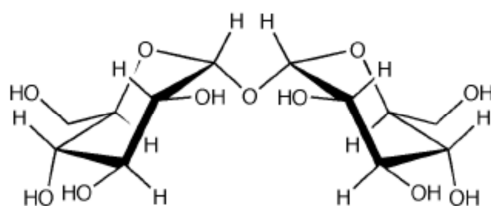


Figura 1.3. Estructura de la trehalosa (tomado de Elbein *et al.*, 2003).

La ruta biosintética de la trehalosa se conoce como vía TPS/TPP (Fig. 1.4). Dicha ruta comienza con la formación de trehalosa-6-fosfato (T-6-P) a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato (G-6-P) catalizada por la enzima trehalosa fosfato sintasa (TPS). Posteriormente, la T-6-P es desfosforilada por la enzima trehalosa fosfato fosfatasa (TPP) para formar trehalosa (Elbein *et al.*, 2003).

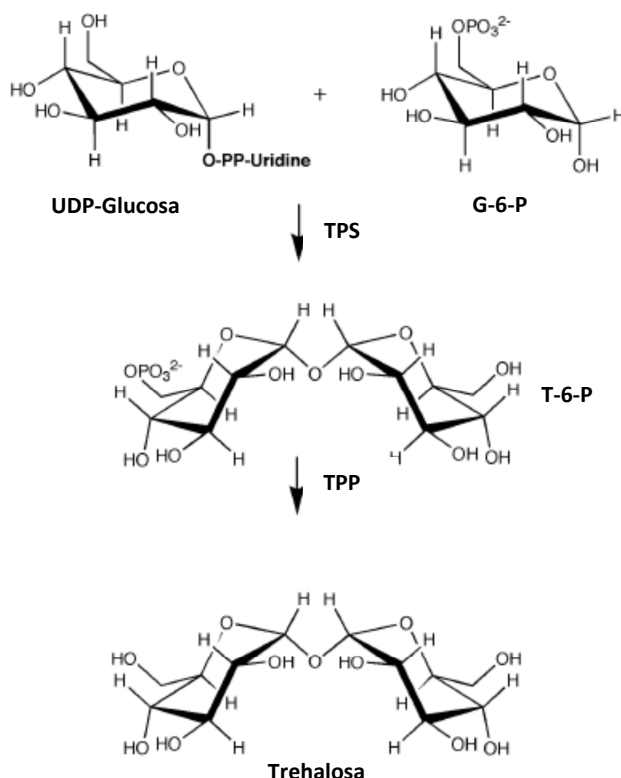


Figura 1.4. Ruta biosintética de la trehalosa (vía TPS/TPP).
 G-6-P: Glucosa-6-fosfato; T-6-P: Trehalosa-6-fosfato;
 TPS: Trehalosa fosfato sintasa; TPP: Trehalosa fosfato fosfatasa
 (modificado de Elbein *et al.*, 2003).

Existen algunos polihidroxicóholes (polioles), tales como manitol, sorbitol, eritritol, glicerol, capaces de proteger a las células del daño por las ROS. Asimismo los polioles están presentes en todos los organismos, desde bacterias hasta animales (Ruijter *et al.*, 2003). Sin embargo, es ampliamente conocido que estas moléculas funcionan como osmoprotectores celulares, así como fuente de reserva de carbono (Brown, 1976; Ruijter *et al.*, 2003). La capacidad antioxidante de los polioles se manifiesta de manera sencilla, ya que secuestra a las ROS (principalmente radicales hidroxilo), a diferencia de la trehalosa que se une a las biomoléculas (Smirnoff y Cumbes, 1989).

El manitol es un poliol derivado de la manosa (Fig. 1.5 A) el cual está presente en diferentes hongos, como *A. niger*, *A. oryzae* y *B. bassiana* (Hallsworth y Magan, 1996;). La biosíntesis de manitol se puede dar a partir de fructosa-6-fosfato (F-6-P) siguiendo dos posibles rutas (Fig. 1.5 B). La primera ruta involucra a las enzimas manitol-1-fosfato deshidrogenasa (MPD) y manitol-1-fosfato fosfatasa (MPP) teniendo como intermediario al manitol-1-fosfato (M-1-P) (ruta 1, Fig. 1.5 B). En la segunda ruta la F-6-P se desfosforila para formar fructosa y posteriormente se reduce para convertirse en manitol; las enzimas que catalizan dichas reacciones son la fructosa-6-fosfato fosfatasa (FPP) y la manitol deshidrogenasa (MTD) respectivamente (ruta 2, Fig. 1.5b) (Ruijter *et al.*, 2003).

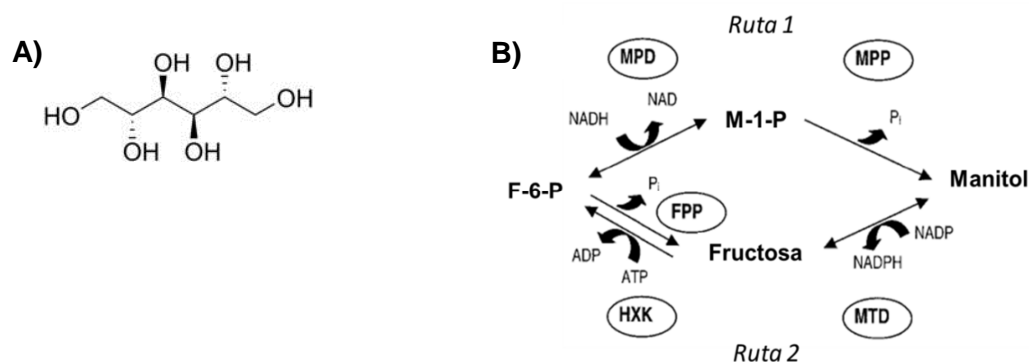


Figura 1.5. A) Estructura del D-manitol; B) Rutas biosintéticas del manitol. F-6-P: fructosa-6-fosfato; M-1-P: maltosa-1-fosfato; MPD: manitol-1-fosfato deshidrogenasa; MPP: manitol-1-fosfato fosfatasa; FPP: fructosa-6-fosfato fosfatasa; HXK: hexocinasa; MTD: maltosa deshidrogenasa (modificado de Ruijter *et al.*, 2003).

1.4. Cuantificación de la Expresión Diferencial de Genes

La cuantificación de la expresión genética ha adquirido mayor importancia en los últimos años permitiendo avances en investigación médica, microbiológica, forense y biotecnológica (Bustin *et al.*, 2005; Klein, 2002). En el caso de HE, esta actividad ha permitido el entendimiento de procesos importantes involucrados en su ciclo infectivo (Fang y Bidochka, 2006).

Una de las técnicas más usadas recientemente, y que ha adquirido gran popularidad, es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR). Dicha técnica también es conocida como PCR cuantitativa (qPCR). Su fundamento se basa en la cuantificación de productos de PCR en tiempo real. Dicha cuantificación de material nucleico (DNA, RNA) se determina mediante el aumento de fluorescencia, el cual es proporcional a la cantidad de DNA producido durante cada ciclo de PCR (Nolan *et al.*, 2006).

Primeramente, se debe aislar el material nucleico (generalmente RNA mensajero, mRNA), posteriormente se debe pasar por una fase de transcripción reversa (RT, por sus siglas en inglés) para obtener DNA complementario (cDNA) a las muestras de RNA obtenidas previamente. Finalmente, se realiza PCR para detectar la fluorescencia, la cual proviene de colorantes fluoróforos que se enlazan inespecíficamente al DNA amplificado (ej. SYBRTM Green) o de sondas (TaqManTM, FRET, entre otras) que se unen a productos de amplificación específicos. Dichas sondas pueden contener fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda (FAM, HEX, entre otros) (Bustin *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2006; Wong y Medrano, 2005).

Asimismo, ambos métodos de detección de fluorescencia implican la presencia de primers diseñados para los genes de interés. Sin embargo, el uso de sondas evita inespecificidad ya que se une a fragmentos complementarios (Qiagen™, 2010). Las sondas TaqMan™ contienen un fluoróforo adherido al extremo 5' y un extintor o quencher en el extremo 3' que evita que el primero emita fluorescencia (Fig. 1.6 A). Una vez que los primers y la sonda se unen a la secuencia objetivo en el proceso de PCR, la enzima Taq DNA polimerasa extiende el primer y al llegar a la sonda, ésta es fragmentada por la actividad 5'→3' exonucleasa de la enzima, liberando el fluoróforo el cual emite una señal que es fácilmente detectada (Fig. 1.6 B) (Qiagen™, 2010).

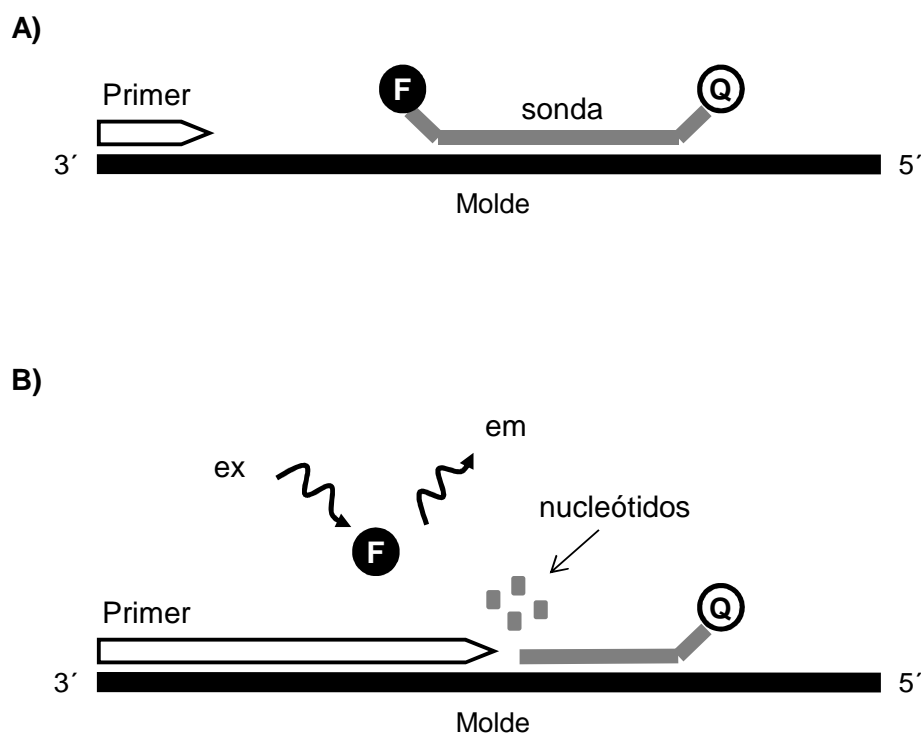


Figura 1.6. Principio de la sonda TaqMan™. A) Los primers y la sonda se alinean con el molde. La cercanía entre el fluoróforo y el quencher evita que se emita señal. B) Extensión de los primers por la enzima Taq DNA polimerasa; al alcanzar la sonda, la actividad 5'→3' exonucleasa de la enzima la fragmenta y se desprende el fluoróforo emitiendo una señal. F: fluoróforo; Q: quencher; ex: extinción; em: emisión (modificado de Qiagen™, 2010).

Existen dos tipos de cuantificación en tiempo real: (i) absoluta o cuantitativa, en el cual es posible cuantificar la concentración del material nucleico, utilizando una curva estándar obtenida mediante diluciones seriadas de concentraciones conocidas de muestra y (ii) cualitativa o relativa, en donde las diferencias de expresión de los genes de interés se comparan con uno o varios genes de referencia o “*housekeeping*”. Estos genes deben mantener su expresión constante bajo cualquier condición, siendo los más utilizados los que codifican para gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*), actinas, tubulinas, subunidades ribosomales, entre otros (Thellin *et al.*, 1999). En este sentido, se han evaluado algunos genes en diversas etapas del ciclo infectivo del HE *M. anisopliae* para determinar si pueden ser utilizados para dicho propósito (Fang y Bidochka, 2006), encontrando que los más estables en su expresión fueron *gpd*, *tef* y *try* (genes que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, el factor de elongación de traducción 1- α y la enzima de biosíntesis de triptófano, respectivamente), lo cual sugiere que estos genes pueden ser utilizados como referencia (*housekeeping*) para otros HE como *B. bassiana*.

2. ANTECEDENTES

El hongo *Beauveria bassiana* es uno de los principales organismos utilizados para la formulación de bioinsecticidas. Sin embargo, una de las limitantes para su producción es la diferencia en la virulencia entre lotes de conidios (Alatorre-Rosas, 2007). En este sentido, en el laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana se aisló una colección de mutantes de *B. bassiana* con el fin de obtener cepas más virulentas (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009).

En el estudio previo a esta investigación (Garza-López, 2008), se evaluó el efecto de diferentes atmósferas en la producción, calidad e infectividad de conidios de *B. bassiana*, al cultivarse en arroz pre-cocido, sobre adultos de *Tenebrio molitor*. Los resultados obtenidos mostraron que dichos parámetros disminuyeron al modificar la composición atmosférica. Sin embargo, la producción de amilasas se incrementó con bajo atmósferas enriquecidas con CO₂ (Garza-López *et al.*, 2011).

Dentro del mismo grupo de investigación, se determinó el efecto de una atmósfera enriquecida con O₂ (26%) en la producción de conidios e infectividad de *M. anisopliae* obtenidos en agar PDA (Tlecuítl-Beristain, 2010; Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010). Esta condición pro-oxidante incrementó la producción de conidios, mientras que la infectividad no se modificó. En el caso de CMS, se ha demostrado que la modificación de la aireación provocó respuestas diferenciales de producción en *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* utilizando arroz pre-cocido como sustrato y lirio acuático como texturizante (Angel-Cuapio, 2011). De manera similar, en cuanto a las atmósferas modificadas durante los bioensayos, se realizó un estudio en el cual se expusieron a larvas y adultos de *Tribolium castaleum* infectados con conidios de *B. bassiana* a una atmósfera modificada (5% O₂ y 40% CO₂), obteniendo incremento en la mortalidad debido a la modificación atmosférica (Lord, 2009).

Como se mencionó previamente, los estados oxidantes promueven la citodiferenciación de algunos hongos como *N. crassa* y *M. anisopliae* (Belozerskaya y Gessler, 2006; Tlecutil-Beristain *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha estudiado la respuesta al estado oxidante en diferentes hongos filamentosos, para lo cual se utilizó paraquat y H₂O₂ como inductores de estrés oxidativo (Angelova *et al.*, 2005), obteniendo que la producción de biomasa disminuyó al exponerlos a dichos agentes oxidantes. Adicionalmente, se ha encontrado que bajo condiciones de estrés debido por incremento o disminución de la temperatura, la actividad enzimática antioxidante se incrementó en algunas especies del género *Aspergillus* (Gocheva *et al.*, 2006, 2009).

Por su parte, Abrashev *et al.* (2008) encontraron una relación directa entre la presencia de proteínas oxidadas y trehalosa, así como en la actividad de las enzimas SOD y Cat, bajo condiciones de estrés térmico en *A. niger*. En este sentido, Benaroudj *et al.* (2001) observaron acumulación de trehalosa, así como disminución en la concentración de proteínas oxidadas como respuesta al estrés oxidativo inducido por choque térmico en *Saccharomyces cerevisiae*. Asimismo, se ha observado que los solutos compatibles que tienen mayor presencia en *B. bassiana* al modificar la temperatura son trehalosa y manitol (Hallsworth y Magan, 1996). En lo que respecta a las enzimas involucradas en la síntesis de manitol en *B. bassiana*, únicamente se ha caracterizado la enzima MPD (Wang *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que el estrés oxidativo inhibe el crecimiento de algunos hongos filamentosos como *Penicillium chrysogenum*, *P. roquefortii*, *Aspergillus niger*, y *A. oryzae*, incrementado la producción de SOD y Cat (Angelova *et al.*, 2005). Además, se ha establecido que el estado oxidante inducido favorece la citodiferenciación en algunos hongos filamentosos (Aguirre *et al.*, 2005; Belozerskaya y Gessler, 2006). Asimismo, se ha estudiado el efecto de la aireación en la producción de conidios e infectividad de *M. anisopliae* e *I. fumosorosea* utilizando CMS (Angel-Cuapio, 2011).

Sin embargo, hasta el momento, para hongos entomopatógenos, no se ha determinado si existe estrés oxidativo causado por la modificación de la composición atmosférica, tanto por la variación de O₂ como por el incremento de CO₂, este último es un producto del metabolismo que se acumula en las cámaras de cultivo sólido. En esta investigación, se estudió el efecto de distintas composiciones atmosféricas sobre la producción, calidad e infectividad de conidios de *Beauveria bassiana*, así como la correlación entre la actividad enzimática antioxidante (SOD, Cat y POX) y la oxidación de biomoléculas, como proteínas y lípidos. Por otra parte, se complementó el estudio sobre la respuesta a diferentes concentraciones de oxígeno determinando la concentración de trehalosa y manitol, así como la expresión los genes que codifican para las enzimas deshidrogenasas de las rutas biosintéticas del manitol (MPD y MTD).

4. HIPÓTESIS

La modificación atmosférica favorecerá la inducción del estado oxidante en *Beauveria bassiana*, afectando la producción y la calidad de los conidios, así como la respuesta antioxidante.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Evaluar las diferencias en la calidad de los conidios de *Beauveria bassiana* y la respuesta al estado oxidante bajo diferentes composiciones atmosféricas.

5.2. Objetivos Particulares

Comparar la influencia de la composición atmosférica sobre la producción, calidad e infectividad de los conidios de *Beauveria bassiana*.

Comparar el efecto de la composición atmosférica en la actividad enzimática antioxidantes de *Beauveria bassiana*.

Cuantificar el daño de proteínas y lípidos en *Beauveria bassiana* sometido a distintas atmósferas.

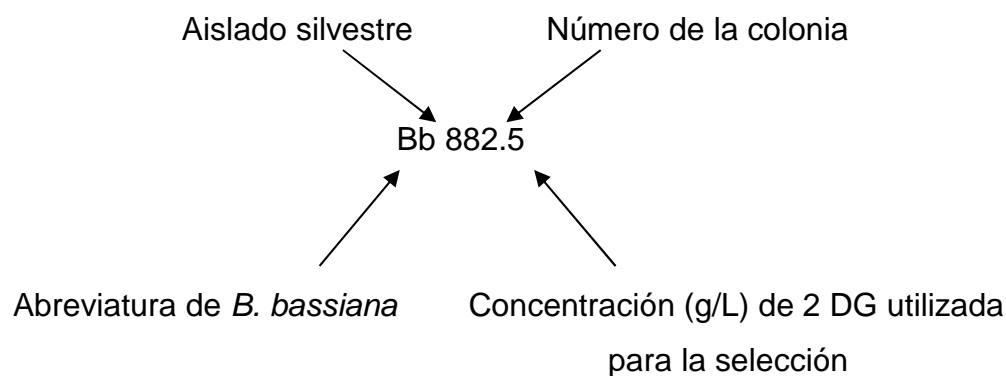
Determinar las diferencias en la concentración de solutos compatibles (trehalosa y manitol) como respuesta antioxidante.

Determinar las diferencias de expresión de los genes de síntesis de manitol por efecto de la concentración de oxígeno.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Beauveria bassiana* Bb 882.5 perteneciente a la colección de hongos del laboratorio de Enzimología de Hongos Filamentosos de la UAM-Iztapalapa, aislada previamente mediante un proceso de mutagénesis (Robledo-Monterrubio *et al.*, 2009). Esta cepa se propagó por estría en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de agar Sabouraud-Maltosa al 2% modificado (SMA) (agar 15g/L, maltosa 20 g/L, peptona de caseína 2.5 g/L, extracto de levadura 0.5 g/L, harina de avena 15 g/L) previamente esterilizados en autoclave a 15 PSI durante 15 min. Posteriormente se incubaron a $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 8 días con fotoperiodo 12:12 h (Garza-López, 2008; Montesinos-Matías, 2008). El significado de la nomenclatura de la cepa utilizada es la siguiente:



6.2. Cultivo en Medio Sólido (CMS)

Se utilizaron botellas serológicas de 75 mL como unidades experimentales, conteniendo 5 g de arroz pre-cocido, esterilizadas 15 min en autoclave a 15 PSI. Se preparó una suspensión de conidios adicionando 20 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05% a los matraces Erlenmeyer utilizados en la propagación. Posteriormente, se realizó un conteo de conidios en cámara de Neubauer, realizando

las diluciones necesarias, con Tween 80 al 0.05%, para obtener una concentración de 5×10^6 conidios por mL (con/mL). Finalmente se adicionó 1 mL de esta suspensión de conidios para obtener una concentración final de 1×10^6 conidios por g de sustrato sólido inicial (con/gssi), con la cantidad necesaria de una solución estéril de extracto de levadura (0.5 g/L) para obtener humedad inicial de 40% (Garza-López, 2008).

6.3. Modificación Atmosférica

Se utilizaron seis diferentes condiciones atmosféricas las cuales se enlistan en la Tabla 6.1, indicando cómo se nombrarán en este documento. Las mezclas gaseosas se adquirieron de la compañía Praxair-México S.A. Todos los experimentos comenzaron con una fase pre-estacionaria, donde a cada unidad experimental se colocó un tapón de algodón al inicio del cultivo. Al tercer día del cultivo se colocaron tapones de goma a las botellas destinadas a los tratamientos denominados 16 y 26, posteriormente se colocaron dos agujas, una para facilitar la salida de los gases y la segunda conectada al tanque que contenía la mezcla correspondiente con flujo de $20 \text{ cm}^3/\text{s}$ durante 1 min (Garza-López *et al.*, 2012; Tlecuítl-Beristain *et al.*, 2010). Los recambios gaseosos se realizaron a intervalos de 12 h. Las unidades experimentales se incubaron durante 8 d a $28^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ con un fotoperiodo 12:12 h, con tres repeticiones en cada tiempo de muestreo.

Tabla 6.1. Mezclas gaseosas utilizadas para la modificación atmosférica.

Atmósfera	[O ₂]	[CO ₂]
Atmósfera Normal (AN)	21%	--
16	16%	--
26	26%	--
21-5	21%	5%
16-5	16%	5%
26-5	26%	5%

6.4. Obtención de Muestras

Se recolectaron muestras de biomasa y conidios cada 24 h para lo cual se adicionaron 20 mL una solución de Tween 80 al 0.05% a las botellas serológicas y se agitaron durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo se depositó la solución final en tubos Falcon de 50 mL.

6.5. Producción de Conidios

Los conidios son las principales unidades infectivas del hongo entomopatógeno *B. bassiana*. Las cinéticas de producción de conidios se realizaron mediante conteo en la cámara de Neubauer. Las muestras de biomasa y conidios fueron filtradas en gasa para evitar que el micelio interfiriera en el conteo. La producción de conidios se reportó por g de sustrato seco inicial (con/gssi).

6.6. Determinación de Parámetros de Calidad

6.6.1. Hidrofobicidad y Germinación

Dos factores muy importantes en el ciclo infectivo de los hongos entomopatógenos son la adhesión de los conidios a la cutícula del insecto y la germinación de dichos conidios (Montesinos-Matías, 2008). Wösten (2001) encontró que la hidrofobicidad de los conidios favorece dicha adhesión; además, facilita la dispersión de las unidades infectivas y le proporciona resistencia a la deshidratación (Boucias, *et al.*, 1988). Para determinar la hidrofobicidad de los conidios, obtenidos en las diferentes composiciones atmosféricas, a los 8 días de cultivo se realizó el ensayo modificado de exclusión de fases utilizando n-hexadecano como solvente orgánico. Primero se centrifugaron las suspensiones de conidios obtenidos a 3000 x g durante 30 minutos a temperatura ambiente, en varios tubos Eppendorf de 2 mL con la finalidad de tener suficiente volumen para el análisis. A continuación se desechó el sobrenadante y se

realizó un lavado con agua destilada a 50°C; tanto la centrifugación como el lavado se realizaron dos veces. Posteriormente se realizó una tercera centrifugación bajo las mismas condiciones y se adicionó nitrato de potasio (0.1 M) 1:1 v/v para neutralizar la carga de la superficie de los conidios. Se estandarizaron las suspensiones de conidios a una concentración final de 1×10^7 con/mL. Posteriormente, se adicionó 1 mL de n-hexadecano a tubos de ensayo y se agregaron 3 mL de la suspensión de conidios, se agitaron los tubos durante 10 segundos y se dejaron reposar por 30 minutos para permitir la separación de fases. Finalmente, se recolectó la fase acuosa y se registraron los datos de densidad óptica (DO_{ac}) utilizando un espectrofotómetro a 660 nm (Beckman™ DU-640) (Shah *et al.*, 2007). La densidad óptica total (DO_{total}) se determinó con la suspensión de conidios inicial. La hidrofobicidad relativa se determinó utilizando una ecuación que describe la relación, expresada en porcentaje, entre los conidios hidrofóbicos que emigran a la fase orgánica y los que permanecen en la fase acuosa, la cual se muestra a continuación:

$$\text{Hidrofobicidad relativa (\%)} = 100 \left[1 - \left(\frac{DO_{ac}}{DO_{total}} \right) \right]$$

En lo que respecta a la determinación del porcentaje de germinación, se realizó al octavo día de cultivo. Para ello, se prepararon cámaras húmedas colocando un portaobjetos con un soporte de goma sobre papel filtro. En los extremos de cada portaobjetos se colocó una alícuota de agar-agua estéril (agar 15g/L) con la ayuda de una pipeta Pasteur. Finalmente, de una suspensión de conidios (1×10^3 con/mL) se adicionó una alícuota de 50 μ L sobre el de agar-agua ya solidificado y se adicionó 1 mL de agua destilada estéril al papel filtro de las cámaras húmedas. Pasadas 20 horas, se realizó el conteo al microscopio de por lo menos 100 conidios, registrando los conidios germinados y los no germinados, utilizando el objetivo 40X (Ibrahim *et al.*, 2002; Tlecuitl-Beristain *et al.*, 2010). Los conidios con tubo germinativo mayor a su diámetro fueron considerados como germinados (Safavi, *et al.*, 2007).

6.6.2. Bioensayo

El bioensayo con insectos es una técnica muy utilizada en la entomopatología en la cual los posibles insectos hospederos son infectados con algún microorganismo para determinar la virulencia o el rango de hospederos, entre otros parámetros, de los microorganismos patógenos (Butt y Goettel, 2000). Después de transcurrido el tiempo de CMS con atmósferas modificadas (Sección 6.3), se obtuvieron suspensiones de conidios de los diferentes tratamientos, para lo cual se agregaron 30 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% en cada botella serológica, se agitaron durante 10 minutos y posteriormente se estandarizaron las suspensiones a una concentración final de 1×10^8 con/mL. Los conteos se realizaron en cámara de Neubauer. Se seleccionaron adultos y larvas de *Tenebrio molitor* sanos (Fig. 6.1 A y B), de tamaño homogéneo formando grupos de 12 adultos así como de 10 larvas por cada caja de Petri de 90 mm, para conformar una unidad experimental, teniendo además 5 réplicas para cada tratamiento. Cada grupo de insectos fue sumergido en 30 mL de suspensión de conidios (3 segundos para adultos y 10 segundos para larvas) y depositado en una caja de Petri (Butt y Goettel, 2000; Eken *et al.*, 2006; Goettel e Inglis, 1997). Paralelamente, se hizo un tratamiento control, sumergiendo los insectos en 30 mL de Tween 80 al 0.05%, sin conidios. Se adicionó alimento estéril (avena, salvado de trigo 1:1 p/p) a todas las cajas. Finalmente las cajas de Petri se colocaron en una cámara húmeda, la cual consistió en una caja de plástico transparente con papel filtro humedecido con agua estéril y sellada con un pliego de plástico (Fig. 6.2 C). Las cajas se incubaron a 28°C con fotoperiodo 12:12 horas. Se mantuvo la cámara húmeda durante 3 días para promover la germinación de los conidios (Montesinos-Matías, 2008). Se realizaron observaciones todos los días y se registró el número de individuos muertos. Posteriormente los insectos muertos se depositaron en cámara húmeda para confirmar que la muerte de los insectos fue debido a micosis producida por conidios de *B. bassiana* (Tefera y Pringle, 2003).

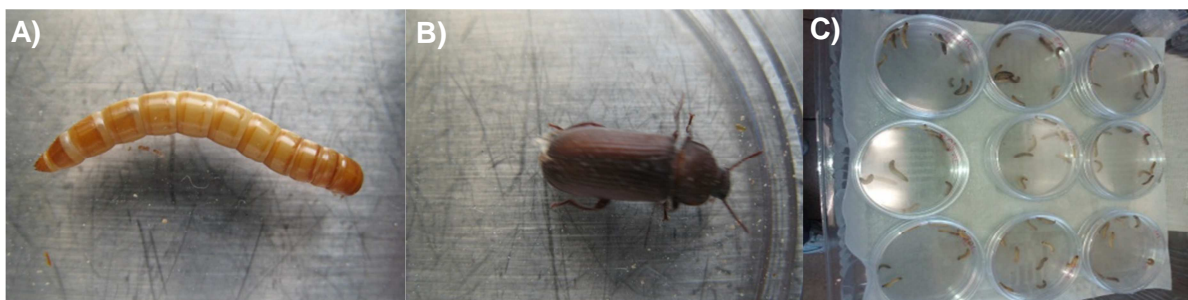


Figura 6.1. A) Larva de *Tenebrio molitor*, B) Adulto de *Tenebrio molitor*, C) Cámara húmeda utilizada en bioensayo.

El tiempo en el que se alcanza 50% de mortalidad (TL_{50}) en los grupos de insectos se determinó mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación que se muestra a continuación:

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

Donde:

k = Velocidad Específica de Mortalidad (d^{-1})

t_0 = Tiempo de Retardo de Inicio de Muerte (d)

S = Porcentaje de Sobrevivencia al final del Bioensayo (%)

Y = Porcentaje de Sobrevivencia al tiempo t (%)

La ecuación anterior es una función de decaimiento exponencial a partir del momento en que los insectos infectados comienzan a morir (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009). Los mejores ajustes de los datos experimentales se obtuvieron mediante el algoritmo Solver (Excel, Microsoft) (Garza-López, 2008; Montesinos-Matías, 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos en los bioensayos con larvas y adultos de *T. molitor* que se presentan posteriormente en la sección 7.2.2, se eligieron únicamente las tres condiciones atmosféricas que no contenían CO_2 para determinar la presencia de estrés oxidativo en *B. bassiana*.

6.7. Determinación de Estrés Oxidativo

Se determinaron actividades enzimáticas antioxidantes y oxidación de biomoléculas, en las diferentes condiciones atmosféricas experimentales, para lo cual se transfirieron 1.5 mL de la solución de biomasa y conidios (Sección 6.4) a tubos Eppendorf. Posteriormente, se agregaron perlas de zirconio (aproximadamente $\frac{1}{4}$ del volumen de la solución) y se agitaron vigorosamente durante 2 min en un Mini Bead-Beater-1 (Biospec Products™) a velocidad media. Finalmente se centrifugó por 1 min a 8000 x g (Biofug, Heraeus™). Se utilizó 1 mL del sobrenadante para las distintas determinaciones.

6.7.1. Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

Las superóxido dismutasas catalizan la dismutación del radical anión O_2^- en H_2O_2 y O_2 ; son las primeras enzimas antioxidantes que actúan en los organismos aerobios (Aguirre *et al.*, 2005; Gómez-Quiroz y Cuevas-Bahena, 2008). La actividad de estas enzimas fue medida con un kit comercial el cual se basa en la generación de un colorante de formazán, debido a la presencia de radicales O_2^- y ausencia de SOD, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (SOD determination Kit cat. # 19160, Sigma-Aldrich™). La absorbancia fue medida en un lector multimodal de placas DTX-880 (Beckman-Coulter™) a 440 nm. La unidad SOD fue definida de acuerdo a lo establecido en el protocolo proporcionado en el kit comercial. Asimismo, se realizó una curva estándar con SOD comercial (Sigma-Aldrich™) (Anexo A).

6.7.2. Actividad Catalasa (Cat)

Las catalasas son enzimas responsables de descomponer el H_2O_2 en agua y oxígeno; forman parte de los mecanismos antioxidantes enzimáticos de los organismos aerobios, incluso se han encontrado catalasas en organismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos (Aguirre *et al.*, 2005; Peraza-Reyes,

2008). La actividad de catalasa se midió por medio de la liberación de oxígeno utilizando un microelectrodo de Clark (Oxygen Monitor 53, YSI™) como se describió previamente (Kawasaki y Aguirre, 2001; Lledías *et al.*, 1998). Las muestras obtenidas (Sección 6.7) se concentraron previamente, para lo cual se adicionaron 2 mL de etanol, posteriormente se dejó reposar durante 2 h en hielo. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó por 1 min a 8000 x *g* (Biofug, Heraeus™) y el precipitado se resuspendió con 0.5 mL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.8). La reacción se inició al inyectar 5 μ L de concentrado enzimático en una cámara sellada que contenía 2 mL de una solución de H₂O₂ (10 mM) disuelto en buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.8). Los datos se obtuvieron mediante un graficador acoplado al microelectrodo. De la pendiente de la gráfica se obtuvo la cantidad de oxígeno atómico liberado expresado en nanoátomo de oxígeno (na O). Una unidad de catalasa se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un nanoátomo de oxígeno atómico por minuto (na O/min) bajo las condiciones de ensayo (Olivares-Jiménez, 1995).

6.7.3. Actividad Peroxidasa Total (POX)

Las peroxidasas son enzimas antioxidantes que degradan el H₂O₂ utilizando distintas moléculas como reductores, son complementarias pero menos eficientes que las Cat (Hansberg-Torres, 2008). La actividad POX se determinó mediante espectrofotometría, para lo cual se registró el incremento de la absorbancia, en un equipo Beckman™ DU-640 a 470 nm, debido a la formación de tetraguayacol (Mazhoudi *et al.*, 1997; Sowjanya-Sree y Padmaja, 2008). La mezcla de reacción contenía buffer de fosfato de potasio (25 mM, pH 7.0), H₂O₂ (10 mM), guayacol (9 mM) y muestra (Sección 6.7) para obtener un volumen final de 1 mL. Los volúmenes de muestra fueron variables (50-200 μ L). La concentración de tetraguayacol se determinó con el coeficiente de extinción molar (26.6/cm mM) (Anexo B). Una unidad internacional de peroxidasa fue definida como la cantidad de enzima necesaria para formar un μ mol de tetraguayacol por minuto bajo las condiciones de ensayo.

6.7.4. Oxidación de Proteínas

Las proteínas, así como otras biomoléculas, también pueden ser dañadas debido a las ROS, alterando su función o inactivándolas. Sin embargo, en algunos casos se pueden oxidar selectivamente para hacerlas funcionales. La oxidación de las cadenas peptídicas se puede dar a nivel de las cadenas laterales de los aminoácidos así como en el carbono α de la columna vertebral de las proteínas (Zentella y Piña, 2008). La oxidación de las proteínas se determinó utilizando un kit comercial (OxyELISA™ Oxidized Protein Quantitation Kit cat. # S7250, Millipore™), el protocolo incluye una derivatización previa de las proteínas oxidadas con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Posteriormente, mediante el principio de inmunodetección de ELISA se cuantificó la cantidad de grupos carbonilos producidos por ROS. Adicionalmente, se prepararon estándares de proteínas oxidadas y reducidas para construir una curva estándar como se indica en el manual proporcionado por el fabricante. Dicha curva estándar se presenta en el Anexo C. Los datos de densidad óptica fueron obtenidos de un lector multimodal de placas DTX-880 (Beckman-Coulter™) a 450 nm. Las proteínas oxidadas fueron expresadas como nanomoles de grupos carbonilos por miligramo de proteína (nmol carbonilos/mg proteína).

6.7.5. Lipoperoxidación

Las ROS alteran los lípidos de las membranas biológicas, generando compuestos tóxicos y alterando la fluidez y permeabilidad, asimismo afecta proteínas, enzimas, receptores y canales iónicos asociados a las membranas (Zenteno-Savin y Saldaña-Balmori, 2008). La lipoperoxidación se midió por colorimetría utilizando el método de malondialdehído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) (Buege *et al.*, 1978; Nair y Turner, 1984; Suttner *et al.*, 1997). Se colocaron las muestras (Sección 6.7) en tubos con rosca y se adicionaron 2 mL de solución reactiva (ácido tricloroacético, TCA; ácido tiobarbitúrico, TBA; ácido clorhídrico, HCl) (Anexo D). Posteriormente se incubaron

durante 30 min en agua hirviendo. Una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y se centrifugó en tubos Eppendorf durante 2 min a $8000 \times g$ (Biofug, Heraeus™). El sobrenadante fue extraído y se registraron los datos de densidad óptica a 535 nm en espectrofotómetro (Beckman™ DU-640). La concentración de MDA se determinó con el coeficiente de extinción molar ($1.56 \times 10^5/\text{cm M}$) (Anexo B). La lipoperoxidación se expresó como nanomoles de malondialdehído por miligramo de proteína (nmol MDA/mg proteína).

Las actividades enzimáticas antioxidantes (SOD, Cat y POX) así como la oxidación de biomoléculas (proteínas y lípidos) se expresaron por mg de proteína. La proteína soluble total se determinó por el método de Bradford (1976). La reacción consistió en adicionar 800 μL de muestra (Sección 6.7) y 200 μL de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich™). Transcurridos 5 min, se registró la absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro (Beckman™ DU-640).

Con la finalidad de validar las técnicas de determinación de actividades enzimáticas antioxidantes y oxidación de biomoléculas se realizaron experimentos con H_2O_2 (25mM).

6.7.6. Determinación Concentración de Trehalosa y Manitol

Existen moléculas denominadas solutos compatibles, tales como trehalosa y manitol, capaces de reducir el daño producido en hongos por distintos tipos de estrés (oxidativo, térmico, entre otros), así como por diferentes condiciones adversas como desecación y deshidratación (Abrashev *et al.*, 2008; Hallsworth y Magan, 1996; Liu *et al.*, 2009). Para la determinación de la concentración de trehalosa y manitol se realizaron curvas estándar con estándares de ambos solutos compatibles (Sigma-Aldrich™) (Anexos E y F). En lo que respecta al análisis de las muestras, se depositó 1 mL de la solución de biomasa y conidios de cada tratamiento (Sección 6.4) en tubos Eppendorf, los cuales fueron sometidos a un tratamiento de sonicación y baño

en agua hirviendo (2 y 5.5 min respectivamente) para extraer los solutos compatibles (Hallsworth y Magan, 1994). Posteriormente, los tubos fueron centrifugados en microfiltros de 0.5 μm (MilliporeTM) durante 5 min a 8000 x g (Biofug, HeraeusTM) para eliminar los residuos de proteínas. Finalmente, las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en una columna Aminex HPX-42A (Bio-RadTM) acoplada a un cromatógrafo Agilent 1260 el cual tiene una bomba cuaternaria, termostato para columna, automuestreador y detector de índice de refracción (IR). El tiempo de retención para trehalosa fue de 15.7 min, mientras que para manitol fue 21.5 min. La concentración de ambos solutos compatibles se expresó como miligramo de soluto (trehalosa o manitol) por miligramo de biomasa (mg soluto/mg biomasa). La biomasa se determinó por diferencia de peso seco en membranas de Nylon de 0.45 μm (MilliporeTM), las cuales se encontraban a peso constante. Se colocaron 5 mL de solución de biomasa y conidios (Sección 6.4) sobre las membranas. Posteriormente, se secaron en una estufa a 70°C durante 24 h y finalmente se registró la diferencia de peso. De acuerdo a los resultados obtenidos de dichos solutos compatibles (presentados en la Sección 7.5), se eligió estudiar la expresión diferencial de los genes que codifican para las enzimas deshidrogenasas de la ruta biosintética del manitol (manitol-1-fosfato deshidrogenasa, MPD; manitol deshidrogenasa, MTD) (Figura 1.5).

6.8. Análisis de la Expresión Diferencial de los Genes *mpd* y *mtd*

Una de las técnicas mayormente utilizadas para la cuantificación de la expresión genética es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real-Time PCR o qPCR). Las muestras fueron recolectadas en los días 3, 4 y 6 del cultivo, los cuales corresponden al inicio del recambio atmosférico, a las 24 h posteriores y al tiempo al cual la concentración de manitol fue considerablemente mayor, respectivamente (Sección 7.5).

6.8.1. Aislamiento de RNA mensajero (mRNA)

El mRNA es el material nucleico más utilizado para cuantificar la expresión genética mediante qPCR (Nolan *et al.*, 2006). Para el aislamiento de mRNA de las muestras se utilizó el reactivo TRIzol™. Inicialmente, las muestras fueron maceradas con nitrógeno líquido y posteriormente el procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen™). El mRNA aislado se almacenó a -20°C para su posterior manipulación.

6.8.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Una etapa clave para la cuantificación de la expresión genética es la síntesis de cDNA a partir del mRNA ya que le confiere mayor estabilidad a las muestras, lo que evita su degradación (Nolan *et al.*, 2006; Wong y Medrano, 2005). El cDNA se sintetizó utilizando un kit comercial (QuantiTect™ Reverse Transcription Kit cat. # 205311, Qiagen™) el cual contiene un buffer para eliminar DNA genómico, primers oligo-dT y primers al azar, así como la enzima transcriptasa reversa y un buffer diseñado para optimizar la reacción. Se utilizó 1 µg/µL de molde del mRNA aislado previamente (Sección 6.8.1) y el protocolo se realizó de acuerdo al fabricante. Una vez sintetizado el cDNA, se cuantificó su concentración y pureza en un equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) y se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración final de 100 ng/µL. El cDNA fue almacenado a -20°C

6.8.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR)

Una vez obtenido el cDNA se cuantificó la expresión diferencial de los genes *mpd* y *mtd* mediante la técnica de qPCR, para lo cual se eligió el gen que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*) como gen de referencia o “housekeeping” (Fang y Bidochka, 2006). Se utilizó un kit comercial para preparar las mezclas de reacción (Rotor-Gene™ Probe PCR Kit cat. # 204372, Qiagen™) que

contiene la enzima *Taq* Polimerasa, dNTP's y un buffer que contribuye a la optimización de la reacción. Asimismo, se diseñaron cebadores (primers) y sondas específicos para los genes *mpd*, *mtd* y *gpd* (Anexo G). Los volúmenes de los componentes de la reacción se enlistan en la Tabla 6.2. Por otra parte, se agregaron controles negativos que contenían todos los componentes excepto cDNA y controles positivos que contenían DNA aislado de la cepa silvestre de *B. bassiana* Bb 2693 perteneciente a la colección de hongos entomopatógenos del Servicio de Investigación Agrícola de Estados Unidos (ARSEF, por sus siglas en inglés) para comprobar la presencia de productos de amplificación.

Tabla 6.2. Volúmenes de los componentes de reacción de PCR.

Componente	Volúmen (μL)	Concentración
Buffer	6.0	1x
Mezcla de Primers y Sonda	1.0	0.4/0.2 μM
cDNA	0.5	50 ng
Agua	4.5	
Total	12	

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un paso de activación a 95°C por 3 min, seguido de 40 ciclos de 5 seg a 95°C y 15 seg a 60°C con detección de fluorescencia en el canal verde al final de cada ciclo. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett™). Los datos obtenidos de ciclo umbral o “cycle threshold” (C_T) fueron normalizados por el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001) (Anexo H).

6.9. Análisis Estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y todos los experimentos fueron realizados por triplicado a excepción del bioensayo que se efectuó por quintuplicado. Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer, con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$. Se utilizó el programa de cómputo de análisis estadístico SPSSTM para Windows versión 13 (SPSS Inc. Chicago. IL).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Producción de Conidios

Las cinéticas de producción de conidios obtenidas con las diferentes mezclas de O_2/CO_2 se presentan en la Figura 7.1. Como se puede observar, al octavo día de cultivo, la cantidad máxima de conidios se obtuvo con la atmósfera 16 (1.51×10^9 con/gssi) (Fig. 7.1 A), siendo significativamente distinto al resto de los tratamientos ($P < 0.05$), mientras que la menor producción obtenida fue con el tratamiento 21-5 (3.22×10^8 con/gssi) (Fig. 7.1 B, Tabla 7.1).

Por otra parte, el tiempo de máxima producción de conidios para las atmósferas AN, 16 y 26-5 fue al séptimo día de cultivo; sin embargo, para el resto de las atmósferas se alcanzó 24 horas después. Es importante mencionar que con el tratamiento 16 se incrementó 32% la producción de conidios con respecto a la atmósfera AN (1.51×10^9 y 1.14×10^9 con/gssi, respectivamente) (Tabla 7.1), mientras que con la atmósfera 21-5, el rendimiento de conidios fue tan solo 28% comparado con AN. Asimismo, durante los 2 días posteriores al inicio del recambio atmosférico, se observó al menos un incremento de 26% en la producción de conidios con todos los tratamientos, comparado con AN, excepto el tratamiento 21-5, el cual provocó que el rendimiento de conidios fuera menor durante el resto del tiempo de cultivo (Fig. 7.1 B).

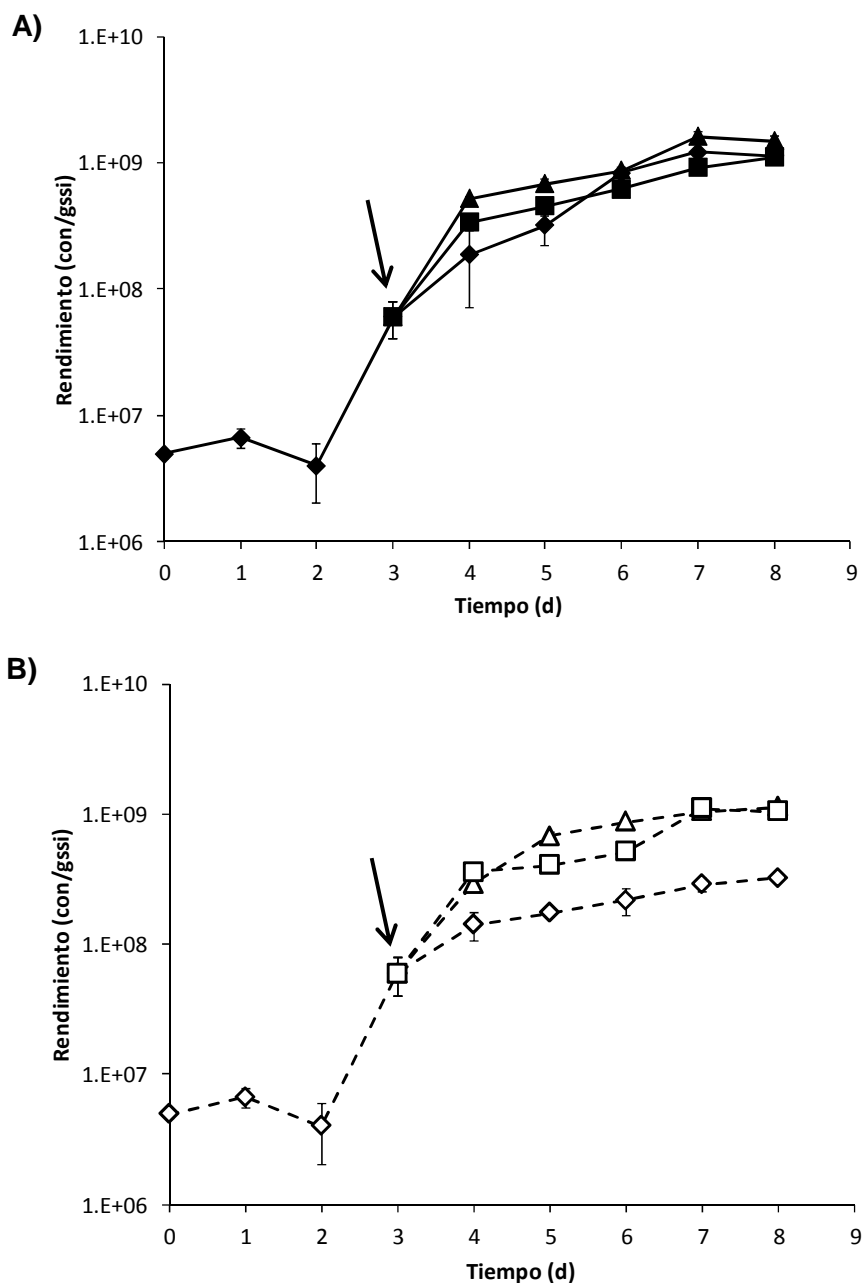


Figura 7.1. Cinéticas de producción de conidios de la cepa Bb 882.5 a diferentes atmósferas. A) Atmósferas sin dióxido de carbono, B) Atmósferas que contienen dióxido de carbono (5%) (◆ AN; ▲ 16% O₂; ■ 26% O₂; ◇ 21% O₂ 5% CO₂; △ 16% O₂ 5% CO₂; □ 26% O₂ 5%CO₂). Las flechas indican el inicio de la modificación atmosférica.

Tabla 7.1. Rendimiento de conidios al octavo día de cultivo obtenidos bajo diferentes atmósferas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Atmósfera	Rendimiento (10^9 con/gssi)
AN	1.14 \pm 0.02 b
16	1.51 \pm 0.13 c
26	1.11 \pm 0.07 b
21-5	0.32 \pm 0.02 a
16-5	1.14 \pm 0.07 b
26-5	1.04 \pm 0.03 b

El arroz pre-cocido ha sido utilizado previamente como sustrato para la producción de hongos entomopatógenos. De acuerdo con el estudio realizado por Ye *et al.* (2006), fue posible obtener rendimientos de conidios de *B. bassiana* en el mismo orden de magnitud. La diferencia radica en que los autores utilizaron cultivo bifásico. Asimismo, la producción máxima se alcanzó al sexto día de cultivo.

De manera similar, Grimm (2001) mencionó un proceso de producción de conidios de *B. bassiana* y *M. anisopliae*, el cual consistió en tres pasos: propagación en agar PDA sobre cajas de Petri, inoculación en matraces Erlenmeyer que contenían arroz pre-cocido y finalmente bolsas de polipropileno con el mismo sustrato. Los rendimientos de conidios obtenidos de *B. bassiana* fueron superiores respecto a los obtenidos en la presente investigación. Cabe destacar que todo este proceso tomó aproximadamente 30 días. En este sentido, se realizó un estudio para seleccionar diferentes cepas de *B. bassiana*, sobre el mismo sustrato y los rendimientos obtenidos máximos fueron de 2.7×10^9 con/gssi aunque no se menciona el tiempo del cultivo (Neves y Alves, 2000).

Por su parte, Kang *et al.* (2005) utilizaron una mezcla salvado de trigo y cascarilla de arroz como sustrato, depositados en un biorreactor, obteniendo rendimientos de 10^{10} con/gssi. Asimismo, se han utilizado distintos residuos agroindustriales tales como residuos de papa, bagazo de caña, residuos de café y salvado de trigo, así como combinaciones de ellos, para la producción de *B. bassiana* (Dalla-Santa *et al.*, 2005; Nuñez-Gaona *et al.*, 2010). La diferencia de rendimientos obtenidos en dichos estudios estuvo influenciado por diversos factores como el sustrato utilizado, el tiempo de cultivo, la a_w y el inóculo inicial.

En un estudio reciente (Tlecutil-Beristain *et al.*, 2010) se mostró que una atmósfera enriquecida con oxígeno (26%) duplicó la producción de conidios de *M. anisopliae*. Similarmente, se incrementó la producción de blastosporas de *M. anisopliae* en CL saturado con O_2 (Issaly *et al.*, 2005). Asimismo, se ha reportado que la aireación forzada afectó la conidiación de varios hongos entomopatógenos, ya que *Isaria fumosorosea* incrementó su producción mientras que con *M. anisopliae* se observó el efecto contrario, ambos hongos fueron inoculados arroz pre-cocido adicionado con lirio acuático como texturizante (Angel-Cuapio, 2011).

Por otra parte, algunos hongos filamentosos como *N. crassa* y *A. nidulans*, necesitan la generación metabólica de ROS, ya que éstos actúan como mecanismos de señalización en la diferenciación celular, además se activan los sistemas antioxidantes enzimáticos (Aguirre *et al.*, 2005; Belozerskaya y Gessler, 2006; Finkel y Holbrook, 2000). En este sentido, Angelova *et al.* (2005) desarrollaron un experimento donde indujeron estrés oxidativo en varias especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* por medio de moléculas altamente oxidantes (paraquat y H_2O_2); los resultados obtenidos mostraron disminución en el crecimiento y en la producción de biomasa de dichos hongos.

Respecto al efecto del CO₂ sobre el crecimiento de hongos filamentosos, se ha observado efecto inhibitorio en la producción de biomasa y enzimas de *A. niger* (McIntyre y McNeil, 1997, 1998). De manera similar, Smith y Ho (1985) sometieron a *P. chrysogenum* a concentraciones entre 3% y 5% de CO₂ lo cual no afectó la producción de penicilina ni la velocidad de crecimiento. Por su parte, Ikasari y Mitchell (1998) reportaron incremento en el tiempo de fermentación al usar concentraciones de CO₂ entre 8 y 16% con *Rhizopus oligosporus*. Asimismo, se ha demostrado que el CO₂ puede causar modificaciones en las membranas de hongos filamentosos, como variaciones de pH intracelular, modificación de la actividad de enzimas del metabolismo primario y cambios morfológicos (McIntyre y McNeil, 1998; Smith y Ho, 1985).

La producción de conidios de *B. bassiana* se afectó debido a los pulsos de diferentes atmósferas, siendo el tratamiento denominado 16 con el que se obtuvo mayor rendimiento, mientras las atmósferas que contenían CO₂ provocaron inhibición de producción de conidios.

7.2. Parámetros de Calidad

7.2.1. Hidrofobicidad y Germinación

Previo a la realización del bioensayo se determinaron los parámetros de hidrofobicidad y germinación, debido a que son considerados como indicadores de calidad en hongos entomopatógenos. Además, en este trabajo se pretendió evaluar cómo se afectan en función de la atmósfera. Como se menciona en la Tabla 7.2, los porcentajes de hidrofobicidad de los conidios obtenidos disminuyeron únicamente al modificar la atmósfera. Con el tratamiento AN se obtuvo el mayor porcentaje de hidrofobicidad (54.65%), el cual es significativamente distinto a los porcentajes obtenidos con el resto de las mezclas gaseosas ($P < 0.05$). Comparativamente, los valores de hidrofobicidad al modificar la composición atmosférica disminuyeron al menos 10% con respecto al tratamiento AN.

La hidrofobicidad es un factor muy importante que debe ser considerado en la formulación de un bioinsecticida ya que de esto depende que los conidios de los HE se adhieran a la cutícula de los insectos y que en las formulaciones comerciales se dispersen para su aplicación (Boucias y Pendland, 1998; Hegedus *et al.*, 1992). En estudios previos, se ha determinado la hidrofobicidad de conidios de cepas silvestres y mutantes de *B. bassiana* utilizando tolueno como solvente orgánico. Dicho experimento arrojó valores entre 60% y 100% de hidrofobicidad, dependiendo de la cepa, sin embargo, no se encontró correlación positiva entre este parámetro y las diferencias de infectividad (Montesinos-Matías, 2008).

Respecto a los porcentajes de germinación de los conidios, se observó un efecto similar al de hidrofobicidad, ya que los valores disminuyeron al menos 25% al modificar la atmósfera (Tabla 7.2). El máximo valor se obtuvo con el tratamiento AN, mientras que el menor se observó con la atmósfera limitada de O₂ y con exceso de

CO₂ (16-5) (92.67% y 42.67% respectivamente) siendo significativamente distintos ($P < 0.05$).

Se ha recomendado que la determinación del porcentaje de germinación en HE se realice entre 12 y 72 horas posteriores a la inoculación (Goettel e Inglis, 1997; Monzón, 2001). En estudios similares, se han reportado valores de germinación, medido a las 24 h, de distintas cepas de *B. bassiana* aisladas en diferentes países y propagadas en agar Sabouraud Dextrosa (SDA), obteniendo un intervalo entre 23% y 81% (Talaie-Hassanloui *et al.*, 2006). Por otra parte, Tlecuitl-Beristain *et al.* (2010), observaron que al aplicar pulsos de oxígeno (26%) a *M. anisopliae* los porcentajes de hidrofobicidad y germinación no fueron significativamente distintos a los valores obtenidos con una atmósfera normal (21% O₂). De manera similar, se ha estudiado el efecto de la aireación forzada, así como la adición de lirio acuático como texturizante sobre los parámetros de calidad de *M. anisopliae* e *I. fumosorosea*, obteniendo respuesta diferencial en los porcentajes de hidrofobicidad y germinación (Angel-Cuapio, 2011)

Tabla 7.2. Porcentajes de hidrofobicidad y germinación de la cepa Bb 882.5 obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada variable ($P < 0.05$).

Atmósfera	Hidrofobicidad (%)	Germinación (%)
AN	54.65 ± 0.57 c	92.67 ± 2.31 d
16	49.04 ± 3.75 b,c	64.33 ± 3.22 c
26	45.46 ± 1.08 a,b	68.33 ± 2.08 c
21-5	42.47 ± 4.17 a,b	52.67 ± 3.06 b
16-5	39.72 ± 2.71 a	42.67 ± 1.53 a
26-5	44.93 ± 2.68 a,b	52.67 ± 1.53 b

Es importante mencionar que los conidios de *B. bassiana* fueron más sensibles a las atmósferas que contenían CO₂ ya que con estos tratamientos se obtuvieron los menores porcentajes de hidrofobicidad y germinación. Adicionalmente, es posible establecer que las diferencias de estos parámetros son dependientes de diversos factores como medio de cultivo, método de medición y tiempo de cultivo.

7.2.2. Bioensayo

Una vez que se realizó el ajuste de los datos experimentales al modelo descrito en la sección 6.6.2 para determinar los parámetros de infectividad, se encontró que en el caso de adultos de *T. molitor* el parámetro TL₅₀ únicamente se alcanzó con las atmósferas AN y 26, los cuales son significativamente distintos entre sí ($P < 0.05$) (Fig. 7.2, Tabla 7.3). Por otra parte, los valores obtenidos para el parámetro k mostraron que con el tratamiento AN se obtuvo el valor máximo (5.59 d^{-1}), siendo significativamente distinto a los valores obtenidos con las atmósferas restantes ($P < 0.05$), lo cual sugiere que la muerte de los insectos infectados fue más rápida con conidios provenientes de la atmósfera AN.

En cuanto al parámetro t_0 , el menor tiempo en adultos se obtuvo con la atmósfera 26-5 (2.06 d) mientras que el mayor tiempo se alcanzó con la atmósfera 16 (5.68 d) presentando diferencias significativas entre ellos ($P < 0.05$). Respecto al parámetro S , cabe señalar que el único tratamiento que provocó que todos los adultos de *T. molitor* infectados murieran fue AN, aun cuando con la atmósfera 26 se alcanzó TL₅₀, no se alcanzó el 100% de mortalidad de los insectos infectados con los conidios obtenidos bajo éste tratamiento (Fig. 7.2, Tabla 7.3). Adicionalmente, con la atmósfera denominada 16, se observó el mayor porcentaje de sobrevivencia (77.1%). Lo anterior indica que el incremento en los valores de dicho parámetro, debido a la modificación la composición atmosférica, se reflejó en la disminución de la infectividad de los conidios obtenidos con los diferentes tratamientos.

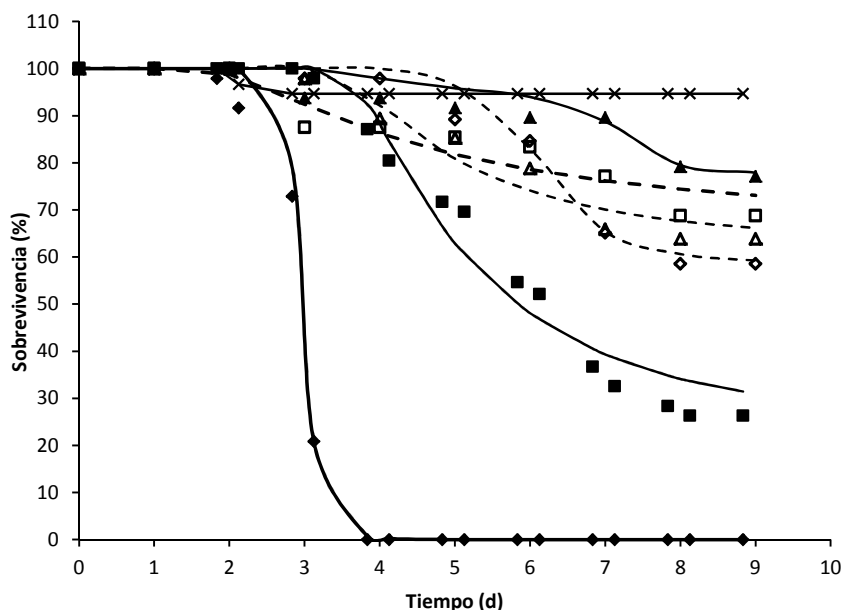


Figura 7.2. Perfiles de sobrevivencia de adultos de *Tenebrio molitor* infectados con conidios de la cepa Bb 882.5 obtenidos a distintas atmósferas. Los puntos representan los promedios y las líneas representan el ajuste al modelo utilizado. (◆ AN; ▲ 16% O₂; ■ 26% O₂; ◇ 21% O₂ 5% CO₂; △ 16% O₂ 5% CO₂; □ 26% O₂ 5%CO₂; X Control).

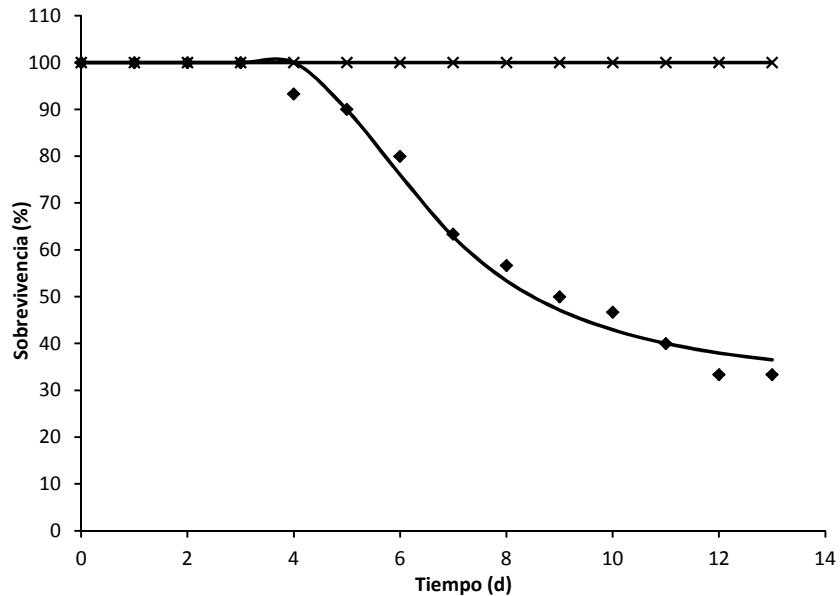


Figura 7.3. Perfiles de sobrevivencia de larvas de *Tenebrio molitor* infectados con conidios de la cepa Bb 882.5. Los puntos representan los promedios y las líneas representan el ajuste al modelo utilizado. (◆ AN; X Control).

Tabla 7.3. Parámetros de calidad de conidios de *B. bassiana* obtenidos bajo diferentes composiciones atmosféricas. Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada variable ($P < 0.05$).

Atmósfera		TL ₅₀ (d)	k (d ⁻¹)	t ₀ (d)	S (%)
Adultos	AN	2.95 ± 0.07	5.59 ± 2.09 b	2.81 ± 0.1 a	0.0 ± 0.0 a
	16	---	3.43 ± 2.92 a,b	5.68 ± 1.46 b	77.08 ± 7.98 d
	26	6.14 ± 1.14	0.52 ± 0.08 a	3.63 ± 0.27 a	26.25 ± 12.04 b
	21-5	---	1.18 ± 0.35 a	5.30 ± 0.77 b	58.52 ± 5.72 c
	16-5	---	0.53 ± 0.09 a	3.51 ± 0.38 a	63.82 ± 3.93 c,d
	26-5	---	0.33 ± 0.14 a	2.06 ± 0.42 a	68.75 ± 7.98 c,d
Larvas	AN	8.60 ± 1.84	0.42 ± 0.19	4.89 ± 0.88	32.5 ± 5.00

Por otra parte, se pudo observar que la modificación de la atmósfera tuvo un efecto más acentuado sobre larvas, ya que la atmósfera AN fue la única que provocó mortalidad en los insectos (Fig. 7.3, Tabla 7.3). Este efecto se puede atribuir al proceso de ecdisis de las larvas o a las diferencias metabólicas e inmunológicas entre larvas y adultos (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

En estudios realizados previamente, se evaluaron los parámetros de infectividad de *B. bassiana*, propagado en diversos medios artificiales, sobre adultos de *T. molitor*. Los resultados obtenidos muestran valores de TL₅₀, *k* y *t*₀ similares a los obtenidos en esta investigación, sin embargo, el porcentaje de sobrevivencia no superó 3% (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009). Estos mismos autores utilizaron larvas del mismo insecto obteniendo disminución en todos los parámetros mencionados anteriormente. Dichas diferencias se pueden atribuir al efecto de los sustratos y aislados utilizados (Montesinos-Matías, 2008; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2009).

Recientemente, Tlecuítl-Beristain *et al.* (2010) al utilizar adultos de *T. molitor*, no encontraron diferencias significativas en los parámetros de infectividad de *M. anisopliae* al someterlo a pulsos de 26% O₂ con respecto a condiciones normóxicas.

Asimismo, se ha evaluado la infectividad de *B. bassiana* y *M. anisopliae* variando la relación C/N de los medios de cultivo (Safavi *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2005). En dichos estudios únicamente se reportan valores de TL_{50} dentro del rango de 2 a 12 d. Por su parte, Montesinos-Matías *et al.* (2011), evaluaron la relación entre la infectividad de varias cepas de *B. bassiana* y los perfiles enzimáticos involucrados en el ciclo infectivo de dicho hongo. Los resultados obtenidos mostraron por una parte diferencias inherentes a las cepas en los parámetros TL_{50} , k , t_0 y S , además la correlación entre la infectividad y la producción de enzimas que degradan la cutícula fue notoria para las cepas más agresivas. Adicionalmente, Lord (2009) estudió la eficacia de *B. bassiana* para controlar plaga de *Tribolium castaneum* aplicando una atmósfera con O_2 reducido y CO_2 incrementado (5% y 40% respectivamente) posterior a la infección del hospedero, lo cual contribuyó al incremento en la mortalidad de los insectos infectados. Por otra parte, se observó incremento en la infectividad sobre *T. molitor* al utilizar conidios de *M. anisopliae* sometidos a pulsos de O_2 y CO_2 (21-5) (Tlécuil-Beristain, 2010). Lo anterior contrasta con los resultados obtenidos con *B. bassiana* en este estudio.

Las diferencias de infectividad entre HE son inherentes a los microorganismos aun cuando se utilizó el mismo insecto hospedero. Además, es necesario mencionar que no es posible realizar comparaciones más estrictas debido a que se utilizan diferentes modelos para obtener los parámetros de infectividad.

Previamente, se ha determinado que el CO_2 provoca diversos efectos en hongos filamentosos, tales como alteración de la fluidez de las membranas, así como la actividad de las proteínas asociadas (McIntyre y McNeil, 1998; Roth, 1980). Esto podría estar relacionado con el decremento en la infectividad y calidad de *B. bassiana* encontrado en este trabajo (Secciones 7.2.1 y 7.2.2). Otro efecto del CO_2 posiblemente asociado a la disminución de los parámetros de calidad e infectividad de *B. bassiana* es la alteración síntesis enzimática o la inhibición de las mismas (Dixon y Kell, 1989), lo cual podría afectar a enzimas involucradas en el ciclo

infectivo de los hongos entomopatógenos como quitinasas y proteasas. Asimismo, se ha observado que al incrementar el CO₂ (5%) la frecuencia de ramificación y la formación de micelio aumentaron en *P. chrygenum* y *A. niger* (McIntyre y McNeil, 1998), lo cual probablemente explicaría la disminución en la producción de conidios de *B. bassiana* mostrada previamente (Sección 7.1).

La respuesta de *B. bassiana* a la modificación atmosférica es muy sensible en cuanto a parámetros de calidad e infectividad ya que al modificar la composición atmosférica, dichos parámetros disminuyeron significativamente, siendo más notable con las atmósferas enriquecidas con CO₂, lo cual se reflejó en la mortalidad de los insectos. Es importante señalar que el incremento en la producción de conidios de *B. bassiana* no implicó tendencia similar en la calidad e infectividad de los conidios (Secciones 7.1 y 7.2). Hasta ahora, no se han encontrado reportes donde se haya evaluado el efecto de diferentes composiciones atmosféricas sobre la producción de conidios de HE, así como el impacto en la calidad de los mismos.

Debido a los resultados presentados en esta sección se eligieron las atmósferas que no contenían CO₂ para la determinación de estrés oxidativo, con la finalidad de explicar la disminución en los parámetros de calidad e infectividad de *B. bassiana*, teniendo como primer criterio el tratamiento al cual no se modificó la atmósfera (AN). El siguiente criterio se basó en el parámetro S, eligiendo las atmósferas con las que se obtuvieron el mayor valor de dicho parámetro (16% O₂) y un valor intermedio (26% O₂), respectivamente. Finalmente, se descartaron los tratamientos enriquecidos con CO₂ para evitar posibles interferencias.

7.3. Actividades Enzimáticas Antioxidantes

7.3.1. Actividad SOD

Las SOD son las primeras enzimas antioxidantes que actúan para eliminar las ROS producidas por estados oxidantes. La Figura 7.4 muestra las cinéticas de actividad de dichas enzimas en *B. bassiana*, en la cual se puede observar que se alcanzó la máxima actividad al sexto día de cultivo con la atmósfera 16, mientras que para el tratamiento 26, el máximo se alcanzó 24 h después. Sin embargo, con la atmósfera AN la máxima actividad se alcanza al día 4, aunque posteriormente, se observa una fluctuación en la actividad.

En los días finales del cultivo se puede observar que debido a la modificación de la atmósfera la actividad de dicha enzima se incrementó al menos 25% con respecto al tratamiento AN. Al octavo día de cultivo, la mayor actividad se alcanzó con la atmósfera 16 (30.21 U/mg proteína) siendo significativamente distinta a la actividad registrada con la atmósfera AN (21.68 U/mg proteína) ($P < 0.05$). Adicionalmente, se pudo observar que dichas condiciones atmosféricas mostraron tendencias similares en la actividad SOD de *B. bassiana* durante el periodo de cultivo.

La respuesta antioxidante de hongos filamentosos ha sido evaluada previamente. Miller *et al.* (2004) sometieron al hongo entomopatógeno *M. anisopliae* a estrés por radiación UV, observando que la actividad SOD no se modificó en las diferentes etapas de desarrollo del hongo ni al exponerlo a diversas dosis de radiación. Por otra parte, se ha encontrado incremento en la actividad de esta enzima al exponer a diferentes especies de *Penicillium* a bajas temperaturas (Gocheva *et al.*, 2006, 2009). También se ha observado incremento en la actividad SOD en *Aspergillus niger* bajo condiciones de estrés térmico (Abrashev *et al.*, 2008). Similarmente, Angelova *et al.* (2005) encontraron que en algunos hongos pertenecientes de los géneros *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, entre otros, se incrementó la actividad SOD cuando se indujo

estrés oxidativo con paraquat. Además, se ha observado que la SOD cuyo sitio activo contiene manganeso (MnSOD) contribuye a la resistencia a estrés oxidativo en *B. bassiana* (Xie *et al.*, 2010). Estos resultados coinciden con los obtenidos en *B. bassiana* en la presente investigación, ya que se incrementó la actividad SOD debido a la modificación atmosférica en los días finales del cultivo (Fig. 7.4).

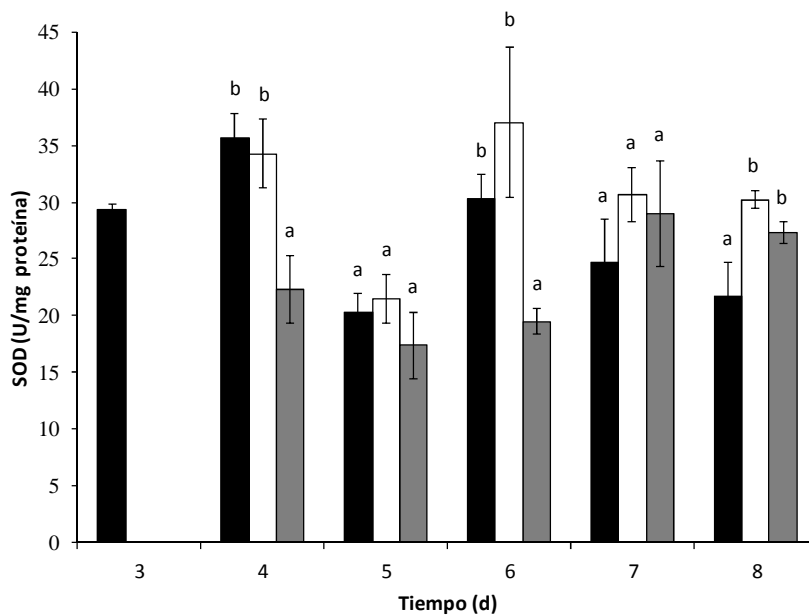


Figura 7.4. Actividad SOD de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas. (■ AN; □ 16% O₂; ▒ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día (P < 0.05).

7.3.2. Actividad Cat

Los perfiles de actividad Cat se muestran en la Figura 7.5, en la cual se observa un máximo de actividad para todos los tratamientos. Una vez alcanzado el valor máximo de actividad, ésta tiende a disminuir. Como se puede observar, en los tratamientos AN y 16, el máximo se alcanza al sexto día de cultivo, mientras que el tratamiento denominado 26, se alcanza al siguiente día. Después de ocho días de cultivo, la mayor actividad se obtuvo con el tratamiento AN, mientras que el menor valor se observó con la atmósfera 16 (12.67 y 1.18 U/mg proteína, respectivamente) siendo significativamente distintos ($P < 0.05$). Por otra parte, cabe mencionar que en los últimos días de cultivo, se observó una disminución acentuada en la actividad debido a la modificación atmosférica.

Previamente, se ha estudiado el efecto de diferentes tipos de estrés sobre la actividad Cat en hongos filamentosos. Abrashev *et al.* (2008) encontró que la actividad de esta enzima aumentó en *A. niger* cuando fue cultivado a temperaturas superiores a 30°C. Un efecto similar se observó en diversas especies de *Penicillium* con la diferencia que el estrés fue producido por bajas temperaturas (Gocheva *et al.*, 2006). Referente a estrés oxidativo, se ha observado que al adicionar H₂O₂, la actividad Cat de diferentes especies de hongos filamentosos se incrementó, sin embargo, dicho incremento fue dependiente del microorganismo y la cepa estudiada (Angelova *et al.*, 2005).

En lo que respecta a hongos entomopatógenos, se encontró que los patrones de isoenzimas de *M. anisopliae* se modificaron dependiendo de la edad del cultivo cuando se sometió a radiación UV (Miller *et al.* 2004). Asimismo, se ha reportado que la sobreexpresión de Cat en el mismo hongo entomopatógeno redujo el tiempo de germinación e incrementó la patogenicidad sobre *Plutella xyostella* (Morales-Hernandez *et al.*, 2010).

Los resultados de este trabajo muestran variaciones en la actividad Cat debido a la modificación de la concentración de O₂, sugiriendo que la respuesta en la actividad de dicha enzima es inherente tanto al microorganismo como a las condiciones de cultivo. Por otra parte, el efecto de los pulsos de O₂ provocó variaciones más acentuadas en la actividad de esta enzima.

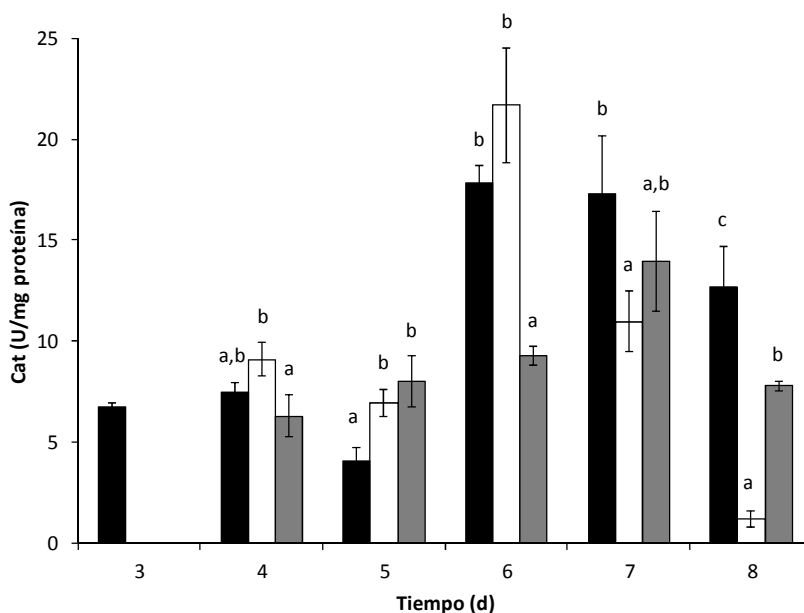


Figura 7.5. Actividad Cat de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas. (■ AN; □ 16% O₂; ▒ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día (P < 0.05).

7.3.3. Actividad POX

La actividad de POX obtenida de *B. bassiana* al someterlo a diferentes concentraciones de oxígeno se muestra en la Figura 7.6. Como se puede observar, la modificación atmosférica provocó disminución al menos de 56% en la actividad POX (día 4), sin embargo, se observó un efecto similar con el tratamiento AN. Asimismo, una vez que se alcanzaron los valores máximos de actividad, éstos disminuyeron en los días finales del cultivo. Adicionalmente, para los tratamientos AN y 16, los valores máximos de actividad se registraron al día 6, mientras que para el tratamiento denominado 26 se observó 24 h después. Al octavo día, la mayor actividad se alcanzó con la atmósfera 26 (5.10 UI/mg proteína) siendo significativamente distinta a la actividad observada con la atmósfera AN (0.90 UI/mg proteína) ($P < 0.05$).

Es importante notar que aunque la actividad fue mayor al día 6 con la atmósfera pobre en O_2 , respecto al resto de los tratamientos, no se mantuvo esta diferencia hasta el final del cultivo, ya que como se mencionó previamente, la atmósfera enriquecida de O_2 fue superior en los días finales del cultivo. Cabe destacar que la metodología utilizada permitió determinar la actividad conjunta de varios tipos de peroxidasas.

En un estudio realizado por Muthukumar y Nachiappan (2010), se observó que la actividad enzimática antioxidante, incluyendo la enzima glutatión peroxidasa (Gpx), se incrementó al someter a *S. cerevisiae* a estrés oxidativo inducido por cadmio. Asimismo, se ha demostrado en el mismo microorganismo, que la Gpx2 está relacionada con el proceso de esporulación. Similarmente, Xu *et al.* (2011) observaron incremento en la actividad SOD, Cat y POX del hongo basidiomiceto *Agaricus bisporus* cuando fue expuesto a metales pesados como cadmio, zinc y cobre, corroborando la inducción por estrés de estas enzimas.

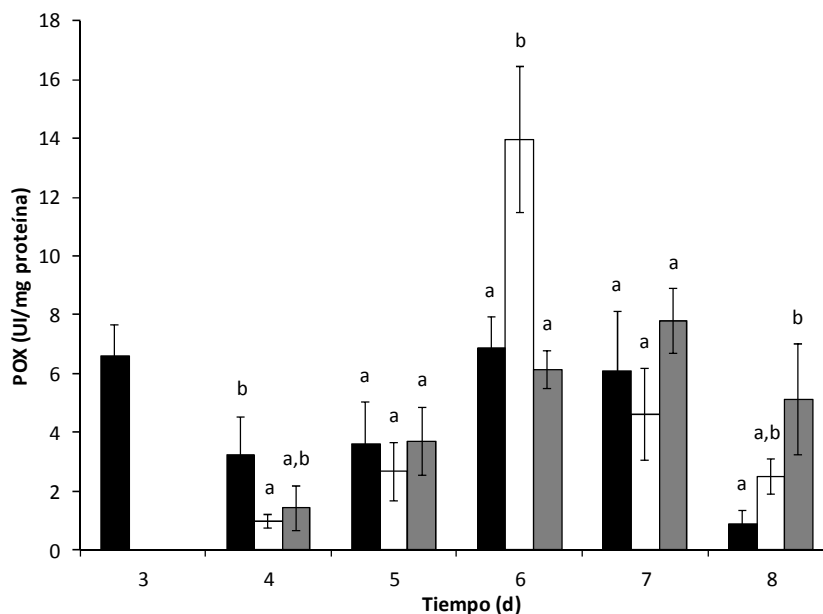


Figura 7.6. Actividad POX de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas. (■ AN; □ 16% O₂; ■ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día (P < 0.05).

Por otra parte, existen estudios en los que se menciona la importancia de las catalasa-peroxidadas en los hongos fitopatógenos *Magnaporthe grisea* y *M. oryzae*, ya que están involucradas en el mecanismo de defensa contra ROS producidas por las plantas hospederas (Tanabe *et al.*, 2011; Zámocký *et al.*, 2012). En lo que respecta a hongos entomopatógenos, se ha observado que la actividad catalasa-peroxidasa de *M. anisopliae* disminuyó al incrementar el tiempo de exposición a radiación UV (Miller *et al.*, 2004) lo cual indica que la respuesta de los hongos a los diferentes tipos de estrés no es general.

Las actividades enzimáticas antioxidantes (SOD, Cat y POX) de *B. bassiana* presentadas en esta investigación mostraron perfiles similares durante el tiempo de cultivo, ya que los máximos de actividad se obtuvieron entre los días 6 y 7, posteriormente, la tendencia fue a disminuir. Lo anterior sugiere que la respuesta enzimática antioxidante de *B. bassiana* es general, sin importar el tipo en enzima.

Es importante destacar que bajo condiciones normóxicas (AN), las actividades SOD y POX se mantuvieron cerca o por debajo de los valores registrados previo al inicio del recambio atmosférico (día 3), mientras que la actividad Cat se incrementó independientemente de la atmósfera utilizada.

7.4. Oxidación de Biomoléculas

7.4.1. Oxidación de Proteínas

La cuantificación de oxidación de biomoléculas tales como proteínas contribuyen a la determinación de estrés oxidativo en las células. En la Figura 7.7 se presentan los perfiles de oxidación de proteínas de *B. bassiana*, en la cual se puede observar que la modificación atmosférica provocó disminución en la cantidad de proteínas oxidadas, a partir de 24 h posteriores del inicio del recambio de la atmósfera. Asimismo, con los tratamientos con 16% y 26% O₂, se observó una disminución continua de dichas biomoléculas oxidadas. Al final del cultivo (día 8), la atmósfera AN produjo mayor oxidación de proteínas, mientras que el menor valor se obtuvo con el tratamiento denominado 26 (3.49 y 1.51 nmol carbonilos/mg proteína, respectivamente), los cuales son significativamente distintos entre ellos ($P < 0.05$).

En un estudio realizado por Gocheva *et al.* (2009), se ha observado aumento en la presencia de grupos carbonilos de proteínas en *Penicillium olsonii* y *P. waksmanii* cuando fueron sometidos a temperaturas menores a 15°C. Por otra parte, se ha reportado que la acumulación de grupos carbonilo se incrementó cuando *S. cerevisiae* alcanzó estado de senescencia, lo cual también se relacionó con la disminución de la capacidad antioxidante (Grzelak *et al.*, 2006). De manera similar, la inducción de choque térmico en *A. niger* produjo estrés oxidativo ya que se observó decremento en la actividad Cat al final del periodo de cultivo y consecuentemente la oxidación de proteínas se incrementó (Abrashev *et al.*, 2008).

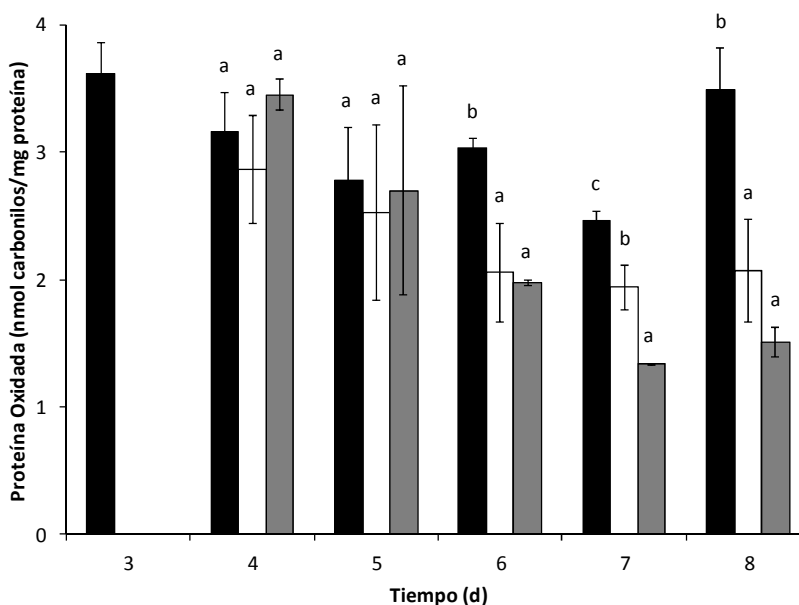


Figura 7.7. Perfiles de oxidación de proteínas de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas. (■ AN; □ 16% O₂; ■ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día ($P < 0.05$).

La oxidación de proteínas provocado por estrés oxidativo, inducido por H₂O₂ y paraquat, en hongos filamentosos ha sido estudiado previamente (Angelova *et al.*, 2005). Los resultados mostraron que la presencia de grupos carbonilo se incrementó en algunas especies de los géneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Penicillium*. En el presente estudio, la respuesta de *B. bassiana* a la modificación atmosférica contrasta con los reportes previos, lo cual probablemente está relacionado con el hecho que existe además de la respuesta antioxidante enzimática, una respuesta no enzimática que protege eficientemente las proteínas. Por otra parte, la disminución de proteínas oxidadas en *B. bassiana* podría estar relacionada con mecanismos celulares que degradan moléculas dañadas, tales como la autofagia, los proteosomas y los lisosomas (Dunlop *et al.*, 2009; Nakatogawa *et al.*, 2009; Pungartnik *et al.*, 2009).

Benaroudj *et al.* (2001) demostraron que el estrés oxidativo inducido por choque térmico provocó la acumulación de trehalosa y consecuentemente la disminución en la presencia de proteínas oxidadas en *S. cerevisiae*. Esto es consistente con los resultados descritos en la presente investigación, ya que la cantidad de grupos carbonilo en *B. bassiana* fue menor desde que se modificó la concentración de O₂ en comparación con el tratamiento AN, probablemente debido a la contribución de solutos compatibles, como trehalosa y manitol, en la estabilización de proteínas (Ruijter *et al.*, 2003; Singer y Lindquist, 1998). Por lo anterior, se consideró importante determinar la presencia de dichos solutos compatibles en *B. bassiana* lo cual se presenta posteriormente.

7.4.2. Lipoperoxidación

Otro parámetro importante para la determinación de estrés oxidativo es la oxidación de lípidos. Se encontró que a partir del sexto día de cultivo se empiezan a acumular los lípidos oxidados con las atmósferas AN y 16, mientras que para la atmósfera denominada 26, ésta acumulación comienza 24 horas después (día 7), aunque el daño a estas moléculas disminuyó abruptamente en el día 6 (Fig. 7.8). Adicionalmente, los pulsos de 26% de O₂ provocaron incremento de 30% comparado con las condiciones de atmósfera normal (día 7), lo cual sugiere que la capacidad antioxidante había sido superada. Esto fue consistente con los resultados encontrados al octavo día de cultivo, ya que la atmósfera 26 produjo la mayor cantidad de lípidos oxidados (4.81 nmol MDA/mg proteína), el cual es 76% superior al tratamiento AN (2.73 nmol MDA/mg proteína); éstos valores presentan diferencia significativa entre ellos (P < 0.05).

Previamente, se han observado cambios morfológicos en las mitocondrias y en el metabolismo de lípidos en *M. anisopliae* cuando se indujo estrés oxidativo con H₂O₂ (Li *et al.*, 2008). De manera similar, se han realizado estudios con diferentes especies de *Aspergillus* relacionados con la producción de toxinas y la presencia de

lípidos oxidados (Passi *et al.* 1984; Reverberi *et al.*, 2010). Asimismo, Cortés-Rojo *et al.* (2009) encontraron alteración en la cadena de transporte de electrones en mitocondrias dañadas por lipoperoxidación en *S. cerevisiae*.

Por otra parte, se ha demostrado que *S. cerevisiae* requiere de diversos factores de respuesta a estrés para resistir condiciones de hiperoxia (100% O₂), incluyendo defensa antioxidante, proteínas de choque térmico y de reparación de DNA, así como mantener los procesos de transcripción y traducción genéticos (Outten *et al.*, 2005). Es importante mencionar que no existen reportes que describan el efecto del estrés oxidativo y la presencia de biomoléculas oxidadas (proteínas y lípidos) en hongos entomopatógenos, aunado a la producción y calidad de conidios.

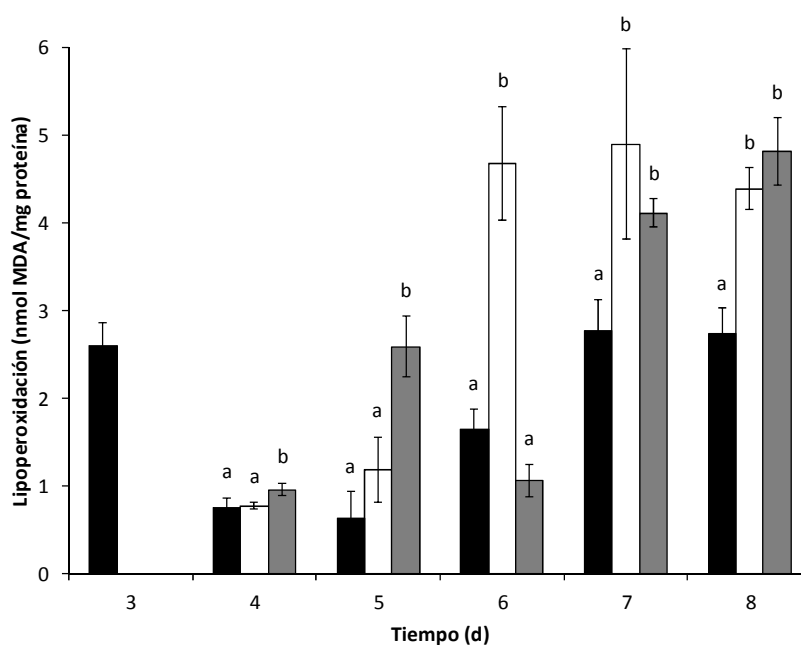


Figura 7.8. Perfiles de oxidación de lípidos de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas. (■ AN; □ 16% O₂; ▒ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día (P < 0.05).

Es importante destacar que en las actividades enzimáticas (SOD, Cat y POX) así como en la lipoperoxidación se observó un desplazamiento de 24 h en el que se obtuvieron los valores máximos de dichas variables con la atmósfera denominada 26, respecto a los tratamientos restantes (Figs. 7.4, 7.5, 7.6 y 7.8). Por otra parte, el incremento inmediato en la conidiación posterior a la modificación atmosférica (días 4 y 5) (Fig. 7.1 A) podría estar relacionado con el desbalance de las actividades SOD y POX junto con un ligero incremento en la lipoperoxidación en dichos tiempos.

De acuerdo con la actividad antioxidante (SOD, Cat y POX) y los perfiles de oxidación de biomoléculas obtenidos en éste estudio, las actividades enzimáticas antioxidantes comenzaron a disminuir al sexto día de cultivo. Este efecto coincidió con un incremento en la presencia de lípidos oxidados, sugiriendo que la capacidad antioxidante de *B. bassiana* fue insuficiente para contrarrestar los efectos de la modificación de la concentración de O₂, lo cual confirma que las atmósferas con 16% y 26% O₂ provocaron estrés oxidativo en *B. bassiana*. Asimismo, este desbalance afectó significativamente la producción de conidios, específicamente bajo condiciones de hipoxia (16% O₂) (Sección 7.1). Adicionalmente, dicho estrés provocó efecto negativo en la calidad de los conidios (Secciones 7.2.1 y 7.2.2).

7.5. Concentración de Trehalosa y Manitol

La concentración de trehalosa y manitol es un parámetro útil para determinar si dichos solutos se producen como respuesta a un estado oxidante, y sean capaces de prevenir la oxidación de biomoléculas, tales como proteínas y lípidos. La concentración del disacárido trehalosa a diferentes días de cultivo se muestra en la Figura 7.9. Se puede observar que la modificación de la concentración de O₂ provocó que la presencia de dicho soluto compatible disminuyera al menos 75%, siendo la hipoxia (16% O₂) el tratamiento que tuvo el mayor efecto, ya que no se detectó presencia de trehalosa. Por otra parte, no se encontraron variaciones importantes en la concentración de trehalosa durante el tiempo de cultivo para ambos tratamientos. Asimismo, con la atmósfera 26 los valores de concentración fueron menores con respecto a los obtenidos con AN, los cuales fueron significativamente distintos ($P < 0.05$). Es importante señalar que al día que se inicia el recambio atmosférico (día 3) no se detectó presencia del disacárido.

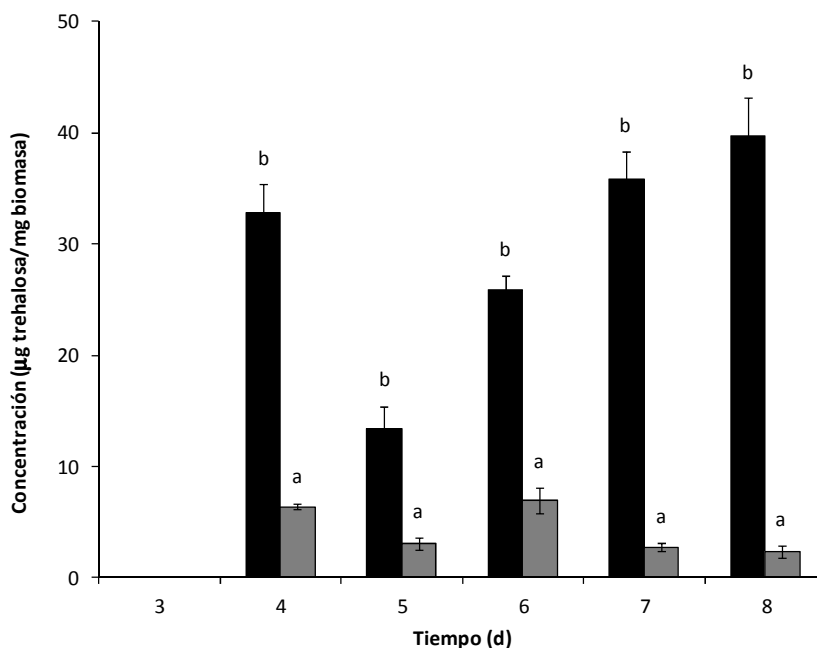


Figura 7.9. Concentración de trehalosa de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas. (■ AN; □ 16% O₂; ▒ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día ($P < 0.05$).

La trehalosa es un azúcar que ha sido considerado, junto con el glucógeno, como reserva (Elbein *et al.*, 2003), sin embargo, se ha demostrado que tiene la capacidad de estabilizar proteínas y lípidos para evitar daños producidos por diferentes tipos de estrés abiótico (Benaroudj *et al.*, 2001; Crowe *et al.*, 1984; Mascorro-Gallardo *et al.*, 2005; Singer y Lindquist, 1998). Previamente se ha demostrado que la concentración de trehalosa se incrementó en *B. bassiana* bajo condiciones de estrés térmico (Liu *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado que el estrés inducido por bajas temperaturas provocó aumento en la presencia de dicho disacárido en diferentes especies de *Penicillium* (Gocheva *et al.*, 2006, 2009). Similarmente, se observó que el estrés térmico incrementó de manera considerable la acumulación de trehalosa en *A. niger* (Abrashev *et al.*, 2008).

De igual manera, se ha evaluado el efecto sobre la concentración de este disacárido que se produce por cambios de temperatura, pH y edad del cultivo en diferentes hongos entomopatógenos dentro de los que se incluye *B. bassiana* (Hallsworth y Magan, 1996), en especial los resultados mostraron que la variación de temperatura y pH incrementó la presencia de trehalosa. Por otra parte, Benaroudj *et al.* (2001) demostraron que al someter a *S. cerevisiae* a estrés oxidativo, la trehalosa se acumuló en dicho microorganismo y el daño a proteínas se redujo. Por otra parte, se ha observado que la concentración de trehalosa se modificó al utilizar diferentes fuentes de carbono (Hallsworth y Magan, 1994).

Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en el presente estudio, ya que la presencia de estrés oxidativo inducido por pulsos de diferentes concentraciones de O₂ provocó disminución en la concentración de trehalosa, lo cual sugiere que éste disacárido se hidrolizó para favorecer el crecimiento (Singer y Lindquist, 1998; Thevelein, 1984) o no está relacionado con la disminución de la cantidad de proteínas oxidadas (Sección 7.4.1).

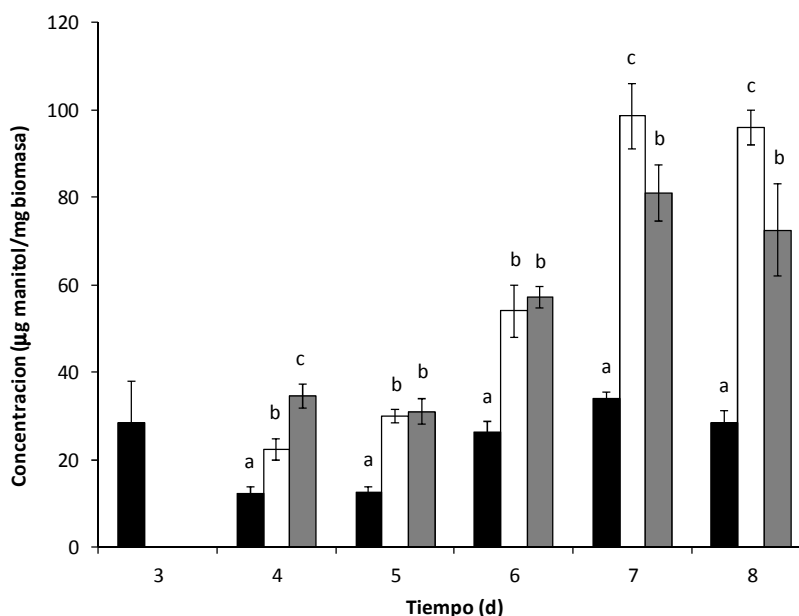


Figura 7.10. Concentración de manitol de la cepa Bb 882.5 cultivada a diferentes atmósferas. (■ AN; □ 16% O₂; ▒ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día ($P < 0.05$).

Respecto a la concentración del poliol manitol, se encontró que se incrementó al modificar la concentración de O₂ a partir del inicio del recambio atmosférico (día 4) y hasta el final del cultivo (Fig. 7.10). Adicionalmente, es importante destacar que en el séptimo día de cultivo se alcanzó el máximo de concentración del poliol con todos los tratamientos. Al día final del cultivo (día 8), la concentración mayor se registró con la atmósfera 16 (100 µg manitol/mg biomasa) siendo tres veces superior respecto al valor obtenido cuando no se modificó la atmósfera (AN) (30 µg manitol/mg biomasa) los cuales son significativamente distintos ($P < 0.05$).

Es manitol es un poliol considerado, al igual que la trehalosa, como reserva de carbono (Ruijter *et al.*, 2003) así como antioxidante ya que es capaz de atrapar los radicales libres previniendo daño celular (Jennings *et al.*, 1998; Ruijter *et al.*, 2003; Smirnov y Cumbes, 1989). Se ha determinado que la presencia de manitol se incrementó al modificar temperatura y pH en *B. bassiana*, *M. anisopliae* e *I. farinosa*.

También la modificación de la fuente de carbono provocó variaciones en la concentración de manitol en dichos hongos entomopatógenos (Hallsworth y Magan, 1994, 1996). Sin embargo, cuando se sometió *B. bassiana* a estrés térmico prolongado, la concentración de manitol disminuyó (Liu *et al.*, 2009). Lo anterior indica que la respuesta en la síntesis de polioles de *B. bassiana* está relacionado con el tipo de estrés inducido, ya que los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los pulsos de O₂ incrementaron la concentración de manitol.

Con la determinación de la presencia de trehalosa y manitol en *B. bassiana* se puede establecer que la modificación de la atmósfera indujo respuesta diferencial de *B. bassiana* en la síntesis de los solutos compatibles determinados (trehalosa y manitol). Asimismo, el incremento en la concentración de manitol debido a los pulsos de O₂ podría explicar la disminución de proteínas oxidadas (Sección 7.4.1).

En este sentido, debido a dicha respuesta en la concentración de manitol, se cuantificó la expresión de los genes *mpd* y *mtd* (los cuales codifican para las enzimas MPD y MTD, respectivamente), que intervienen en el ciclo del manitol (Fig. 1.5 B).

7.6. Expresión Diferencial de los Genes *mpd* y *mtd*

La cuantificación de la expresión de los genes *mpd* y *mtd* contribuye a medir la respuesta debida a los pulsos con concentraciones diferentes de oxígeno, y la relación con el incremento en la concentración de manitol. Los criterios para elegir los tiempos de muestreo se especifican previamente (Sección 6.8). La expresión del gen *mpd*, la cual se presenta de forma normalizada, se muestra en la Figura 7.11 A, en donde se puede observar que la modificación de la concentración de O₂ provocó al menos un incremento de 34%, siendo la atmósfera enriquecida (26% O₂) con la que se obtuvieron los valores mayores de expresión del gen *mpd*, los cuales son significativamente distintos al resto de los tratamientos ($P < 0.05$). Respecto a la expresión del gen *mtd*, no se obtuvo amplificación en ninguna de las muestras, incluyendo los controles positivos, por lo que las posibles causas se mencionan posteriormente.

Por otra parte, en la Figura 7.11 B se muestran los valores normalizados de la concentración de manitol correspondientes a los días de muestreo elegidos para la determinación de la expresión genética, con el objetivo de comparar las diferencias entre la síntesis de manitol y la expresión del gen *mpd*. Se observa que al día 4, las tendencias tanto de concentración como de expresión, obtenidas debido a la modificación atmosférica, son similares, aunque difieren en magnitud. En este sentido, en el día 6 no se encontró una relación tan notable entre la síntesis de manitol y la expresión del gen *mpd*, ya que con la atmósfera 26 se obtuvo la mayor expresión génica (Fig. 7.11 A), siendo significativamente mayor al resto de las atmósferas ($P < 0.05$), mientras que en términos de concentración de manitol, los tratamientos 16 y 26 no son significativamente distintos entre ellos ($P > 0.05$) (Fig. 7.11 B).

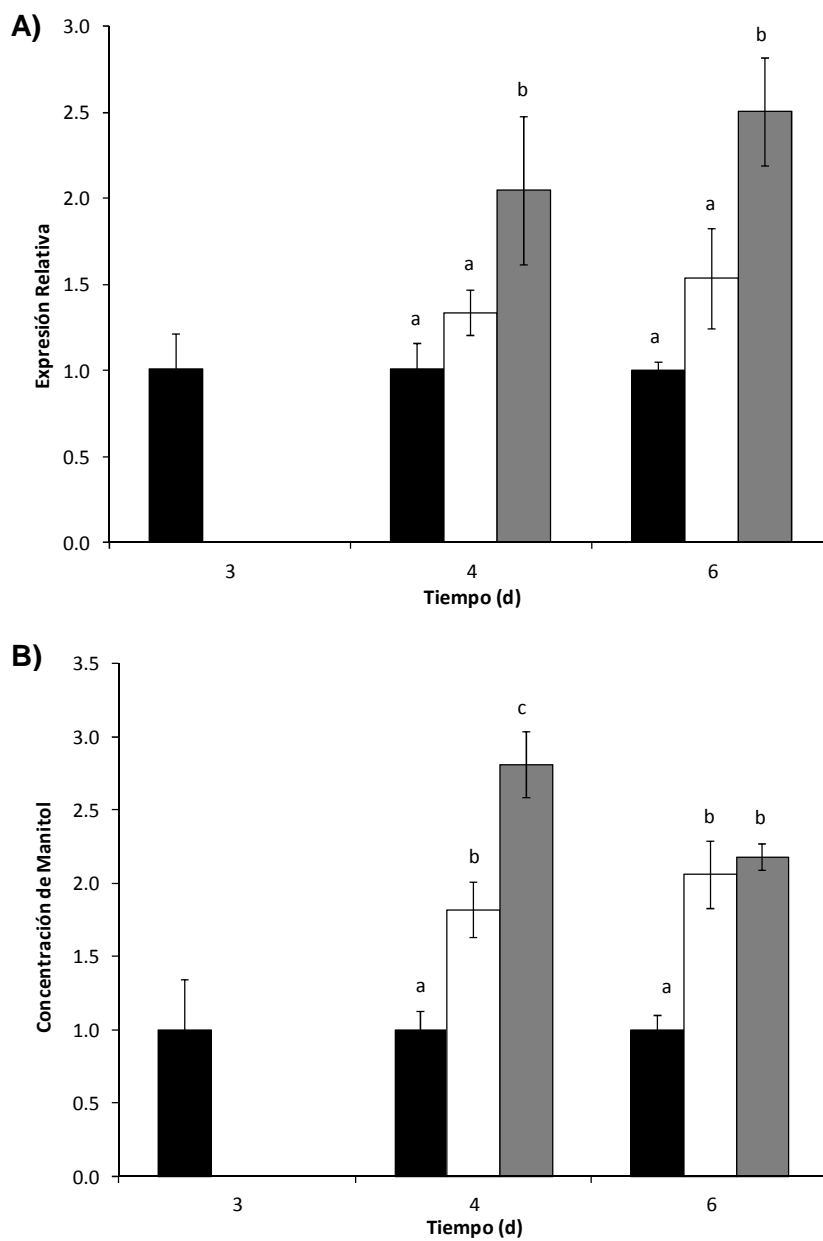


Figura 7.11. A) Expresión relativa normalizada del gen *mpd* de la cepa Bb. 882.5. B) Concentración normalizada de manitol de la cepa Bb. 882.5. (■ AN; □ 16% O₂; ■ 26% O₂). Las letras distinguen los grupos obtenidos en la prueba de Tukey para cada día (P < 0.05).

Previamente, Wang *et al.* (2011) estudiaron la importancia de los genes *mpd* y *mtd* en *B. bassiana*, y observaron que al suprimir ambos genes, la concentración de manitol disminuyó, así como la virulencia y la resistencia a diversos tipos de estrés (dentro de los que se incluye al oxidativo). También se corroboró que la supresión del gen *mpd* tuvo el mayor impacto en los parámetros evaluados. Sin embargo, en el mismo estudio se observó actividad residual de la enzima MTD cuando se suprimió el gen correspondiente, sugiriendo los autores que posiblemente el manitol sea sustrato de diferentes enzimas deshidrogenasas. Por otra parte, existen estudios que sugieren que la vía de síntesis de manitol más importante en hongos es la que involucra a la enzima MPD (Véléz *et al.*, 2007). Asimismo, la síntesis de manitol se redujo notablemente al suprimir el gen *mpd*. Los resultados de expresión del mismo gen obtenidos en la presente investigación, soportan la idea de que la vía en la que interviene la enzima MPD es la más importante en la síntesis de manitol en hongos.

Recientemente, se ha observado en *A. niger* que la expresión de los genes *mpd* y *mtd* es inherente a la etapa de desarrollo del microorganismo (Aguilar-Osorio *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha secuenciado y caracterizado la enzima MPD en *B. bassiana* (Wang *et al.*, 2010). Sin embargo, no existen reportes similares para la enzima MTD. En este sentido, es posible encontrar las secuencias de ambos genes de *B. bassiana* en la base de datos de GenBank (NCBI), no obstante, las referencias citadas solo permiten encontrar la correspondiente al gen *mpd*, lo cual sugiere que aún no existe alguna publicación relacionada con el gen *mtd* y que la secuencia descrita en la base de datos no es totalmente confiable, explicando parcialmente la ausencia de amplificación de dicho gen en el presente trabajo. Asimismo, el diseño de los primers y sondas es un paso crucial para experimentos de qPCR, por lo que posiblemente los oligonucleótidos utilizados para analizar la expresión diferencial del gen *mtd* se diseñaron de manera errónea, pese a que las secuencias diseñadas para los genes *mpd* y *gpd* fueran correctas.

8. CONCLUSIONES

- La producción de conidios de *Beauveria bassiana* se incrementó bajo condiciones de hipoxia (16% O₂).
- La modificación de la composición atmosférica provocó disminución en los parámetros de calidad e infectividad de *B. bassiana*.
- Los pulsos de diferentes concentraciones de O₂ indujeron estrés oxidativo en *B. bassiana*, debido a que la capacidad antioxidante fue insuficiente para contrarrestar los efectos de dichos pulsos.
- La modificación de la concentración de O₂ produjo incremento en la síntesis de manitol de *B. bassiana*, mientras que el efecto contrario se observó con la trehalosa.
- El incremento en la expresión del gen *mpd* de *B. bassiana* es proporcional a la síntesis de manitol, ambos parámetros se incrementaron al modificar la concentración de O₂.

9. PERSPECTIVAS

- Cuantificar especies reactivas de oxígeno (ROS).
- Identificar posibles isoenzimas antioxidantes.
- Determinar la presencia de diferentes antioxidantes no enzimáticos.
- Cuantificar la actividad MPD y MTD.
- Corroborar la secuencia del gen *mtd*.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abrashev R I, Pashova S B, Stefanova L N, Vassilev S V, Dolashka-Angelova P A, Angelova M B. 2008. Heat-shock-induced oxidative stress and antioxidant response in *Aspergillus niger* 26. *Canadian Journal of Microbiology*. 54: 977-983.
- Aguilar-Osorio G, VanKuyk P A, Seiboth B, Blom D, Solomon P S, Vinck A, Kindt F, Wösten H A B, De Vries R. 2010. Spatial and developmental differentiation of mannitol dehydrogenase and mannitol-1-phosphate dehydrogenase in *Aspergillus niger*. *Eukaryotic Cell*. 9: 1398-1402.
- Aguirre J, Ríos-Momberg M, Hewitt D, Hansberg W. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends in Microbiology*. 13: 111-118.
- Alatorre-Rosas R. 2007. Hongos entomopatógenos. En: *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. L. A. Rodríguez del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds). Sociedad Mexicana de Control Biológico. Capítulo 9. 127-143 pp.
- Angel-Cuapio R A. 2011. Producción de conidios de hongos entomopatógenos sobre arroz y lirio acuático como texturizante. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- Angelova M B, Pashova S B, Spasova B K, Vassilev S V, Slokoska L S. 2005. Oxidative stress response of filamentous fungi induced by hydrogen peroxide and paraquat. *Mycological Research*. 109: 150-158.
- Arzumanov T, Jenkins N, Roussos S. 2005. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridium*. *Process Biochemistry*. 40: 1037-1042.
- Barrera J F. 2007. Introducción, filosofía y alcance del control biológico. En: *Teoría y Aplicación del Control Biológico*. L. A. Rodríguez del-Bosque y H. C. Arredondo-Bernal (eds). Sociedad Mexicana de Control Biológico. Capítulo 1. 1-18 pp.
- Belozerskaya T A, Gessler N N. 2006. Oxidative stress and differentiation in *Neurospora crassa*. *Microbiology*. 75: 427-431.
- Benaroudj N, Lee D H, Goldberg A L. 2001. Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 24261-24267.
- Boucias D G, Pendland J C. 1998. *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publishers. 1-14 pp.
- Boucias D G, Pendland J C, Latge J P. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1975-1805.

-
- Boveris A, Repetto M G, Boveris A D, Valdéz L B . 2008. Determinación del estrés oxidativo en seres humanos en situaciones clínicas. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 21. 319-328 pp.
- Bradford M. 1976. A quick and sensitive method for the cuantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- Brown A D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriological Reviews*. 40: 803-846.
- Buege J A, Aust S D. 1978. Microsomal lipid peroxidation In: *Methods in Enzymology*. Vol. 52, Part C Fleischer S and Packer L (eds). Academic Press, New York. 302-310 pp.
- Bustin S A, Benes V, Nolan T, Pfaffl M W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*. 34: 597-601.
- Butt T M, Goettel M S. 2000. Bioassays with entomogenous fungi. In: *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. A. Navon and K.R.S. Ascher (eds). Willingford, UK. CABI Publishing. 141-195 pp.
- Candas M, Bulla L A. 2003. Microbial Insecticides. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* Copyright © 2002 by John Wiley & Sons.
- Cárdenas-Rodríguez N, Medina-Campos O N, Pedraza-Chaverri J. 2008. Glutati6n peroxidasas: Una familia de enzimas. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 13. 201-217 pp.
- Charnley A K. 2003. Fungal pathogens of insect: cuticle degrading enzyme and toxins. *Advances in Botanical Research* V.
- Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalosa. *Science*. 223: 701-703.
- Dalla-Santa H S, Dalla-Santa O R, Brand D, Porto de Souza-Vandenberghe L, Soccol C R. 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agroindustrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48: 51-60.
- Dalla-Santa, H S, Sousa N J, Brand D, Dalla-Santa O R, Pandey A, Sobotka M, Pada J, Soccol C R. 2004. Conidia production of *Beauveria sp.* by solid-state fermentation for biocontrol of *Ilex paraguariensis* caterpillars. *Folia Microbiologica*. 49: 418-422.
- Deshpande M V. 1999. Mycopesticide production by fermentation: Potential and challeges. *Critical Reviews in Microbiology*. 25: 229-243.

-
- Diario Oficial de la Federación. 28 de Diciembre de 2004. Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos. SEMARNAT. México.
- Diario Oficial de la Federación. 18 de Marzo de 2005. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Secretaría de Salud. México.
- Diario Oficial de la Federación. 19 de Marzo de 2008. Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Secretaría de Salud. México.
- Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Augur C, Viniegra-González G. 2001. Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid-state and submerged fermentation: a comparative study. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 26: 271-275.
- Díaz-Sobac R. 2008. Polifenoles. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 20. 303-315 pp.
- Dixon N M, Kell D B. 1989. The inhibition of CO₂ of the growth and metabolism of microorganisms. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 109-136.
- Dunlop R A, Brunk U T, Rodgers K J. 2009. Oxidized proteins: Mechanisms of removal and consequences of accumulation. *IUBMB Life*. 61: 522-527.
- Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. 46: 387-400.
- Eken C, Tozlu G, Dane E, Coruh S, Demirci E. 2006. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycete) to larvae of the small poplar longhorn beetle, *Saperda populnea* (Coleoptera: Cerambycidae). *Mycopathologia*. 162: 69-71.
- Elbein A D, Pan Y T, Pastuszak I, Carroll D. 2003. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*. 14: 17R- 27R.
- Fang W, Bidochka M J. 2006. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research*. 110: 1165-1171.
- Farges J, Remaudiere G. 1977. Considerations on the specificity of entomopathogenic fungi. *Mycopathologia*. 62: 31-37.
- Faria H R, Wraight S P. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43: 237-256.
- Feng M G, Poprawski T J, Khachatourians G G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*. 4: 3-34.

-
- Finkel T, Holbrook N J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408: 239-247.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*. 201: 1203-1209.
- Garza-López P M. 2008. Cambios fisiológicos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. como respuesta a la composición atmosférica. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- Garza-López P M, Konigsberg M, Gómez-Quiroz L E, Loera O. 2012. Physiological and antioxidant response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 353-359.
- Garza-López P M, Konigsberg M, Saucedo-Castañeda G, Loera O. 2011. Perfiles diferenciales de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en respuesta al CO₂: Producción de conidios y amilasas. *Agrociencia*. 45: 761-770.
- Greathead D J, Waage J K. 1983. Opportunities for biological control of agricultural pests in developing countries. The World Bank, Washington, D.C., World Bank Technical Paper Number 11. 44 p.
- Grzelak A, Macierzynska E, Bartosz G. 2006. Accumulation of oxidative damage during replicative aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Experimental Gerontology*. 41: 813-818.
- Gocheva Y G, Krumova E T, Slokoska L S, Miteva J G, Vassilev S V, Angelova M B. 2006. Cell response of antarctic and temperate strains of *Penicillium* spp. to different growth temperature. *Mycological Research*. 110: 1347-1354.
- Gocheva Y G, Tosi S, Krumova E T, Slokoska L S, Miteva J G, Vassilev S V, Angelova M B. 2009. Temperature downshift induces antioxidant response in fungi isolated from Antarctica. *Extremophiles*. 13: 273-281.
- Goettel M S, Inglis D G. 1997. Fungi: Hyphomycetes. In: LA Lacey (ed). *Manual of Techniques in Insect Pathology*. California, USA, Academic Press, Inc. 213-249 pp.
- Gómez-Quiroz L E, Cuevas-Bahena D B. 2008. Superóxido Dismutasa. En: *Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas*. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 11. 169-182 pp.
- Grimm C. 2001. Economic feasibility of a small-scale production plant for entomopathogenic fungi in Nicaragua. *Crop Protection*. 20: 623-630.
- Hajek A E, St. Leger R J. 1994. Interactions between fungal pathogen and insect host. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.
- Hallsworth J E, Magan N. 1994. Effect of carbohydrate type and concentration on polyhydroxy alcohol and trehalose content of conidia of three entomopathogenic fungi. *Microbiology*. 140: 2705-2713.

-
- Hallsworth J E, Magan N. 1996. Culture age, temperature, and pH affect the polyol and trehalose contents of fungal propagules. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2435-2442.
- Hansberg-Torres W. 2008. El dioxígeno y sus especies reactivas. En: *Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas*. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 2. 25-46 pp.
- Hegedus D D, Bidochka M J, Miranpuri G S, Khachatourians G G. 1992. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 36: 785-789.
- Hegedus, D. D., Khachatourians, G. G. 1995. The impact of biotechnology on hyphomycetous fungal insect biocontrol agents. *Biotechnology Advances*. 13: 455-490.
- Hernández-Velázquez V M, Berlanga-Padilla A M. 1999. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial. Ficha Técnica CB-03. SAGARPA.
- Huang B, Chun-Ru L, Zhen-Gang L, Mei-Zhen F, Zeng-Zhi L. 2002. Molecular identification of the teleomorph of *Beauveria bassiana*. *Mycotaxon*. 81: 229-236.
- Ibrahim L, Butt TM, Jenkinson P. 2002. Effect of artificial culture media on germination, growth, virulence and surface properties of the entomopathogenic hyphomycete *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 106: 705-715.
- Ikasari L, Mitchell D A. 1998. Mimicking gas and temperature changes during enzyme production by *Rhizopus oligosporus* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 20: 349-353.
- Issaly N, Chauveau H, Aglevor F, Fargues J, 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.
- Jefferies, L B, Xavier I J, Matai R E, Khachatourians G G. 1999. Relationships between fungal spore morphologies and surface properties for entomopathogenic members of the genera *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Tolypocladium* and *Lecanicillium*. *Canadian Journal of Microbiology*. 45: 936-948.
- Jennings D B, Ehrenschaft M, Pharr D M, Williamson J D. 1998. Roles for mannitol and mannitol dehydrogenase in active oxygen-mediated plant defense. *Plant Biology*. 95: 15129-15133.
- Kang S W, Lee S H, Yoon C S, Kim S W. 2005. Conidia production by *Beauveria bassiana* (for the biocontrol of a diamondback moth) during solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. *Biotechnology Letters*. 27: 135-139.
- Kawasaki L, Aguirre J. 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology*. 183: 1434-1440.

-
- Khachatourians G G, Qazi S S. 2008. Entomopathogenic fungi. Biochemistry and molecular biology. In: The Mycota VI. A. A. Brakhage, P. F. Zipfel (eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Capítulo 3. 33-61 pp.
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *TRENDS in Molecular Medicine*. 8: 257-260.
- Konigsberg M. 2008. Cadena respiratoria. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 3. 49-59 pp.
- Li L, Pischetsrieder M, St Leger R J, Wang C. 2008. Associated links among mtDNA glycation, oxidative stress and colony sectorization in *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Genetics and Biology*. 45: 1300-1306.
- Liu Q, Ying S H, Feng M G, Jiang X H. 2009. Physiological implication of intracellular trehalosa and mannitol changes in response of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to thermal stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. 95: 65-75.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*. 25: 402-408.
- Lledías F, Rangel P, Hansberg W. 1998. Oxidation of catalase by singlet oxygen. *The Journal of Biological Chemistry*. 273: 10630-10637.
- Lord J C. 2009. Efficacy of *Beauveria bassiana* for control of *Tribolium castaneum* with reduced oxygen and increased carbon dioxide. *Journal of Applied Entomology*. 133: 101-107.
- Machado de Almeida-Siqueira E, Fernandes-Arruda S. 2008a. Potencial antioxidante del ácido ascórbico. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 18. 279-289 pp.
- Machado de Almeida-Siqueira E, Fernandes-Arruda S. 2008b. Potencial antioxidante de los carotenoides. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 17. 269-278 pp.
- Mascorro-Gallardo J O, Avonce N, Iturriaga G. 2005. Biotecnología de la trehalosa en las plantas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 11: 193-202.
- Mazhoudi S, Chaoui A, Ghorbal M H, El-Ferjani E. 1997. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill.). *Plant Science*. 127: 129-137.
- McIntyre M, McNeil B. 1997. Effects of elevated dissolved CO₂ levels on batch and continuous cultures of *Aspergillus niger* A60: an evaluation of experimental methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4171-4177.

-
- McIntyre M, McNeil B. 1998. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50: 291-298.
- Miller C D, Rangel D, Braga G U L, Flint S, Kwon S I, Messias C L, Roberts D W, Anderson A J. 2004. Enzyme activities associated with oxidative stress in *Metarhizium anisopliae* during germination, mycelial growth, and conidiation and in response to near-UV irradiation. *Canadian Journal of Microbiology*. 50: 41-49.
- Montesinos-Matías R. 2008. Relación entre variables de crecimiento y virulencia en aislados de *Beauveria bassiana*. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- Montesinos-Matías R, Viniegra-González G, Alatorre-Rosas R, Loera O. 2011. Relationship between virulence and enzymatic profiles in the cuticle of *Tenebrio molitor* by 2-deoxy-D-glucose-resistant mutants of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27: 2095-2102.
- Montiel-González A M, Viniegra-González G, Fernández F J, Loera O. 2004. Effect of water activity on invertase production in solid state fermentation by improved diploid strains of *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*. 39: 2085-2090.
- Monzón A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 63: 95-103.
- Morales-Hernandez C E, Padilla-Guerrero I E, Gonzalez-Hernandez G A, Salazar-Solis E, Torres-Guzman J C. 2010. Catalase overexpression reduces the germination time and increases the pathogenicity of the fungus *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 1033-1044.
- Muthukumar K, Nachiappan V. 2010. Cadmium-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 47: 383-387.
- Nair V, Turner G A. 1984. The thiobarbituric acid test for lipid peroxidation: Structure of the adduct with malondialdehyde. *Lipids*. 19: 804-805.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10: 458-467.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. www.ncbi.nlm.nih.gov. 21 de septiembre de 2012.
- Neves P J, Alves S B. 2000. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 43: 373-378.
- Nolan T, Hands R E, Bustin S A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*. 1: 1559-1582.

-
- Nuñez-Gaona O, Saucedo-Castañeda G, Alatorre-Rosas R, Loera O. 2010. Effect of moisture content and inoculum on growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53: 771-777.
- Olivares-Jiménez I P. 1995. Estudio comparativo del daño producido en células de origen hepático humano por una exposición aguda a etanol y acetaldehído. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- Outten C E, Falk R L, Culotta C. 2005. Cellular factors required for protection from hyperoxia toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*. 388: 93-101.
- Pandey A. 2003. Solid-state Fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13: 81-84.
- Passi S, Nazzaro-Porro M, Fanelli C, Fabbri A A, Fasella P. 1984. Role of lipoperoxidation in aflatoxin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 19: 186-190.
- Peraza-Reyes L. 2008. Catalasa. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 12. 183-200 pp.
- Pérez-Gastel P L, Pérez de Alejo J L. 2000. Métodos para medir daño oxidativo. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 29: 192-198.
- Pucheta-Díaz M, Flores-Macías A, Rodríguez-Navarro S, De la Torre M. 2006. Mecanismos de acción de los hongos entomopatógenos. *INCI vol. 31 No. 12*.
- Pungartnik C, Melo S C O, Basso T S, Macena W G, Cascardo J C M, Brendel M. 2009. Reactive oxygen species and autophagy play a role in survival and differentiation of the phytopathogen *Moniliophthora perniciosa*. *Fungal Genetics and Biology*. 46: 461-472.
- Qiagen™. 2010. Critical factors for successful Real-Time PCR.
- Rehner S. 2005. Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In: *Insect-Fungal Associations, Ecology and Evolution*. F. E. Vega and M. Blackwell (eds.) Oxford Univ. Press. 3-27 pp.
- Reverberi M, Punelli F, Scarpari M, Camera E, Zjalic S, Ricelli A, Fanelli C, Fabbri A A. 2010. Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1935-1946.
- Riquelme M, Reynaga-Peña C G, Bartnicki-García S, Gires G. 1998. What determines growth direction in fungal hyphae? *Fungal Genetics and Biology*. 24: 101-109.
- Robledo-Monterrubio M, Alatorre-Rosas R, Viniegra-González G, Loera O. 2009. Selection of improved *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. strains based on 2-deoxy-D-glucose resistance and physiological analysis. *Journal of Invertebrate Pathology*. 101: 222-227.

-
- Rodríguez-Gómez D, Loera O, Saucedo-Castañeda G, Viniegra-Gonzalez 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.
- Romero-Machado J M. 1996. Producción y extracción de esporas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin por fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría. UAM-Iztapalapa.
- Roth S H. 1980. Membrane and extracellular effects of anaesthetic agents. *Federation Proceedings*. 39: 1595-1599.
- Roy H E, Steinkraus D C, Eilenberg J, Hajek A E., Pell J K. 2006. Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*. 51: 331-357.
- Ruijter G J G, Bax M, Patel H, Flitter S J, van de Vondervoort P J I, de Vries R P, vanKuyk P A, Visser J. 2003. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. *Eukaryotic Cell*. 2: 690-698.
- Safavi S A, Shah F A, Pakdel A, Rasouljan G R, Bandani A R, Butt T M. 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*. 270: 116-123.
- Saldaña-Balmori Y. 2008. Potencial antioxidante de los α -tocoferoles. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 19. 291-301 pp.
- Saucedo-Castañeda G, Gutiérrez-Rojas M, Bacquet G, Rimbault M, Viniegra-González G. 1990. Heat transfer simulation in solid substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 35: 802-808.
- Shah F A, Allen N, Wright C J, Butt T M. 2007. Repeated invitro subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 276: 60-66.
- Shah F A, Wang C S, Butt T M. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. 251: 259-266.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82: 291-295.
- Singer M A, Lindquist S. 1998. Multiple effects of trehalose on protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Molecular Cell*. 1: 639-648.
- Smirnoff N, Cumbes Q J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. 28: 1057-1060.

-
- Smith M D, Ho C S. 1985. The effect of dissolved carbon dioxide on penicillin production: Mycelial morphology. *Journal of Biotechnology*. 2: 347-363.
- Sowjanya-Sree K, Padmaja V. 2008. Destruxin from *Metarhizium anisopliae* induces oxidative stress effecting larval mortality of the polyphagous pest *Spodoptera litura*. *Journal of Applied Entomology*. 132: 68-78.
- Suttnar J, Cermák J, Dyr J. E. 1997. Solid-phase extraction in malondialdehyde analysis. *Analytical Biochemistry*. 249: 20-23.
- Talaei-Hassanloui R, Kharazi-Pakdel A, Goettel M, Mozaffari J. 2006. Variation in virulence of *Beauveria bassiana* isolates and its relatedness to some morphological characteristics. *Biocontrol Science and Technology*. 16: 525-534.
- Tamez-Guerra P, Galán-Wong M J, Medrano-Roldán H, García-Gutiérrez C, Rodríguez-Padilla C, Gómez-Flores R A, Tamez-Guerra R S. 2001. Bioinsecticidas: su empleo, comercialización y uso en México. *Ciencia UANL*. 4: 143-152.
- Tanabe S, Ishii-Minami N, Saitoh K I, Otake Y, Kaku H, Shibuya N, Nishizawa Y, Minami E. 2011. The role of catalase-peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 24: 163-171.
- Tefera T, Pringue K L. 2003. Effect of exposure method to *Beauveria bassiana* and conidia concentration on mortality, mycosis, and sporulation in cadavers of *Chilo partellus* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 84: 90-95.
- Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*. 75: 291-295.
- Thevelein J M. 1984. Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological Reviews*. 48: 42-59.
- Tlecuil-Beristain S. 2010. Producción de conidios de *Metarhizium anisopliae* en cultivos con concentraciones modificadas de O₂ y CO₂. Tesis de Doctorado. UAM-Iztapalapa.
- Tlecuil-Beristain S, Viniegra-González G, Díaz-Godínez G, Loera O. 2010. Medium selection and effect of higher oxygen concentration pulses on *Metarhizium anisopliae* var. *lepidiotum* conidial production and quality. *Mycopathologia* 169: 387-394.
- Vélèz H, Glassbrook N J, Daub M E. 2007. Mannitol metabolism in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology*. 44: 258-268.
- Vega F E, Blackwell M. 2005. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press. Inc. USA. 352 p.
- Viniegra-González G, Favela-Torres, E, Aguilar C N, Romero-Gómez S, Díaz-Godínez G, Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*. 13:157-167.

-
- Wang Z L, Lu J d, Feng M G. 2011. Primary roles of two dehydrogenases in the mannitol metabolism and multi-stress tolerance of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*. doi:10.1111/j.1462-2920.2011.02654.x
- Wang Z L, Ying S H, Feng M G. 2010. Gene cloning and catalysis features of a new mannitol-1-phosphate dehydrogenase (BbMPD) from *Beauveria bassiana*. *Carbohydrate Research*. 345: 50-54.
- Wessel, J. G. H. 1999. Fungi in their own right. *Fungal Genetics and Biology*. 27: 134-145.
- Whalon ME, Mota-Sanchez D, Hollingworth. 2008. Analysis of global pesticides resistance in arthropods. CABI, Oxfordshire.
- Whipps J M y Lumsden R D. 2001. Commercial use of fungi as plant disease biological control agents: Status and prospects. In: *Fungi as Biocontrol Agents*. T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (eds). CABI International. Capitulo 2. 9-22 pp.
- Wong M L, Medrano J F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 39: 75-85.
- Wösten H A B. 2001. Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology*. 55: 625-646.
- Wraigt S P, Inglis G D, Goettel M S. 2007. Fungi. In: *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey LA and Kaya HK (eds). Springer. 223-248 pp.
- Xie X Q, Wang J, Huang B F, Ying S H, Feng M G. 2010. A new manganese superoxide dismutase identified from *Beauveria bassiana* enhances virulence and stress tolerance when overexpressed in the fungal pathogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 1543-1553.
- Xu H, Song P, Gu W, Yang Z. 2011. Effects of heavy metals on production of thiol compounds and antioxidant enzymes in *Agaricus bisporus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 1685-1692.
- Ye S D, Ying S H, Chen C, Feng M G. 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. *Biotechnology Letters*. 28:799-804.
- Zámocký M, Droghetti E, Bellei M, Gasselhuber B, Pabst M, Furtmüller P G, Battistuzzi G, Smulevich G, Obinger C. 2012. Eukaryotic extracellular catalase-peroxidase from *Magnaporthe grisea* - Biophysical/chemical characterization of the first representative from a novel phytopathogenic KatG group. *Biochimie*. 94: 673-683.
- Zentella-Piña M, Piña E. 2008. Daño a Proteínas. En: *Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas*. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 8. 97-119 pp.

Zenteno-Savin T, Saldaña-Balmori Y. 2008. Daño a Lípidos. En: Radicales Libres y Estrés Oxidativo, Aplicaciones Médicas. M. Konigsberg-Fainstein (ed). Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V. México. Capítulo 9. 135-146 pp.

Zimmermann G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beuaveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology .17: 553-596.

Zhu, Y, Smits J P, Knol W, Bol J. 1994. A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. Biotechnology Letters. 16: 643-648.

ANEXOS

Anexo A. Curva Estándar para la determinación de Actividad Superóxido Dismutasa (SOD)

Se construyó una curva estándar con superóxido dismutasa comercial (cat. # S2515, Sigma-Aldrich™) disuelta en buffer de fosfato de potasio (0.1 M, pH = 7.5) a una concentración de 10 U/mL. Posteriormente se hicieron diluciones 1:1 v/v con buffer. La determinación de los porcentajes de inhibición se realizó de acuerdo a las indicaciones proporcionadas en el kit comercial para determinación de actividad SOD (SOD determination Kit cat. # 19160, Sigma-Aldrich™). La absorbancia fue determinada en un lector multimodal de placas DTX-880 (Beckman-Coulter™) a 440 nm. Cada dilución se realizó por triplicado.

Las concentraciones finales de enzima y el promedio de porcentaje de inhibición fueron las siguientes:

SOD (U/mL)	Inhibición (%)
10	67.55
5	51.96
2.5	33.57
1.25	18.43
0.625	13.67

Se realizó el ajuste con la ecuación de la línea recta para obtener los parámetros correspondientes. La ecuación de la recta se describe a continuación.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Porcentaje de Inhibición

m = Pendiente de la Recta

x = Concentración de Enzima SOD

b = Ordenada al Origen

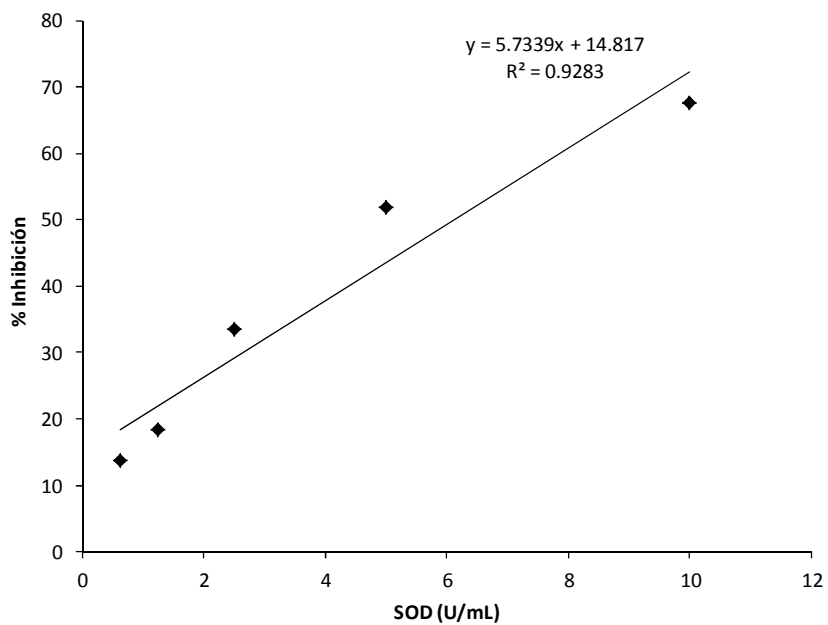


Figura A1. Curva estándar de superóxido dismutasa.

Anexo B. Determinación de Concentración mediante la Ley de Beer-Lambert

Para la determinación de la concentración de tetraguayacol y malondialdehído a partir de datos de densidad óptica, se utilizó la ecuación de la ley de Beer-Lambert:

$$C = A/EI$$

Donde:

C = Concentración (M)

A = Absorbancia

E = Coeficiente de Extinción Molar (1/cm M)

I = Grosor de la Celda (cm)

Anexo C. Curva Estándar para la determinación Proteínas Oxidadas

Se construyó una curva estándar con estándares de proteínas oxidadas y reducidas proporcionadas en el kit OxyELISA™ Oxidized Protein Quantitation Kit (cat. # S7250, Millipore™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La absorbancia fue registrada con un lector multimodal de placas DTX-880 (Beckman-Coulter™) a 450 nm. Cada dilución se realizó por triplicado.

Las concentraciones finales de proteína oxidada y el promedio absorbancia fueron las siguientes:

Proteína Oxidada (nmol carbonilo/mg proteína)	Absorbancia
7.2	2.49
4.8	1.86
3.2	1.41
2.1	1.06
1.4	0.77
0.9	0.58
0.6	0.49
0	0.26

Se realizó el ajuste con la ecuación de la línea recta para obtener los parámetros correspondientes. La ecuación de la recta se describe a continuación.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Absorbancia

m = Pendiente de la Recta

x = Concentración de Proteína Oxidada

b = Ordenada al Origen

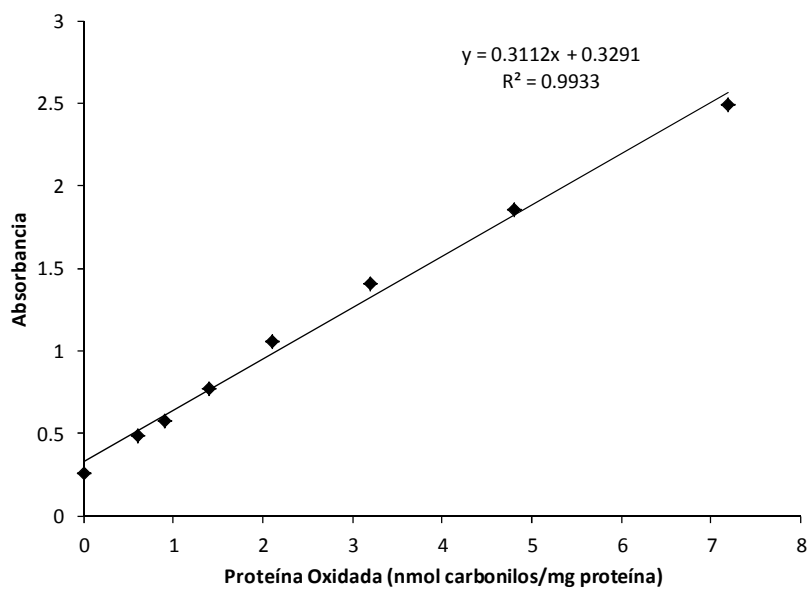


Figura A2. Curva estándar de proteína oxidada.

Anexo D. Solución Reactiva para la determinación de Lipoperoxidación

Para la determinación de oxidación de lípidos se preparó una solución reactiva de ácido tricloroacético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA) y ácido clorhídrico (HCl). La solución se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	
TCA	7.5 mL
TBA	0.25 g
HCl	1.025 mL

Finalmente se aforó a 50 mL con agua desionizada.

Anexo E. Curva Estándar para la determinación de concentración de Trehalosa

Se construyó una curva estándar con trehalosa grado HPLC (cat. # T9531, Sigma-Aldrich™) disuelta en agua desionizada estéril a una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente se hicieron diluciones con agua desionizada. La determinación de las unidades de índice de refracción se realizó por HPLC (Sección 6.7.6).

Las concentraciones finales trehalosa y los valores de las unidades de índice de refracción (nRIU) fueron las siguientes:

Trehalosa (mg/mL)	nRIU
1	170,713
0.5	85,356
0.1	15,387
0.05	2,447

Se realizó el ajuste con la ecuación de la línea recta para obtener los parámetros correspondientes. La ecuación de la recta se describe a continuación.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Nano-unidades de Índice de Refracción (nRIU)

m = Pendiente de la Recta

x = Concentración de Trehalosa

b = Ordenada al Origen

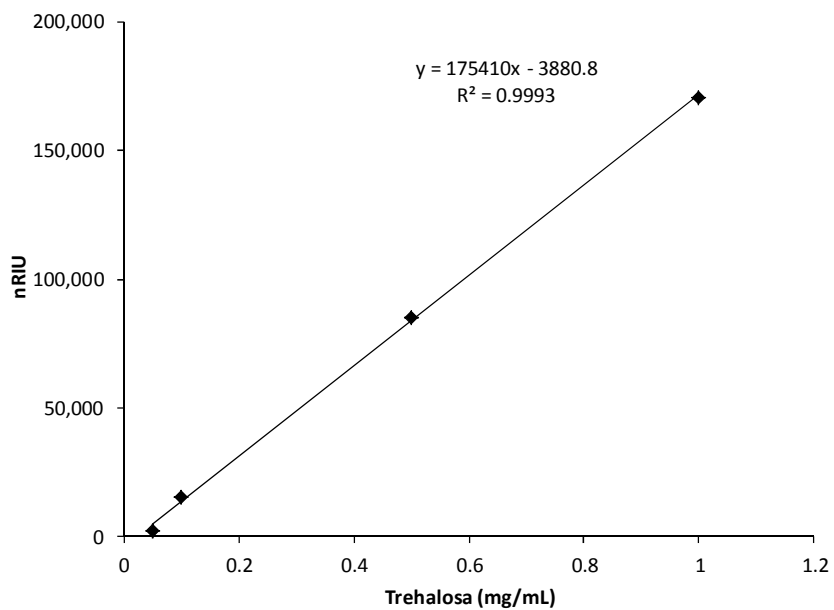


Figura A3. Curva estándar de trehalosa.

Anexo F. Curva Estándar para la determinación de concentración de Manitol

Se construyó una curva estándar con manitol grado HPLC (cat. # 63559, Sigma-Aldrich™) disuelta en agua desionizada estéril a una concentración de 1 mg/mL. Posteriormente se hicieron diluciones con agua desionizada. La determinación de las unidades de índice de refracción se realizó por HPLC (Sección 6.7.6).

Las concentraciones finales trehalosa y los valores de las unidades de índice de refracción (nRIU) fueron las siguientes:

Manitol (mg/mL)	nRIU
1	345729
0.5	211420
0.1	76891
0.05	37945

Se realizó el ajuste con la ecuación de la línea recta para obtener los parámetros correspondientes. La ecuación de la recta se describe a continuación.

$$y = mx + b$$

Donde:

y = Nano-unidades de Índice de Refracción (nRIU)

m = Pendiente de la Recta

x = Concentración de Manitol

b = Ordenada al Origen

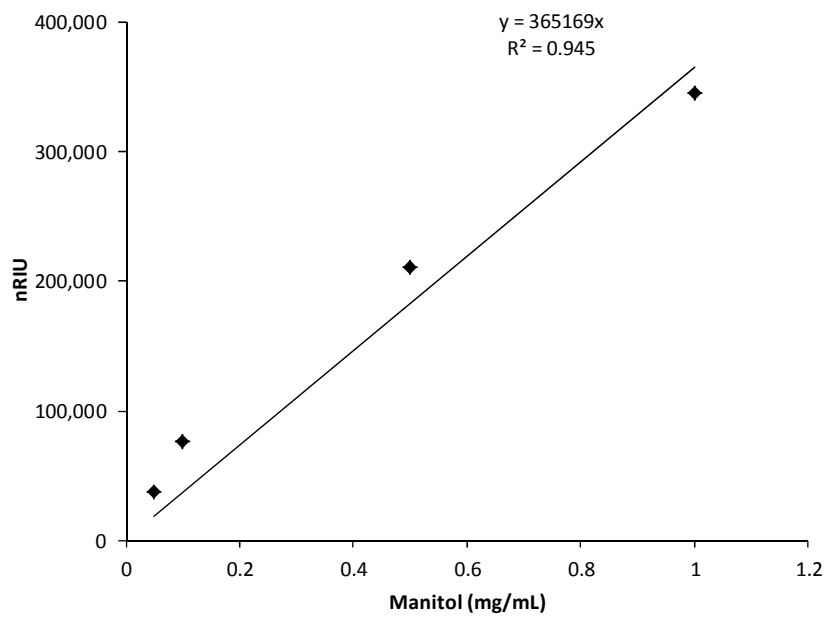


Figura A4. Curva estándar de manitol.

Anexo G. Primers y Sondas utilizadas para qPCR

Se diseñaron primers y sondas específicos para los genes *mpd*, *mtd* y *gpd* con las secuencias reportadas para *B. bassiana* en la base de datos GeneBank (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) mediante el programa OligoArchitect (Sigma-Aldrich™). Las secuencias se muestran a continuación:

Gen	Oligo	Secuencia
<i>mpd</i>	Primer F*	5'-GCTACGAGGTCGTATTTG-3'
	Primer R ⁺	5'-GGCAGTGCTAATCTCTTC-3'
	Sonda	5'-/FAM/CGACGCTCT/ZEN/GATAGGCTCCAT/IBFQ/-3'
<i>mtd</i>	Primer F*	5'-CGTCTTCAAGAAGCAAGG-3'
	Primer R ⁺	5'-GAGACCGGTGTTGATGTA-3'
	Sonda	5'/FAM/CTCGTCCTC/ZEN/ACAGCCTCCAT/IBFQ/-3'
<i>gpd</i>	Primer F*	5'-GAGGTCGTTTCCACTGAC-3'
	Primer R ⁺	5'-GCGACGTAGGAGATAAGG-3'
	Sonda	5'/FAM/ACGGCAACA/ZEN/CTAACTCCTCCAT/IBFQ/-3'

* Primer F: Forward

⁺ Primer R: Reverse

Las sondas utilizadas fueron del tipo TaqMan™ y contenían el fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína) en el extremo 5' que emite en verde, el extintor de fluorescencia o "quencher" IBFQ (Iowa Black™ FQ) en el extremo 3', además de un quencher interno ZEN™, el cual disminuye la fluorescencia de fondo, pegado al nucleótido 9. Todos los oligonucleótidos fueron manufacturados por la empresa IDT™.

Anexo H. Normalización de los Valores de C_T mediante el Método $2^{-\Delta\Delta C_T}$

Para el análisis de la expresión de los genes *mpd*, *mtd* y *gpd* se utilizaron los valores de ciclo umbral (C_T) obtenidos de las reacciones de qPCR, los cuales fueron normalizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001). La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-((C_{T,X}-C_{T,H})_{Atm}-(C_{T,X}-C_{T,H})_{AN})}$$

Donde:

$C_{T,X}$ = Ciclo Umbral del Gen *mpd* o *mtd*

$C_{T,H}$ = Ciclo Umbral del Gen *Housekeeping gpd*

Atm = Atmósfera 16% O₂ o 26 % O₂

AN = Atmósfera Normal

PUBLICACIONES Y TRABAJOS DERIVADOS DE ESTA INVESTIGACIÓN

Trabajos presentados en Congresos

Garza-López P M, Konigsberg M, Gómez-Quiroz L E, Loera O. 2011. La composición Atmosférica altera el Rendimiento y Calidad de Conidios de *Beauveria bassiana*. XVI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Juriquilla, Querétaro, México. Ponencia Oral.

Garza-López P M, Konigsberg M, Saucedo-Castañeda G, Loera O. 2009. Modificación de la Calidad de Conidios de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. en función de la Composición Atmosférica. XXXII Congreso Nacional de Control Biológico. Villahermosa, Tabasco, México. Ponencia Oral.

Artículos Publicados

Garza-López P M, Konigsberg M, Gómez-Quiroz L E, Loera O. 2012. Physiological and Antioxidant Response by *Beauveria bassiana* Bals (Vuill.) to different oxygen concentrations. World J Microbiol Biotechnol. 28: 353-359.

Garza-López P M, Konigsberg M, Saucedo-Castañeda G, Loera O. 2011. Perfiles Diferenciales de *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. en la Respuesta al CO₂: Producción de Conidios y Amilasas. Agrociencia. 45: 761-770.